**ESTUDOS ESPECTROSCÓPICOS E CROMATOGRÁFICOS DE
SUBSTÂNCIAS HÚMICAS DE SOLOS SOB DIFERENTES
SISTEMAS DE PREPARO**

Etelvino Henrique Novotny

Tese apresentada ao Instituto de
Química de São Carlos, da
Universidade de São Paulo para a
obtenção do título de Doutor em
Ciências - Físico Química

*Este exemplar foi revisado e
alterado em relação à versão
original, sob a exclusiva
responsabilidade do autor.*

São Carlos, 20/02/2004

Orientador: Dr. Ladislau Martin-Neto

**São Carlos
2002**

Novotny, Etelvino Henrique

Estudos espectroscópicos e cromatográficos de substâncias húmicas de solos sob diferentes sistemas de preparo. Novotny – São Carlos, IQSC, 2002.
215 p.

Tese (Doutorado) – Instituto de Química de São Carlos-
Universidade de São Paulo, 2002.

Orientador: Dr. Ladislau Martin-Neto

1. Substâncias Húmicas; 2. Espectroscopia; 3. Cromatografia; 4. Sistemas de Preparo do Solo.

I. Título

“Tenho tido, freqüentemente, motivos para sentir que minhas mãos são mais hábeis que minha mente. Esta é uma forma rude de caracterizar o dialeto da experimentação. Quando tudo corre bem, é como uma tranqüila conversa com a Natureza. Faz-se uma pergunta e obtém-se uma resposta; faz-se então a próxima pergunta e obtém-se a resposta seguinte. Uma experiência é um mecanismo para fazer que a Natureza fale compreensivelmente. Depois disto, pode-se somente ouvir.”

G. Wald - passagem tirada de Science, 162, 230 (1968).

Aos meus pais, a quem tudo devo e sou grato, pelo exemplo que me ofereceram e por terem me concedido o bem mais precioso que um ser humano pode ambicionar, a liberdade de desenvolver plenamente as possibilidades que nos são inerentes. À Larissa, pessoa amada, razão da minha felicidade e à minha irmã Carolina, ser frágil vítima da ganância atroz e bestial.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

- Ao Dr. Ladislau Martin-Neto, pela orientação, amizade e preocupação com meu bem estar durante meu período em São Carlos. Meus sinceros agradecimentos.
- À Fapesp pelo total apoio financeiro.
- À Embrapa pela acolhida e excelentes condições de trabalho.
- Ao Instituto de Química de São Carlos e seus Docentes.
- Ao IAC pela cessão da área experimental.
- Aos Doutores Isabella C. De Maria; Sidney R. Vieira e Sônia C.F. Dechen, pelo suporte no trabalho de campo e fornecimento de dados à respeito da área experimental.
- Aos professores Doutores: Tito J. Bonagamba; Antônio J. da Costa Filho; Cláudio J. Magon; Otaciro R. Nascimento; e Dr. Luiz A. Colnago, pela disponibilidade em esclarecer minhas infindáveis dúvidas.
- À Dra. Débora Millori pela auxílio nas medidas de fluorescência;
- À Ana Maria por sua competência e disposição em ajudar e resolver todos as questões burocráticas.
- Às bibliotecárias do IQSC, da Embrapa e especialmente do IFSC pela simpatia e pronto atendimento das minhas solicitações;
- Às secretárias Alessandra e Beth;
- À Dra. Heike Knicker pela excelente acolhida em Munique e precioso auxílio com a espectroscopia de RMN.
- Aos amigos Roberto Franco e Rodrigo Bagueira pelos auxílios e sugestões e a este último pelos divertidos momentos e amizade.
- Ao Renê, Ferrazini, Godoy, Jorge, Rubens, Moacyr “Formiga”, Valentim, Ednaldo, e Odemilson pela inestimável ajuda, muito além do profissional.
- Ao Prof. Dr. Osvaldo N. de Oliveira e aos colegas Antonio “Totó” Riul e Everaldo “Pacato” pelo suporte “lingüístico”. Agradeço também ao Totó e à Lucimara pela leitura crítica deste trabalho.
- Ao Prof. Dr. Mangrich, grande referencial da minha vida acadêmica, pela eterna disposição em Ensinar, e pelo valioso auxílio na redação da seção 2.2.
- Aos meus amigos e colegas de labuta: Denise, Juliana, Marcos, Rafael e Sérgio pela amizade e companheirismo.
- Agradecimento especial para Julieta e Marcelo pelo auxílio na impressão deste trabalho e pela amizade.
- Aos demais colegas de trabalho e a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.
- E principalmente à Larissa, companheira perfeita de todos os momentos, a quem devo o quinhão de felicidade que me faltava, pelo carinho, compreensão e amor.

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	xii
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xiv
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 O PLANTIO DIRETO.....	3
1.1.1 UM BREVE HISTÓRICO DO PLANTIO DIRETO.....	4
1.2 A MATÉRIA ORGÂNICA DO SOLO.....	5
1.3 CARACTERIZAÇÃO DOS ÁCIDOS HÚMICOS	6
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	8
2.1 AS SUBSTÂNCIAS HÚMICAS.....	8
2.1.1 INTRODUÇÃO	8
2.1.1.1 Interações com íons metálicos.....	10
2.1.1.2 Extração e fracionamento químico.....	12
2.1.1.3 Fracionamento cromatográfico.....	15
2.1.1.4 Estrutura molecular das substâncias húmicas.....	17
2.2 TÉCNICAS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA APLICADAS NO ESTUDO DA MATÉRIA ORGÂNICA DO SOLO	24
2.2.1 INTRODUÇÃO	24
2.2.2 CONCEITOS BÁSICOS.....	25
2.2.2.1 O momento magnético das partículas atômicas e o fenômeno de ressonância.....	25
2.2.2.2 Tempos de relaxação	28
2.2.2.3 Regras de seleção	29
2.2.2.4 O spin total resultante.....	30
2.2.2.5 Interações magnéticas.....	32
2.2.2.6 Área sob a linha de ressonância.....	38
2.2.3 A ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA....	39
2.2.3.1 Introdução.....	39
2.2.3.2 O fator-g.....	41
2.2.3.3 Anisotropia do fator-g e sistemas rígidos não orientados.....	44
2.2.3.4 A separação de campo zero (interação fina).....	46
2.2.3.5 Espectros de RPE de materiais magneticamente ordenados.....	48
2.2.3.6 Sondas de RPE freqüentemente detectadas em substâncias húmicas.....	49
2.2.3.7 Outras técnicas experimentais	61
2.2.4 A ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR	62
2.2.4.1 Introdução.....	62
2.2.4.2 Ângulo dos pulsos de rf e intervalos de relaxação	64
2.2.4.3 O deslocamento químico	65
2.2.4.4 Desacoplamento	67
2.2.4.5 Anisotropia do deslocamento químico	68
2.2.4.6 A transferência de polarização	70
2.2.4.7 Aplicação da RMN para a análise da matéria orgânica do solo	73
2.2.4.7.1 Interpretação dos espectros de ¹³ C-RMN das substâncias húmicas.....	76
2.2.4.7.2 A técnica de ¹³ C CP-MAS NMR com desacoplamento defasado	79

2.3	ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA DE ÁCIDOS HÚMICOS	80
2.3.1	CONCEITOS BÁSICOS.....	80
2.3.2	INTENSIDADE DA FLUORESCÊNCIA EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO.....	85
2.3.3	FLUORESCÊNCIA DE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS.....	86
2.3.3.1	Fluorescência e estrutura molecular	87
2.3.3.2	Efeito do meio na fluorescência	89
3	AMOSTRAS UTILIZADAS	92
3.1	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	92
3.2	AMOSTRAGEM DO SOLO.....	93
4	ANÁLISES FÍSICAS E QUÍMICAS DOS SOLOS	94
5	MÉTODO DE EXTRAÇÃO DOS ÁCIDOS HÚMICOS DO SOLO	97
5.1	MATERIAL E MÉTODOS.....	97
5.2	RESULTADOS E DISCUSSÃO	100
5.3	CONCLUSÕES	112
6	ESTUDO METODOLÓGICO DA CARACTERIZAÇÃO ESPECTROSCÓPICA DE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS	114
6.1	PROCEDIMENTOS PARA AQUISIÇÃO DE ESPECTROS DE ¹³C-RMN NO ESTADO SÓLIDO	114
6.1.1	TEMPO DE CONTATO	115
6.1.2	TEMPO DE ESPERA DA RECICLAGEM.....	116
6.1.3	EXPERIMENTOS COM DESACOPLAMENTO DEFASADO (DD)	117
6.1.4	AJUSTES DOS PARÂMETROS DE AQUISIÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ¹³ C VACP-MAS NMR.....	119
6.1.4.1	Introdução.....	119
6.1.4.2	Metodologia	119
6.1.4.3	Resultados e discussões.....	120
6.1.5	SUPRESSÃO DAS BANDAS LATERAIS (TOSS)	123
6.2	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ELÉTRONS DESEMPARELHADOS (SPINS).....	124
6.2.1	INTRODUÇÃO	124
6.2.2	FORMA DA LINHA DE RESSONÂNCIA	125
6.2.3	FATORES EXPERIMENTAIS.....	129
6.2.3.1	Potência das microondas	129
6.2.3.2	Amplitude de modulação.....	130
6.2.3.3	Correção da linha de base.....	131

7	FATORES QUE AFETAM A ANÁLISE QUANTITATIVA DE RADICAIS LIVRES ORGÂNICOS POR RPE.....	133
7.1	RESUMO	133
7.2	INTRODUÇÃO	134
7.3	MATERIAL E MÉTODOS.....	135
7.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	138
7.5	CONCLUSÕES	146
8	PROPRIEDADES DA RELAXAÇÃO MAGNÉTICA DOS RADICAIS LIVRES ORGÂNICOS DETECTADOS POR RPE EM SUBSTÂNCIAS HÚMICAS	147
8.1	INTRODUÇÃO	147
8.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	148
8.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	149
8.4	CONCLUSÕES	152
9	CARACTERIZAÇÃO POR ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA DE ÁCIDOS HÚMICOS EXTRAÍDOS DE SOLOS SUBMETIDOS A DIFERENTES SISTEMAS DE PREPARO	153
9.1	INTRODUÇÃO	153
9.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	154
9.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	155
9.4	CONCLUSÕES	162
10	EFEITO DO ÍON VANADILA (VO^{2+}) RESIDUAL NAS ANÁLISES ESPECTROSCÓPICAS DE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS	163
10.1	INTRODUÇÃO	163
10.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	164
10.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	167
10.4	CONCLUSÕES	176

11	CROMATOGRAFIA POR EXCLUSÃO DE TAMANHO EM VIDRO DE POROSIDADE CONTROLADA DE ÁCIDOS HÚMICOS E ANÁLISE POR ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA DAS FRAÇÕES CROMATOGRÁFICAS	177
11.1	INTRODUÇÃO	177
11.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	178
11.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	180
11.4	CONCLUSÕES	188
12	ANÁLISE MULTIVARIADA DOS DADOS ESPECTROSCÓPICOS .	189
12.1	INTRODUÇÃO	189
12.1.1	ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS.....	189
12.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	191
12.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	192
12.4	CONCLUSÕES	197
13	CONCLUSÕES GERAIS.....	198
14	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	201

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Exemplos de complexos organo-metálicos.	11
FIGURA 2 - Microfotografia de um grânulo de vidro de porosidade controlada usado como leito de colunas cromatográficas, o diâmetro médio dos poros mostrado é de 300 nm.	16
FIGURA 3 - Estrutura dos ácidos húmicos proposta por Fuchs (1931). Extraído de Orlov (1985).	18
FIGURA 4 - Modelo de substâncias húmicas e da associação substâncias húmicas-argila e substâncias húmicas-íons metálicos proposto por Kleinhempel (1970), extraído de Orlov (1985).	19
FIGURA 5 - Estrutura proposta para os ácidos fúlvicos (Schnitzer e Khan, 1978).	20
FIGURA 6 - Modelo dos ácidos húmicos (Schulten e Schnitzer, 1993).	20
FIGURA 7 - Modelo tridimensional dos ácidos húmicos (Schulten e Schnitzer, 1997). C - azul; O - vermelho; N - azul escuro e H - branco. As letras A, B e C indicam os espaços vazios provavelmente presentes na estrutura das substâncias húmicas.	21
FIGURA 8 - Modelo tridimensional de uma partícula de solo otimizado geometricamente por Schulten e Schnitzer (1997). C - azul; O - vermelho; N - azul escuro; H - branco; Si - lilás; Al - amarelo; Fe^{3+} - verde.	21
FIGURA 9 - Simulação por computador da sorção de atrazina no complexo muscovita-ácidos húmicos modelo (oxidação de carboidrato e lignina). Akim (1998).	22
FIGURA 10 - Remoção da degenerescência dos estados de spins por um campo magnético (efeito Zeeman). Os índices “e” e “n” referem-se ao elétron e aos núcleons, respectivamente.	27
FIGURA 11 - Orientação quantizada do spin; α e β são os estados de spin $+1/2$ e $-1/2$ respectivamente, o eixo z tem como unidade $\hbar$. (a) $S = 1/2$ e (b) $S = 1$. Os sub índices “e” e “n” referem-se ao elétron e aos núcleons, respectivamente.	32
FIGURA 12 - Construção geométrica para um vetor $P_1 - P_2$ ilustrando as quantidades de interesse para a interação dipolar. O vetor $P_1 - P_2$ de comprimento r faz um ângulo de θ com a direção do campo magnético. P_1 e P_2 são as partículas e μ_p seus momentos magnéticos. B_{local} é a componente z do campo magnético gerado pela partícula P_2 à distância r	35
FIGURA 13 - Níveis de energia e o respectivo espectro de RPE para um sistema com $S = 1/2$ e $I = 1/2$ (linhas cheias) e $S = 1/2$ e $I = 0$ (linhas pontilhadas). As setas denominadas k , l e m representam as transições permitidas.	37
FIGURA 14 - “Pentágono mágico” utilizado para a obtenção do coeficiente de mistura (número nas setas) dos pares de orbitais d.	43
FIGURA 15 - Espectros de RPE de amostras não orientadas (pó ou solução congelada); absorção (superior) e primeira derivada (inferior) sendo: (a) sistema isotrópico; (b) com simetria axial e (c) com simetria rômica.	45
FIGURA 16 - Diagramas de energia e respectivos espectros de RPE para sistemas $S = 5/2$. (a) Em simetria cúbica $D = 0$; (b) em simetria menor que a cúbica com $D \ll h \nu$ e (c) com $D \gg h \nu$ e $E/D = 1/3$, p. ex.: Fe^{3+} em sítio rômico. D é a separação de campo zero, os números sob as linhas de ressonância em (b) são as suas intensidades relativas. Cada par de níveis energéticos formado por $\pm m_s$ é chamado de dubleto de Kramer (spin efetivo de $1/2$) sendo indicados em (c) por K_1 , K_2 e K_3	47
FIGURA 17 - Variações dos parâmetros espectroscópicos $g_{\parallel}$ (a) e $A_{\parallel}$ (b) em função do número de átomos de nitrogênio coordenados ao íon Cu^{2+} no plano equatorial. Dados obtidos da literatura referentes a complexos com substâncias húmicas e compostos modelo: Boyd et al. (1983); Senesi et al. (1985); Senesi (1990).	57

FIGURA 18 - Deflexão do vetor magnetização líquida (M) por um pulso de rf (B_1) no sistema girante de coordenadas	65
FIGURA 19 - (a) Cinética da polarização cruzada. (b) Dados experimentais de uma amostra de ácidos húmicos. Alquila corresponde à região espectral de 0 - 45 ppm e carboxila de 158 - 186 ppm.	71
FIGURA 20 - Esquema comparativo do B_1 para a sequência de polarização cruzada (a) e da polarização cruzada com amplitude variável (b)	72
FIGURA 21 - Espectros de ^{13}C -RMN no estado sólido adquiridos com as sequências de pulsos ^{13}C CP-MAS NMR e ^{13}C VACP-MAS NMR a diferentes taxas de rotação (MAS). Amostra de ácidos húmicos extraídos de solo.	73
FIGURA 22 - Diagrama energético do fenômeno de fluorescência.	82
FIGURA 23 - Diagrama energético do fenômeno de fosforescência.	83
FIGURA 24 - Intensidade de fluorescência em função da concentração de ácidos húmicos. Emissão a 500 nm com excitação em 240 nm	86
FIGURA 25 - Carbono orgânico total em função da profundidade para os três sistemas de preparo do solo e conteúdo total de carbono em 1 ha na camada de 0-30 cm de profundidade (gráfico pequeno à direita).	95
FIGURA 26 - Concentração de P extraído dos solos submetidos a diferentes tratamentos de preparo do solo.	96
FIGURA 27 - Espectro de FTIR do resíduo de centrifugação dos ácidos húmicos após tratamento com K^+	101
FIGURA 28 - Espectro de FTIR de ácidos húmicos extraídos da amostra plantio convencional (5-10 cm).	103
FIGURA 29 - Espectro de FTIR em segunda derivada dos ácidos húmicos extraídos da amostra plantio direto (5-10 cm).	104
FIGURA 30 - Espectro de RPE dos ácidos húmicos extraídos da amostra plantio direto (5-10 cm).	106
FIGURA 31 - Espectro de RPE dos ácidos húmicos extraídos da amostra cultivo mínimo (0-5 cm). Detalhe na região de $g = 2$ mostrando o sinal atribuído aos radicais livres orgânicos e os espectros simulados de Cu^{2+} e VO^{2+}	107
FIGURA 32 - Espectro de RPE dos ácidos húmicos extraídos da amostra cultivo mínimo (5-10 cm). Detalhe na região de $g = 2$ mostrando o sinal atribuído ao radical livre orgânico e as simulações utilizadas no cálculo da concentração de spins.	109
FIGURA 33 - Concentração de radicais livres orgânicos nas amostras de ácidos húmicos extraídos pelos métodos <i>I</i> e <i>II</i>	109
FIGURA 34 - Espectro de ^{13}C CP-MAS NMR dos ácidos húmicos extraídos da amostra cultivo mínimo (0-5 cm).	110
FIGURA 35 - Variação do tempo de contato para a amostra de ácidos húmicos extraídos do tratamento plantio direto na profundidade de 0-5 cm.	115
FIGURA 36 - Medida de $T_1\rho$ pelo ^{13}C para a amostra de ácidos húmicos extraídos do tratamento cultivo mínimo na profundidade de 5-10 cm.	116
FIGURA 37 - Ajuste de $T_1\rho$ pelo ^{13}C para a amostra de ácidos húmicos extraídos do tratamento plantio direto na profundidade de 0-5 cm.	117
FIGURA 38 - Intensidade dos sinais de ^{13}C VACP-MAS NMR em função do tempo de defasagem. Amostra de ácidos húmicos extraídos do tratamento plantio direto na profundidade de 0-5 cm.	118
FIGURA 39 - Espectros de ^{13}C VACP-MAS NMR com rampas nos canais do (^1H) e do (^{13}C). Amostra de ácidos húmicos extraídos do tratamento plantio direto na profundidade de 0-5 cm.	120
FIGURA 40 - Espectros de ^{13}C CP-MAS NMR e ^{13}C VACP-MAS NMR com variação da inclinação da rampa. Amostra de ácidos húmicos extraídos do tratamento plantio direto na profundidade de 0-5 cm.	121
FIGURA 41 - Comparação entre o espectro adquirido com desacoplamento defasado (DD) e a subtração espectral entre aqueles adquiridos com a sequência ^{13}C VACP-MAS NMR e ^{13}C CP-MAS NMR (VACP-CP). Amostra de ácidos húmicos extraídos do tratamento plantio direto na profundidade de 0-5 cm.	122
FIGURA 42 - Variação do tempo de contato para a amostra de ácidos húmicos extraídos do tratamento cultivo mínimo na profundidade de 0-5 cm.	122
FIGURA 43 - Comparação entre os espectros de ^{13}C VACP-MAS NMR adquiridos com e sem a sequência TOSS. Amostra de ácidos húmicos extraídos do tratamento plantio direto na profundidade de 0-5 cm.	123

FIGURA 44 - Linhas lorentziana e gaussiana simuladas com mesma largura a meia altura (ΔB).....	126
FIGURA 45 - Linha gaussiana simulada em absorção, 1ª e 2ª derivadas.	126
FIGURA 46 - Relação entre as amplitudes da linha em 2ª derivada e a forma da linha simulada.	128
FIGURA 47 - Emprego da relação dada na Figura 46 para estimativa da forma da linha do espectro do rubi sintético.	129
FIGURA 48 - Potência de saturação do “strong pitch”, (a) Y' versus $P^{1/2}$; (b) $Y' P^{1/2}$ versus $P^{1/2}$...	130
FIGURA 49 - Correção da linha de base utilizando a saturação do sinal do radical livre orgânico. Amostra de ácidos húmicos extraídos pelo <i>MI</i> (capítulo 5) do tratamento plantio direto na profundidade de 0-5 cm.	131
FIGURA 50 - Correção da linha de base utilizando simulações. Amostra de ácidos húmicos extraídos pelo <i>MI</i> (capítulo 5) do tratamento cultivo mínimo na profundidade de 5-10 cm.	132
FIGURA 51 - Espectro de RPE da amostra de húmus não tratado mostrando em detalhe o sinal dos radicais livres orgânicos.	138
FIGURA 52 - (a) Largura da linha ($\Delta B'$) em função da umidade e (b) concentração de radicais livres orgânicos.	139
FIGURA 53 - Largura da linha ($\Delta B'$) do sinal dos radicais livres orgânicos de amostras de húmus a diferentes umidades em função da potência das microondas a meia saturação ($P_{1/2}$) com a extensão de saturação igual a 2.	140
FIGURA 54 - Concentração de radicais livres orgânicos em função da adição de íons.	141
FIGURA 55 - Concentração de radicais livres orgânicos em função da amplitude do sinal de Mn^{2+} octaédrico em esfera externa medida no espectro em segunda derivada (ressonância em campo mais alto - $M_I = -5/2$).	142
FIGURA 56 - Parâmetros de saturação ajustados com a extensão de saturação igual a 2 em função da adição de íons paramagnéticos.	143
FIGURA 57 - Concentração de radicais livres orgânicos em função do parâmetro de não homogeneidade (b) com a extensão de saturação igual a 2.	144
FIGURA 58 - Largura da linha ($\Delta B'$) do sinal dos radicais livres orgânicos de amostras de húmus tratadas com íons paramagnéticos em função da potência das microondas a meia saturação ($P_{1/2}$) com a extensão de saturação igual a 2.	144
FIGURA 59 - Dependência com a temperatura do parâmetro ajustado $P_{1/2}$ (a) e $\Delta B'$ (b) em amostras com diferentes conteúdos de Fe^{3+}	149
FIGURA 60 - Dependência com a temperatura do produto $P_{1/2}$ pelo inverso de $\Delta B'$, que é proporcional a k_I , em amostras com diferentes conteúdos de Fe^{3+}	151
FIGURA 61 - Mapa de contorno dos espectros de fluorescência no modo tridimensional de emissão-excitação (a) e de excitação síncrona (b) de ácidos húmicos extraídos da amostra cultivo mínimo 0-5 cm.	156
FIGURA 62 - Espectros de fluorescência no modo de excitação com emissão em 500 nm.	157
FIGURA 63 - Razão entre as áreas sob diferentes regiões dos espectros de fluorescência no modo de excitação com emissão em 500 nm.	158
FIGURA 64 - Espectros de fluorescência bidimensionais comparativos entre os modos de excitação com emissão em 500 nm e varreduras síncronas com $\Delta\lambda$ de 20 e 80 nm (a) e síncrona com $\Delta\lambda$ de 20 nm (b).	159
FIGURA 65 - Espectros de fluorescência bidimensionais no modo de emissão com excitação em 455 nm.	160
FIGURA 66 - Espectros de fluorescência bidimensionais no modo de emissão com excitação em 243 nm.	160
FIGURA 67 - Espectro de RPE da amostra de ácidos húmicos extraídos do tratamento cultivo mínimo na profundidade de 0-5 cm mostrando a linha de ressonância correspondente a $M_I = -3/2$ utilizada no cálculo da área do sinal do íon VO^{2+}	165
FIGURA 68 - Espectro de ^{13}C VACP-MAS NMR da amostra de ácidos húmicos extraídos do solo sob plantio convencional (20-30 cm) mostrando o espectro experimental, o resultado da deconvolução e os sinais deconvoluídos, assim como as bandas laterais.	166
FIGURA 69 - Hidrofilicidade determinada por ^{13}C VACP-MAS NMR em função do conteúdo de VO^{2+} determinado por RPE.	170
FIGURA 70 - Espectros de ^{13}C VACP-MAS NMR e ^{13}C VACP-MAS NMR com desacoplamento defasado (DD) de 70 μs da amostra de ácidos húmicos extraídos do solo sob plantio convencional (0-5 cm).	171
FIGURA 71 - Área absoluta sob os espectros de emissão fluorescente (emissão com excitação em 243 nm) em função do conteúdo de VO^{2+} determinado por RPE.	173

FIGURA 72 - Radicais livres orgânicos em função do conteúdo de VO^{2+} , ambos determinados por RPE.....	175
FIGURA 73 - Cromatogramas de amostras de ácidos húmicos extraídos do solo sob plantio direto.	181
FIGURA 74 - Cromatogramas de amostras de ácidos húmicos extraídos das camadas de 0-5 e 20-30 cm e resultado da subtração destes dois cromatogramas e seus picos deconvoluídos.	181
FIGURA 75 - Cromatogramas de amostras de ácidos húmicos extraídos do solo sob plantio direto (0-5 cm), mostrando os picos deconvoluídos e frações coletadas.	182
FIGURA 76 - Área dos picos deconvoluídos dos cromatogramas das amostras de ácidos húmicos.	183
FIGURA 77 - Contribuição relativa (em %) da área do terceiro pico deconvoluído ($K_d = 0,57$) dos cromatogramas de ácidos húmicos em função do conteúdo de VO^{2+} determinado por RPE.	184
FIGURA 78 - Mapa de contorno dos espectros de fluorescência no modo tridimensional de emissão-excitação (a) e de excitação síncrona (b) da fração B2 de ácidos húmicos extraídos da amostra plantio direto 0-5 cm.	184
FIGURA 79 - Mapa de contorno dos espectros de fluorescência no modo tridimensional de emissão-excitação (a) e de excitação síncrona (b) da fração A de ácidos húmicos extraídos da amostra plantio direto 0-5 cm.	185
FIGURA 80 - Espectros de fluorescência das diferentes frações cromatográficas dos ácidos húmicos extraídos da área sob plantio direto (10-20 cm). Modos de: (a) emissão com excitação em 240 nm; (b) excitação com emissão em 500 nm; (c) síncronas com $\Delta\lambda$ de 20 nm e (d) 80 nm.	186
FIGURA 81 - Razão entre as áreas sob diferentes regiões dos espectros de fluorescência (excitação com emissão em 500 nm). MC: 220 - 300 nm e L: 410 - 480 nm.	187
FIGURA 82 - Espectros de fluorescência, modo de emissão com excitação em 450 nm, das diferentes frações cromatográficas dos ácidos húmicos extraídos da área sob plantio direto (10-20 cm). $IF_{\text{máx}}$ é a intensidade de fluorescência no máximo.	188
FIGURA 83 - Carregamentos das segundas componentes principais dos dados de fluorescência: Emissão com excitação em 240 nm (0,16 % da variância); Emissão com excitação em 450 nm (0,02 % da variância); Excitação com emissão em 500 nm (2,57 % da variância).	193
FIGURA 84 - Escores fatoriais da segunda componente principal (2,6% da variância total) extraída dos espectros de fluorescência, modo de excitação com emissão em 500 nm.	193
FIGURA 85 - Carregamentos das componentes principais extraídas dos espectros de ^{13}C VACP-MAS NMR. (a) primeira CP e (b) segunda.	194
FIGURA 86 - Escores fatoriais da primeira componente principal (66,8% da variância total) extraída dos espectros de ^{13}C VACP-MAS NMR.	195
FIGURA 87 - Carregamentos das duas primeiras componentes principais dos dados de RPE.	196
FIGURA 88 - Escores fatoriais da segunda componente principal (25,3% da variância total). Dados dos espectros de RPE.	196

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Propriedades de alguns núclídeos utilizados como sondas na análise da matéria orgânica do solo por RMN	64
TABELA 2 - Resultados da análise química das amostras de solo.	94
TABELA 3 - Atribuição das bandas de absorção no infravermelho do resíduo de centrifugação dos ácidos húmicos após tratamento com K^+	101
TABELA 4 - Atribuição das bandas de absorção no infravermelho do espectro de FTIR em segunda derivada de ácidos húmicos.	104
TABELA 5 - Contribuição relativa (% da área total) das regiões de deslocamento químico (ppm)..	111
TABELA 6 - Perda da intensidade (área) do sinal de ressonância quando o tempo de contato ideal e de 1 ms eram utilizados na aquisição dos espectros de ^{13}C CP-MAS NMR, amostra de ácidos húmicos extraídos do tratamento cultivo mínimo na profundidade de 0-5 cm.	116
TABELA 7 - Equações analíticas e algumas relações importantes das linhas lorentzianas e gaussianas.	127
TABELA 8 - Resultados das análises elementar e de ^{13}C CP-MAS NMR.	135
TABELA 9 - Parâmetros utilizados na aquisição dos espectros de fluorescência	155
TABELA 10 - Coeficientes de correlação entre os íons metálicos paramagnéticos e os dados obtidos pelas diferentes técnicas espectroscópicas.....	168
TABELA 11 - Parâmetros utilizados na aquisição dos espectros de fluorescência	180
TABELA 12 - Variância capturada e correlação com o conteúdo de VO^{2+} das componentes principais atribuídas ao efeito deste íon	192

RESUMO

Neste trabalho efetuou-se um detalhado estudo metodológico das técnicas empregadas para a caracterização espectroscópica e cromatográfica dos ácidos húmicos. Neste estudo demonstrou-se que outros fatores, além de características intrínsecas dos ácidos húmicos, podem afetar os resultados obtidos pelas diferentes técnicas espectroscópicas utilizadas. Dentre estes fatores o mais importante foi o íon vanadila (VO^{2+}) residual que afetou drasticamente os resultados das análises espectroscópicas levando à supressão: dos sinais de RMN de ^{13}C de grupos hidrofílicos; dos sinais de RPE dos radicais livres orgânicos; e da intensidade de fluorescência. Pela supressão seletiva dos sinais de RMN de ^{13}C dos grupos carboxilas e daqueles associados a carboidratos foi possível inferir que estas estruturas possivelmente estejam diretamente envolvidas na complexação do VO^{2+} , assim como a supressão dos sinais de fluorescência e de RPE dos radicais livres orgânicos indicaram que estes radicais e estruturas fluorescentes também podem estar envolvidas na complexação deste íon ou então o efeito do íon paramagnético pode difundir-se facilmente pela estrutura dos ácidos húmicos. Adicionalmente, os ácidos húmicos com maior conteúdo de VO^{2+} apresentaram um maior tamanho molecular aparente, indicando um possível efeito agregante deste íon. A análise multivariada dos dados obtidos possibilitou o isolamento destes efeitos do VO^{2+} e as novas variáveis obtidas pela técnica dos componentes principais, independentes do conteúdo deste íon, indicaram que o cultivo mais intenso do solo levou ao acúmulo relativo de estruturas mais recalcitrantes e com maiores conteúdos de estruturas associadas à lignina e C-Alquila de cadeia longa. Além disto, observou-se que o sinal dos radicais livres orgânicos dos ácidos húmicos era devido à pelo menos dois centros paramagnéticos distintos sendo que o VO^{2+} suprimiu preferencialmente o sinal com maior valor-g, atribuído a radicais livres orgânicos onde o elétron desemparelhado estaria delocalizado sobre átomos de oxigênio.

ABSTRACT

In this work it was realized a detailed methodological studies of spectroscopic and chromatographic techniques that were applied in the humic substances characterization. In these studies it was demonstrated that, besides the intrinsic characteristics of humic substances, there are other factors which can affect the results obtained with the different spectroscopic techniques utilized. Among these factors, the residual vanadyl ion (VO^{2+}) affected drastically the spectroscopic results causing the suppression of: ^{13}C NMR signals of hydrophilic groups; EPR signals from organic free radicals; and the fluorescence intensity. By the selective suppression of ^{13}C NMR signals from carbohydrates and carboxyl groups it was proposed that these structures could possibly be directly involved in the VO^{2+} complexation. The suppression of fluorescence signals and EPR ones from organic free radicals indicated that or these radicals and the fluorescent structures can also be involved in the VO^{2+} complexation, either the paramagnetic ion effect can diffuse through the humic substances structures. In addition, the increase of VO^{2+} contents resulted in a higher apparent molecular size indicating a possibly aggregating effect of this ion. The multivariate analysis from the obtained data allowed the isolation of these effects from VO^{2+} . The new variables obtained by the principal components technique, independent from that ion content, indicated that the most intense cultivation of the soil lead to the relative accumulation of more recalcitrant structures associated to lignin and long chain C-alkyl. Besides this, we observed that the organic free radicals signal from humic acids was due to at least two paramagnetic centers. The residual VO^{2+} suppressed preferentially the signal with the highest g-value. This signal was assignment to organic free radicals where the unpaired electron could be delocalized on oxygen atoms.

1 INTRODUÇÃO

O Brasil perde cerca de um bilhão de toneladas de solo por ano, o que corresponde à perda da camada superficial (0-50 cm) de uma área equivalente ao estado de Alagoas a cada quinze anos. A principal causa desse fenômeno é a erosão hídrica, que ocorre pelo desgaste natural do meio ambiente, mas que é intensificada drasticamente pela ação do homem. A consequência é um processo de degradação, cujo estágio final é o deserto. Queimadas, desmatamentos, manejos inadequados do solo e recursos naturais vêm sendo responsáveis pelo desencadeamento do processo em vários países do mundo. No Brasil, além da sua ocorrência natural em uma vasta área entre as regiões Nordeste e Centro-Oeste, a desertificação se expande no Sul e Sudeste. Em São Paulo, segundo cálculos da Secretaria da Agricultura, são perdidos cento e noventa e quatro milhões de toneladas de solos todos os anos, com prejuízos anuais de duzentos e doze milhões de dólares, considerando a perda de fertilizantes aplicados no solo e da própria área fértil, isto sem se considerar a contaminação dos mananciais hídricos.

Uma alternativa de manejo de solos que está se expandindo consideravelmente no Brasil, e que pode minimizar estes problemas, é o plantio direto. Implantado inicialmente na região Sul do país, esse sistema de cultivo atingiu 6 milhões de hectares na safra 96/97, incorporando, também, área significativa na

região dos Cerrados. Para 2001/2002, estima-se que mais de 14 milhões de hectares estarão sendo cultivados sob plantio direto no Brasil, algo em torno de 30% da área total cultivada com culturas anuais. Em São Paulo, segundo a Secretaria de Agricultura, no ano agrícola de 2000/2001 cerca de 800.000 ha foram cultivados com plantio direto, o que corresponde a 13% da área total cultivada.

Dentre os efeitos decorrentes da degradação do solo são de particular importância e complexidade aqueles associados à matéria orgânica, visto que alterações na quantidade e qualidade desta podem ocorrer em função das práticas de manejo do solo. A matéria orgânica, embora um componente em menor quantidade na vasta maioria dos solos, é a principal responsável pela estrutura, bom funcionamento e sustentabilidade do ecossistema. Apesar disto, após mais de dois séculos de estudos, a dinâmica, reações e características da matéria orgânica permanecem sem um entendimento completo.

Os objetivos do presente trabalho foram: aprimorar a metodologia existente para a caracterização dos ácidos húmicos; avaliar possíveis interferentes, tais como umidade das amostras e presença de íons metálicos, nos resultados obtidos; e, utilizando-se desta metodologia, caracterizar, comparativamente, os ácidos húmicos extraídos de solos submetidos a diferentes sistemas de preparo.

O presente trabalho pôde ser convenientemente dividido em capítulos. Neste primeiro faz-se uma breve introdução aos principais temas abordados, no segundo capítulo apresenta-se uma revisão bibliográfica a respeito das substâncias húmicas e a fundamentação teórica das principais técnicas espectroscópicas utilizadas. Nos capítulos três, quatro e cinco descreve-se: o solo; os tratamentos testados; o delineamento experimental; a técnica de amostragem do solo; e o método de extração dos ácidos húmicos empregado. Do capítulo seis ao dez aborda-se aspectos

metodológicos das técnicas espectroscópicas utilizadas assim como limitações destas técnicas e fatores que as afetam. Já no capítulo onze relatam-se os resultados do fracionamento cromatográfico dos ácidos húmicos e da análise por espectroscopia de fluorescência das frações obtidas. E, finalmente, no capítulo doze apresentam-se os resultados da análise multivariada dos dados espectroscópicos e cromatográficos.

1.1 O PLANTIO DIRETO

O plantio direto é uma técnica de cultivo conservacionista na qual se procura manter o solo sempre coberto por resíduos vegetais, cobertura esta que tem por finalidade protegê-lo do impacto das gotas da chuva, do escoamento superficial e das erosões hídrica e eólica. Existem diversos sinônimos ou termos equivalentes para plantio direto: plantio direto na palha, cultivo zero, sem preparo (“no-tillage”), cultivo reduzido entre outros. Efetivamente poderia-se considerar o plantio direto como um cultivo mínimo, visto que o preparo do solo limita-se a uma pequena área, procedendo-se o preparo do solo, semeadura, adubação e, eventualmente, a aplicação de herbicidas em uma única operação. No plantio direto o distúrbio total do solo limita-se ao requerido para adequada colocação da semente (Jones et al., 1968) e do fertilizante.

Os efeitos deste sistema de cultivo nas propriedades físicas, químicas e biológicas do solo já foram descritos nos primeiros trabalhos científicos com esta técnica. A efetividade do plantio direto em evitar o selamento superficial, decorrente do impacto das gotas de chuva, reduzir o escoamento superficial de água e perdas desta por evaporação, além de preservar a estrutura do solo, já foi descrito por Moody et al. (1961). A redução do escoamento superficial da água e da ausência de

erosão hídrica em áreas com 21% de declividade sob plantio direto foi descrita por Harrold e Edwards (1972). O efeito de estratificação de nutrientes e matéria orgânica do solo em áreas sob plantio direto por sua vez já foi descrito por Shear e Moschler (1969) e o acúmulo de raízes e biomassa nas camadas superficiais do perfil do solo sob plantio direto foi descrito por Lynch (1984).

1.1.1 UM BREVE HISTÓRICO DO PLANTIO DIRETO

Antes do advento dos herbicidas seria inviável se pensar em plantio direto. Assim, os primeiros relatos de plantio direto foram concomitantes com o desenvolvimento destes produtos. Em 1951 pesquisadores da DOW CHEMICAL COMPANY reportaram o sucesso do uso de herbicidas no preparo do leito de semeadura. Suas pesquisas também indicavam os efeitos positivos desta nova técnica de cultivo na conservação do solo e da umidade deste. Em Nova Jersey (EUA) no início dos anos 50 foram utilizados herbicidas como substituto para o cultivo em trabalhos de renovação de pastagens. Na metade dos anos 50 relatou-se, na Nova Zelândia, a produção de morangos utilizando técnicas de plantio direto (Phillips e Young, 1973). Em 1952 foi reportado o sucesso do cultivo de milho, soja e linho sobre resteva de trevo ladino tratado com 2,4 - D (derivados do ácido 2,4-diclorofenoxiacético) e outros experimentos com DALAPON (ácido 2,2-dicloropropiônico) (Jones et al., 1968). A primeira produção bem sucedida de milho sob plantio direto foi obtida nos primeiros anos da década de 50 (Dick et al., 1991). Em 1960 Moody et al. (1961) instalaram um experimento com plantio direto de milho na Virgínia (EUA).

As primeiras citações brasileiras sobre a necessidade de uma agricultura baseada em sistemas conservacionistas, no caso o cultivo mínimo, datam de 1961. Em 1969 instalou-se, em Não-Me-Toque - RS, o primeiro experimento com plantio direto no Brasil, semeando-se sorgo sobre resteva de inverno. Entretanto, devido à destruição da máquina empregada para o plantio em um incêndio não se deu continuidade ao trabalho (Borges, 1993). Os primeiros experimentos com plantio direto em trigo foram realizados em 1971 e 1972 pela Missão Agrícola Alemã em Londrina - PR. Após esta bem sucedida experiência iniciavam-se, ainda em 1971, experimentos com plantio direto de soja em Ponta Grossa - PR e a partir de 1973 também com trigo (Derpsch, 1984), no estado de São Paulo os primeiros experimentos com plantio direto foram instalados em 1973 em Campinas e Pindorama. O primeiro agricultor brasileiro a iniciar o plantio direto a campo provavelmente tenha sido Herbert Bartz em Rolândia - PR no ano de 1972 (Borges, 1993). Atualmente esta técnica de cultivo está em franca expansão, principalmente em áreas sob cerrado.

1.2 A MATÉRIA ORGÂNICA DO SOLO

A matéria orgânica ambiental é o elo entre a biosfera, geosfera, hidrosfera e atmosfera sendo portanto fundamental para a sustentabilidade do ecossistema. Dentre os diversos componentes do solo a matéria orgânica desempenha papel primordial na qualidade deste. Isso ocorre devido à influência que a quantidade e qualidade da matéria orgânica exerce sobre as propriedades físicas, químicas e biológicas dos solos. Dentre essas propriedades destacam-se efeitos na melhoria e estabilidade de agregados, diminuição da plasticidade, aumento da capacidade de retenção de água,

aumento da capacidade de troca de cátions (CTC) e participação essencial na respiração microbiana de determinadas espécies (Schnitzer e Khan, 1978; Preston, 1996; Lovley et al., 1996). Adicionalmente a matéria orgânica é, geralmente, o principal sítio de sorção para agrotóxicos e metais pesados no solo (Wang et al., 1990; Martin-Neto et al., 1994a; Senesi et al., 1996a). Estima-se ainda que o manejo inadequado dos solos e o desmatamento são responsáveis por aproximadamente 30% do gás carbônico (CO₂) produzido na Terra com todas as consequências para o chamado efeito estufa e mudanças globais do clima (Borin et al., 1997).

1.3 CARACTERIZAÇÃO DOS ÁCIDOS HÚMICOS

Diversos métodos químicos e físicos têm sido intensamente empregados na caracterização dos ácidos húmicos, dentre estes se destacam os métodos cromatográficos, tais como a cromatografia de exclusão por tamanho molecular, e os espectroscópicos tais como as espectroscopias de: ressonância magnética nuclear (RMN); ressonância paramagnética eletrônica (RPE); e fluorescência.

O tamanho molecular dos ácidos húmicos afeta significativamente diversas das suas propriedades e o conhecimento da distribuição do tamanho molecular dos ácidos húmicos é essencial para a compreensão do seu papel em importantes processos de pedogênese e absorção de íons pelas plantas. Além disto, o fracionamento dos ácidos húmicos em classes de diferentes tamanhos moleculares pode ser mais adequado do que o fracionamento químico baseado em características de solubilidade, pois se obtêm frações relativamente homogêneas em relação a essa importante característica físico-química dos ácidos húmicos (Kuiters e Mulder, 1993;

Machado e Gerzabek, 1993; Mohamad et al., 1993; Fontecha e Swaisgood, 1995; Novotny e Martin-Neto, 1999; Piccolo, 2001).

Certamente a RMN é uma das principais técnicas empregadas na avaliação das alterações estruturais ocorridas nos ácidos húmicos decorrentes dos diferentes manejos do solo. Exemplos destas alterações detectáveis por RMN são: mudanças na contribuição relativa de grupos funcionais lábeis e recalcitrantes; identificação de compostos como ligninas, taninos, carboidratos, aminoácidos, biopolímeros alifáticos entre outros (Newman et al., 1980; Wilson, 1987; Preston, 1996; Schmidt et al., 1997; Hu et al., 2000).

A técnica de RPE é uma das poucas, entre os métodos de laboratório, que pode fornecer informações estruturais sem artefatos ou condições experimentais restritivas sobre os complexos dos íons metálicos paramagnéticos com os ácidos húmicos (Lakatos et al., 1977; Boyd et al., 1983; Mangrich e Vugman, 1988; Senesi, 1990a; Martin-Neto et al., 1991; Jezierski et al., 2000a,b). Além disto, uma das importantes características dos ácidos húmicos é a presença de radicais livres orgânicos estáveis em sua estrutura e a técnica utilizada para detectar e quantificar estes radicais livres é a RPE (Riffaldi e Schnitzer, 1972; Martin-Neto et al., 1991; Olk et al., 1999).

Embora estruturas fluorescentes pareçam constituir a menor parte dos constituintes dos ácidos húmicos, a fluorescência intrínseca destes compostos pode fornecer informações a respeito da sua estrutura, conformação e heterogeneidade assim como da sua interação com íons metálicos (Senesi, 1990b; Spark e Swift, 1994; Zsolnay et al., 1998; Kalbitz et al., 1999; Piana e Zahir, 2000).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 AS SUBSTÂNCIAS HÚMICAS

2.1.1 INTRODUÇÃO

Desde a Antiguidade o homem reconhecia a importância da matéria orgânica do solo e, curiosamente, o próprio termo química pode ter surgido relacionado à matéria orgânica do solo. Nas margens do rio Nilo, depois das enchentes, as terras ribeirinhas ficavam cobertas por uma camada de material orgânico escuro trazido das florestas da África por onde o rio passava, material orgânico este que garantia a fertilidade do solo. Os egípcios chamavam aquela terra preta de quemite, e segundo alguns autores, foi de onde se originou a palavra árabe alquimia que depois se transformou na palavra química (Glackin, 1976).

Os efeitos benéficos do húmus sobre as propriedades químicas, físicas e biológicas do solo e no desenvolvimento das plantas, com reflexos nas produtividades atuais e em longo prazo das culturas, assim como na preservação do ambiente são bem conhecidos e documentados (Stevenson, 1994; Darst e Murphy, 1989; Buffle, 1990; Schnitzer, 1991; Lovley et al., 1996; Piccolo et al., 1997). Estimativas da massa total de C orgânico do solo variam de $1,22 \cdot 10^{18}$ g de C

(Sombroek et al., 1993) a $2,456 \cdot 10^{18}$ g de C (Batjes, 1996), este reservatório, que excede a quantidade em todos os demais reservatórios superficiais, interage com a atmosfera e afeta seu conteúdo em CO₂ (Bohn, 1982), logo a estabilidade da matéria orgânica do solo e os efeitos da atividade humana sobre ela devem ser levados em consideração ao pensar-se na elevação da concentração de CO₂ atmosférico (Schnitzer, 1991; Borin et al., 1997; Reicosky et al., 1997; Piccolo e Mbagwu, 1994; Piccolo, 1999).

Devido à diversidade de conceitos relativos à matéria orgânica do solo, torna-se importante descrever um que será aqui adotado. O húmus constitui-se de uma mistura de compostos vegetais e animais em vários estágios de decomposição e substâncias orgânicas sintetizadas química e biologicamente. Este material complexo pode ser dividido em substâncias húmicas (ácidos húmicos, ácidos fúlvicos e huminas) e não-húmicas (proteínas, aminoácidos, polissacarídeos, ácidos orgânicos de baixa massa molar, ceras e outros).

As substâncias não-húmicas pertencem a grupos bem conhecidos da química orgânica e suas características físicas e químicas são bem conhecidas. Geralmente correspondem aos compostos facilmente degradados por microorganismos, tendo, normalmente, tempo curto de vida nos solos e sedimentos. Por sua vez, as substâncias húmicas são os maiores constituintes da fração orgânica dos solos, sedimentos e águas, ocorrendo praticamente em todos os sítios terrestres e aquáticos. Surgem da degradação de resíduos de plantas e animais e da atividade sintética de microorganismos (Schnitzer e Khan, 1978). As substâncias húmicas são compostos orgânicos macromoleculares (Schulten e Schnitzer, 1993) ou estruturas supramoleculares (Piccolo et al., 1996a,b; Piccolo, 2001), com massa molar¹

¹ Massa molar é um termo mais adequado do que peso molecular (Atkins, 1998).

aparente variando de poucas centenas a diversos milhares de unidades de massa atômica. As substâncias húmicas se diferem de biopolímeros na sua estrutura e pela sua longa persistência no solo (Sposito, 1989; Stout, et al., 1995). Elas são amorfas, de cor escura, parcialmente aromáticas, principalmente hidrofílicas e quimicamente complexas. Comportam-se como materiais polieletrólitos (Schnitzer e Khan, 1978), ou seja, quando dissociadas em solução não apresentam uma distribuição uniforme de cargas positivas e negativas na solução, mas sim com íons de carga oposta à “macromolécula” ligados a ela e íons de mesma carga difundindo na solução.

Do ponto de vista da sua estabilidade no solo, a matéria orgânica pode ser dividida em uma fração lábil (biodegradável, leve) e uma fração humificada (estável, pesada). A fração lábil representa aproximadamente 1/3 do carbono orgânico do solo e apresenta alta taxa de decomposição e um curto período de permanência no solo. Sua principal função é o fornecimento de nutrientes às plantas e de energia e carbono aos microorganismos do solo obtidos da sua mineralização (Oades, 1989). Já a fração humificada representa cerca de 2/3 do carbono orgânico do solo e tem maior permanência neste (Theng et al., 1989; Andriulo et al., 1990). Sua principal função é atuar sobre as condições físicas e químicas do solo.

2.1.1.1 Interações com íons metálicos

Uma das propriedades importantes da matéria orgânica do solo é a capacidade desta de formar complexos e quelatos com íons metálicos do solo, tanto nutrientes quanto tóxicos, podendo até mesmo controlar sua disponibilidade para as plantas (Pionke e Corey, 1967; Miller e McFee, 1983; Gerritse e Van Driel, 1984; Pohlman e McColl, 1988; Gerke, 1992; Matzner, 1992; Dobrovolskii, 1997).

De modo geral, em solos minerais, pode-se esperar que mais de 50% do total dos elementos traços esteja associado à matéria orgânica (Kabata-Pendias e Pendias, 1985). O alto conteúdo de matéria orgânica nos solos gera uma complexa influência no comportamento dos elementos traços, podendo tanto fixá-los quanto mobilizá-los pela formação de complexos organo-metálicos solúveis de baixa massa molar, pois ácidos orgânicos oriundos da liteira são conhecidos por mobilizar metais pesados nos solos (Kabata-Pendias e Pendias, 1985; Pohlman e McColl, 1988).

Praticamente todos os aspectos da química e da reatividade de elementos traços no solo estão relacionados à formação de complexos estáveis com substâncias orgânicas. Enquanto cátions monovalentes (Na^+ , K^+ , etc.) são mantidos principalmente pela simples formação de sais por reações de troca de cátions envolvendo grupos tais como carboxílicos e fenólicos. Cátions polivalentes (Cu^{2+} , Fe^{3+} , e outros) podem formar ligações coordenadas com moléculas orgânicas. Na Figura 1 são mostradas duas propostas de ligação com o Cu^{2+} , a primeira, com ligantes nitrogenados, mais estável, e portanto menos disponível para as plantas e a segunda, com ligantes oxigenados, menos estável (Martin-Neto et al., 1991).

FIGURA 1 - Exemplos de complexos organo-metálicos.

A estabilidade destas ligações é preponderante na disponibilidade dos íons metálicos adsorvidos pela matéria orgânica, sendo que a planta é capaz de absorver complexos organo-metálicos de pequena massa molar, inclusive, este é o mecanismo utilizado por certas plantas, como por exemplo o milho, para absorver nutrientes que

normalmente não estariam disponíveis pela sua baixa solubilidade, como é o caso do Fe^{3+} (Marschner et al., 1986). Por outro lado, se o íon é fortemente adsorvido pela matéria orgânica de elevada massa molar e insolúvel ele torna-se indisponível para as plantas.

2.1.1.2 Extração e fracionamento químico

Em solos minerais os componentes orgânicos e inorgânicos estão intimamente associados e geralmente é necessário primeiro separá-los para estudá-los em maiores detalhes (Schnitzer e Khan, 1978). Um dos maiores problemas enfrentados no estudo da matéria orgânica é a necessidade da extração desta do solo. De acordo com Stevenson (1994) o método ideal de extração das substâncias húmicas seria aquele que: (a) levasse ao isolamento do material inalterado; (b) fornecesse um extrato livre de contaminantes inorgânicos e com frações representativas de toda a amplitude de massas molares e; (c) fosse um método aplicável a todos os solos. Em adição, haveria a necessidade de um extrato livre de impurezas orgânicas co-adsorvidas nas substâncias húmicas “verdadeiras” (Danneberg, 1973).

Método químico tradicional

O método sugerido pela “International Humic Substances Society” é o de solubilização da matéria orgânica do solo em uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) e fracionamento desta baseado nas características de solubilidade das substâncias húmicas. É importante mencionar que este não é um método recomendado ou aprovado, mas um método que se tem mostrado satisfatório para

muitos tipos de solos e que pode ser realizado em muitos laboratórios. É relativamente eficiente e pode ser usado como um método padrão para comparações (Swift, 1996). Esta ressalva é necessária frente às freqüentes críticas que este método recebe (Schnitzer, 1991), sendo as principais desvantagens segundo Stevenson (1994): (a) a dissolução da sílica mineral e de tecidos orgânicos frescos que contaminariam o extrato; (b) a autooxidação de alguns constituintes orgânicos no contato do extrato alcalino com o ar e; (c) além de outras alterações químicas que poderiam ocorrer em meio alcalino como a condensação entre aminoácidos e os grupos C=O de aldeídos aromáticos ou quinonas levando à formação de compostos semelhantes às substâncias húmicas por reações de “escurecimento”. Estes problemas podem ser minimizados efetuando-se todos os passos em uma atmosfera de N₂.

A solubilização das substâncias húmicas em meio alcalino provavelmente seja devida à conversão dos grupos ácidos (principalmente carboxílicos e fenólicos) em íons com subsequente formação de uma solução física. Sendo que sais (humatos) de cátions polivalentes não são solúveis (Stevenson, 1994). Outros mecanismos que provavelmente contribuam com a solubilidade das substâncias húmicas em meio alcalino sejam a repulsão eletrostática entre os íons de substâncias húmicas e os colóides do solo (por exemplo, as argilas que também são carregadas negativamente) e a repulsão intramolecular que leva a uma conformação mais “aberta” facilitando a sua hidratação.

O fracionamento da matéria orgânica extraída, segundo este método, é baseado nas características de solubilidade das substâncias húmicas, sendo os ácidos fúlvicos solúveis a qualquer pH, os ácidos húmicos solúveis apenas em meio alcalino e as huminas insolúveis a qualquer valor de pH, estas últimas são o resíduo orgânico

do solo após a extração da matéria orgânica por NaOH. É possível fracionar ainda mais as substâncias húmicas, por exemplo, pela adição de eletrólitos à solução alcalina dos ácidos húmicos obtêm-se duas frações: os ácidos húmicos cinzas, que coagulam na presença do eletrólito; e os ácidos húmicos marrons que permanecem em solução.

Os ácidos húmicos se caracterizam por uma maior massa molar, maior conteúdo de C, e menores conteúdos de O e grupos funcionais carboxílicos e fenólicos. Eles afetam em maior grau as características físicas do solo como agregação e retenção de água. Já os ácidos fúlvicos, por apresentarem menor massa molar, maior solubilidade (e logo maior mobilidade) e maior conteúdo de grupos funcionais carboxílicos e fenólicos, afetam mais diretamente as propriedades químicas do solo, como por exemplo na formação de complexos de íons metálicos e aumento da CTC, dentre outras.

Frente às críticas ao método acima descrito propõem-se diversos outros extratores, como por exemplo: pirofosfato; EDTA; acetil-acetona; soluções ácidas diluídas; ditionito-citrato-bicarbonato; e resinas complexantes (Rosell et al., 1971; Danneberg, 1973; Dormaar, 1974; Schnitzer e Khan, 1978; Kutsch, 1985; Hermann e Gerke, 1992; Stevenson, 1994; Novotny, 1997). Estes métodos são baseados no fato que, provavelmente, as substâncias húmicas ligam-se à fração mineral do solo através de cátions polivalentes, sendo que estes servem de “pontes” entre as substâncias húmicas e os minerais do solo. Os extratores acima citados dissolvem a fração mineral do solo ou removem os metais polivalentes que serviam de ponte “liberando” as substâncias húmicas adsorvidas.

Com a finalidade de aumentar-se a eficiência dos extratores, pode-se submeter a suspensão do solo a um tratamento de dispersão dos colóides com o uso

de vibração ultra-sônica. Este procedimento aumentou a extração de material orgânico por NaOH, Na₄P₂O₇ (Schnitzer e Khan, 1978) e resina (Novotny, 1997).

2.1.1.3 Fracionamento cromatográfico

Diversos métodos físicos e químicos têm sido recomendados para o fracionamento da matéria orgânica do solo (Schnitzer e Khan, 1978). Também aqui, uma possível desvantagem dos métodos químicos é que podem ocorrer modificações na matéria orgânica do solo fracionada.

Diversas propriedades da matéria orgânica do solo dependem do seu tamanho molecular, como por exemplo, a ligação com íons metálicos (Aster et al., 1997), então o conhecimento da distribuição do tamanho molecular da matéria orgânica do solo é essencial para a compreensão do seu papel em importantes processos de pedogênese e absorção de íons pelas plantas (Kuiters e Mulder, 1993). Além disto, as substâncias húmicas são, provavelmente, estruturas supramoleculares com uma conformação micelar (Piccolo, 2001) e o estudo e fracionamento destas substâncias por técnicas cromatográficas de exclusão por tamanho molecular são recomendados (Machado e Gerzabek, 1993; Mohamad et al., 1993; Fontecha e Swaisgood, 1995; Piccolo et al. 1996a,b; Novotny et al., 1999). Exemplos de técnicas de cromatografia de exclusão por tamanho molecular são permeação em gel e em vidro de porosidade controlada (“peneiras moleculares”).

A cromatografia de permeação em gel é extensivamente utilizada para a determinação dos valores de massas molares da matéria orgânica do solo ou sua distribuição (Cameron et al., 1972a,b), porém esta técnica apresenta certas limitações como por exemplo: a interação do gel com o material sendo analisado/fracionado

(Swift e Posner, 1971; Kuiters e Mulder, 1993); e a impossibilidade de trabalhar-se com fluxos maiores durante a cromatografia tornando tal procedimento demorado.

A cromatografia de exclusão em vidro de porosidade controlada utiliza como leito cromatográfico o vidro de porosidade controlada que são grânulos de vidro permeados por uma vasta rede interconectada de poros com tamanho controlado (Figura 2). A separação de moléculas com diferentes tamanhos se baseia no princípio de migração diferenciada do material a ser analisado na coluna cromatográfica. Moléculas de maior tamanho molecular exibem menor interação com o espaço poroso da coluna, sendo excluídas no menor tempo. Moléculas de menor tamanho exibem caminhamento mais tortuoso, pelo maior aprofundamento na matriz porosa que empacota a coluna. Compostos de tamanho molecular intermediário exibem velocidades de migração compreendidas entre aquelas das classes de compostos anteriormente citadas (Meyer, 1993).

FIGURA 2 - Microfotografia de um grânulo de vidro de porosidade controlada usado como leito de colunas cromatográficas, o diâmetro médio dos poros mostrado é de 300 nm.

O uso da cromatografia de exclusão em vidro de porosidade controlada, para a análise e fracionamento de misturas de substâncias orgânicas, apresenta algumas vantagens em relação aos clássicos géis orgânicos: ela é relativamente inerte à maioria das substâncias (Danneberg, 1977) e permite fluxos 5 a 10 vezes maiores (Gerzabek e Ullah, 1989) reduzindo significativamente o tempo das análises. Outras

vantagens do vidro de porosidade controlada são: sua alta resistência mecânica o que possibilita a manutenção do fluxo mesmo com variações na pressão interna; termoestabilidade e portanto pode ser autoclavada; pequena variação na distribuição do tamanho de poros; e imunidade à degradação microbiana.

2.1.1.4 Estrutura molecular das substâncias húmicas

O tema desta seção não é especificamente a composição química das substâncias húmicas, porém se fará uma breve revisão histórica a respeito da nossa compreensão sobre estes compostos.

No final do século XIX já se compreendiam as substâncias húmicas como uma mistura complexa de substâncias orgânicas com natureza principalmente coloidal e com propriedades fracamente ácidas. Também já havia informações a respeito da sua interação com outros componentes do solo (Stevenson, 1994).

A proposta de uma estrutura básica e da origem das substâncias húmicas tem sido objeto de inúmeros trabalhos. Maillard (1913, 1916) acreditava que os ácidos húmicos seriam produtos da reação exclusivamente química, sem envolvimento direto de microorganismos, entre açúcares redutores e aminoácidos, (estes sim originados da atividade microbiana). Este autor inclusive sintetizava compostos de coloração escura “semelhantes às substâncias húmicas”. Esta reação entre açúcares redutores e aminoácidos ou aminas para formar polímeros nitrogenados escuros (melaninas) mostrou-se de grande significância na desidratação comercial de produtos alimentares e é freqüentemente referida como “reação de Maillard” (Stevenson, 1994).

Por sua vez, Fischer e Schrader (1921) postularam que os ácidos húmicos seriam essencialmente lignina modificada. Em seu detalhado trabalho Shmook (1930)¹ reviu os aspectos mais importantes da química das substâncias húmicas e da sua síntese microbiológica e concluiu que os ácidos húmicos seriam os constituintes mais característicos das substâncias húmicas, e estes não seriam um composto específico, mas sim uma mistura de substâncias relacionadas tendo características estruturais similares. Ele inferiu a existência de grupos carboxilas e que os ácidos húmicos seriam formados principalmente por um composto nitrogenado (proteína) e um anel aromático derivado da lignina.

Uma estrutura das substâncias húmicas muito popular foi proposta por Fuchs (1931) e é dada na Figura 3. Já a estrutura proposta por Dragunov (1948)² era constituída de anéis aromáticos substituídos por grupos hidroxilas e quinonas, sendo os anéis aromáticos ligados por grupos $-\text{CH}_2\text{O}-$ e $-\text{CN}-$. Carboidratos e peptídeos estariam ligados aos C que uniam os anéis aromáticos e a grupos CH_2 ligados diretamente aos anéis.

FIGURA 3 - Estrutura dos ácidos húmicos proposta por Fuchs (1931). Extraído de Orlov (1985).

O modelo de Flaig de 1964 (Flaig et al., 1975) continha anéis aromáticos e quinonas substituídas por grupos hidroxilas, carboxilas e metoxilas. Segundo

¹ Shmook, A. 1930. *Pedology*. **25**, 5 (citado por Stevenson, 1994).

² Dragunov, C.C et al. 1948. *Pochvovedenie*. **7**, 409. (citados por Schulten e Schnitzer, 1995).

Kleinhempel (1970) os núcleos aromáticos seriam conectados por átomos de O, N e outras “pontes” enquanto polissacarídeos e peptídeos estariam presentes como estruturas lineares, neste modelo mostrou-se o papel de cátions polivalentes, no caso íons Fe^{2+} , na associação entre substâncias húmicas e a porção mineral do solo (Figura 4).

FIGURA 4 - Modelo de substâncias húmicas e da associação substâncias húmicas-argila e substâncias húmicas-íons metálicos proposto por Kleinhempel (1970), extraído de Orlov (1985).

O modelo de Buffle et al. (1977) consistia de um grupo naftaleno substituído por hidroxilas, carboxilas e cadeias alifáticas curtas contendo grupos alcoólicos, metilas, carboxilas e carbonilas. Uma certa evolução foi o modelo de Schnitzer e Khan (1978) que era composto de fenóis e ácidos benzóicos unidos por ligações de H (Figura 5). A diferença é que haveria espaços vazios de diferentes tamanhos que poderiam alojar compostos orgânicos ou inorgânicos de baixa massa molar (Schulten e Schnitzer, 1997).

FIGURA 5 - Estrutura proposta para os ácidos fúlvicos (Schnitzer e Khan, 1978).

Pode-se observar que até alguns anos estruturas basicamente aromáticas eram as mais aceitas (Kononova, 1966; Schnitzer e Khan, 1978; Stevenson, 1994). Contudo, graças principalmente aos dados obtidos por espectroscopia de RMN, verificou-se que o grau de aromaticidade seria muito menor que o esperado, devido a isto Schulten e Schnitzer (1993) propuseram uma estrutura que continha grandes porções alifáticas (Figura 6).

FIGURA 6 - Modelo dos ácidos húmicos (Schulten e Schnitzer, 1993).

Na Figura 7 mostra-se uma proposta de estrutura tridimensional, baseada na molécula da Figura 6, obtida a partir de modelagem molecular, e na Figura 8 um

modelo de uma partícula do solo otimizado geometricamente (Schulten e Schnitzer, 1997).

FIGURA 7 - Modelo tridimensional dos ácidos húmicos (Schulten e Schnitzer, 1997). C - azul; O - vermelho; N - azul escuro e H - branco. As letras A, B e C indicam os espaços vazios provavelmente presentes na estrutura das substâncias húmicas.

FIGURA 8 - Modelo tridimensional de uma partícula de solo otimizado geometricamente por Schulten e Schnitzer (1997). C - azul; O - vermelho; N - azul escuro; H - branco; Si - lilás; Al - amarelo; Fe^{3+} - verde.

Conforme pode ser observado nos modelos mais recentemente propostos a estrutura dos ácidos húmicos conteria espaços vazios de diferentes tamanhos no interior da macromolécula (Figura 7). Estes espaços poderiam alojar outros compostos orgânicos, hidrofílicos ou hidrofóbicos, tais como: carboidratos e materiais proteináceos; lipídios; agrotóxicos e outros poluentes assim como inorgânicos como argilas e óxidos-hidróxidos (Schulten e Schnitzer, 1997).

A modelagem de substâncias húmicas, e mesmo de partículas do solo que incluam a porção mineral deste, utilizando cálculos moleculares poderá trazer importantes informações a respeito da estrutura e reatividade das substâncias húmicas em seu “meio natural”, ou seja, numa complexa interação com todos os componentes e fases do solo (Bailey et al., 1997; Shevchenko e Bailey, 1998). Um exemplo disto pode ser visto na Figura 9 que mostra um modelo obtido por cálculos moleculares da interação entre o herbicida atrazina (6-cloro-N-etil-N'-(1-metiletil)-1,3,5-triazina-2,4-diamina) e o complexo ácidos húmicos-muscovita.

FIGURA 9 - Simulação por computador da sorção de atrazina no complexo muscovita-ácidos húmicos modelo (oxidação de carboidrato e lignina). Akim (1998).

Para a avaliação estrutural das substâncias húmicas, i.e., tamanho, forma e massa das partículas, o primeiro modelo conceitual adotado foi o de partículas globulares sólidas (Visser, 1964). Posteriormente uma estrutura mais flexível e um formato elipsoidal, assim como uma conformação polimérica espiralada ao acaso foi atribuída às substâncias húmicas (Cameron et al., 1972b). O próximo modelo aceito foi o de uma estrutura macromolecular variando do formato esférico a filamentoso dependendo da concentração da amostra, pH e força iônica do meio (Chen e Schnitzer, 1976; Ghosh e Schnitzer, 1980; Senesi et al., 1996b).

E finalmente, diferentemente dos modelos que consideram as substâncias húmicas como grandes compostos macromoleculares de massa molar variável e comportamento conformacional semelhante ao das proteínas, há a proposta de estruturas supramoleculares (Piccolo, 1998) onde as substâncias húmicas em solução formariam agregados mistos ou micelas sendo que estes agregados húmicos seriam mantidos por ligações fracas tais como ligações de H e interações hidrofóbicas (Wershaw, 1986; Barak e Chen, 1992; Piccolo e Conte, 2000; Piccolo, 2001).

Tal modelo das substâncias húmicas pode levar à reconsideração da definição clássica das frações ácidos húmicos e ácidos fúlvicos da matéria orgânica humificada. Os ácidos fúlvicos seriam formados por pequenas micelas estáveis que permaneceriam dispersas pela repulsão das cargas negativas originadas da dissociação da grande quantidade de grupos ácidos presentes na sua estrutura. As micelas de ácidos húmicos, por outro lado, por apresentarem uma menor quantidade de grupos funcionais ácidos poderiam aproximar-se o suficiente para formar agregados de aparente elevada massa molar¹ (Piccolo et al., 1996a,b).

¹ Embora, neste texto, utilizou-se com frequência os termos “massa molar” e “tamanho molecular” não se pode perder de vista a possibilidade de se tratarem de valores aparentes.

2.2 TÉCNICAS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA APLICADAS NO ESTUDO DA MATÉRIA ORGÂNICA DO SOLO¹

2.2.1 INTRODUÇÃO

A técnica de ^{13}C CP-MAS NMR (ressonância magnética nuclear de ^{13}C com polarização cruzada e rotação em torno do ângulo mágico) tem sido intensamente utilizada para o estudo da matéria orgânica do solo tanto para avaliar-se sua composição e estrutura (Kögel-Knaber et al., 1991), quanto para se acompanhar suas transformações (Leinweber et al., 1993) e avaliar os efeitos de diferentes sistemas de manejo do solo (Preston et al., 1994).

Outra técnica de ressonância magnética empregada para a caracterização da matéria orgânica do solo é a de RPE (Ressonância Paramagnética Eletrônica), que pode fornecer informações estruturais sobre a formação de complexos de íons paramagnéticos com as substâncias húmicas (Lakatos et al., 1977; Boyd et al., 1983; Mangrich e Vugman, 1988; Senesi, 1990a; Martin-Neto et al., 1991; Jezierski et al., 2000a,b). Ela também é utilizada na identificação e quantificação do nível de radicais livres orgânicos, parâmetro que é correlacionado ao grau de humificação destes compostos (Riffaldi e Schnitzer, 1972; Martin-Neto et al., 1991; Olk et al., 1999).

Neste capítulo a abordagem será dos conceitos físicos envolvidos nos fenômenos de RMN e de RPE tentando-se, ao máximo, analogias com a física clássica e evitando-se definições puramente matemáticas.

¹ Capítulo redigido com a colaboração do Prof. Dr. Antonio Sálvio Mangrich

2.2.2 CONCEITOS BÁSICOS

2.2.2.1 O momento magnético das partículas atômicas e o fenômeno de ressonância

A fundamentação física da ressonância magnética, tanto nuclear quanto eletrônica, baseia-se nas propriedades magnéticas das partículas atômicas, os elétrons e os núcleons (prótons e nêutrons). Estas propriedades magnéticas, numa visão clássica, advêm do fato que partículas carregadas eletricamente em rotação ao redor do próprio eixo (“spin”) geram um campo magnético. Com isto estas partículas se comportariam como pequenos magnetos (dipolos). Embora os nêutrons possuam carga elétrica nula eles também apresentam um momento magnético. Isto pode ser justificado ao imaginá-los como partículas com carga total nula porém com distribuição de cargas não uniforme (Freitas e Bonagamba, 1999).

Este momento magnético é quantizado, ou seja, só pode existir em certos valores discretos, definidos pelo número quântico de spin (m_s)¹ que indica a projeção (componente) deste momento magnético, S_z , em um eixo arbitrário. Na ausência de um campo magnético esses dipolos magnéticos estarão alinhados aleatoriamente e os diferentes estados de spin ($m_s = \pm 1/2$) serão equivalentes em energia, ou seja, degenerados. Porém, na presença de um campo magnético externo, cuja direção é definida como sendo a direção do eixo z de coordenadas cartesianas, eles assumirão

¹ Optou-se por indicar o número quântico de spin como m_s tanto para o elétron como para os núcleons, porém é comum encontrar-se a notação m_s para o elétron e m_i para os núcleons.

diferentes orientações distinguidas pelo número quântico m_s , sendo uma delas, de menor energia, paralela ao campo magnético e outra, de maior energia, antiparalela. Os estados de spin de menor energia são $m_s = +1/2$ para os núcleons e $m_s = -1/2$ para o elétron. A diferença dos sinais para os estados de menor energia é devida à carga negativa do elétron.

A interação do momento magnético da partícula com o campo magnético levará, segundo as regras da mecânica quântica, a um diagrama energético cuja energia da partícula será restrita a certos valores discretos definidos pelos seus respectivos números quânticos. Estes níveis energéticos são dados pela relação:

$$E = \pm g \mu B m_s \quad (1)$$

sendo o sinal positivo para o elétron e negativo para os núcleons; g é uma constante de proporcionalidade conhecida como fator de Zeeman, fator- g ou valor- g e é característica de cada partícula sendo igual a 2,0023193 (Weil et al., 1994) para o elétron livre, isto é, um único elétron no vácuo. Para o próton e o nêutron os valores de g são 5,5856912 e -3,8260837, respectivamente (Freitas e Bonagamba, 1999); μ é o magneton de Bohr (μ_B) para o elétron ($9,2740154 \cdot 10^{-24} \text{ J T}^{-1}$) e magneton nuclear (μ_n) para os núcleons ($5,0507866 \cdot 10^{-27} \text{ J T}^{-1}$); B (em T) é a densidade de fluxo magnético que por simplicidade é denominada apenas de campo magnético. Devido à diferença de massa entre as partículas o magneton de Bohr é 1836 vezes maior que o magneton nuclear e assim o momento magnético do elétron é cerca de 2000 vezes maior que o dos núcleons. O diagrama energético para uma partícula com spin 1/2 submetido a um campo magnético é dado na (Figura 10).

FIGURA 10 - Remoção da degenerescência dos estados de spins por um campo magnético (efeito Zeeman). Os índices “e” e “n” referem-se ao elétron e aos núcleons, respectivamente.

Substituindo-se os números quânticos de spin na Eq. (1), têm-se os valores de energia para cada estado ($\pm 1/2 g \mu B$) e a separação de energia entre os dois estados, chamada de separação Zeeman, será de:

$$\Delta E = g \mu B \quad (2)$$

Esta separação aumenta linearmente com o aumento de B (Figura 10). Transições de dipolo magnético entre os dois estados de spins ocorrem quando se faz incidir, perpendicularmente ao B , radiação eletromagnética cujos fótons possuem energia $h\nu$ igual a ΔE , onde h é a constante de Planck ($6,6260755 \cdot 10^{-34}$ J s) e ν é a frequência da radiação incidente, como mostrado a seguir:

$$h\nu = \Delta E = g \mu B_r \quad (3)$$

Esta equação representa a condição de ressonância num experimento de ressonância magnética e B_r é o campo magnético em que ocorre este fenômeno (Figura 10). Assim pode-se atingir a condição de ressonância variando-se a frequência da radiação incidente ou o campo magnético externo.

Tanto as transições para o nível de maior energia quanto para o de menor são igualmente prováveis, porém somente ocorrerá absorção líquida de energia pela amostra quando a população de spins do nível de menor energia for superior à população de spins de maior energia (Carrington e McLachlan, 1967). Quando as populações de spins destes níveis se igualarem o sistema estará num estado de saturação (Poole, 1983). Em um conjunto macroscópico de spins, submetido a um campo magnético externo em equilíbrio térmico e sem a aplicação de radiação eletromagnética que promova as transições de spins, a razão entre as populações de spins dos níveis energéticos, pode ser satisfatoriamente descrita pela distribuição de Boltzmann:

$$n^+/n^- = \exp(-h\nu/kT) \cong 1 - g \mu B/kT \quad (4)$$

onde n^+ e n^- são as populações dos níveis de maior e de menor energia respectivamente, k é a constante de Boltzmann ($1,380658 \cdot 10^{-27} \text{ J K}^{-1}$) e T a temperatura da amostra em estudo (Goodman e Hall, 1994). Assim a diminuição da temperatura da amostra ou o aumento do campo magnético leva a um aumento da população de spins de menor energia e conseqüentemente a um aumento da intensidade do sinal.

2.2.2.2 Tempos de relaxação

Se a partícula promovida ao nível de maior energia retornasse ao seu estado fundamental emitindo radiação não seria possível detectar a absorção líquida de energia, pois cada fóton absorvido seria re-emitido. Existem, porém, acoplamentos entre os spins e o meio atômico circundante que possibilitam a transferência de energia sem a emissão de um fóton durante a transição do spin de volta para o nível

inferior. Este processo é denominado de relaxação spin-rede, e possui um tempo característico (T_1) dependente dos acoplamentos existentes (Coelho-Neto, 1992). A rede refere-se a outros átomos na molécula e outras moléculas, incluindo o solvente quando for o caso. A taxa de transição do nível de menor energia para o de maior energia não pode exceder a taxa de relaxação de volta para o estado fundamental, pois, neste caso, haverá a saturação do sistema (Senesi, 1990a). Por outro lado, a largura de uma linha espectral é inversamente relacionada ao tempo de relaxação spin-spin (T_2). Na ausência de saturação, quanto maior a taxa de relaxação ou seja menor T_2 , mais larga será a linha espectral (Weil et al., 1994), perdendo-se resolução e até mesmo impossibilitando o registro do espectro. Neste caso também a diminuição da temperatura da amostra pode ser efetiva pois isto acarretaria um aumento dos tempos de relaxação.

2.2.2.3 Regras de seleção

As condições para que a matéria absorva radiação eletromagnética estão sumariadas nas regras de seleção. As transições que são possíveis, de acordo com estas regras, são chamadas de permitidas, enquanto as transições que não obedecem estas regras são chamadas de proibidas. É importante ressaltar que o termo proibido refere-se a regras estabelecidas para um modelo simples, de modo que transições proibidas podem se tornar permitidas por mecanismos não incluídos neste modelo simples. Porém, a intensidade de absorção ou emissão que ocorre com uma transição está relacionada à probabilidade deste evento (transição) ocorrer. Quanto mais provável for o evento, mais intensa será a absorção, assim, transições proibidas são de baixa probabilidade e logo dão absorções de baixa intensidade (Drago, 1992).

As regras de seleção para RPE são: Δm_s nuclear igual a 0 e Δm_s eletrônico igual a ± 1 , ou seja, as transições nucleares e de mais de um spin eletrônico são pouco prováveis. Já para RMN temos como transições proibidas as de spin eletrônico e as de mais de um spin nuclear.

2.2.2.4 O spin total resultante

Em sistemas atômicos e moleculares não mais do que dois elétrons podem ocupar um dado orbital espacial e quando dois elétrons ocupam um mesmo orbital seus números quânticos de spin (m_s) sempre terão sinais opostos, ou seja, estes elétrons estarão emparelhados tendo seus spins anti-paralelos, o que é expresso pelo *Princípio de Exclusão de Pauli*. Neste caso o momento magnético de cada elétron cancela o outro, resultando que orbitais completos não são efetivos quanto ao spin-magnetismo e logo apenas quando, no mínimo um orbital da espécie química possuir um elétron desemparelhado, esta espécie química poderá servir de sonda de RPE. Em se tratando de elétrons e núcleons, a soma dos spins desemparelhados de dada espécie é o spin total resultante sendo representado por S no caso de spin eletrônico e I no nuclear. Assim, conhecendo-se a distribuição das partículas atômicas é fácil prever o spin total resultante. Isto é relativamente simples para os elétrons cuja determinação da configuração eletrônica é possível utilizando a estrutura de camadas. Porém não é o caso para o núcleo, visto que a determinação da configuração nuclear é muito complexa pois se desconhece a natureza detalhada da interação nuclear responsável pela coesão dos núcleons e também há a dificuldade de se tratar matematicamente um problema de muitos corpos em interação mútua. A alternativa tem sido o uso de modelos simplificados para a estrutura nuclear sendo

que o modelo de camadas tem sido extremamente bem sucedido no que diz respeito às previsões sobre spins nucleares.

Nesse modelo trata-se a distribuição dos núcleons dentro do núcleo de forma análoga aos elétrons na eletrosfera, ou seja pressupõe-se a existência de níveis de energia discretos e bem definidos para as partículas atômicas dentro do átomo, cada nível possuindo um valor máximo de ocupação. Assim, na “construção” de um átomo devemos ir acrescentando elétrons, prótons ou nêutrons aos sucessivos níveis, em ordem crescente de energia, até completar a máxima ocupação de cada nível (Freitas e Bonagamba, 1999), lembrando-se que pelo *Princípio de Exclusão de Pauli* duas partículas só poderão ocupar o mesmo estado quântico desde que seus spins sejam contrários, ou seja estejam emparelhados.

No modelo de camadas para a estrutura nuclear existe uma sequência de níveis para os prótons e outra para os nêutrons (Freitas e Bonagamba, 1999) de tal sorte que prótons não “emparelham” seus spins com nêutrons. Como resultado disto temos que átomos com o número de prótons (Z) e de massa (A) pares possuem $I = 0$ visto que neste caso haverá o emparelhamento de todos os prótons e de todos os nêutrons pois eles ocorrem aos pares; exemplos: $^{12}_6\text{C}$, $^{16}_8\text{O}$. No caso em que Z for ímpar e A for par o I será inteiro, pois tanto os prótons quanto os nêutrons ocorrerão em número ímpar “sobrando” necessariamente pelo menos um próton e um nêutron desemparelhados; exemplos: $^{14}_7\text{N}$ ($I = 1$), $^{10}_5\text{B}$ ($I = 3$) e no caso em que A for ímpar o número quântico I será semi-inteiro, pois haverá um número ímpar de prótons ou de nêutrons, como exemplos $^{27}_{13}\text{Al}$ ($I = 5/2$), ^1_1H e $^{13}_6\text{C}$ ($I = 1/2$) (Gil e Geraldês, 1987).

Na presença de um campo magnético externo cada spin desemparelhado poderá assumir duas diferentes orientações (paralelo e anti-paralelo em relação ao campo magnético externo), com isto a projeção do momento magnético resultante no eixo de coordenadas cartesianas z adota $2S + 1$ ou $2I + 1$ (multiplicidade) diferentes orientações (Figura 11).

FIGURA 11 - Orientação quantizada do spin; α e β são os estados de spin $+1/2$ e $-1/2$ respectivamente, o eixo z tem como unidade $\hbar$. (a) $S = 1/2$ e (b) $S = 1$. Os sub índices “e” e “n” referem-se ao elétron e aos núcleons, respectivamente.

2.2.2.5 Interações magnéticas

A condição de ressonância dada pela Eq. (3) depende de constantes próprias da partícula em questão (g e μ) e do B , porém o campo magnético efetivo (B_{efet}) a que determinada partícula é submetida não é necessariamente apenas o B aplicado. Adicionalmente a este podem existir campos magnéticos locais (B_{local}), decorrentes de outras interações magnéticas, que se somam vetorialmente ao B para produzir o

B_{efet} que age sobre a partícula. Devido a isto, a condição de ressonância dada pela Eq. (3) ocorrerá em um valor de B diferente daquele para a partícula livre ou haverá o desdobramento da linha de ressonância em multipletos. Exemplos de B_{local} são os decorrentes do movimento orbital dos elétrons e do momento magnético das demais partículas. De fato se não houvesse estas interações os espectros de RPE e RMN limitar-se-iam apenas a uma linha simples com g igual ao valor da partícula livre não fornecendo quaisquer informações a respeito do átomo ou molécula ao qual esta partícula dotada de momento magnético pertence. Na prática essas interações produzem uma multiplicidade de fascinantes e úteis fenômenos observáveis pela RMN e RPE (Weil et al., 1994). A seguir será apresentado, brevemente, algumas destas interações magnéticas que são importantes no estudo das substâncias húmicas por espectroscopia de ressonância magnética.

A energia Zeeman

Um campo magnético externo induz os elétrons de um átomo ou molécula a fazerem um movimento de precessão ao redor da direção deste campo e este movimento circular gera uma componente de campo magnético contrária ao B (Lei de Lenz), e em se tratando de núcleons (RMN) este B_{local} é um importante componente para o B_{efet} de tal sorte que a Eq. (3) pode ser modificada para:

$$h\nu = \Delta E = g_n \mu_n (1-\sigma) B \quad (5)$$

onde σ é chamada de constante de blindagem cujo valor é da ordem de 10^{-6} . O grau de blindagem depende da densidade de elétrons ao redor do núcleon em questão. Com isto o núcleon serve como uma sonda para o ambiente químico (densidade eletrônica) em que está inserido. É importante ressaltar que mesmo elétrons

emparelhados geram este B_{local} , embora a magnitude deste seja muito menor do que daquele gerado por elétrons desemparelhados (Silverstein et al., 1991).

Para o caso eletrônico, elétrons emparelhados ou em orbitais esféricos (orbitais s) não contribuem significativamente para alterar o B_{efet} . Apesar disto a energia de ressonância do elétron pode diferir muito do valor teórico $h\nu = \Delta E = 2,0023193 \mu_B B_r$ do elétron livre. Em RMN é usual considerar-se que o g_n é uma propriedade inerente dos núcleons e qualquer correção na energia Zeeman são interpretadas como efeitos de blindagem - Eq. (5). Já os espectroscopistas de RPE preferem descrever as mudanças na energia Zeeman como alterações do momento magnético efetivo do elétron, ou seja o valor- g não é uma constante e pode ser diferente em diferentes situações, com isto o valor- g medido experimentalmente pode diferir muito do g_e .

O momento angular intrínseco de spin do elétron desemparelhado é associado com um valor- g igual ao g_e , porém o movimento orbital deste elétron pode dotá-lo de um pequeno momento angular orbital que altera o momento magnético efetivo e conseqüentemente o seu valor- g (Carrington e McLachlan, 1967). Assim o valor de g em espectroscopia de RPE é utilizado na caracterização de grupos de átomos das estruturas moleculares, como os números de onda (λ^{-1}) de uma determinada banda de absorção em espectroscopia no infravermelho, ou o comprimento de onda do máximo de absorção (λ_m) em espectroscopia eletrônica (ultravioleta - visível).

A interação dipolar

O acoplamento magnético entre os momentos magnéticos das partículas pode ocorrer via interação dipolar que é inteiramente análoga ao acoplamento dipolar entre dois magnetos da física clássica (Figura 12).

FIGURA 12 - Construção geométrica para um vetor $P_1 - P_2$ ilustrando as quantidades de interesse para a interação dipolar. O vetor $P_1 - P_2$ de comprimento r faz um ângulo de θ com a direção do campo magnético. P_1 e P_2 são as partículas e μ_P seus momentos magnéticos. B_{local} é a componente z do campo magnético gerado pela partícula P_2 à distância r .

Esta interação magnética depende da orientação dos momentos magnéticos e da distância entre eles e não há a necessidade de “contato” entre as partículas em interação. Esta dependência da orientação é chamada de anisotropia. Entretanto, devido ao fato que no estado líquido os átomos e moléculas possuem movimento de rotação aleatório (eles “tombam” aleatoriamente) e durante este movimento o ângulo θ assume todos os possíveis valores anulando em média o termo $1 - 3 \cos^2 \theta$ (Atkins, 1998), e caso este movimento seja suficientemente rápido, em relação ao alargamento da linha devido a interação dipolar esta não contribuirá com o B_{efet} . Assim ela é um importante fator no estado sólido e em sistemas líquidos onde os átomos ou moléculas “tombam” lentamente, tais como macromoléculas e em meios viscosos.

O acoplamento hiperfino e super-hiperfino

Os momentos magnéticos dos elétrons e dos núcleons podem ser acoplados via interação de contato (contato de Fermi) sendo a constante de acoplamento a , com dimensão de energia proporcional à densidade do elétron desemparelhado no núcleo.

Assim sendo a interação de contato só pode ocorrer quando o elétron desemparelhado possuir uma probabilidade finita de densidade no núcleo. Logo, elétrons em orbitais p , d , f e superiores, que têm funções de onda com nós no núcleo (densidade eletrônica nula) precisam ter algum caráter de orbital s para que possa ocorrer a interação via interação de contato (Carrington e McLachlan, 1967).

Entretanto, outros dois mecanismos podem viabilizar o acoplamento dos momentos magnéticos dos elétrons e dos núcleons e quanto mais eficiente forem estes mecanismos maior será a constante de acoplamento. O primeiro mecanismo é a interação de troca na qual ocorre a polarização dos spins eletrônicos de orbitais s cheios pelo elétron desemparelhado de orbitais cuja densidade eletrônica no núcleo seja zero (orbitais p , d , f ,...). Como esses elétrons “internos” sofrem a influência tanto do momento magnético eletrônico quanto do nuclear, eles efetivamente acoplam estes dois sistemas. O segundo mecanismo é a interação dipolar que, como já visto na seção anterior, depende da distância e da orientação relativa das partículas em interação, sendo que, a orientação do spin nuclear é governada pelo campo magnético aplicado enquanto que a do elétron desemparelhado depende de qual orbital ele está e da orientação da molécula ou átomo em relação ao campo magnético aplicado.

Quando um elétron desemparelhado, que possa interagir com um núcleo com spin diferente de 0, for submetido a um campo magnético externo este elétron estará submetido também a um campo magnético inerente do núcleo que pode ser somado ou subtraído ao campo externo, ou seja, o B_{efet} experimentado pelo elétron desemparelhado será a soma do B com o B_{local} gerado pelo spin nuclear.

O acoplamento é chamado de hiperfino para o caso em que o elétron desemparelhado interage com seu próprio núcleo e super-hiperfino quando a

interação ocorre com o spin nuclear de núcleos adjacentes. Para o caso de $I = 1/2$ a linha de RPE será dividida em duas (Figura 13) e a separação destas linhas corresponde ao valor da constante de interação hiperfina ou super-hiperfina (a). O número de linhas destas interações é dado pela multiplicidade dos estados de spin nuclear ($2I + 1$). Experimentalmente mede-se a separação entre as linhas dos multipletos ($A = a g^{-1} \mu_B^{-1}$) em unidades de campo magnético (T). Este valor pode ser positivo ou negativo sendo que, para os objetivos deste trabalho, será considerado apenas seu valor absoluto. É comum, também, encontrar a constante de acoplamento hiperfino ou super-hiperfino em unidades de cm^{-1} ou MHz. A relação entre estas unidades é: $A (\text{mT}) / a (\text{cm}^{-1}) = 2141,9497 / g$; e $a (\text{cm}^{-1}) = 3,33546 \cdot 10^{-5} A (\text{MHz})$. O valor da constante de acoplamento hiper-fino ou super-hiperfino depende do grau de interação que ocorre entre o(s) elétron(s) desemparelhado(s) e o núcleo em questão.

FIGURA 13 - Níveis de energia e o respectivo espectro de RPE para um sistema com $S = 1/2$ e $I = 1/2$ (linhas cheias) e $S = 1/2$ e $I = 0$ (linhas pontilhadas). As setas denominadas k , l e m representam as transições permitidas.

Em alguns casos o elétron desemparelhado pode estar deslocalizado sobre diversos átomos idênticos, por exemplo complexos metálicos polinucleares e radicais livres orgânicos. Nestes casos o número de linhas será dado por: $(2nI + 1)$, onde n é o número de núcleos equivalentes com quem o elétron desemparelhado interage.

2.2.2.6 Área sob a linha de ressonância

A área sob a linha de ressonância será proporcional à concentração da espécie responsável por esta linha desde que o espectro tenha sido adquirido em condições quantitativas, ou seja, quando não houver, por exemplo: saturação do sistema; supressão de sinais decorrentes de características da própria amostra; ajuste inadequado de parâmetros. Porém, a quantificação absoluta utilizando técnicas de ressonância magnética, em substâncias húmicas raramente é efetuada. O que se faz freqüentemente é uma quantificação relativa dos diferentes grupos químicos (RMN), ou da espécie paramagnética em relação a um padrão (RPE). Este assunto será tratado em detalhes no capítulo 6.

2.2.3 A ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA

2.2.3.1 Introdução

A RPE é um ramo da espectroscopia na qual a radiação, na frequência de microondas, é absorvida por moléculas, íons ou átomos possuindo elétrons com spins desemparelhados, que são chamados de centros paramagnéticos (Drago, 1992), quando estes são submetidos a um campo magnético. A técnica de RPE baseia-se na existência de um momento magnético líquido, ou resultante, de spin associado ao elétron (Parish, 1990). Esta técnica concerne à detecção de elétrons desemparelhados e à caracterização de seu ambiente químico. Substâncias diamagnéticas, ou seja, aquelas que não possuem elétrons desemparelhados, não podem ser detectadas por RPE e, portanto, não interferem nos experimentos envolvendo substâncias paramagnéticas.

Com a RPE é possível analisar-se não destrutivamente amostras sólidas, líquidas e gasosas. É uma técnica extremamente sensível e sob condições favoráveis o limite de detecção para centros paramagnéticos encontra-se no intervalo de 10^{11} a 10^{12} spins g^{-1} , o que equivale à parte por bilhão. A resolução, porém, é perdida quando os centros paramagnéticos estão próximos o suficiente para que ocorra significativa interação dipolar entre eles. Portanto esta técnica aplica-se, primariamente, na caracterização de espécies magneticamente diluídas (Goodman e Hall, 1994) porém, diferentemente da espectroscopia no infravermelho, em RPE a diluição de amostras sólidas não é obtida pela simples mistura com um pó “silencioso” (diamagnético) mas sim há a necessidade da diluição dos centros

paramagnéticos em nível molecular. No caso de soluções solventes com alta constante dielétrica (por exemplo água) não são recomendados pois ocorrem perdas de potência da energia aplicada na forma de microondas pela interação do solvente com a componente elétrica desta, assim como aquecimento e outros problemas (Parisch, 1990). Porém é possível a aquisição de espectros nestas condições utilizando as celas planas (“flat cells”) ou tubos capilares especiais.

A maioria dos experimentos em RPE é efetuada em uma frequência ao redor de 9 GHz, que é conhecida como banda-X de frequência, ou de 35 GHz (banda-Q). Com estas frequências o B_r de um elétron livre será de 321,1 mT e 1248,9 mT, respectivamente. Estas frequências foram escolhidas pois já havia equipamentos que as utilizavam tais como radares marinhos (9 GHz) e de aeroportos (35 GHz) (Parisch, 1990). Há, no entanto, experimentos executados em outras frequências de microondas tais como de 1 a 2 GHz (banda-L, $B_r = 35,7$ e $71,4$ mT), 3 a 4 GHz (banda-S, $B_r = 107$ e $142,7$ mT), 24 GHz (banda-K, $B_r = 856,4$ mT), 50 GHz (banda-V, $B_r = 1784,1$ mT) e 95 GHz (banda-W, $B_r = 3389,8$ mT). Normalmente os experimentos de RPE são efetuados à temperatura ambiente, porém, sobre certas circunstâncias, torna-se interessante efetuá-los a baixa temperatura utilizando N_2 ou mesmo He líquido (77 K e 4,2 K, respectivamente) para o resfriamento.

As espécies paramagnéticas frequentemente observadas incluem radicais livres orgânicos, complexos metálicos paramagnéticos e estados tripletos excitados de moléculas diamagnéticas (Bunce, 1987). Para a aquisição de um espectro de RPE a amostra é colocada dentro de uma cavidade ressonante cujas dimensões são ajustadas à frequência de microondas utilizada e, logo, é impossível variar esta frequência sem variar as dimensões da cavidade. Assim, por questões práticas, é mais conveniente submeter a amostra à radiação de microondas com frequência fixa e

conhecida e variar B (Parisch, 1990). Isto provoca a variação de ΔE até que a condição de ressonância, dada pela Eq. (3), seja atingida e ocorra a transição de spin com a absorção de energia que é detectada pelo equipamento.

Geralmente os espectros de RPE são adquiridos na forma de primeira derivada do espectro de absorção (Figura 13b). A resolução pode ser melhorada pela aquisição do espectro em segunda derivada (Parisch, 1990), entretanto a relação sinal-ruído em espectroscopia diminui geometricamente com sucessivas derivações (Starsinic, 1984).

2.2.3.2 O fator-g

O momento angular orbital do elétron é caracterizado pelo número quântico secundário (representado por l), que especifica o seu módulo, e pelo número quântico magnético (m_l), que especifica a sua orientação com respeito a um dado eixo z . Os valores de l variam de 0 a $n - 1$ ($s, p, d, f, g, \dots$), sendo n o número quântico principal, e m_l varia de $-l$ a $+l$. A soma dos m_l de todos os elétrons em orbitais incompletos fornece o momento angular orbital total que é representado por L ($S, P, D, F, G, \dots$) e o estado deste átomo pode ser representado por $^{(2S+1)}L$, onde o subscrito à esquerda é a multiplicidade de spin (seção 2.2.2.4). A seguir são dados alguns exemplos de configurações:

V^{4+}	Fe^{3+}, Mn^{2+}	Cu^{2+}																														
$d^1, L = 2 (^2D)$	$d^5, L = 0 (^6S)$	$d^9, L = 2 (^2D)$																														
<table> <tr> <td>↑</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>+2</td> <td>+1</td> <td>0</td> <td>-1</td> <td>-2</td> </tr> </table>	↑					+2	+1	0	-1	-2	<table> <tr> <td>↑</td> <td>↑</td> <td>↑</td> <td>↑</td> <td>↑</td> </tr> <tr> <td>+2</td> <td>+1</td> <td>0</td> <td>-1</td> <td>-2</td> </tr> </table>	↑	↑	↑	↑	↑	+2	+1	0	-1	-2	<table> <tr> <td>↑↓</td> <td>↑↓</td> <td>↑↓</td> <td>↑↓</td> <td>↑</td> </tr> <tr> <td>+2</td> <td>+1</td> <td>0</td> <td>-1</td> <td>-2</td> </tr> </table>	↑↓	↑↓	↑↓	↑↓	↑	+2	+1	0	-1	-2
↑																																
+2	+1	0	-1	-2																												
↑	↑	↑	↑	↑																												
+2	+1	0	-1	-2																												
↑↓	↑↓	↑↓	↑↓	↑																												
+2	+1	0	-1	-2																												

O acoplamento spin-órbita fornece um mecanismo com o qual o momento angular orbital pode ser adicionado, ou misturado, ao momento angular de spin

(Goodman e Hall, 1994). Quando há significativa contribuição deste momento angular orbital ao momento magnético total do elétron desemparelhado o valor de g pode desviar significativamente do g_e .

Desvios do valor-g do g_e ($g - g_e = \Delta g$) podem ser explicados com a seguinte analogia: campos cristalinos removem a degenerescência dos orbitais d dos metais de transição¹, ou seja, quando estes átomos estão formando complexos os ligantes provocam distorções dos orbitais alterando a energia destes. Com esta remoção da degenerescência o elétron desemparelhado não terá acesso indiscriminado a estes orbitais, tendo uma maior densidade no orbital de menor energia. Entretanto, a mistura do estado fundamental com estados excitados é possível e esta transição pode ser pictoricamente compreendida como um movimento do elétron desemparelhado entre orbitais “vizinhos”. Por exemplo, transições $d_{x^2-y^2}^2 \leftrightarrow d_{xy}$ e $d_z^2 \leftrightarrow d_{yz}$, gerando um B_{local} paralelo e outro perpendicular ao B , respectivamente (regra da mão direita), o que alteraria o valor-g deste elétron. A magnitude de Δg é inversamente proporcional à separação energética entre estes orbitais, pois grandes diferenças energéticas entre os orbitais dificultam o movimento eletrônico hipotético.

A forma geral para o valor-g obtido é dada por:

$$g = g_e - n \lambda \Delta E^{-1} \quad (6)$$

onde n é o coeficiente de mistura entre os orbitais envolvidos, e é obtido do chamado “pentágono mágico” (Figura 14), λ é a constante de acoplamento spin-órbita para o átomo livre e que será positiva para átomos com menos de cinco elétrons d e negativa para mais de cinco elétrons d . O valor absoluto de λ depende do estado de

¹ Estes orbitais são designados d_{xy} , d_{xz} , d_z^2 , d_{yz} , e $d_{x^2-y^2}^2$ sendo o orbital d_z^2 coincidente com o eixo z , $d_{x^2-y^2}^2$ coincidente com os eixos x , y e d_{xy} , d_{xz} , d_{yz} coincidentes com a bissetriz dos eixos indicados pelos subscritos.

oxidação do átomo mas aumenta rapidamente com o aumento do número atômico, e ΔE é a separação em energia destes orbitais que pode ser obtida de espectros eletrônicos (Parish, 1990).

FIGURA 14 - “Pentágono mágico” utilizado para a obtenção do coeficiente de mistura (número nas setas) dos pares de orbitais d.

Devido ao fato de λ aumentar e ΔE diminuir com o aumento do número atômico observa-se que radicais livres orgânicos apresentam valores de g próximos ao g_e , enquanto que metais de transição podem apresentar grandes deslocamentos do valor- g em relação ao g_e .

Utilizando a constante de acoplamento spin-órbita e a ΔE obtida de espectros eletrônicos dificilmente se consegue reproduzir os valores de g experimentais obtidos dos espectros de RPE. Para ajustar estes valores experimentais modifica-se a Eq. (6) para:

$$g = g_e - k n \lambda \Delta E^{-1} \quad (7)$$

onde o fator k é sempre menor do que um e inversamente relacionado ao caráter covalente das ligações do complexo. Este caráter covalente deslocaliza o elétron desemparelhado na direção dos ligantes reduzindo assim sua contribuição orbital ao momento magnético total com conseqüente redução de Δg .

2.2.3.3 Anisotropia do fator-g e sistemas rígidos não orientados

Em sistemas químicos o elétron desemparelhado ocupa um orbital que pode ser mais ou menos localizado em um átomo simples ou pode ser grandemente deslocalizado na molécula ou radical. O fator-g reflete a natureza deste orbital inclusive sua simetria. Caso o radical em questão possua uma simetria esférica ou cúbica apenas um valor de g será obtido, independente da orientação deste radical em relação ao campo magnético externo (isotropia). Porém para radicais de menor simetria o fator-g pode variar de acordo com a orientação do orbital contendo o elétron desemparelhado em relação ao campo magnético externo (anisotropia).

Ao analisar-se um mono-cristal, com anisotropia em g , o valor medido deste parâmetro será dependente da orientação dos eixos deste mono-cristal em relação ao B , portanto, três valores característicos, g_x , g_y e g_z , podem ser obtidos e estes valores fornecem informações a respeito dos eixos principais de simetria do orbital contendo o elétron desemparelhado. No caso de simetria axial, $g_x = g_y$ e ambos são designados por $g_{\perp}$, e g_z é designado $g_{\parallel}$ (Goodman e Hall, 1994).

Por outro lado, quando o movimento de rotação aleatório dos átomos ou moléculas atinge taxas consideravelmente maiores do que a frequência de operação do espectrômetro, qualquer anisotropia se anula durante o tempo requerido para excitar-se o sistema. Sendo assim, em qualquer instante o conjunto de átomos ou moléculas terá todas as possíveis orientações em relação ao campo magnético externo e o espectro resultante será “aparentemente” isotrópico e terá apenas um fator-g. É interessante ressaltar que a frequência de operação dos espectrômetros de RPE é na faixa das microondas (GHz) de tal sorte que para a anisotropia ser nula a taxa deste movimento rotacional, dada pelo inverso do tempo de correlação, deve ser

muito elevada. Com isto macromoléculas, ou mesmo íons em meios viscosos, podem apresentar espectros de RPE com anisotropia em sistemas líquidos. Esta característica pode ser utilizada em estudos dinâmicos nos quais se avalia o tempo de correlação da amostra ou de grupamentos químicos.

Em sistemas rígidos não orientados, tais como amostras sólidas na forma de pó e soluções congeladas, todas as possíveis orientações ocorrerão aleatoriamente, mantendo-se, contudo, as posições moleculares. Cada molécula com uma orientação particular tem seu próprio fator-g e o espectro resultante é a soma dos espectros individuais de cada molécula. Para um sistema isotrópico apenas um valor de g será obtido (Figura 15a).

FIGURA 15 - Espectros de RPE de amostras não orientadas (pó ou solução congelada); absorção (superior) e primeira derivada (inferior) sendo: (a) sistema isotrópico; (b) com simetria axial e (c) com simetria rômbrica.

Para o caso da simetria axial, em base puramente estatística, haverá poucas moléculas com o eixo principal de simetria paralelo ao campo magnético externo e muitas moléculas com o eixo principal de simetria perpendicular a ele de modo que a intensidade de absorção do sinal correspondente ao $g_{\perp}$ será máxima (Parisich, 1990). Assim, em primeira derivada, mede-se o $g_{\perp}$ na posição onde a linha de ressonância passa por zero e o $g_{\parallel}$ em um máximo ou mínimo, dependendo se ele for maior ou menor que o $g_{\perp}$, respectivamente (Figura 15b). Já para um centro paramagnético com simetria rômica três valores de g serão observados no espectro (Figura 15c).

Freqüentemente, a determinação dos valores- g diretamente dos espectros é difícil e há a necessidade de simular estes espectros com o auxílio de métodos computacionais.

2.2.3.4 A separação de campo zero (interação fina)

No caso em que íons ou moléculas possuam mais de um elétron desemparelhado próximos ($S > 1/2$) haverá uma interação entre os momentos magnéticos destes elétrons. O campo magnético efetivo experimentado pelos elétrons desemparelhados será a soma do campo magnético aplicado com o campo magnético local gerado pelo(s) spin(s) eletrônico(s) do(s) outro(s) elétron(s) desemparelhado(s). Esta interação magnética, que ocorre via acoplamento spin-órbita, pode remover a degenerescência (provocar a separação de energia entre os estados de spin) mesmo na ausência de campo magnético externo e esta quebra de degenerescência é chamada de separação de campo zero (D). A princípio ela é zero para simetria estritamente cúbica, porém a separação de campo zero ocorre na vasta maioria dos casos (Parish, 1990). Quando D for igual a zero as diferentes transições permitidas

ocorrerão em um mesmo valor de campo magnético externo e apenas uma linha de ressonância será obtida (Figura 16a).

FIGURA 16 - Diagramas de energia e respectivos espectros de RPE para sistemas $S = 5/2$. (a) Em simetria cúbica $D = 0$; (b) em simetria menor que a cúbica com $D \ll h\nu$ e (c) com $D \gg h\nu$ e $E/D = 1/3$, p. ex.: Fe^{3+} em sítio rômico. D é a separação de campo zero, os números sob as linhas de ressonância em (b) são as suas intensidades relativas. Cada par de níveis energéticos formado por $\pm m_s$ é chamado de dubleto de Kramer (spin efetivo de $1/2$) sendo indicados em (c) por K_1, K_2 e K_3 .

Porém, quando D for diferente de zero, os níveis energéticos não mais serão degenerados na ausência do campo magnético externo (Figura 16b) e esta separação

em energia será dada por $D S^2$. Devido a esta separação de campo zero as diversas transições de ressonância magnética não mais coincidirão e uma série de linhas será obtida (estrutura fina do espectro). A intensidade relativa destas linhas será dada por $(S + m_s + 1)(S - m_s)$ quando D for pequeno em relação à $h \nu$ visto que todos os níveis serão populados. Por outro lado quando D for grande em relação à $h \nu$ (Figura 16c) as transições permitidas serão aquelas no mesmo dubleto de Kramer que, devido à mistura entre os diferentes estados de spins, possuem spin efetivo 1/2 (Wickman et al., 1965).

A separação de campo zero pode ser anisotrópica, ou seja, depender da orientação, e é convencionalmente representada por duas constantes independentes, que são os parâmetros de campo cristalino E (distorção rômica) e D (distorção axial). É comum representar estas constantes como $\lambda = E/D$ cujos valores estão restritos a $\lambda \leq 1/3$, assim, no caso de máxima distorção rômica o parâmetro λ será igual a 1/3, para simetria axial $E = 0$ e $D \neq 0$, e para simetria cúbica $D = E = 0$ (Drago, 1992).

2.2.3.5 Espectros de RPE de materiais magneticamente ordenados

A interação entre os momentos magnéticos de íons paramagnéticos muito próximos resulta em um forte acoplamento dipolar. Isto usualmente produz espectros com linhas muito largas, especialmente se houver qualquer não homogeneidade no arranjo espacial destes íons. Este tipo de sinal não fornece muitas informações a respeito das características físicas e químicas da amostra (Goodman e Hall, 1994).

Em substâncias húmicas a interação dipolar entre íons Fe^{3+} , principalmente como contaminantes inorgânicos tais como na forma de óxidos ou hidróxidos, é a

principal responsável pelas linhas largas centradas em $g \cong 2$ freqüentemente observadas em seus espectros, o que dificulta ou mesmo impossibilita a análise deste tipo de material por RPE.

2.2.3.6 Sondas de RPE freqüentemente detectadas em substâncias húmicas

As espécies paramagnéticas freqüentemente detectadas por RPE em substâncias húmicas são: Fe^{3+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , VO^{2+} e radicais livres orgânicos. E ao comparar os parâmetros obtidos dos espectros de RPE com os da literatura é possível inferir sobre o estado de oxidação, a simetria e os ligantes destes íons paramagnéticos dentre outras informações. Estas informações podem ser relacionadas com a estabilidade destes complexos e sua conseqüente disponibilidade para as plantas e potencialidade de liberação no ambiente, assim como avaliar o potencial oxi-redutor das substâncias húmicas. Porém, é também possível, em trabalhos mais elaborados, obter mais informações acerca das ligações entre os átomos, sobre a distribuição do elétron desemparelhado nas moléculas e a respeito do ordenamento dos níveis de energia nos compostos paramagnéticos (Mangrich e Vugman, 1988).

Fe^{3+}

Na crosta terrestre o ferro é o quarto mais abundante de todos os elementos e o primeiro entre os metais de transição. Em conseqüência disto é encontrado em diversos constituintes do ambiente como argilas, matéria orgânica ambiental e em sedimentos orgânicos e inorgânicos em geral, além de seres vivos. O íon Fe^{3+} , cujo isótopo mais abundante (^{56}Fe , 91,72% de abundância natural) possui $I = 0$, tem uma

configuração $3d^5$ e dependendo do campo ligante ao qual está submetido, poderá ser $S = 5/2$, $S = 3/2$ e $S = 1/2$. O Fe^{2+} ($3d^6$, $S = 2$), embora paramagnético, não é observado à temperatura ambiente devido ao T_2 extremamente curto produzindo linhas muito largas. Mesmo na temperatura do He líquido (aproximadamente 4 K) a largura da linha de ressonância desta espécie é usualmente de 50 mT (Drago, 1992).

O estado $S = 5/2$ é o freqüentemente detectado por RPE em substâncias húmicas e por se tratar de um estado S ($L = 0$) não há contribuição orbital para o momento angular total dos elétrons no estado fundamental, e enquanto a simetria for alta não ocorrerá mistura deste com estados excitados resultando que o valor- g esperado será aproximadamente o do elétron livre. Porém, devido a ser uma espécie com cinco elétrons desemparelhados a separação de campo zero pode tornar-se significativa, o que dependerá da simetria do complexo, e com isto temos que Fe^{3+} em simetria cúbica, por exemplo íons hidratados em complexos de esfera externa, apresentará um sinal isotrópico com $g \cong g_e$.

Já em simetria axial a separação de campo zero (D) pode ser muito maior do que a freqüência de operação do espectrômetro ($D \gg h \nu$) resultando em um espectro anisotrópico com $g_{\parallel} \cong g_e$ e $g_{\perp} \cong 6$. Este tipo de sinal, observado em alguns espectros de substâncias húmicas (Senesi, 1990a), pode ser atribuído a íons de Fe^{3+} ligado a quatro átomos de nitrogênio no plano equatorial, como no caso de complexos Fe^{3+} -porfirinas. Esta estrutura pode ter sua origem na clorofila residual incorporada às substâncias húmicas, onde o Fe^{3+} substituiu o íon central de Mg^{2+} (Filip et al., 1985), ou sintetizada por microrganismos do próprio solo (Mangrich et al., 1998).

Finalmente, com máxima distorção rômica, o espectro resultante apresentará um sinal em $g = 4,3$ e outro, de menor intensidade, em $g = 8,9$ (Figura 16c). O sinal

da transição do dubleto K_1 normalmente não é observado à temperatura ambiente devido à baixa população de spins neste dubleto. Linhas de ressonância com fator-g próximo a 4,3 são comuns em espectros de RPE de minerais e de complexos orgânicos de Fe^{3+} . Porém, é importante ressaltar que isto não é devido a uma preferência do Fe^{3+} por ambientes com simetria rômica ou aproximadamente rômica ($\lambda = 1/3$), mas sim devido à alta isotropia da transição $m_s(-3/2) \rightarrow m_s(+3/2)$ nesta condição, visto que os três valores-g (g_x , g_y e g_z) são coincidentes (Figura 16c). Muitas outras transições do Fe^{3+} em sítios com separação de campo zero, porém de maior simetria, apresentam uma alta anisotropia dos seus valores-g e em sistemas não orientados produzem linhas largas, e conseqüentemente de baixa amplitude (Goodman e Hall, 1994).

Outro aspecto importante em relação a este sinal, freqüentemente observado em espectros de RPE de substâncias húmicas, é que devido à: sua similaridade com os mesmos sinais de Fe^{3+} observados em argilas; sua resistência a tratamentos de hidrólise ácida, formação de complexos e redução; e, como muitas vezes, o tratamento de amostras de substâncias húmicas com sais de Fe^{3+} não leva à formação desses centros (McBride, 1978) não se pode excluir a possibilidade dele ser devido aos contaminantes minerais invariavelmente encontrados em substâncias húmicas.

Mn^{2+}

Assim como o Fe^{3+} , o Mn^{2+} também apresenta uma configuração $3d^5$, porém em substâncias húmicas seus complexos normalmente são de alta simetria e, conseqüentemente, a separação de campo zero é pequena sendo de pouca importância. Devido a isto os valores-g de seus complexos são próximos ao g_e . Outra importante diferença é que o isótopo ^{55}Mn , cuja abundância natural é de 100%,

possui $I = 5/2$ resultando em um sexteto cuja constante de interação hiperfina (A) varia de 5 a 10 mT (Parisich, 1990). Em complexos com mesmo número de coordenação o valor de A aumenta quase que linearmente com o aumento do caráter iônico das ligações. Por outro lado, em complexos com ligações cujo caráter iônico é similar, os valores de A são 5 a 10% menores nos complexos tetraédricos em relação aos octaédricos (Title, 1963).

Os valores de A , normalmente obtidos para os complexos de Mn^{2+} com substâncias húmicas, indicam coordenação a átomos de oxigênio em sítios octaédricos sendo que valores entre 9,3 e 9,6 mT ($87 \cdot 10^{-4}$ e $90 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$) são consistentes com complexos de esfera externa (Lakatos et al., 1977) onde o Mn^{2+} mantém sua esfera interna de hidratação, ou seja, o Mn^{2+} solvatado - $[Mn(H_2O)_6]^{2+}$ - é adsorvido principalmente por atração eletrostática (Senesi, 1990a). Já valores de A entre 8,4 e 8,8 mT ($78 \cdot 10^{-4}$ e $82 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$) indicam complexos em esfera interna sendo que os grupos funcionais possivelmente envolvidos seriam o carboxílico, as hidroxilas fenólica e alcoólica, a carbonila e a metoxila (Schnitzer e Khan, 1978). Caso o Mn^{2+} estivesse coordenado a quatro átomos de nitrogênio (Mn-porfirinas) os valores de A seriam menores (7,4 mT ou $69 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$) sendo que não se conhece relato deste tipo de complexo em substâncias húmicas.

Outro aspecto importante da interação hiperfina, pouco explorado na análise de substâncias húmicas por RPE, é a freqüente ocorrência de algumas linhas adicionais entre as linhas do sexteto. Estas linhas adicionais são atribuídas às transições proibidas Δm_s eletrônico e nuclear igual a ± 1 . A intensidade destas linhas adicionais em relação à intensidade das linhas decorrentes das transições permitidas pode ser utilizada na estimativa da separação de campo zero (D) quando $D \ll h \nu$, o

mesmo podendo ser feito utilizando a eventual divisão das linhas do sexteto permitido, principalmente em campo alto (Abragam e Bleaney, 1986).

A análise da largura das linhas do sexteto dos espectros de Mn^{2+} também pode fornecer informações interessantes a respeito da dinâmica dos seus complexos com substâncias húmicas, tais como a rápida troca entre os íons de Mn^{2+} em solução e adsorvidos e eventuais distorções da esfera de coordenação quando da sua adsorção (McBride, 1978).

Em relação a métodos de troca iônica a espectroscopia de RPE tem se mostrada mais sensível, conveniente e rápida para a determinação das constantes de equilíbrio dos complexos de Mn^{2+} com substâncias húmicas (Senesi, 1990a).

VO^{2+}

Os números de oxidação do vanádio são, +2, +3, +4 e +5 sendo que o último é diamagnético e o estado +3, $3d^2$, embora paramagnético, usualmente não é detectado em estruturas octaédricas devido aos curtos tempos de vida produzindo linhas muito largas na temperatura ambiente. Este estado normalmente é detectado a aproximadamente 4 K (He líquido) ou em estruturas tetraédricas. Tanto o estado +2 quanto o +4 são facilmente detectáveis sendo que o estado +2 é instável e é facilmente oxidado ao estado +4. Normalmente o V^{4+} está sob a forma do seu oxidação mais comum, o íon vanadilo (VO^{2+}), em complexos $VO L_4$ axiais (pirâmide de base quadrada, sendo o ligante axial o O do íon vanadilo).

O VO^{2+} é um sistema d^1 com o elétron desemparelhado no orbital d_{xy} , assim as transições eletrônicas possíveis são $d_{xy} \leftrightarrow d_{x^2-y^2}$ e $d_{xy} \leftrightarrow d_{xz}, d_{yz}$, e como este íon possui menos de cinco elétrons d a constante de acoplamento spin-órbita é positiva (248 cm^{-1}), resultando em fatores-g menores que o g_e :

$$g_{//} = 2,0023 - 8 k' 248 / \Delta E(d_{xy} - d_{x^2-y^2}^2); \quad g_{\perp} = 2,0023 - 2 k' 248 / \Delta E(d_{xy} - d_{x^2-y^2}^2)$$

Valores típicos são $1,97 > g_{//} > 1,93$ e $2,00 > g_{\perp} > 1,96$ (Parish, 1990).

O ^{51}V (99,75% de abundância natural) possui $I = 7/2$ e a estrutura hiperfina, com oito linhas, é usualmente observada. A constante de interação hiperfina (A) pode ser anisotrópica com $A_{//}$ sendo sempre maior do que $A_{\perp}$ e quando estão sob a forma de matéria condensada apresentam espectros com dezesseis linhas, oito correspondentes ao espectro paralelo e oito ao espectro perpendicular, em amostra sob a forma de pó, soluções congeladas, materiais mal cristalizados, ou vidros não se distinguem todas as dezesseis linhas porque algumas delas estão superpostas, principalmente na parte central do espectro.

Ambos os parâmetros g e A refletem a natureza dos ligantes do vanádio e há uma alta correlação negativa entre estes parâmetros. Com o aumento da covalência, a energia do estado excitado aumenta e este aumento da separação entre os níveis energéticos dos orbitais d (ΔE) leva a um aumento do valor g aproximando-o do g_e , além disto, como visto na seção 2.2.3.2, o aumento do caráter covalente também reduz Δg . Ao mesmo tempo, com a ligação mais covalente, a deslocalização do elétron desemparelhado reduz a constante de interação hiperfina. Os valores de $g_{//}$ e $A_{//}$, são utilizados para diagnóstico pela maior amplitude de variação em relação aos parâmetros perpendiculares e em solução, onde apenas os valores isotrópicos são obtidos. Neste caso, os valores de g_{iso} apresentam maiores variações do que A_{iso} (Parish, 1990). É possível a comparação de dados obtidos em sistemas rígidos não orientados com aqueles obtidos em solução, para isto basta calcular as médias aritméticas dos parâmetros anisotrópicos, por exemplo: $g_{iso} = \langle g \rangle = 1/3 (2 g_{\perp} + g_{//})$,

porém, na prática, pode haver discrepâncias de 10 a 20% entre este valor médio e o verdadeiro valor isotrópico (Parisch, 1990).

Complexos de VO^{2+} em substâncias húmicas normalmente possuem átomos de oxigênio como ligantes equatoriais e caso este complexo seja de esfera externa obtêm-se valores de $A_{//}$ ligeiramente superiores a 20 mT ($182 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$). Para complexos em esfera interna este valor diminui para valores próximos a 18 mT ($164 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$), e em complexos cujos ligantes sejam átomos de nitrogênio, tais como VO-porfirinas, 17,4 mT ($158 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$) (Lakatos et al., 1977; McBride, 1978). Valores intermediários entre aqueles atribuídos a complexos em esfera interna e externa são comuns em substâncias húmicas. Logo se pode inferir que o VO^{2+} é coordenado a átomos de oxigênio das substâncias húmicas permanecendo, entretanto, parcialmente hidratado. Visto que o valor de $A_{//}$ não varia em função do grau de hidratação da amostra conclui-se também que ele é fortemente imobilizado (McBride, 1978). Embora haja a predominância de relatos de VO^{2+} coordenado a átomos de oxigênio em substâncias húmicas a ocorrência de coordenação com átomos de nitrogênio também já foi relatada (Goodman e Cheshire, 1975; Cheshire et al., 1977).

Cu^{2+}

O Cu^{2+} (d^9) normalmente está coordenado a seis ligantes em sistemas distorcidos com duas ligações mais alongadas que as quatro restantes e com o elétron desemparelhado no orbital $d_{x^2-y^2}$. Assim as transições eletrônicas possíveis são $d_{x^2-y^2} \leftrightarrow d_{xy}$ e $d_{x^2-y^2} \leftrightarrow d_{xz}, d_{yz}$, e como este íon possui mais de cinco elétrons d a constante de acoplamento spin-órbita é negativa (-830 cm^{-1}), resultando em fatores- g maiores que o g_e :

$$g_{//} = 2,0023 + 8 k' 830 / \Delta E(d_{x^2-y^2} - d_{xy}); \quad g_{\perp} = 2,0023 + 2 k' 830 / \Delta E(d_{x^2-y^2} - d_{xz}, d_{yz})$$

Valores típicos são $2,1 > g_{//} > 2,35$ e $2,02 > g_{\perp} > 2,07$ (Parish, 1990). Sendo que, analogamente ao caso do VO^{2+} , o aumento do caráter covalente leva a um aumento de ΔE e diminuição de k e, conseqüentemente, redução de Δg .

O Cu possui dois isótopos com abundância natural significativa, ^{63}Cu (69,09%) e ^{65}Cu (30,91%) sendo que ambos possuem $I = 3/2$, assim espera-se um quarteto para ambos os isótopos e como os momentos magnéticos nucleares são similares, as linhas são próximas e nem sempre é possível distingui-las, principalmente quando elas são largas. Novamente a interação hiperfina pode ser anisotrópica sendo que $A_{//}$ é normalmente sete vezes maior do que $A_{\perp}$ (Parisch, 1990).

O efeito dos ligantes na constante de acoplamento hiperfino (A) para o Cu^{2+} nem sempre é de fácil interpretação, visto que há diversos fatores envolvidos (Parisch, 1990) e esse efeito é diferente do discutido para o Mn^{2+} e VO^{2+} . Isto é devido ao fato que no Cu^{2+} o elétron desemparelhado está localizado no orbital $d_{x^2-y^2}$, que faz ligação σ com os ligantes. Como os elétrons de ligações σ têm considerável caráter s , pois estão em orbitais moleculares ligantes híbridos, quanto maior a densidade eletrônica nestes orbitais moleculares maior será o valor de A . Logo, para o Cu^{2+} , o aumento da covalência das ligações leva a um aumento do valor de A .

O valor- $g_{//}$ diminui com o aumento da intensidade do campo ligante equatorial, assim este parâmetro fornece informações a respeito da força de interação e do tipo de átomo coordenado ao Cu^{2+} no plano equatorial. Em geral o valor- $g_{//}$ diminui na seguinte ordem: oxigênio > nitrogênio > enxofre. Assim, com o aumento do número de átomos de nitrogênio, ao invés de oxigênio, coordenados na posição equatorial, o valor- $g_{//}$ diminui e, embora menos regular, uma tendência oposta

observa-se para o valor de $A_{//}$ (Figura 17). Para o complexo de Cu^{2+} hexahidratado obtêm-se $g_{//} = 2,422$ e $A_{//} = 11,9$ mT (Boyd et al., 1983).

FIGURA 17 - Variações dos parâmetros espectroscópicos $g_{//}$ (a) e $A_{//}$ (b) em função do número de átomos de nitrogênio coordenados ao íon Cu^{2+} no plano equatorial. Dados obtidos da literatura referentes a complexos com substâncias húmicas e compostos modelo: Boyd et al. (1983); Senesi et al. (1985); Senesi (1990a).

Eventualmente em complexos de Cu^{2+} coordenado com átomo(s) de nitrogênio pode-se observar, no sinal perpendicular do Cu^{2+} , um conjunto de linhas separadas por 1 a 3 mT (Senesi et al, 1985; Martin-Neto et al., 1991). Este conjunto de linhas é devido à interação super-hiperfina proveniente da interação do elétron desemparelhado do Cu^{2+} com o núcleo do nitrogênio ligante. O número de linhas da interação super-hiperfina é dado por $2nI + 1$ (seção 2.2.2.5), então, por exemplo,

para o caso de cinco linhas equidistantes n equivale a dois átomos de nitrogênio equivalentes.

Os radicais livres orgânicos

Os processos de transformação da matéria orgânica no ambiente são conectadas com várias reações envolvendo radicais livres e estes podem ser estabilizados em estruturas “spins traps” tais como polifenóis, melaninas e melanoidinas (Jezierski et al., 1998). Estes radicais livres podem ser detectados em substâncias húmicas pela espectroscopia de RPE como um sinal estreito e intenso com g entre 2,0030 e 2,0043. Este sinal é atribuído a semiquinonas possivelmente conjugadas a anéis aromáticos ($g = 2,0041$ para radical 9,10-antraquinona), embora contribuições de radicais metoxibenzênicos, cujo valor- g varia de 2,0035-2,004 (Blois et al., 1961) e radicais associados a nitrogênio não podem ser excluídas (Senesi e Steelink, 1989; Senesi, 1990a). Estruturas aromáticas conjugadas às semiquinonas causam uma parcial deslocalização do elétron livre do oxigênio da semiquinona para os átomos de carbono reduzindo com isto o valor- g (Schnitzer e Skinner, 1969; Riffaldi e Schnitzer, 1972). Entretanto, Cheshire e McPhail (1996) afirmaram que os sinais observados em substâncias húmicas não se parecem com aqueles de monômeros de semiquinonas. Como não há uma atribuição consensual para estes radicais preferiu-se referir a eles apenas como radicais livres orgânicos.

Geralmente os espectros dos radicais livres orgânicos de substâncias húmicas não apresentam estrutura hiperfina, principalmente em amostras sólidas, o que torna impossível qualquer outra descrição da estrutura química destes radicais, porém alguns autores descreveram sinais com estrutura hiperfina resolvida (Senesi, 1990a; Cheshire e McPhail, 1996).

Provavelmente o sinal dos radicais livres orgânicos observado em substâncias húmicas seja devido a mais de uma espécie paramagnética, sendo uma delas mais transiente e envolvida em reações de óxido-redução (Steelink e Tollin, 1962; Alberts et al., 1974; Senesi e Schnitzer, 1977). Oniki e Takahama (1994) reportaram a presença de três tipos de radicais livres orgânicos em amostras de ácidos húmicos e Cheshire e McPhail (1996) observaram pelo menos duas espécies sendo que uma delas apresentava um sinal alargado e sem estrutura e outra com estrutura bem resolvida. A proporção entre estas duas espécies variou de amostra para amostra.

A largura da linha, medida pico a pico no sinal de primeira derivada, dos radicais livres orgânicos detectados em substâncias húmicas geralmente é de 0,2 a 1 mT, sendo menores em solução do que no estado sólido (pó) e geralmente aumenta no sentido: huminas < ácidos húmicos < ácidos fúlvicos. Esta largura de linha, elevada em relação às de compostos orgânicos puros, pode ser devida à estrutura hiperfina e super-hiperfina não resolvida e à sua grande complexidade, onde um vasto conjunto de radicais livres orgânicos ligeiramente diferentes coexistiria apresentando sinais de ressonância próximos, dando como resultado um envelope de linhas de RPE sobrepostas.

Visto que a área sob a curva de absorção de um sinal de RPE é diretamente proporcional ao número de centros paramagnéticos que contribuem para a ressonância, é relativamente simples obter-se a concentração de spins de uma amostra comparando-se a área do seu sinal com a de um padrão cuja concentração de spins seja conhecida. Porém, medidas absolutas da concentração de spins requer o conhecimento de um grande número de fatores, todos os quais são fontes de erro ou ainda podem variar durante o experimento. Então, a concentração de spins é usualmente medida de forma relativa.

A concentração destes radicais livres orgânicos em substâncias húmicas é um importante parâmetro que pode ser obtido por RPE (Senesi, 1990a). Tal parâmetro pode ser usado na estimativa do grau de humificação das substâncias húmicas (Riffaldi e Schnitzer, 1972; Schnitzer e Lévesque, 1979; Senesi, 1990a; Martin-Neto, 1991; Barančíková et al., 1997; Jezierski et al., 1998; Jerzykiewicz et al., 1999; Olk et al., 1999); em estudos do impacto de diferentes sistemas de cultivo do solo (Martin-Neto et al., 1994b); para estimar a reatividade das substâncias húmicas no ambiente (Senesi, 1990a; Martin-Neto et al., 1994a; Sposito et al., 1996); assim como no monitoramento ambiental (Jezierski et al., 1998).

A concentração de radicais livres depende de numerosos fatores laboratoriais tais como: pH; irradiação; hidrólise ácida; metilação; temperatura (Senesi, 1990a); adição de íons metálicos (Jezierski et al., 2000a,b; Novotny e Martin-Neto, 2000, 2002) e de fatores ambientais que atuam na sua produção e estabilização: material de origem; clima (Martin-Neto et al., 1998); poluição (óxidos de enxofre e nitrogênio, metais de transição) (Jezierski et al., 1998); pH; e condição redox (Senesi, 1990a).

A presença de metais paramagnéticos adsorvidos nas substâncias húmicas pode levar à supressão dos sinais de RPE dos radicais livres orgânicos (Jezierski et al., 2000a,b; Novotny e Martin-Neto, 2000, 2002) e este efeito possivelmente está associado a mecanismos de relaxação, no qual o metal paramagnético, na proximidade do radical livre orgânico, pode induzi-lo a relaxar rapidamente impossibilitando a sua detecção ou por uma interação antiferromagnética decorrente da formação de ligações químicas entre estes metais e os radicais livres orgânicos (Novotny e Martin-Neto, 2000, 2002).

2.2.3.7 Outras técnicas experimentais

Visto que a RPE é uma técnica que permite a detecção e análise semi-quantitativa de metais paramagnéticos assim como, em certas situações, inferir sobre os ligantes deste metal (Mangrich e Vugman, 1988; Senesi, 1990a; Martin-Neto et al., 1991) pode-se utilizá-la com a finalidade de monitorar os conteúdos de metais paramagnéticos e sítios de ligação e correlacionar estes dados com os obtidos por outras técnicas, de maneira a inferir sobre o efeito destes metais nos resultados obtidos por estas técnicas assim como as possíveis estruturas envolvidas na formação de complexos destes íons.

Outras técnicas experimentais utilizando RPE envolvem o uso de substâncias “spin-trap” e “spin-labels”. As primeiras “capturam” e estabilizam elétrons desemparelhados formados em reações onde os radicais livres formados são tão efêmeros que não seriam detectados convencionalmente. As segundas são sondas de RPE que são adicionadas a substâncias que não possuem elétrons desemparelhados ou cujo próprio sinal não fornece a informação desejada. Estas sondas de RPE são radicais livres facilmente detectáveis normalmente com estrutura hiperfina ou super-hiperfina sensível ao ambiente em que estão expostas. Ferreira et al. (2001) utilizaram esta técnica para o estudo de possíveis sítios hidrofóbicos em ácidos húmicos.

2.2.4 A ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

2.2.4.1 Introdução

Devido à existência de excelentes livros textos abordando os aspectos teóricos da RMN e de se considerar desnecessário um exaustivo tratamento teórico de aspectos normalmente pouco relevantes para a análise da matéria orgânica do solo por RMN, optou-se por um texto mais geral com ênfase a experimentos padrão de RMN ao invés de técnicas mais elaboradas e freqüentemente de grande complexidade instrumental.

O experimento básico de RMN é a absorção ressonante de radiação radiofrequente (MHz) por núcleos magnéticos ($I \neq 0$) expostos a um campo magnético. Esta técnica, não invasiva, é muito sensível na caracterização da estrutura da matéria (Atkins, 1998). Embora conceitualmente simples, a RMN pode ser muito complexa, especialmente em experimentos multidimensionais.

Métodos modernos de detecção da separação em energia entre estados de spin nuclear são mais sofisticados do que o simples monitoramento da frequência em que a ressonância ocorre. Uma das analogias encontradas para a diferenciação entre o antigo e o novo meio com que se estimula um dado sistema de spins é aquela da detecção das frequências de vibração de um sino. É possível estimular um sino com uma leve vibração cuja frequência vai aumentando gradualmente até que o sino entre em ressonância com este estímulo. Outra alternativa é bater no sino com um martelo, com isto obtém-se um soar que contém todas as frequências que este sino pode emitir. O equivalente em RMN é monitorar a radiação emitida por um sistema de

spins durante o período em que este sistema retorna ao equilíbrio após um estímulo apropriado (Atkins, 1998).

Este estímulo é um pulso curto de radiofrequência (pulso de rf) cuja componente magnética é perpendicular à direção do B e que pode abranger todas as frequências de ressonância do sistema de spins devido ao *Princípio da Incerteza*, pois a uma pequena incerteza temporal corresponde uma grande incerteza energética: $\Delta E \Delta t \approx h$. Após este estímulo na forma de um pulso, os spins nucleares excitados retornarão à condição de equilíbrio emitindo radiação eletromagnética cuja frequência reflete o ambiente químico em que este núcleo está.

Em RMN a separação energética entre os estados de spin frequentemente é expressa em termos da frequência de Larmor (ν_L) dada por: $\nu_L = \gamma B (2\pi)^{-1}$ onde γ é a razão magnetogírica dada por $\gamma = g_n \mu_n 2\pi (h)^{-1}$. Assim, em um equipamento com magneto de 9,4 T os ^1H ($\gamma = 2,675 \cdot 10^8 \text{ T}^{-1} \text{ s}^{-1}$) entrarão em ressonância a cerca de 400 MHz, que é a ν_L neste campo magnético e o modo usual de descrever-se o equipamento (Silverstein et al., 1991), enquanto que os ^{13}C entrarão em ressonância a cerca de 100 MHz pois seus g_n e γ são aproximadamente quatro vezes menores que os dos ^1H .

O elemento carbono, que evidentemente é de grande importância para a química orgânica e conseqüentemente em estudos da matéria orgânica do solo, possui dois isótopos estáveis, o ^{12}C e o ^{13}C , cujas abundâncias naturais são 98,9 e 1,1%, respectivamente. Destes, somente o ^{13}C possui um momento magnético, assim a espectroscopia de RMN do carbono limita-se a este isótopo.

Como o momento magnético do ^{13}C é cerca de quatro vezes menor que o do ^1H sua sensibilidade em experimentos de RMN é menor. Adicionalmente a isto a sua

baixa abundância natural torna a detecção do ^{13}C muito mais difícil, o que é expresso pela sua menor receptividade. Estas relações são dadas por:

$$\text{Sensitividade} = (I + 1) \Gamma^2 \mu_n^3 B^2 \quad \text{Receptividade} = N \gamma^3 I (I + 1)$$

onde N é a abundância natural do nuclídeo em questão. Como os ^1H apresentam a maior sensibilidade e conseqüentemente a maior receptividade em um mesmo B , ele é freqüentemente usado como referência para os demais nuclídeos. Os valores da receptividade e da sensibilidade relativas do ^{13}C e de outros nuclídeos com $I = 1/2$ de interesse para a análise da matéria orgânica do solo por RMN são dados na Tabela 1.

TABELA 1 - Propriedades de alguns nuclídeos utilizados como sondas na análise da matéria orgânica do solo por RMN

Isótopo	Abundância natural (%)	Sensitividade relativa (igual número de núcleos)	Receptividade relativa
^1H	99,9844	1	1
^{13}C	1,108	$1,5894 \cdot 10^{-2}$	$1,7613 \cdot 10^{-4}$
^{15}N	0,365	$1,0410 \cdot 10^{-3}$	$3,8004 \cdot 10^{-6}$
^{31}P	100	$6,6334 \cdot 10^{-2}$	$6,6345 \cdot 10^{-2}$

2.2.4.2 Ângulo dos pulsos de rf e intervalos de relaxação

A aplicação de um pulso de rf (B_1), na direção do eixo- x , a um sistema de spins causa uma deflexão do vetor de magnetização resultante (M) do eixo- z e induz uma magnetização no eixo- y (Figura 18). O ângulo de deflexão em radianos (α) deste M em relação ao eixo- z logo após o pulso é dado por: $\alpha = \gamma B_1 t_p$ onde B_1 é a intensidade da componente magnética deste pulso e t_p a duração do pulso. Assim, para uma dada duração de pulso, este ângulo torna-se igual a 90° e propicia máxima magnetização no plano $x'y'$. Como a detecção é realizada no plano $x'y'$ tem-se a máxima intensidade do sinal com o pulso de 90° .

FIGURA 18 - Deflexão do vetor magnetização líquida (M) por um pulso de rf (B_1) no sistema girante de coordenadas

Para que não haja saturação do sistema de spins é necessário aguardar um certo período de tempo entre o término de um ciclo de uma sequência de pulsos e o início do próximo ciclo para que o M “retorne” ao eixo-z (relaxação spin-rede – T_1). Este tempo de espera é chamado de intervalo de relaxação e para pulsos de 90° ele deve ser no mínimo cinco vezes T_1 .

2.2.4.3 O deslocamento químico

Como já visto na seção 2.2.2.5, B induz um movimento orbital eletrônico que por sua vez gera um B_{local} que é uma importante contribuição ao $B_{efetivo}$ (ambos ao longo da direção z) ao qual o núcleo magnético de interesse está submetido. A habilidade do campo magnético aplicado em gerar esta corrente eletrônica na molécula, e a intensidade do B_{local} resultante experimentado pelo núcleo, depende de detalhes da estrutura eletrônica próxima a este núcleo. Com isto núcleos do mesmo elemento, porém em diferentes ambientes químicos, poderão apresentar diferentes

freqüências de Larmor (Atkins, 1998) e estas diferenças são decorrentes da blindagem do B pelas nuvens eletrônicas dos orbitais moleculares, assim a condição de ressonância é dada por:

$$h\nu = \Delta E = g_n \mu_n (1-\sigma) B = h\nu_L \quad (8)$$

sendo que a ν_L é a freqüência com que os spins nucleares precessionam ao redor do eixo z quando expostos a um campo magnético e depende do $B_{efetivo}$ a que estes spins estão submetidos. Isto leva a uma freqüência de precessão diferente para cada núcleo com diferente constante de blindagem. Quanto maior o $B_{efetivo}$ maior será a ν_L assim núcleos desblindados precessionam a freqüências maiores do que núcleos blindados.

Visto que as diferenças nas razões giromagnéticas γ dos diferentes nuclídeos são muito maiores do que os efeitos derivados de σ , assim sendo, exceto em campos baixos (menores que 1 T), não há problemas na distinção dos sinais de diferentes nuclídeos, isto é, os sinais do ^{13}C e do ^{15}N por exemplo, nunca serão confundidos. Na prática as diferenças são tão grandes que se torna necessário diferentes arranjos instrumentais para estudar diferentes nuclídeos (Drago, 1992).

É comum as freqüências de ressonância serem expressas em termos de uma quantidade empírica chamada de deslocamento químico (δ) que é obtida pela diferença entre as freqüências de ressonância do núcleo em questão (ν) e de um padrão usado como referência (ν_0):

$$\delta = (\nu - \nu_0) \nu_0^{-1} 10^6 \quad (9)$$

o uso do termo “ppm”, em referência à 10^6 , após o valor de δ é desnecessário, porém freqüente.

Exemplos de padrões utilizados são para o ^1H a freqüência de ressonância do ^1H do tetrametilsilano – $\text{Si}(\text{CH}_3)_4$, para o ^{13}C é a freqüência de ressonância do ^{13}C do

mesmo composto e do ^{31}P a ressonância do ^{31}P em solução 85% de H_3PO_4 , a vantagem do uso do δ é que esta escala é independente do campo magnético aplicado (Atkins, 1998).

2.2.4.4 Desacoplamento

Os spins nucleares dos diferentes núcleos magnéticos em uma molécula podem interagir entre si via acoplamento escalar, que é mediado pela densidade eletrônica na molécula, ou via acoplamento dipolar através do espaço que não envolve a densidade eletrônica mas depende da orientação relativa ao B_0 do vetor que une os dois núcleos em interação e da distância entre eles.

O acoplamento escalar spin-spin nuclear leva ao desdobramento das linhas espectrais em multipletos, sendo que o número de linhas é dado pelo número de núcleos magnéticos com os quais ocorre o acoplamento ($2nI + 1$). A separação entre estas linhas é chamada de constante de acoplamento spin-spin (J). Assim, por exemplo, o sinal de ^{13}C -RMN de um grupo metila (CH_3) será um quarteto.

As constantes de acoplamento J e o acoplamento dipolar podem fornecer diversas informações a respeito da amostra em estudo, porém há situações em que o espectro obtido é extremamente complexo e de difícil interpretação, ou alargado, perdendo-se resolução. Nestes casos, torna-se conveniente o desacoplamento dos ^1H de modo que cada núcleo de ^{13}C quimicamente diferente dê origem a um sinal simples ao invés de multipletos.

O desacoplamento envolve a aplicação de um campo de rf adicional (B_2) na frequência de ressonância do spin cuja influência deseja-se remover. Este B_2 faz com que a componente z destes spins oscile rapidamente comparado à interação spin-spin.

Com isto, o tempo médio de permanência do núcleo que está sendo irradiado em cada estado de spin será tão curto que apenas o efeito médio dos estados de spin será efetivo e como resultado ocorrerá uma simplificação do espectro pela eliminação dos multipletos e estreitamento dos sinais (Gil e Geraldês, 1987).

2.2.4.5 Anisotropia do deslocamento químico

Em solução um C quimicamente distinto geralmente apresenta uma linha simples de ressonância quando os ^1H estão desacoplados. A frequência de ressonância, ou deslocamento químico, de uma linha simples é relacionada à distribuição eletrônica ao redor do núcleo responsável pelo sinal de RMN. Frequentemente esta distribuição (ou blindagem) eletrônica ao redor do núcleo não é simétrica, mas devido à rápida rotação molecular que ocorre em solução esta anisotropia é anulada. No estado sólido, por outro lado, geralmente não há esta alta mobilidade e o tensor deslocamento químico descreve a magnitude e direção da blindagem eletrônica. Logo, em sistemas com menor simetria, as diferentes orientações dos vetores, em relação às linhas de força do campo magnético aplicado, resultam em diferentes deslocamentos químicos observáveis. Quando se tem uma amostra na forma de pó todas as orientações possíveis coexistem resultando em um padrão de distribuição aleatória (“powder pattern”).

Para o deslocamento químico o termo $(3/2 \sin^2\theta)$ multiplica o tensor isotrópico enquanto $(3 \cos^2\theta - 1)$ multiplica as demais componentes deste tensor, sendo θ o ângulo formado entre as linhas de força do B e o eixo principal do tensor. Se θ for igual a $54,7^\circ$ (ângulo mágico) $\cos^2\theta = 1/3$ e $\sin^2\theta = 2/3$ e apenas a componente isotrópica será observada e o sólido se comportaria como se estivesse

em solução. A rápida rotação macroscópica da amostra à volta de um eixo orienta, em média, qualquer vetor internuclear paralelamente a este eixo de rotação, logo, girando-se a amostra rapidamente ao redor do ângulo mágico, obtém-se que a orientação média dos vetores internucleares fará um ângulo de $54,7^0$ com as linhas de força do B de forma que o termo anisotrópico da interação dipolar será nulo (Gil e Gerald, 1987). A taxa de rotação deve ser maior do que a anisotropia do deslocamento químico, caso contrário o sinal isotrópico irá desdobrar-se em bandas laterais espaçadas à frequência de rotação. Como a anisotropia do deslocamento químico depende da intensidade do B utilizado quanto maior for este maior deverá ser a velocidade de rotação, por exemplo: em um campo magnético de 1,4 T (15,1 MHz para o ^{13}C) uma anisotropia do deslocamento químico de 170 ppm corresponde a um pouco mais do que 2500 Hz, assim uma taxa de rotação de 2,6 kHz seria suficiente para obter-se um espectro livre de bandas laterais; já em um magneto de 4,7 T (50,3 MHz para o ^{13}C) a taxa de rotação deveria ser de no mínimo 8,6 kHz.

Existem seqüências de pulsos que podem ser utilizadas para eliminar as bandas laterais tal como a TOSS (Total Suppression of Side-bands).

A rotação segundo o ângulo mágico também minimiza a interação dipolar, pois as interações dipolares também são proporcionais a $(1-3\cos^2\theta)$, onde θ é o ângulo formado entre o vetor internuclear dos núcleos em interação e a direção das linhas de força do B , e da mesma forma que para a anisotropia do desvio químico, se $\cos^2\theta$ for igual a 1/3 ($\theta = 54,7^0$), as interações dipolares serão igualadas a zero. Na prática, a taxa de rotação deveria ser superior à taxa de relaxação spin-spin ($1/T_2$), ou seja, para remover as interações ^1H - ^1H ou ^{13}C - ^1H a taxa de rotação deveria ser em torno de 60 kHz o que não é factível rotineiramente sendo então necessário o desacoplamento dos ^1H .

2.2.4.6 A transferência de polarização

Como já visto em 2.2.4.1 núcleos de ^1H e ^{13}C submetidos ao mesmo campo magnético precessionam a diferentes frequências (frequências de Larmor), porém, utilizando diferentes campos de rf (B_1) para cada núcleo, é possível atingir uma situação em que ambos precessionem à mesma frequência nos seus respectivos sistemas girantes de coordenadas. Esta situação é chamada de condição de Hartmann-Hahn onde os núcleos estarão em contato térmico podendo ocorrer transferência de energia entre eles, visto que eles se comportam como núcleos idênticos. Nos experimentos com polarização cruzada (CP-“cross polarization”) ajusta-se uma situação em que os núcleos abundantes (p. ex.: ^1H) estejam em uma situação de não equilíbrio com uma temperatura de spins da ordem de mK, necessitando transferir energia para os núcleos raros (p. ex.: ^{13}C) com os quais eles estão em contato. Com isto ganha-se intensidade do sinal do núcleo raro de até γ_a/γ_b , onde γ_a é a razão magnetogírica do núcleo abundante e γ_b a do raro. No caso do par $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ o ganho é de aproximadamente quatro. Adicionalmente, o tempo de repetição dos experimentos torna-se dependente do tempo de relaxação longitudinal (T_1) do núcleo abundante, que no caso do ^1H é frequentemente menor que do ^{13}C , e logo o tempo total de experimento é drasticamente reduzido.

O processo de transferência de polarização leva um certo tempo característico que depende de diversos fatores, tais como movimentos moleculares e distância entre os núcleos de ^{13}C e ^1H em interação, este tempo é chamado de tempo de polarização cruzada (T_{CH}), e por outro lado, a magnetização dos ^1H , que será transferida para os ^{13}C , não é constante durante o tempo de contato, mas sim diminui exponencialmente a uma taxa dada pelo tempo de relaxação spin-rede dos ^1H no sistema de coordenadas girantes ($T_{1\rho}$). Logo, a magnetização resultante dos ^{13}C é resultado de uma combinação destes dois processos que ocorrem simultaneamente: a diminuição da magnetização dos ^1H

devida à relaxação ($T_{1\rho}$) e a transferência de magnetização para os núcleos de ^{13}C (Figura 19a).

Para que ocorra uma polarização cruzada eficiente, T_{CH} precisa ser muito menor do que $T_{1\rho}$ e, para que os espectros sejam quantitativos, os diferentes grupos químicos devem possuir valores de T_{CH} e $T_{1\rho}$ semelhantes. Normalmente o processo de difusão de spin que ocorre entre os núcleos de ^1H homogeneiza os valores de $T_{1\rho}$, porém isto não ocorre para substâncias húmicas (Figura 19b). Valores típicos de tempo de contato para substâncias húmicas ficam ao redor de 1 ms (Hagaman et al., 1986; Wilson, 1987; Fründ et al., 1994; Preston, 1996).

FIGURA 19 - (a) Cinética da polarização cruzada. (b) Dados experimentais de uma amostra de ácidos húmicos. Alquila corresponde à região espectral de 0 - 45 ppm e carboxila de 158-186 ppm.

A presença de íons paramagnéticos afeta principalmente $T_{1\rho}$, reduzindo-o, e este efeito é maior para os grupos químicos mais próximos ao íon paramagnético. Isto pode levar a uma subestimativa destes grupos, mas, por outro lado, possibilita a identificação dos grupos químicos envolvidos na formação dos complexos destes íons (Pfeffer et al., 1984; Preston et al., 1984, 1989b; Smernik e Oades, 1999, 2000).

Visando o aumento da sensibilidade e resolução dos espectros, utilizam-se campos magnéticos cada vez mais intensos e isto leva à necessidade de girar a

amostra a maiores velocidades porém, quando a velocidade do rotor é comparável à interação dipolar o acoplamento de Hartmann-Hahn é dividido em uma série de picos separados pela frequência de rotação. A intensidade do sinal obtida com a polarização cruzada no máximo destes picos é comparável àquela obtida sob condições estáticas, porém no intervalo entre os picos a intensidade obtida pode até ser nula. Logo, torna-se muito difícil ajustar corretamente as amplitudes dos B_1 para o perfeito acoplamento de Hartmann-Hahn. Como as interações dipolares variam entre os diferentes grupos químicos que se pretende quantificar, devido às diferenças no acoplamento ^{13}C - ^1H e de mobilidade molecular, o efeito da rotação acaba sendo seletivo para os grupos com menor interação dipolar tais como aqueles com maior mobilidade e/ou não protonados (Peersen et al., 1993).

Uma alternativa para minimizar isto é variar a amplitude do B_1 do ^1H ou do ^{13}C durante o tempo de contato da polarização cruzada (Figura 20). Desta forma o B_1 apresenta um gradiente capaz de abranger as diferentes condições de Hartmann-Hahn existentes na amostra. Esta técnica é chamada de polarização cruzada com amplitude variável ou “Variable Amplitude Cross-Polarization” (VACP).

FIGURA 20 - Esquema comparativo do B_1 para a sequência de polarização cruzada (a) e da polarização cruzada com amplitude variável (b)

Na Figura 21 pode-se observar as diferenças entre os espectros obtidos com ^{13}C CP-MAS NMR e ^{13}C VACP-MAS NMR.

FIGURA 21 - Espectros de ^{13}C -RMN no estado sólido adquiridos com as seqüências de pulsos ^{13}C CP-MAS NMR e ^{13}C VACP-MAS NMR a diferentes taxas de rotação (MAS). Amostra de ácidos húmicos extraídos de solo.

2.2.4.7 Aplicação da RMN para a análise da matéria orgânica do solo

A primeira observação do fenômeno de RMN ocorreu em 1945 (Günther, 1995), desde então esta técnica tem mostrado um tremendo desenvolvimento. Após o primeiro experimento em que ela mostrou-se capaz de resolver questões químicas da matéria, ela tornou-se uma das principais técnicas analíticas para os químicos, porém, devido à flexibilidade dos seus métodos experimentais, ela tem sido utilizada

por outros ramos da ciência além da química. A RMN ainda não tem sido amplamente utilizada na ciência do solo provavelmente devido à complexa e heterogênea estrutura física e química deste, apesar disto, em virtude da habilidade da RMN em resolver a estrutura microscópica e macroscópica da matéria orgânica, inorgânica e biológica, é muito provável que também na ciência do solo a RMN possa trazer, e já vem trazendo, valiosas informações que levem à melhor compreensão da estrutura química do solo e dos processos que nele ocorrem (Veeman, 1997).

As primeiras tentativas de uso da espectroscopia de RMN para a caracterização estrutural das substâncias húmicas foram reportadas por Barton e Schnitzer (1963) e Neyroud e Schnitzer (1972). Gonzalez-Vila et al. (1976) usaram a espectroscopia de ^{13}C RMN para estudar as características estruturais de ácidos húmicos extraídos de solos. Espectros de ^{13}C CP-MAS NMR de solo inteiro tem sido reportado por Wilson et al. (1981a) e desde então a RMN no estado sólido tem sido a técnica mais utilizada para estudos estruturais da matéria orgânica ambiental (Newman et al., 1980; Newman e Tate, 1984; Wilson, 1987, 1990; Preston, 1996; Olk et al., 1995; Schmidt et al., 1997; Hu et al., 2000).

Quando disponível, a técnica de RMN tem virtualmente substituído a espectroscopia no infravermelho. Porém, cientistas do solo e espectroscopistas têm diferentes expectativas em relação à RMN. Após anos de investigação química, tem-se aceito que a matéria orgânica ambiental pode apresentar quase todo arranjo químico possível, por isto alguns cientistas do solo já estão satisfeitos se um espectro de RMN fornecer-lhes informações semi-quantitativas de grupos aromáticos, alifáticos e carboxílicos. Por outro lado, poucos espectroscopistas sentem-se atraídos por estes resultados e podem se desinteressar pelo estudo desses materiais. Para a

obtenção de resultados mais interessantes para ambas as partes, um diálogo necessita ser estabelecido. Este diálogo é essencial, pois até os ajustes padrões para a aquisição de espectros de RMN da matéria orgânica ambiental são controversos (Dudley e Fyfe, 1982; Preston e Blackwell, 1985; Fründ e Lüdemann, 1989; Kinchesh et al., 1995; Conte et al., 1997; Hemminga e Buurman, 1997; Smernik e Oades, 2000).

A técnica de ^{13}C CP-MAS NMR só pode ser aplicada a amostras sólidas. Esta técnica apresenta a vantagem de poder ser utilizada para a análise da matéria orgânica sem a necessidade de extraí-la do solo, neste caso é assumido que o espectro obtido representa a totalidade da matéria orgânica como ela ocorre no solo, porém espectros deste tipo são significativamente diferentes daqueles da matéria orgânica extraída, especialmente pelo alargamento das linhas e grande redução da relação sinal/ruído devido à presença de grandes quantidades de íons paramagnéticos (especialmente Fe^{3+} e Mn^{2+}) nas amostras intactas. Conseqüentemente, uma grande parte da matéria orgânica do solo pode ser “obscurecida” por íons paramagnéticos, e a fração obscurecida pode ser exatamente a matéria orgânica ligada aos íons paramagnéticos (Hemminga e Buurman, 1997), ou seja ser exatamente a fração mais reativa desta matéria orgânica.

Outro problema semelhante seria que em complexos organominerais parte da matéria orgânica pode não ser detectada por RMN e esta fração “invisível” pode ser a matéria orgânica mais humificada ligada à fração argila do solo (Hemminga e Buurman, 1997). Novamente esta fração não detectável tem uma grande importância agronômica e ambiental. Estes problemas podem ser minimizados pelo pré-tratamentos das amostras de solo com ditionito para remoção do Fe^{3+} por redução, o que nem sempre é eficiente (Preston et al., 1994). Mas uma combinação de redução por ditionito seguido por troca com SnCl_2 pode ser suficiente (Arshad et al., 1988) e

no caso de complexos organominerais uma possível solução seria a remoção dos silicatos por ácido fluorídrico, o que tem se mostrado eficiente também para a remoção dos óxidos de ferro (Dai e Johnson, 1999). Porém, estes tratamentos devem ser efetuados com cautela, pois pode haver importantes alterações químicas da matéria orgânica do solo.

2.2.4.7.1 Interpretação dos espectros de ^{13}C -RMN das substâncias húmicas

Provavelmente não se elucide a “estrutura” das substâncias húmicas por RMN, mesmo porque atualmente não se acredite em uma estrutura única para estes compostos (Piccolo, 2000, 2001). Porém, a espectroscopia de ^{13}C RMN pode ser utilizada para caracterizar a matéria orgânica do solo e acompanhar a sua decomposição visto que os diversos compostos que dela fazem parte possuem diferentes taxas de mineralização e alguns compostos sintetizados pelos microorganismos do solo também podem ser detectados por ^{13}C RMN.

A caracterização das substâncias húmicas em termos da sua aromaticidade, definida como a porcentagem da área do espectro de ^{13}C RMN na região dos grupos aromáticos (110-145 ou 110-160 ppm) em relação à área total do espectro, excetuando-se as áreas do C carboxílico e carbonílico, (Hatcher et al., 1981) e relacionando este valor com o grau de humificação das substâncias húmicas, como é comum na literatura (Inbar et al., 1989; Barančíková et al., 1997), pode não ser adequado visto que materiais não decompostos, tais como lignina e tanino, apresentam grupos aromáticos. Além disto, durante os processos de transformação da matéria orgânica do solo a razão entre as áreas atribuídas aos grupos aromáticos oxigenados em relação aos aromáticos diminui (Guggenberger et al., 1994), e grupos

recalcitrantes ou de síntese microbiana, que se acumulam durante a decomposição da matéria orgânica do solo, tais como C alquila, contribuem para a região alifática do espectro de ^{13}C RMN. Logo, é possível ter um material pouco humificado, porém com alta aromaticidade.

Portanto, faz-se necessário conhecer as transformações ocorridas com a matéria orgânica do solo durante o processo de humificação antes da interpretação dos resultados analíticos. Ao saber-se quais as porções da matéria orgânica do solo que são mais lábeis e quais são mais resistentes ou acumulam-se durante a humificação, relações entre estas diferentes porções podem ser obtidas, tornando a interpretação dos resultados de ^{13}C RMN mais compreensível. Neste texto, humificação é entendida como a degradação de compostos lábeis e acúmulo de material quimicamente recalcitrante, logo, aquele material que é preservado no solo por proteção física não é considerado humificado. A seguir será apresentada uma breve revisão bibliográfica a respeito das alterações sofridas pela matéria orgânica durante o processo de humificação.

Durante o processo de degradação oxidativa da lignina observa-se uma diminuição na intensidade dos sinais atribuídos a grupos aromáticos oxigenados (145-160 ppm) e metoxílicos (50-62 ppm) (Guggenberger et al., 1994). A degradação dos anéis aromáticos da lignina leva à diminuição do conteúdo dos grupos aromáticos oxigenados e do pico atribuído a grupos aromáticos desse material (112-120 ppm), com a concomitante conversão dos picos aromáticos a um pico simples e largo em 132 ppm atribuídos a C aromáticos C-substituídos (Preston, 1996). Kögel-Knabner et al. (1991) afirmaram não ser conhecida uma via metabólica que leve à perda de oxigênio de grupos aromáticos, logo, o aumento de anéis

aromáticos C-substituídos encontrados em estruturas aromáticas recalcitrantes devem ter uma origem diferente da lignina (Guggenberger et al., 1994).

Outra região do espectro de ^{13}C CP-MAS NMR que apresenta diminuição de intensidade durante o processo de humificação é aquela atribuída a grupos alifáticos oxigenados (50-110 ppm) (Senesi et al., 1996a; Kögel-Knabner et al., 1991; Guggenberger et al., 1994; Preston, 1996) visto que nesta região ocorrem os sinais atribuídos a compostos de fácil degradação microbiana, tais como aminoácidos (53 ppm), metoxila da lignina (58 ppm) (Catroux e Schnitzer, 1987) e carboidratos da celulose e hemicelulose (picos a 64, 74, 85 e 105 ppm) (Guggenberger et al., 1994).

A degradação microbiana da matéria orgânica do solo leva ao acúmulo de estruturas parafínicas (C alquila – 0-50 ppm), quer seja aquela de origem vegetal (cutina e suberina) que são resistentes à degradação microbiana (Baldock et al., 1992; Preston, 1996) ou aquela da neo-síntese microbiana (Baldock et al., 1990).

Quanto ao aspecto geral dos espectros de ^{13}C -RMN, em função do aumento da humificação, observa-se um alargamento dos picos de ressonância com perda de resolução devido à alta complexidade estrutural (Preston et al., 1994). O pico atribuído ao C alquila de cadeia longa (30 ppm), de origem vegetal e microbiana, diminui de intensidade e mostra-se alargado. Já a modificação dos anéis aromáticos da lignina se caracteriza por uma diminuição dos grupos aromáticos oxigenados e aromáticos (112-120 ppm), resultando que toda a região atribuída a grupos aromáticos passa a ter um pico simples e alargado em 132 ppm (Preston, 1996).

Logo, de maneira geral, a região alifática oxigenada (50-110 ppm) da matéria orgânica do solo é lábil pois nesta região do espectro de ^{13}C RMN há contribuições importantes de carboidratos da celulose (O-alquila e di-O-alquila – 62-112 ppm),

material protéico e lignina (metoxila e/ou C protéico – 50-62 ppm). Na região dos aromáticos, por sua vez, os sinais na região de 145-160 ppm (fenólico) e 112-124 ppm (aromático) podem ser considerados como grupos lábeis ou pouco decompostos pois ambos podem ser atribuídos à lignina. Por outro lado, os sinais atribuídos a CH alifático (0-50 ppm) e a região alargada entre 124 e 145 ppm, atribuída a C aromático alterado, podem ser consideradas como estruturas recalcitrantes ou de materiais decompostos.

2.2.4.7.2 A técnica de ^{13}C CP-MAS NMR com desacoplamento defasado

Técnicas que simplifiquem os espectros de RMN são importantes na análise de moléculas complexas. Na técnica de desacoplamento defasado (DD) acrescenta-se na seqüência de pulsos de CP-MAS convencional um período em que o desacoplador fica desligado de forma a provocar um alargamento seletivo, por interação dipolar, dos sinais de C que possuem forte acoplamento dipolar com o H.

A interação dipolar é inversamente proporcional a r^3 , onde r é a distância internuclear. Assim, C ligados diretamente a H ($r \cong 0,11$ nm) apresentam acoplamento muito maior do que C com H somente na vizinhança ($r > 0,2$ nm) e esta diferença pode ser utilizada para diferenciar estes C. Entretanto, movimentos moleculares podem reduzir a intensidade do acoplamento dipolar e grupos com rápida rotação intramolecular, tais como CH_3 , podem não ter seus sinais alargados (Opella et al., 1979). Assim, a técnica de DD suprime seletivamente sinais de C protonados em estruturas com menor mobilidade. Este tempo de espera com o desacoplador desligado pode ser variado, normalmente entre 20 e 120 μs , visando otimizar os sinais de interesse.

Adicionalmente, a técnica de ^{13}C CP-MAS NMR apresenta limitações na análise quantitativa dos espectros devido às variações na eficiência de polarização entre os C em diferentes ambientes químicos (Preston, 1996). Logo, o grau de aromaticidade medido por ^{13}C -RMN, da forma freqüentemente utilizada na literatura, pode estar sendo subestimada por não detectar corretamente os C aromáticos em estruturas condensadas. A técnica de DD, por sua vez, privilegia C não protonados e móveis (Opella et al., 1979), assim os C com acoplamento dipolar fraco, tais como aqueles não protonados de estruturas aromáticas condensadas, são facilmente detectados por esta técnica (Colnago et al., 1997; Saab et al., 1999) e estes dados podem ser utilizados para estimar-se o grau de humificação das substâncias húmicas.

2.3 ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA DE ÁCIDOS HÚMICOS

2.3.1 CONCEITOS BÁSICOS

Luminescência é a propriedade que numerosas substâncias têm de emitir luz sob o efeito de uma excitação que pode ser mecânica (triboluminescência), térmica (termoluminescência ou crioluminescência), elétrica (eletroluminescência), química (quimioluminescência), biológica (bioluminescência), ou ainda luminosa, causada por radiação ultravioleta ou na região do visível (fotoluminescência). Sendo fluorescência se o fenômeno for instantâneo ou fosforescência se ocorrer um lapso de tempo entre a excitação e a emissão. Estes dois fenômenos serão discutidos em detalhes posteriormente.

As moléculas apresentam diferentes níveis energéticos e podem sofrer transições entre estes níveis pela absorção ou emissão de um quantum discreto de luz com energia igual à separação entre os níveis. As energias necessárias para alterar a distribuição eletrônica de moléculas são da ordem de diversos eletronsvolts. Logo, os fótons absorvidos ou emitidos quando tais alterações ocorrem estão nas regiões do visível e ultravioleta do espectro eletromagnético (Atkins, 1998).

Se a energia absorvida por uma molécula não for suficiente para ionizá-la ou dissociá-la, esta molécula permanecerá no estado excitado por um determinado tempo, chamado de tempo de vida do estado excitado. Para retornar ao estado fundamental a energia absorvida deve ser dissipada, o que normalmente ocorre por decaimentos não radiativos em que o excesso de energia é transferido na forma de vibrações, rotações e translações. Esta degradação térmica converte a energia de excitação em movimento térmico do ambiente “aquecendo-o” (Atkins, 1998). Porém, quando o descarte de energia pela molécula é feito pela emissão de um fóton temos um decaimento radiativo que é chamado de fotoluminescência.

A Figura 22 mostra a seqüência de passos envolvidos na fluorescência. A absorção de um fóton provoca uma transição eletrônica para o primeiro estado excitado ($S_0 \rightarrow S_1^*$). A molécula excitada é sujeita a colisões com as demais moléculas das redondezas dissipando, não radiativamente, parte da energia absorvida. Com isto o elétron excitado “desce” os níveis vibracionais ($\dots \rightarrow V_3 \rightarrow V_2 \rightarrow \dots$) até o nível vibracional de menor energia (V_1) do estado molecular eletronicamente excitado (S_1^*). Nesta condição, as moléculas das redondezas não são capazes de aceitar a grande diferença de energia que separa os estados S_1^* e S_0 e assim a molécula emite esta energia espontaneamente, na forma de fluorescência, para retornar ao seu estado fundamental (Atkins, 1998).

Onde: S_0 é o estado fundamental; S_1^* é o primeiro estado excitado e V_1 , V_2 , V_3 são os estados vibracionais do S_1^* .

FIGURA 22 - Diagrama energético do fenômeno de fluorescência.

A fluorescência observada normalmente apresenta uma simetria especular em relação ao espectro de absorção (regra de Levshin) e é a fluorescência de Stokes na qual os fótons emitidos possuem maior comprimento de onda daqueles que foram absorvidos na formação do estado excitado (deslocamento de Stokes). Isto ocorre quando alguma energia vibracional é descartada durante o tempo de vida do estado excitado (Senesi, 1990b) na forma de decaimento não radiativo (Figura 22). Este deslocamento, normalmente, fica em torno de 50 a 70 nm, porém quando a absorção de radiação pela molécula é acompanhada de mudanças angulares ou das distâncias interatômicas o deslocamento de Stokes pode ocorrer no intervalo de 150 a 250 nm.

Os principais processos que competem com a fluorescência são (Senesi, 1990b): conversão interna ou desativação colisional; cruzamento entre sistemas; e processos de fotodecomposição. A conversão interna resulta em um mecanismo não radiativo para a relaxação do estado excitado. Em geral, fatores que aumentam a interação das moléculas com seu meio (p. ex: solvatação, temperatura, flexibilidade molecular), aceleram a taxa de conversão interna por desativação colisional.

A fotodecomposição pode ocorrer, pois embora o tempo de vida do estado excitado seja curto, normalmente na ordem de nanossegundos, podem ocorrer reações químicas entre a espécie excitada e o solvente ou outras espécies em solução. Isto causa uma alteração com o passar do tempo na concentração das moléculas fluorescentes. Quanto maior a energia do estado excitado, ou seja, maior a diferença entre o estado fundamental e o primeiro estado excitado, maior será a taxa de fotodecomposição. Desta forma pode-se reduzi-la aumentando-se o comprimento de onda da radiação incidente (comprimento de onda de excitação). Outra alternativa é reduzir a intensidade da fonte de luz cujo número de espécies excitadas depende, porém isto também diminui a intensidade de fluorescência. O cruzamento entre sistemas envolve a mudança do estado de spin da molécula e será discutido à seguir.

Na fosforescência os primeiros passos são os mesmos da fluorescência (Figura 23), porém a presença de um estado excitado tripleto é decisiva.

Onde: S_0 é o estado singlete fundamental; S_1^* e T_1^* são os primeiros estados excitados singlete e tripleto, respectivamente.

FIGURA 23 - Diagrama energético do fenômeno de fosforescência.

No estado fundamental, na maior parte das moléculas, os elétrons ocupam o mesmo orbital, tendo spins antiparalelos ($\downarrow\uparrow$ - emparelhados). Com isto o spin total S será zero ($-1/2 + 1/2 = 0$) e a multiplicidade, dada por $|2S| + 1$, será 1. Tais estados são chamados de singlete. Quando os spins estão em orbitais diferentes e são paralelos ($\uparrow\uparrow$ ou $\downarrow\downarrow$), o spin total será $+1$ ou -1 com multiplicidade igual a 3 (estado tripleto). Os estados singlete e tripleto compartilham uma geometria comum no ponto onde as suas curvas de energia potencial se intersectam. Assim, se houver um mecanismo que desemparelhe dois spins eletrônicos (por exemplo: converta $\downarrow\uparrow$ em $\uparrow\uparrow$) a molécula pode sofrer um cruzamento entre sistemas e tornar-se um estado tripleto (no diagrama da Figura 23 é o que ocorre no passo $S_1^* \rightarrow T_1^*$). Estas transições podem ocorrer na presença de acoplamento spin-órbita. Portanto pode-se esperar que o cruzamento entre sistemas seja importante em moléculas com átomos moderadamente pesados, tais como enxofre, visto que estes possuem um maior acoplamento spin-órbita (Atkins, 1998).

Se uma molécula excitada sofre este tipo de transição, ela continua a descartar sua energia localmente, porém agora ela segue “descendo” os níveis vibracionais do estado tripleto, que possuem menor energia que o estado singlete correspondente (regra de Hund). Ao atingir o nível vibracional de menor energia do estado molecular eletronicamente excitado (T_1^*) a transição para o estado singlete fundamental a princípio não seria permitida, pois viola uma regra de seleção ($\Delta S = 0$, ou seja não pode haver variação no spin total da molécula). Porém o elevado acoplamento spin-órbita, responsável pelo cruzamento entre sistemas, acaba por quebrar também esta regra de seleção de tal forma que a molécula emite fracamente e esta emissão pode perdurar por horas após a formação do estado excitado (Atkins, 1998).

2.3.2 INTENSIDADE DA FLUORESCÊNCIA EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO

A intensidade da fluorescência é proporcional ao número de estados excitados que por sua vez depende da concentração de espécies fluorescentes e da eficiência quântica da fluorescência:

$$I_f = I_0 \Phi_f 10^{-c(d_1 \varepsilon_{exc} + d_2 \varepsilon_{em})} (1 - 10^{-cd_3 \varepsilon_{exc}}) \quad (10)$$

onde I_f é a intensidade da fluorescência, I_0 é a intensidade da radiação incidente (radiação de excitação), Φ_f é a eficiência quântica, c é a concentração molar da espécie fluorescente, d_1 , d_2 e d_3 são, respectivamente, os caminhos óticos: até a região de detecção; da região de detecção até o limite da cubeta; e da própria região de detecção. ε_{exc} e ε_{em} são as absortividades molares nos comprimentos de onda da excitação e da emissão, respectivamente.

O primeiro termo exponencial da Eq. (10) representa o efeito de filtro interno onde ocorre a absorção da radiação incidente no decorrer do caminho ótico até a região de detecção e a absorção da radiação emitida no decorrer do caminho ótico compreendido entre a região de detecção até o detector. Assim temos que a intensidade de fluorescência detectada em função da concentração da espécie fluorescente passa por um máximo (Figura 24).

FIGURA 24 - Intensidade de fluorescência em função da concentração de ácidos húmicos. Emissão a 500 nm com excitação em 240 nm

2.3.3 FLUORESCÊNCIA DE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS

O uso da espectroscopia de fluorescência, como um meio não invasivo, de alta sensibilidade e relativamente simples, para o estudo de alguns aspectos moleculares e quantitativos da estrutura e funcionalidade das substâncias húmicas e sua interação com íons metálicos e compostos orgânicos tem recebido grande atenção por parte da comunidade científica (Senesi, 1990b; Senesi et al., 1991; Spark e Swift, 1994; Zsolnay et al., 1998; Kalbitz et al., 1999; Milori et al., 1999; Piana e Zahir, 2000 e diversos artigos apresentados no 10th International Meeting of the International Humic Substances Society realizado em Toulouse-França, tais como: Alberts et al., 2000; Ewald et al., 2000; Milori et al., 2000; Saison et al., 2000; Takács et al., 2000). Esta técnica tem sido aplicada principalmente no estudo de

substâncias húmicas aquáticas, especialmente ácidos fúlvicos, entretanto com materiais de origem terrestre também tem se mostrada promissora (Senesi et al. 1991; Milori et al. 1999, 2000; Piana e Zahir, 2000).

Embora estruturas fluorescentes pareçam constituir a menor parte dos constituintes das substâncias húmicas a fluorescência intrínseca destas pode fornecer informações a respeito da sua estrutura, conformação e heterogeneidade assim como de aspectos dinâmicos e quantitativos relacionados às interações intra e intermoleculares (Senesi, 1990b; Piana e Zahir, 2000).

2.3.3.1 Fluorescência e estrutura molecular

Como já discutido, o fenômeno de fluorescência é o decaimento radiativo resultante do retorno de um elétron excitado para seu estado fundamental, logo há a necessidade de que a molécula de interesse esteja no estado excitado. Transições típicas deste tipo envolvem a promoção de elétrons não ligantes (n) ou ligantes π para orbitais antiligantes π^* . Estes processos são altamente prováveis em sistemas moleculares contendo átomos com pares de elétrons não compartilhados, tais como oxigênio e nitrogênio e em estruturas aromáticas e/ou sistemas alifáticos conjugados com insaturações com alto grau de ressonância, isto é, deslocalização eletrônica, como é o caso das substâncias húmicas (Senesi et al., 1991).

O aumento da extensão do sistema eletrônico π (Ewald et al. 1988; Senesi, 1990b; Belin et al., 1993; Zsolnay et al., 1998; Piana e Zahir, 2000) e a presença de átomos de oxigênio e nitrogênio na estrutura das substâncias húmicas (Senesi et al., 1991) tem o efeito de diminuir a separação energética entre o primeiro estado excitado e o estado fundamental. Logo a energia do fóton emitido será menor,

deslocando o comprimento de onda da emissão fluorescente para valores maiores, o mesmo ocorrendo com substituintes contendo grupos carbonila, hidroxila e amino (Senesi, 1990b). A presença de grupos carbonila ou carboxila leva a uma diminuição da intensidade da fluorescência (Senesi et al., 1991).

Substituições heteroatômicas afetam grandemente a fluorescência de compostos aromáticos. Por exemplo, substituições com grupos aceitadores de elétrons usualmente diminuem a intensidade da fluorescência enquanto que substituições com grupos doadores a aumentam (Senesi et al., 1991).

Átomos de elevado número atômico incorporados à estrutura fluorescente diminuem a eficiência da fluorescência por causar uma grande perturbação do spin eletrônico e assim aumentam a taxa de cruzamento entre sistemas. Isto é o que ocorre com as substâncias húmicas quando ocorre a substituição por halogênios e coordenação de íons de elevado número atômico, especialmente quando o íon é paramagnético (Piana e Zahir, 2000).

O aumento da rigidez estrutural tem o efeito de reduzir o grau de interação da molécula fluorescente com seu meio, com isto ocorre uma diminuição da taxa de conversão interna e conseqüentemente um aumento da intensidade de fluorescência (Senesi, 1990b).

A intensidade da fluorescência diminui com o aumento do tamanho molecular (Levesque, 1972; Hall e Lee, 1974; Senesi, 1990b; Spark e Swift, 1994; Alberts et al., 2000) ocorrendo um deslocamento do pico de emissão para o vermelho, ou seja, deslocamento para comprimentos de onda maiores (Ewald et al., 1988; Korshin e Violleau, 2000).

Assim, a extensão de sistemas eletrônicos π , o nível de substituição heteroatômica e o tipo e número de grupos substituintes dos anéis aromáticos afetam

fortemente a intensidade e o comprimento de onda da emissão fluorescente das substâncias húmicas. Com isto o comportamento da fluorescência de uma molécula resulta de um efeito cumulativo e muitas vezes interdependente de diferentes aspectos estruturais da molécula, além de que diferentes focos emissores de fluorescência (fluoróforos) contribuem para o espectro resultante.

A bem conhecida heterogeneidade das substâncias húmicas fornece, portanto, espectros de fluorescência que podem ser utilizados como critério diagnóstico válido para se distinguirem aspectos baseados na sua natureza, origem e gênese. Por outro lado, esta mesma complexidade representa um obstáculo, provavelmente intransponível, para a identificação de componentes estruturais individuais responsáveis pela fluorescência (Senesi et al., 1991).

2.3.3.2 Efeito do meio na fluorescência

O aumento da temperatura aumenta a taxa de colisão entre as moléculas excitadas em solução e isto aumenta a taxa de conversão interna reduzindo a intensidade da fluorescência (Senesi, 1990b).

A fluorescência observada em solução depende muito da interação soluto-solvente sendo a característica mais importante do solvente a sua polaridade que pode alterar a posição dos picos de fluorescência. Isto decorre do fato que a interação eletrostática entre os dipólos do soluto e do solvente pode estabilizar os estados fundamental ou excitado da molécula mudando com isto o comprimento de onda da emissão fluorescente. Outro fator importante em relação ao solvente é sua viscosidade, pois aumentando-a ocorre uma redução da taxa de colisão entre as moléculas e logo da taxa de conversão interna, aumentando com isto a intensidade da

fluorescência. Já a presença de átomos pesados na solução pode reduzir a intensidade da fluorescência (Senesi, 1990b).

A ocorrência de ligações de hidrogênio com o solvente tende a diminuir a intensidade da fluorescência por aumentar a interação soluto-solvente e logo a taxa de conversão interna. Solventes hábeis em formarem ligações de hidrogênio com o soluto normalmente aumentam o deslocamento de Stokes, além disto, este tipo de solvente estabiliza os elétrons não ligantes de heteroátomos e dependendo se o grau de estabilização for maior para o estado fundamental ou excitado ocorrerá um deslocamento do pico de fluorescência similarmente ao que ocorre com a polaridade do solvente (Senesi, 1990b).

Devido ao fato que a distribuição eletrônica de uma molécula excitada é diferente daquela no estado fundamental, sua acidez, caso possua grupos ácidos ou básicos, também se altera, de tal sorte que, durante o tempo de vida do estado excitado, rápidas reações de transferências de prótons possam ocorrer, dependendo do pH do meio, alterando com isto o comportamento fluorescente da molécula. Portanto a fluorescência de substâncias húmicas é muito sensível ao pH do meio (Ghosh e Schnitzer, 1980; Miano et al., 1988; Spark e Swift, 1994; Zsolnay et al., 1998).

Como a fluorescência depende do grau de conjugação da molécula, e a ocorrência de ligações de hidrogênio intramoleculares pode aumentar ou diminuir a conjugação de grupos vizinhos, a intensidade da fluorescência pode variar com a ocorrência deste tipo de ligação em função de variações da concentração de eletrólitos e do pH do meio (Spark e Swift, 1994).

A maioria dos espectrômetros de fluorescência detecta a fluorescência somente numa região estreita no centro da cubeta. Devido a isto a presença de um

soluto que absorva a radiação de excitação, ou a de emissão, ou mesmo altas concentrações da molécula fluorescente, provoca um efeito de filtro interno, ou seja, estes solutos atenuam a radiação incidente no decorrer do caminho ótico até a região de detecção, ou absorvem a emitida, de tal forma que a fluorescência medida é menor do que aquela efetivamente gerada (Senesi, 1990b; Spark e Swift, 1994). O efeito de filtro interno pode: ser evitado, escolhendo-se um comprimento de onda de excitação adequado ou diluindo-se a amostra ou o soluto interferente; ser reduzido, detectando-se a fluorescência próxima à parte frontal da cubeta; e ser compensado, adicionando-se padrões ou utilizando um fator de correção adequado (Senesi, 1990b).

Uma molécula eletronicamente excitada pode perder sua energia pela interação com outros solutos sendo assim sua fluorescência extinta (“quenching”). O “quenching” é dito estático quando o soluto interage com a molécula fluorescente no seu estado fundamental e dinâmico quando a interação é com a espécie excitada. “Quenchers” freqüentemente encontrados são íons metálicos, mesmo que eles não formem complexos com a molécula fluorescente em seu estado fundamental. O mecanismo mais comum para estes casos é o aumento da taxa de cruzamento entre sistemas sendo que íons paramagnéticos são “quenchers” mais eficientes do que os íons diamagnéticos (Senesi, 1990b; Piana e Zahir, 2000).

3 AMOSTRAS UTILIZADAS

3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Amostras de solo foram coletadas de um experimento instalado no Centro Experimental de Campinas, do Instituto Agronômico, em latossolo roxo distrófico, muito argiloso, unidade Barão Geraldo (Typic Haplortox). A coleta das amostras foi em abril de 1998, sendo que o experimento teve início no verão de 1983/1984. O delineamento experimental adotado foi o de blocos ao acaso, com dois blocos.

Os tipos de preparo do solo estudados foram: plantio convencional com o preparo primário do solo efetuado com arado reversível de discos lisos (3/28”), seguido de duas passadas de grade niveladora de arrasto (32/16”); cultivo mínimo com preparo primário do solo utilizando arado escarificador tipo Jumbo de sete hastes, com espaçamento entre sulcos de 33 cm e profundidade de preparo de 30 cm, seguido de duas gradagens niveladoras; e plantio direto.

A rotação de culturas utilizada foi: milho/soja (verão) e aveia preta/crotalária (inverno). A cultura da soja recebeu 89,6 kg ha⁻¹ de P₂O₅ e 48,8 kg ha⁻¹ de K₂O e a de milho 9 kg ha⁻¹ de N; 44 kg ha⁻¹ de P₂O₅ e 44 kg ha⁻¹ de K₂O com 90 kg ha⁻¹ de N em cobertura. As culturas de inverno receberam 6 kg ha⁻¹ de N; 30 kg ha⁻¹ de P₂O₅ e 30 kg ha⁻¹ de K₂O. A aveia foi colhida e a crotalária roçada no florescimento.

3.2 AMOSTRAGEM DO SOLO

Os solos foram coletados em mini-trincheiras de 0,8 m de largura nas profundidades de 0-5 cm, 5-10 cm, 10-20 cm e 20-30 cm. As amostras foram coletadas após a colheita do milho, tomando-se o cuidado de dispor as mini-trincheiras perpendicularmente a duas linhas de plantio e coletando-se a metade de cada uma e a entrelinha (Novotny, 1997). Este procedimento fora adotado visando coletar a amostra mais representativa possível, baseado na distribuição de P em áreas cultivadas sob plantio direto (Kitchen et al., 1990). Como o espaçamento do milho foi de 0,8 m e da soja 0,4 m (cultura que antecedeu o milho no verão anterior). Tinha-se a certeza, com este procedimento, de coletar um sulco de adubação recente para o milho e dois para a soja, assim como o volume de influência das raízes de uma linha de milho e duas linhas de soja.

Após a coleta as amostras foram postas para secar ao ar. A seguir foram moídas, passadas por peneiras de 2 mm, homogeneizadas e encaminhadas para as análises químicas e físicas que foram efetuadas conforme método descrito em EMBRAPA (1979).

4 ANÁLISES FÍSICAS E QUÍMICAS DOS SOLOS

As análises granulométricas (EMBRAPA, 1979) indicaram conteúdos de argila variando entre 500 e 650 g kg⁻¹, silte entre 130 e 230 g kg⁻¹ e areia entre 210 e 280 g kg⁻¹, sendo as amostras mais argilosas encontradas em maior profundidade. Os dados da análise química dos solos encontram-se na Tabela 2.

TABELA 2 - Resultados da análise química das amostras de solo.

Amostra *	pH		C g dm ⁻³	K	Ca	Mg mmol _c dm ⁻³	H+Al	Al	P mg dm ⁻³	Fe
	água	CaCl ₂								
PD1	6,4	5,8	23,8	3,7	48,0	18,5	30,0	0,5	78,5	11,2
PD2	5,9	5,2	18,3	2,8	26,0	12,0	37,0	0,5	39,5	11,5
PD3	5,9	5,2	15,7	2,3	19,5	10,0	32,0	0,0	10,0	9,9
PD4	5,8	5,3	13,9	1,7	15,5	5,5	29,5	0,0	7,5	9,6
PC1	5,7	4,9	20,3	3,4	24,0	7,0	39,5	0,5	59,5	13,9
PC2	5,7	4,9	19,1	4,1	22,5	6,5	36,0	1,0	36,5	12,2
PC3	5,8	5,0	16,0	3,3	20,5	6,5	34,5	1,0	14,5	10,3
PC4	5,7	5,1	12,8	2,1	12,5	6,0	31,0	0,5	8,5	7,9
CM1	5,5	4,8	20,9	4,8	17,5	3,5	38,5	1,5	33,0	11,6
CM2	5,5	4,8	19,7	3,0	16,5	3,0	39,0	2,5	28,5	11,4
CM3	5,4	4,7	17,4	2,1	14,5	3,0	37,5	2,5	16,5	10,2
CM4	5,4	4,8	12,5	1,7	10,0	2,5	33,0	2,5	6,0	7,9

* Amostra: PD = plantio direto; PC = plantio convencional; CM = cultivo mínimo; Profundidades: 1 = 0-5 cm; 2 = 2-10 cm; 3 = 10-20 cm; 4 = 20-30 cm.

A área sob plantio direto apresentou um maior conteúdo de carbono orgânico na camada superficial (0-5 cm) em comparação às áreas com manejo convencional e cultivo mínimo (Figura 25). Este acúmulo superficial de C em áreas sob plantio já foi relatado por diversos autores (Staley et al., 1988; Havlin et al., 1990; Merten e

Mielniczuk, 1991; Angers et al., 1997; Bayer e Mielniczuk, 1997; Lal, 1997; Novotny et al., 1999; Bayer et al., 2000).

FIGURA 25 - Carbono orgânico total em função da profundidade para os três sistemas de preparo do solo e conteúdo total de carbono em 1 ha na camada de 0-30 cm de profundidade (gráfico pequeno à direita).

Porém, para o conteúdo total de C nos 30 primeiros centímetros de solo (estoque de C) não houve diferenças estatisticamente significativas entre os sistemas de preparo do solo (Figura 25, gráfico pequeno à direita), o que concorda com os resultados de Angers et al. (1995, 1997); Ellert e Bettany (1995) e Novotny et al. (1999). O efeito do sistema de preparo na quantidade de matéria orgânica do solo é assunto controverso (Staley et al., 1988; Franzluebbers e Arshad, 1996; Wander et al., 1998). Sendo que, no presente caso, a não ocorrência de diferenças estatisticamente significativas entre os sistemas de preparo do solo pode ser devida à textura argilosa deste solo, pois nestas condições o conteúdo de C é menos afetado pelo sistema de preparo (Havlin et al., 1990; Angers et al., 1997).

Na área sob plantio direto estabeleceu-se um gradiente bem definido dos nutrientes com a profundidade do solo (Tabela 2 e Figura 26), com as maiores

concentrações ocorrendo nas camadas superficiais. Já para as áreas sob manejo convencional e cultivo mínimo houve uma maior homogeneização ao longo do perfil do solo para o Ca e Mg (Tabela 2) enquanto que o P acumulou-se superficialmente, embora em menor extensão do que na área sob plantio direto (Figura 26). Estes resultados confirmam a importância do monitoramento dos nutrientes no perfil do solo em áreas sob plantio direto visto que o não revolvimento deste e o acúmulo da matéria orgânica na superfície têm forte influência na retenção de nutrientes e na distribuição do sistema radicular das culturas (De Maria e Castro, 1993).

FIGURA 26 - Concentração de P extraído dos solos submetidos a diferentes tratamentos de preparo do solo.

5 MÉTODO DE EXTRAÇÃO DOS ÁCIDOS HÚMICOS DO SOLO

Devido ao fato de ter-se obtido pequenas quantidades de amostras de ácidos húmicos ao utilizar-se o procedimento padrão sugerido pela “International Humic Substances Society” (IHSS) e baseado em experiência anterior na utilização da dispersão dos colóides do solo por vibração ultra-sônica (Novotny et al., 1997) resolveu-se verificar a eficiência desta técnica nas amostras de solo utilizadas.

5.1 MATERIAL E MÉTODOS

Foram empregados dois métodos para a extração das substâncias húmicas do solo: o sugerido pela IHSS de solubilização em solução de NaOH e fracionamento baseado nas características de solubilidade das substâncias húmicas, e uma modificação deste com um pré-tratamento da amostra de solo com uma solução de HCl a pH entre 1 e 2 para redução do conteúdo de cinzas (remoção de metais adsorvidos), seguido da dispersão do solo com uso de vibração ultra-sônica e utilização do K^+ para remoção dos sólidos em suspensão.

Extração pelo método sugerido pela IHSS (M I)

Para a extração foram utilizados 20 g de solo e 200 mL de uma solução de NaOH a $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Nesta suspensão borbulhou-se N_2 por 5 min fechando-se hermeticamente os tubos (tampas com O-ring). Esta mistura foi mantida sob agitação em agitador orbital ajustado a 200 rpm durante 10 h e então centrifugada a 20000 g durante 10 min. O sobrenadante foi filtrado em filtro faixa branca - 389² e centrifugado a 25000 g por 20 min, descartando-se o precipitado. O sobrenadante foi acidificado sob agitação constante até pH próximo de 1 utilizando uma solução de HCl a 6 mol L^{-1} . A suspensão obtida foi mantida em descanso à temperatura ambiente por 12 h e a seguir centrifugada a 15000 g por 5 min. O material assim precipitado são os ácidos húmicos e foi transferido para tubos de diálise (Spectrapor[®] Membrane - MWCO 6000 - 8000 Dalton) e dialisado contra água deionizada até que a condutividade fosse menor que $5 \mu\text{S cm}^{-1}$. Este material foi liofilizado.

Extração pelo método modificado (M II)

Para o pré-tratamento com HCl foram utilizados 50 g de solo e 20 mL de uma solução de HCl a 1 mol L^{-1} e a seguir 480 mL de uma solução de HCl a $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Esta mistura foi agitada por 1 h em agitador orbital ajustado a 200 rpm e então centrifugada a 3500 g por 10 min, o sobrenadante foi descartado. A seguir, para a extração das substâncias húmicas, foram acrescentados 20 mL de uma solução de NaOH a 1 mol L^{-1} ao solo tratado com HCl e a seguir 480 mL de uma solução de NaOH a $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Para a dispersão do solo utilizou-se um equipamento de ultrassom com sonda dissipando-se 120 J mL^{-1} de suspensão do solo (250 W por 4 minutos em banho de gelo). Esta suspensão foi agitada, o resíduo sólido separado por centrifugação e filtragem e os ácidos húmicos separados por precipitação em meio

ácido conforme descrito anteriormente. A seguir, para a remoção dos sólidos em suspensão, os ácidos húmicos obtidos foram re-dissolvidos em 25 mL de uma solução de KOH a $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ onde se adicionou KCl para atingir-se uma concentração de $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ de K^+ e então se centrifugou a 40000 g por 20 min. O sobrenadante foi acidificado sob agitação constante até pH próximo de 1 com HCl a 6 mol L^{-1} . A suspensão obtida foi mantida em descanso à temperatura ambiente por 12 h e centrifugada a 15000 g por 5 min, o resíduo foi dialisado e liofilizado.

Para as análises espectroscópicas de RPE e de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), foram selecionadas as amostras de ácidos húmicos extraídos pelo *MI* e *MII* provenientes dos tratamentos com diferentes preparos do solo das duas primeiras camadas, 0-5 e 5-10 cm, perfazendo 12 amostras (3 métodos de preparo x 2 profundidades x 2 métodos de extração). Já para as análises por ^{13}C CP-MAS NMR foram analisadas apenas as amostras da primeira camada (0-5 cm) perfazendo 6 amostras (3 métodos de preparo x 1 profundidade x 2 métodos de extração). Selecionou-se as amostras das camadas superficiais, pois são nestas onde os efeitos dos diferentes métodos de preparo são normalmente observados.

As análises por FTIR foram efetuadas em equipamento Perkin-Elmer FT-IR Spectrum 1000 somando-se 16 varreduras com uma resolução de 4 cm^{-1} , numa faixa de 4000 a 400 cm^{-1} . Utilizaram-se pastilhas de KBr obtidas por prensagem a vácuo de misturas de 1 mg de ácidos húmicos em 100 mg de KBr preparadas em moinho vibratório Perkin-Elmer. Com o objetivo de diminuir as intensidades das bandas atribuídas à água higroscópica, as pastilhas foram mantidas em estufa por 12 h a 100°C . As medidas foram efetuadas antes e após o armazenamento em estufa.

Para a aquisição dos espectros de RPE, as amostras foram colocadas em tubos de quartzo de 2,5 mm de diâmetro interno. Os espectros foram obtidos à temperatura

ambiente em espectrômetro BRUKER EMX 300 operando em banda-X. Para os espectros obtidos com varredura de campo de 500 mT, as medidas foram efetuadas acumulando-se 2 varreduras, com amplitude de modulação de 1 mT, potência das microondas de 2 mW. Para a determinação da concentração de spins das amostras de ácidos húmicos, as medidas foram efetuadas com quatro repetições acumulando-se 10 varreduras numa faixa de campo de 5 mT, amplitude de modulação de 0,1 mT, potência das microondas de 0,2 mW. Os radicais livres orgânicos foram quantificados utilizando um cristal de rubi sintético como padrão secundário calibrando-se contra amostra de “strong pitch” de acordo com o método de Singer (Singer, 1959; Martin-Neto et al., 1991). A área sob o sinal integrado dos radicais livres orgânicos foi obtida por simulações (detalhes são encontrados na seção 6.2).

Os espectros de ^{13}C CP-MAS NMR foram obtidos em um espectrômetro Varian de 400 MHz operando a 100,6 MHz para o ^{13}C . Foram utilizados rotores cilíndricos com diâmetro externo de 5 mm carregados com aproximadamente 50 mg de amostra. Utilizou-se uma rotação de 5 kHz. A sequência de pulsos de polarização cruzada incluía um pulso de preparação de ^1H de 4 μs , 1 ms de tempo de contato, 15 ms de tempo de aquisição e 200 ms de tempo de espera para relaxação, foram somadas 4000 varreduras, utilizou-se um alargamento de linha de 50 Hz. Os deslocamentos químicos são expressos em ppm em relação ao tetrametilsilano.

5.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A utilização do método modificado produziu, em média, 20% mais ácidos húmicos do que o método padrão sugerido pela IHSS. Este aumento da eficiência pode ser atribuído à dispersão do solo pelo ultra-som.

Com o objetivo de verificar-se a natureza do material precipitado após o tratamento com K^+ analisou-se este material por FTIR. Os resultados desta análise confirmaram a natureza mineral (argila coloidal) deste precipitado (Figura 27, Tabela 3).

FIGURA 27 - Espectro de FTIR do resíduo de centrifugação dos ácidos húmicos após tratamento com K^+

TABELA 3 - Atribuição das bandas de absorção no infravermelho do resíduo de centrifugação dos ácidos húmicos após tratamento com K^+

Banda (cm^{-1})	Atribuição ¹	Mineral ²
3698	estiramento O – H	K, Ha
3652 (larga e fraca)	estiramento O – H	K de baixa cristalinidade
3622	estiramento O – H	K, Ha
3528	estiramento O – H	G
3452	estiramento O – H	G
3398 (fraca)	estiramento O – H	G
3380 (fraca)	estiramento O – H	G
1638	deformação O – H	Água
1092	estiramento Si – O	Ha
1036		K, Ha, G
1010	estiramento Si – O	K, Ha
914	deformação AlAlO – H	K, Ha
798		K, Ha, G
748		G
672		G
542	estiramento Al – O	K, Ha
560 (fraca)		H
472		K, Ha, H
430		K, Ha, H

¹Atribuições retiradas de: Parker (1969); Rouxhet et al. (1977); Elsass e Olivier (1978); Mendelovici et al. (1979); Redon e Serna (1981); Prost et al. (1989); Russell e Fraser (1994). Mineral²: K = caulinita; Ha = haloisita; G = gibsitita; H = hematita.

O espectro de infravermelho do resíduo de centrifugação da solução de ácidos húmicos apresentou bandas fracas de absorção nas regiões onde se encontrariam bandas típicas de espectros de substâncias húmicas. Estas bandas são (Stevenson, 1994): 2900 cm^{-1} - estiramento de C - H alifático; 1250 cm^{-1} - estiramento de C - O e 1600 e 1400 cm^{-1} - estiramento assimétrico e simétrico, respectivamente, de C = O de grupos carboxilatos (Piccolo e Stevenson, 1982) visto que o material foi obtido em meio alcalino. A ausência ou fraca intensidade destas bandas indica o baixo conteúdo de compostos orgânicos que pudessem ter precipitado e também justifica a atribuição da banda em 1638 cm^{-1} à água adsorvida ao invés de grupos orgânicos.

No material precipitado foram identificados, pelas bandas em 3622 cm^{-1} e em 3698 cm^{-1} , minerais do grupo da caulinita. Outra banda típica do grupo da caulinita observada neste espectro foi a em 914 cm^{-1} (Russell e Fraser, 1994). Devido à presença da banda fraca e larga em 1652 cm^{-1} pode-se concluir que a caulinita presente na amostra era de baixa cristalinidade (Russell e Fraser, 1994; Prost et al., 1989).

Outros minerais identificados nesta amostra foram: gibbsita bem cristalizada, identificada pelas bandas em 3528 , 3452 e fracas em 3380 e 3398 cm^{-1} (Russell e Fraser, 1994); e minerais do tipo hematita pelas bandas em 430 , 472 e fraca em 560 cm^{-1} (Wilson et al., 1981b) (Figura 27, Tabela 3). Diversas bandas podem ser atribuídas tanto a caulinita quanto a haloisita, porém a banda em 1092 cm^{-1} pode ser indicativo da presença de haloisita nesta amostra, embora a variação do padrão de absorção na região de $1150 - 1100\text{ cm}^{-1}$ pode também ser devida aos efeitos do tamanho e forma da partícula (Farmer e Russel, 1966).

Os espectros de FTIR das diferentes amostras de ácidos húmicos analisadas foram muito semelhantes entre si (exemplos de espectros são dados na Figura 28).

Sendo que bandas típicas de minerais não foram observadas nos espectros de FTIR indicando a relativa pureza dos ácidos húmicos obtidos. A secagem das pastilhas a 100^o C por 12 h levou a diminuição da intensidade das bandas de absorção da água adsorvida a 3400 cm⁻¹ e a 1630 cm⁻¹ (estiramento e deformação de grupos O-H respectivamente) e como a secagem das pastilhas não causou outras alterações nos espectros este é um procedimento recomendado para minimizar-se o problema de adsorção de água pelo KBr.

FIGURA 28 - Espectro de FTIR de ácidos húmicos extraídos da amostra plantio convencional (5-10 cm).

Com o objetivo de separar as bandas que no espectro de absorção estavam sobrepostas calculou-se a segunda derivada dos espectros (Starsinic et al., 1984). Os resultados desta manipulação são dados na Figura 29 e a atribuição das bandas é dada na Tabela 4. Comparando-se os espectros da Figura 28 com os da Figura 29 fica evidente a importância do uso da segunda derivada. Nestes espectros manipulados é possível constatar-se a presença de pequenas contaminações com minerais nos ácidos húmicos (Figura 29 e Tabela 4).

FIGURA 29 - Espectro de FTIR em segunda derivada dos ácidos húmicos extraídos da amostra plantio direto (5-10 cm).

TABELA 4 - Atribuição das bandas de absorção no infravermelho do espectro de FTIR em segunda derivada de ácidos húmicos.

Banda (cm ⁻¹)	Grupos orgânicos ^{1,2}
2966	vs C-H de CH ₂ e CH ₃ alifático
2928	vas C-H de CH ₂ e CH ₃ alifático
2852	vs C-H de CH ₂ e CH ₃ alifático
1724	v C=O de COOH e parcialmente de outros C=O
1658	v C=O de grupos amidas (banda I de amida)
1628	complexa resultado de v C=C aromático, vsa COO ⁻ , banda I de amida e parcialmente de δ água higroscópica
1598	C=C aromático, amida, vsa COO ⁻
1542	banda II de amida (δ N-H), anel aromático (v C=C)
1508	v de C=C aromático
1475	v de anel aromático
1460	δ de C-H alifático
1378 e 1330	complexa de δ O-H e v C-O fenólicos, vs COO ⁻ , δ grupos CH ₂ e CH ₃
1266 e 1224	v C-O e δ O-H de COOH, parcialmente de v C-O de aril éter
1150 a 1050	v O-H alcoólico alifático, polissacarídeos
912	δ AlAlO-H de caulinita e haloisita, OH, COOH
832	δ C-H aromático
772	δ C-H aromático (fora do plano)

¹Atribuições retiradas de: Stevenson e Goh (1971); Orlov (1985); Paim et al., (1990); Silverstein et al. (1991); Niemeyer et al. (1992); Stevenson (1994); Pavia et al. (1996); Wander e Traina (1996).

Modos vibracionais²: v = estiramento (as = assimétrico e s = simétrico); δ = deformação.

A banda intensa e larga a 3400 cm⁻¹ que permaneceu mesmo após secagem das pastilhas (Figura 28) é atribuída ao estiramento de H-ligado de grupos O-H, incluindo aqueles de COOH. Em alguns casos, grupos N-H também podem contribuir com a absorção nesta região. A absorção na região de 2900 cm⁻¹

(estiramento de C-H alifático) foi relativamente fraca, indicando a ausência de grandes quantidades de grupos CH_2 e CH_3 , enquanto que aquelas atribuídas a grupos aromáticos (3075 , 1628 , 1598 , 1418 , 832 e 772 cm^{-1}) foram relativamente intensas (Figura 29 e Tabela 4).

A presença das bandas de absorção atribuídas tanto a grupos carboxílicos (1724 cm^{-1}) quanto carboxilatos ($1550\text{-}1650\text{ cm}^{-1}$ e a aproximadamente 1400 cm^{-1}) indicam que parte dos grupos carboxílicos estava na forma de sal. A alta intensidade das bandas atribuídas a anéis aromáticos em relação às bandas atribuídas a grupos carboxílicos e carboxilatos, assim como a baixa intensidade de absorção na região de 2900 cm^{-1} (estiramento de C-H alifático), permitem classificar estes espectros como do tipo I, que são típicos de ácidos húmicos de alta massa molar extraídos de solos (Stevenson, 1994).

Observou-se uma banda relativamente intensa em 1084 cm^{-1} , provavelmente devido a uma alta concentração de polissacarídeos. Carboidratos representam cerca de 10% da matéria orgânica do solo (Miano, 1990) e Bravard e Righi (1991) observaram a presença de carboidratos em espectros de FTIR de ácidos fúlvicos extraído de latossolos.

Os espectros de RPE com varredura de campo de 500 mT (Figura 30) apresentaram uma linha larga ($\Delta B' = 72\text{ mT}$) centrada em $g \cong 2$. Este sinal pode ser atribuído à interação dipolar entre íons de Fe^{3+} próximos, provavelmente na forma de óxidos ou hidróxidos (seção 2.2.3.5). Como este sinal foi de menor intensidade nas amostras extraídas com o *M II* (Figura 30) pode-se concluir que este método foi mais eficaz na remoção de impurezas minerais dos ácidos húmicos o que pode ser devido ao tratamento com K^+ .

Outros sinais comuns a todos os espectros analisados foram linhas centradas em $g = 4,2$ e em $g = 8,9$, as quais são atribuídas a íons Fe^{3+} , spin alto ($S = 5/2$), em sítio com máxima distorção rômica (Meads e Malden, 1975), ou seja com $\lambda = 1/3$. Contudo estas linhas de ressonância de Fe^{3+} apresentaram intensidades muito baixas, podendo ser negligenciadas.

FIGURA 30 - Espectro de RPE dos ácidos húmicos extraídos da amostra plantio direto (5-10 cm).

Nas amostras de ácidos húmicos extraídos por ambos os métodos, o sinal dos radicais livres orgânicos apresentou-se como uma linha fina e intensa com valor $g = 2,003$ e $\Delta B' = 0,43$ mT. Estes valores são típicos para radicais livres orgânicos encontrados em ácidos húmicos extraídos do solo (seção 2.2.3.6).

Adicionalmente a estes centros paramagnéticos as amostras extraídas pelo *M II* apresentaram um conjunto complexo de linhas na região de $g = 2$ (Figura 30). Análise detalhada desta região (Figura 31) indicou a presença de dois padrões distintos sobrepostos no limite rígido (anisotropia) do tipo axial. Um destes padrões é formado por uma única absorção a $g_{\perp} = 2,07$ e por um quadrupeto ($A_{//} = 16,5$ mT) de interação hiperfina a $g_{//} = 2,28$ que indica complexo de Cu^{2+} ($I = 3/2$; $S = 1/2$; d^9) em esfera interna com os ácidos húmicos. O padrão anisotrópico restante consiste da

sobreposição de dois octupletos de interação hiperfina correspondentes aos componentes paralelos ($g_{\parallel} = 1,94$ e $A_{\parallel} = 18,9$ mT) e perpendiculares ($g_{\perp} = 1,95$ e $A_{\perp} = 7,7$ mT) do íon vanadila (VO^{2+} ; $I = 7/2$; $S = 1/2$; d^1) também como complexo em esfera interna com os ácidos húmicos.

FIGURA 31 - Espectro de RPE dos ácidos húmicos extraídos da amostra cultivo mínimo (0-5 cm). Detalhe na região de $g = 2$ mostrando o sinal atribuído aos radicais livres orgânicos e os espectros simulados de Cu^{2+} e VO^{2+} .

Os valores de $g_{\parallel}$ e $A_{\parallel}$, que são utilizados para diagnóstico pela maior amplitude de variação em relação aos parâmetros perpendiculares, são consistentes com VO^{2+} coordenado a ligantes oxigenados no plano equatorial (seção 2.2.3.6).

Já para o cobre, os valores de $A_{\parallel}$ e $g_{\parallel}$ observados são coerentes com aqueles reportados por Senesi (1990a) para complexos de Cu^{2+} coordenado a três oxigênios e um nitrogênio (seção 2.2.3.6).

Nas amostras extraídas pelo *M I*, a linha larga atribuída a impurezas ferri ou ferromagnéticas provavelmente tenha sobreposto, com exceção do radical livre orgânico, os demais sinais de centros paramagnéticos observados nas amostras obtidas pelo *M II*.

Uma das principais informações a respeito das substâncias húmicas é a medida do grau de humificação, assim a identificação de um parâmetro que caracterize esse estágio de humificação é de suma importância e tem sido objeto de muitos estudos. Um dos poucos parâmetros que reflete essa propriedade intrínseca das substâncias húmicas é o nível de radicais livres orgânicos (Riffaldi e Schnitzer, 1972; Martin-Neto et al., 1991) e este é um dos dados mais importantes obtidos a partir de espectros de RPE. Visto que a área sob a curva de absorção de um sinal de RPE é diretamente proporcional ao número de centros paramagnéticos que contribuem para a ressonância, é relativamente simples obter-se a concentração de spins de uma amostra comparando-se a área do seu sinal com a de um padrão cuja concentração de spins seja conhecida. Porém, medidas absolutas da concentração de spins requerem o conhecimento de um grande número de fatores, todos os quais são fontes de erro ou ainda podem variar durante o experimento. Então, a concentração de spins é usualmente medida de forma relativa.

Exemplos de espectros adquiridos com varredura de campo de 5 mT utilizados na quantificação dos radicais livres orgânicos são dados na Figura 32 e os valores obtidos são dados na Figura 33.

FIGURA 32 - Espectro de RPE dos ácidos húmicos extraídos da amostra cultivo mínimo (5-10 cm). Detalhe na região de $g = 2$ mostrando o sinal atribuído ao radical livre orgânico e as simulações utilizadas no cálculo da concentração de spins.

FIGURA 33 - Concentração de radicais livres orgânicos nas amostras de ácidos húmicos extraídos pelos métodos I e II.

A extração utilizando o *M II* produziu amostras de ácidos húmicos com maior concentração de radicais livres orgânicos (aumento médio por um fator de aproximadamente 1,8). Isto pode ser devido a uma maior extração de ácidos húmicos

mais humificados em decorrência da dispersão do solo pelo ultra-som. Porém, este aparente menor grau de humificação das amostras obtidas pelo *MI* pode ser devido à supressão do sinal de RPE por íons paramagnéticos, como será demonstrado nos capítulos 7 e 10.

Houve uma tendência de uma menor concentração de spins no sistema plantio direto. Isto pode ser devido ao fato que com o cultivo mais intenso há uma degradação preferencial de estruturas mais lábeis com conseqüente aumento na proporção de ácidos húmicos mais humificados. Outra tendência observada é a menor concentração de spins na camada mais superficial o que pode ser atribuído ao maior aporte de resíduos vegetais frescos na superfície.

Os espectros de ^{13}C CP-MAS NMR de todas as amostras analisadas foram semelhantes (Figura 34) e típicos de ácidos húmicos com perda de resolução (Preston et al., 1994).

FIGURA 34 - Espectro de ^{13}C CP-MAS NMR dos ácidos húmicos extraídos da amostra cultivo mínimo (0-5 cm).

Embora os espectros fossem muito semelhantes visualmente, ao se calcular as áreas referentes a cada grupo funcional pôde-se identificar pequenas diferenças entre as amostras analisadas (Tabela 5).

TABELA 5 - Contribuição relativa (% da área total) das regiões de deslocamento químico (ppm)

	Regiões de deslocamento químico (ppm TMS)							
	CO 196-233	COO 152-196	O-Arom. 138-152	Arom. 105-138	di-O-alq. 88-105	O-alq. 60-88	Metox. 42-60	Alq. 0-42
Extração <i>M I</i>								
Cult. Mín.	3,2	15,5	3,1	13,1	4,7	18,2	15,4	26,9
Pl. Conv.	3,2	15,7	3,1	12,6	4,7	17,8	15,9	27,0
Pl. Dir.	2,3	13,7	3,1	12,7	5,5	20,6	17,4	24,8
Extração <i>M II</i>								
Cult. Mín.	2,7	15,5	3,0	13,3	5,2	20,5	15,6	24,3
Pl. Conv.	3,2	16,5	2,8	12,8	4,9	21,6	15,2	23,2
Pl. Dir.	2,5	16,0	2,9	14,1	5,4	21,7	15,4	22,0

Em relação ao método de extração utilizado observou-se que o *M II* extraiu ácidos húmicos mais ricos em grupos carboxílicos e aromáticos e com menores conteúdos de grupos O-aromáticos e metoxilas. Isto concorda com os dados de concentração de spins, pois com o avanço do processo de humificação, o conteúdo de grupos carboxílicos e aromáticos aumenta (Catroux e Schnitzer, 1987; Kögel-Knabner et al., 1988; Leinweber et al., 1993) enquanto que o de grupos O-aromáticos e metoxilas diminuem. Isto ocorre pois estes grupos são constituintes da lignina que tem seu conteúdo diminuído com as transformações da matéria orgânica no solo (Kögel-Knabner et al., 1991; Leinweber et al., 1993; Preston et al., 1994).

A dispersão do solo com ultra-som pode liberar parte das substâncias húmicas associadas à fração argila. Por conseguinte, o menor conteúdo de grupos O-aromáticos nas amostras extraídas pelo *M II* pode ser devido ao fato que ácidos húmicos extraídos desta fração são pobres em grupos O-aromáticos (Catroux e Schnitzer, 1987; Leinweber et al., 1993).

A extração pelo *M II* produziu ácidos húmicos mais ricos em di-O-alquilas, O-alquilas. Leinweber et al. (1993) observaram que é na fração argila onde estes grupos funcionais estão presentes em maiores quantidades, assim a dispersão do solo por vibração ultra-sônica pode ter extraído maiores quantidades de material rico nestes grupos funcionais.

Cabe ressaltar que as variações observadas no conteúdo relativo dos diferentes grupos funcionais determinados por RMN podem ser devidas ao efeito de supressão seletiva dos sinais de RMN por íons paramagnéticos visto que nas amostras extraídas pelo *M II* o conteúdo de metais paramagnéticos, detectados por RPE, foi significativamente menor e que os grupos funcionais que tiveram maior aumento na sua contribuição relativa, ao utilizar-se este método, foram aqueles possivelmente envolvidos diretamente na formação de complexos com íons paramagnéticos, tais como O-alquila, di-O-alquila e carboxílicos. Isto será discutido em detalhes no capítulo 10.

5.3 CONCLUSÕES

Para a extração dos ácidos húmicos utilizou-se uma modificação do método sugerido pela IHSS. Esta modificação consiste em um pré-tratamento das amostras de solo com uma solução de HCl a pH entre 1 e 2, para a remoção de metais adsorvidos, seguido da dispersão do solo com o uso de vibração ultra-sônica e o uso de íons K^+ e centrifugação para a remoção de sólidos em suspensão. O uso do método modificado aumentou a eficiência da extração (em média um aumento de 20%) e as amostras assim obtidas apresentaram a linha larga de RPE, atribuída a interações ferri ou ferromagnéticas, com menor intensidade. Essas amostras

apresentaram uma concentração de spins em média 1,8 vez maior do que aquelas obtidas pelo método sugerido pela IHSS. Inicialmente ponderou-se que isto seria devido à extração de material mais humificado pelo método modificado, porém não se obtiveram correlações significativas entre os dados de RPE e RMN que confirmassem esta conclusão, logo se supôs que a presença de material ferri/ferromagnético poderia afetar os resultados obtidos por estas técnicas. Este efeito é bem conhecido para RMN (Preston et al., 1989b), porém há poucos relatos na literatura com respeito à RPE (Drozd e Jezierski, 1994; Jezierski et al., 1998, 2000a,b). O efeito de íons paramagnéticos adsorvidos na determinação da concentração de radicais livres orgânicos (Novotny et al., 2002) será demonstrado no capítulo 7.

Em relação aos diferentes sistemas de preparo do solo, observou-se uma tendência de acúmulo relativo de grupos de fácil decomposição nos ácidos húmicos provenientes da área sob plantio direto em relação ao plantio convencional. Este acúmulo refere-se a maiores concentrações de grupos de fácil decomposição tais como O-aromáticos, metoxilas, di-O-alquilas e O-alquilas, e menores de carboxílicos e alquilas assim como uma menor concentração de radicais livres orgânicos determinados por RPE. O aumento relativo de alquilas e diminuição de O-alquilas com o aumento da decomposição tem sido relatado na literatura (Preston et al., 1994; Nordén et al., 1992; Preston et al., 1989a) e a associação de grupos alquilas de cadeia longa com argilas pode torná-los protegidos do cultivo mais intenso do solo.

6 ESTUDO METODOLÓGICO DA CARACTERIZAÇÃO ESPECTROSCÓPICA DE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS

6.1 PROCEDIMENTOS PARA AQUISIÇÃO DE ESPECTROS DE ^{13}C -RMN NO ESTADO SÓLIDO¹

Antes da aquisição dos espectros de ^{13}C -RMN no estado sólido utilizando a polarização cruzada e a rotação segundo o ângulo mágico é necessário efetuar uma série de ajustes e calibrações do equipamento. Os seguintes parâmetros foram ajustados conforme o manual de instruções do equipamento:

- Homogeneidade do campo magnético (“shimming”)
- Campo central para o sinal do ^1H
- Pulsos de 90° para o ^1H e ^{13}C
- Referência do espectro
- Condição de Hartmann-Hahn
- Potência do desacoplador
- Ângulo mágico (MAS-“magic angle spinning”)

¹ Observação: em todos os espectros de ^{13}C -RMN apresentados neste trabalho foi utilizado um alargamento de linha de 50 Hz.

6.1.1 TEMPO DE CONTATO

Para determinar-se o melhor tempo de contato foram efetuados experimentos de ^{13}C CP-MAS NMR variando-se este parâmetro. O tempo de contato ideal é aquele em que se obtém a maior intensidade do sinal, porém, como pode-se observar na Figura 35, não há um único valor de tempo de contato que satisfaça esta condição para todos os grupos químicos. Seleciona-se então um que mais se aproxima do ideal. Um tempo de contato de 1 ms é satisfatório e concorda com valores sugeridos na literatura (Hagaman et al., 1986; Wilson, 1987; Fründ et al., 1994; Preston, 1996; Smernik e Oades, 2000). A perda de sinal para cada região espectral integrada (Tabela 6) foi calculada como a relação percentual entre o valor obtido com o tempo de contato selecionado e aquele ideal (tempo de contato para qual a intensidade ou área seria máxima). Estes resultados podem ser utilizados para corrigir os dados, ou serem desconsiderados em estudos comparativos entre amostras semelhantes.

FIGURA 35 - Variação do tempo de contato para a amostra de ácidos húmicos extraídos do tratamento plantio direto na profundidade de 0-5 cm.

TABELA 6 - Perda da intensidade (área) do sinal de ressonância quando o tempo de contato ideal e de 1 ms eram utilizados na aquisição dos espectros de ^{13}C CP-MAS NMR, amostra de ácidos húmicos extraídos do tratamento cultivo mínimo na profundidade de 0-5 cm.

Região (ppm)	Atribuição	Perda da Intensidade (%)
0-51	alquila	3,8
51-63	metoxila. aa	4,4
63-95	O-alquila	4,7
95-110	di-O-alquila	4,1
110-142	aromático	4,6
142-160	O-aromático	7,9
160-190	carboxila	8,5
190-230	carbonila	7,0

6.1.2 TEMPO DE ESPERA DA RECICLAGEM

Os tempos de relaxação spin-rede dos ^1H , obtidos de experimentos de inversão-recuperação da magnetização, dos diferentes grupos funcionais das amostras de ácidos húmicos analisadas foram semelhantes e curtos (Figura 36 e Figura 37). A semelhança nos valores de T_1H é devida à rápida difusão de spins (Jelinski e Melchior, 2000) e os valores curtos devidos, provavelmente, à presença de metais paramagnéticos visto que estes diminuem T_2 , T_1H e $T_1\rho$ (Wilson, 1987).

FIGURA 36 - Medida de T_1H pelo ^{13}C para a amostra de ácidos húmicos extraídos do tratamento cultivo mínimo na profundidade de 5-10 cm.

FIGURA 37 - Ajuste de T_1H pelo ^{13}C para a amostra de ácidos húmicos extraídos do tratamento plantio direto na profundidade de 0-5 cm.

Em experimentos de RMN que utilizam a polarização cruzada o tempo de espera para relaxação do sistema é aquele do núcleo abundante (^1H), sendo que com um tempo de espera de cinco vezes T_1H obtém-se 99,998 % de recuperação da magnetização (Gil e Geraldes, 1987). Pelos valores de T_1H obtidos (70 ms) um tempo de repetição de 350 ms é suficiente.

6.1.3 EXPERIMENTOS COM DESACOPLAMENTO DEFASADO (DD)

Nos experimentos com DD desliga-se o desacoplador por um curto período de tempo de tal forma que os C protonados menos móveis relaxem via interação dipolar, com isto esta técnica privilegia C não-protonados e CH_3 (Opella et al., 1979). Os grupos não protonados (carboxílico e aromático oxigenado seguidos pelo grupo aromático substituído) são os que sofrem menor perda de sinal com o aumento do tempo de defasagem (Figura 38). Isto mostra a utilidade desta técnica na

diferenciação entre grupos protonados e não protonados, assim como para a correta atribuição dos picos de ressonância.

No presente caso, o pico atribuído a grupos metoxilas (50-62 ppm) provavelmente tenha importantes contribuições de grupos C-protéicos visto que houve uma significativa diminuição deste sinal com o aumento do tempo de defasagem (Figura 38). Isto é baseado no fato que os grupos metoxilas, por apresentarem alta mobilidade, possuem um acoplamento dipolar mais fraco do que grupos N-alquilas e logo apresentam tempos de defasagem maiores (Wilson, 1987).

FIGURA 38 - Intensidade dos sinais de ^{13}C VACP-MAS NMR em função do tempo de defasagem. Amostra de ácidos húmicos extraídos do tratamento plantio direto na profundidade de 0-5 cm.

6.1.4 AJUSTES DOS PARÂMETROS DE AQUISIÇÃO PARA A SEQUÊNCIA ^{13}C VACP-MAS NMR

6.1.4.1 Introdução

Com o objetivo de minimizar os problemas decorrentes da rápida rotação em torno do ângulo mágico, que causa uma perda seletiva dos sinais de grupos químicos com fraco acoplamento dipolar ^{13}C - ^1H , implementou-se a sequência ^{13}C VACP-MAS NMR. Para isto foram efetuados diversos experimentos visando o ajuste dos melhores parâmetros de aquisição. Maiores detalhes a respeito desta técnica podem ser encontrados na seção 2.2.4.6.

6.1.4.2 Metodologia

Após ajustar-se a condição de Hartmann-Hahn para um experimento de CP normal acrescenta-se uma “rampa” de potência em um dos canais de tal forma que as diferentes condições de Hartmann-Hahn sejam atingidas. A inclinação desta rampa assim como os valores máximos e mínimos são parâmetros a serem otimizados. Para isto utilizou-se como critério a intensidade do sinal em 172 ppm, atribuído a grupos carboxílicos. Selecionou-se este sinal pois ele é de um C não protonado e logo com uma péssima polarização cruzada em condições normais, é fortemente influenciado pela taxa de rotação, relativamente isolado das demais regiões e apresentou boa intensidade na amostra utilizada para este ajuste.

6.1.4.3 Resultados e discussão

No equipamento utilizado existe a possibilidade de adicionar a rampa tanto no canal do ^1H (HB_I) quanto no de ^{13}C (CB_I) sendo neste mais conveniente, pois, neste equipamento, as potências do pulso de preparo e de trancamento do ^1H são vinculadas. Logo caso esta potência fosse modificada seria necessário recalibrar o pulso de preparo. Portanto, inicialmente, compararam-se os resultados com as rampas em cada um dos canais (Figura 39) e, como não houve diferenças significativas, e pela maior comodidade já mencionada, optou-se por utilizar a rampa no canal do ^{13}C .

FIGURA 39 - Espectros de ^{13}C VACP-MAS NMR com rampas nos canais do (CB_I) e do ^1H (HB_I). Amostra de ácidos húmicos extraídos do tratamento plantio direto na profundidade de 0-5 cm.

Foram efetuados diversos experimentos variando-se a inclinação da rampa. A melhor condição obtida foi aquela em que rampa variou de 110 a 60% (Figura 40) e foram estes os parâmetros utilizados nas análises posteriores. Pode-se observar também que o espectro de ^{13}C CP-MAS NMR foi o que apresentou a pior relação sinal/ruído.

FIGURA 40 - Espectros de ^{13}C CP-MAS NMR e ^{13}C VACP-MAS NMR com variação da inclinação da rampa. Amostra de ácidos húmicos extraídos do tratamento plantio direto na profundidade de 0-5 cm.

O uso da sequência de CP-MAS levou a importantes subestimativas de diversos grupos químicos presentes nas substâncias húmicas, tais como: carboxílicos, O-aromáticos, aromáticos, metoxila e alquila (Figura 40).

Esta sub-estimativa de grupos com fraco acoplamento dipolar com os ^1H também é importante nos espectros de desacoplamento defasado (DD) visto que nesta sequência os carbonos seletivamente mantidos nos espectros são justamente estes com fraco acoplamento dipolar (Figura 41). Assim ao se utilizar a sequência CP-MAS nos experimentos de DD, ao invés da VACP MAS, depende-se um maior tempo de máquina para obter-se a mesma razão sinal/ruído.

FIGURA 41 - Comparação entre o espectro adquirido com desacoplamento defasado (DD) e a subtração espectral entre aqueles adquiridos com a sequência ^{13}C VACP-MAS NMR e ^{13}C CP-MAS NMR (VACP-CP). Amostra de ácidos húmicos extraídos do tratamento plantio direto na profundidade de 0-5 cm.

Quando se utilizou a sequência CP-MAS observou-se um comportamento oscilatório da intensidade do sinal com tempos de contato menores que 1 ms, principalmente para os grupos químicos mais blindados (desvios químicos abaixo de 145 ppm). Este fenômeno é denominado oscilação transiente (Müller et al., 1974) e foi minimizado com o uso da sequência ^{13}C VACP-MAS NMR (Figura 42), resultado que concorda com o obtido por Hediger et al. (1994).

FIGURA 42 - Variação do tempo de contato para a amostra de ácidos húmicos extraídos do tratamento cultivo mínimo na profundidade de 0-5 cm.

6.1.5 SUPRESSÃO DAS BANDAS LATERAIS (TOSS)

Alguns autores sugerem o uso da sequência TOSS para a eliminação das bandas laterais em estudos quantitativos por ^{13}C CP-MAS NMR (Mao et al., 2000), enquanto outros desaconselham o seu uso pois esta sequência pode trazer problemas na quantificação (Smernik, 2002). Devido a esta divergência efetuaram-se experimentos para verificar se o uso de TOSS seria adequado às medidas realizadas.

Como pode-se observar na Figura 43 o espectro adquirido com a sequência TOSS apresentou importantes sub-estimativas dos sinais dos grupos químicos mais blindados, por conseguinte optou-se pela não utilização desta técnica. A correção das áreas das diferentes regiões espectrais influenciadas pelas bandas laterais, quer seja pela perda de intensidade ou pela sobreposição, pode ser efetuada somando-se as áreas das bandas laterais aos seus respectivos sinais isotrópicos e subtraindo-as das regiões em que elas ocorreram.

FIGURA 43 - Comparação entre os espectros de ^{13}C VACP-MAS NMR adquiridos com e sem a sequência TOSS. Amostra de ácidos húmicos extraídos do tratamento plantio direto na profundidade de 0-5 cm.

6.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ELÉTRONS DESEMPARELHADOS (SPINS)

6.2.1 INTRODUÇÃO

A humificação da matéria orgânica do solo leva, de maneira geral, a formação de compostos mais aromáticos, de maior massa molar aparente, com maior complexidade molecular, maior grau de condensação das estruturas aromáticas, com coloração mais escura e maior concentração de radicais livres orgânicos. Este último parâmetro pode ser obtido pela espectroscopia de RPE, e assim tem-se uma estimativa do grau de humificação do material em estudo.

Na prática, determinações da concentração absoluta de spins raramente são obtidas visto que medidas desta natureza envolvem muitos fatores. Ao invés disto é preferível determinar-se a concentração relativa de centros paramagnéticos comparando-se a área sob a linha de absorção da amostra com um padrão onde a concentração de spins seja conhecida (Weil et al. 1994). Na técnica do padrão secundário, sugerida por Singer (1959), dispõe-se um pequeno cristal de rubi sintético (0,5% $\text{Cr}^{3+}/\text{Al}_2\text{O}_3$) dentro da cavidade de forma a se obter um sinal com a amplitude desejada. O rubi sintético não apresenta linhas de ressonância na região de $g = 2$, sendo por isto adequado para a quantificação dos radicais livres orgânicos. Adquiri-se o espectro de algum dos sinais do rubi, por exemplo, com $g = 1,28$ ou $3,47$; nas mesmas condições experimentais imediatamente antes ou depois da aquisição do espectro do radical livre da amostra em análise, procede-se da mesma maneira para um padrão onde a concentração de spins seja conhecida, como por

exemplo o “strong pitch” que acompanha o espectrômetro de RPE. Visto que ambos estão na mesma cavidade simultaneamente (o rubi e a amostra) é possível compensar-se o efeito de variação do fator de qualidade da cavidade dividindo-se a área sob a linha de absorção da amostra pela amplitude do sinal do rubi.

A área sob a linha de absorção pode ser obtida por diversas maneiras: por integração analógica; por dupla integração digital, sendo que neste caso há a necessidade de correção da linha de base após cada integração (Weil et al. 1994); por simulações; ou pela aproximação $Y' \Delta B'^2$, onde Y' é a amplitude pico a pico do sinal em primeira derivada e $\Delta B'$ é a largura pico a pico deste sinal (Poole, 1983).

A forma da linha de ressonância e diversos fatores experimentais, tais como: potência das microondas; amplitude de modulação; posição da amostra na cavidade; e truncamento do espectro em primeira derivada, afetam os resultados obtidos.

6.2.2 FORMA DA LINHA DE RESSONÂNCIA

Linhas individuais de absorção de RPE tendem a ser simétricas em relação à sua posição central e muitas informações podem ser obtidas pela análise detalhada da sua forma e largura. Radicais livres orgânicos normalmente apresentam linhas com forma gaussiana, lorentziana ou misturas destas (voigt). Exemplos de linhas de absorção gaussiana e lorentziana são dados na Figura 44.

Linhas lorentzianas são usualmente observadas: em sistemas sem alargamento devido à interação hiperfina não resolvida; se a concentração de centros paramagnéticos é baixa; e se há elevado movimento rotacional (em líquidos e gases por exemplo). Linhas gaussianas, por sua vez, ocorrem quando há sobreposição de muitos componentes (envelope de linhas lorentzianas). As equações analíticas e

algumas relações importantes destas linhas são dadas na Tabela 7 e os símbolos empregados são dados na Figura 45.

FIGURA 44 - Linhas lorentziana e gaussiana simuladas com mesma largura a meia altura (ΔB).

FIGURA 45 - Linha gaussiana simulada em absorção, 1ª e 2ª derivadas.

TABELA 7 - Equações analíticas e algumas relações importantes das linhas lorentzianas e gaussianas.

Propriedade	Linha lorentziana	Linha gaussiana
Equação e varredura para Y' tender a 0	$Y = Y_{Máx} \frac{(\Delta B/2)^2}{(\Delta B/2)^2 + (B - B_0)^2}$ $Y \rightarrow 0 \quad Varredura \geq 10\Delta B$	$Y = Y_{Máx} e^{-(\ln 2)(B-B_0)^2 (\Delta B/2)^{-2}}$ $Y \rightarrow 0 \quad Varredura \geq 3\Delta B$
Áreas	Absorção	$\frac{1}{2} \sqrt{\frac{\pi}{\ln 2}} Y \Delta B$
	1ª derivada	$\frac{2\pi}{\sqrt{3}} Y' \Delta B'^2$
	2ª derivada	$\frac{\pi}{16} Y''_{Mín} \Delta B''^3$
	$Y''_{Mín}/Y'$	$0,2 \frac{\sqrt{e}}{\Delta B'} = \frac{0,33}{\Delta B'}$
	$Y''_{Mín}/Y''_{Máx}$	$\frac{e}{2} \sqrt{e} = 2,24$

Os símbolos são dados na Figura 45.

Como se pode observar na Figura 44 a “cauda” da linha lorentziana é maior do que a da gaussiana e por conseguinte a varredura para este tipo de linha deve ser maior (1ª entrada da Tabela 7) assim como os limites de integração para o cálculo da área sob a linha de absorção.

As relações dadas na Tabela 7 (3ª e 4ª entradas) são importantes ao se comparar as áreas de diferentes linhas obtidas pelas aproximações $Y' \Delta B'^2$ e $Y'' \Delta B''^3$, pois as constantes de proporcionalidade são diferentes para cada tipo de linha. Para as linhas em primeira derivada as constantes são (3ª entrada da Tabela 7):

$$\frac{2\pi}{\sqrt{3}} = 3,63 \text{ e } \sqrt{\frac{\pi e}{8}} = 1,03 \text{ para a linha lorentziana e gaussiana, respectivamente. Com}$$

isto quando um espectro lorentziano e um gaussiano apresentam os mesmos valores para $\Delta B'$ e Y' o primeiro é resultado de $(3,63/1,03) = 3,51$ vezes mais spins que o segundo. Para espectros em segunda derivada esta relação é de 3,26. Logo fica claro

que estas aproximações devem ser empregadas com cautela sendo o ideal utilizá-las somente quando as formas das linhas de ressonância forem semelhantes.

A aquisição em segunda derivada aumenta a resolução do espectro e, baseado nas relações dadas na Tabela 7 (5ª entrada), pode-se observar que há um aumento da intensidade do sinal ao adquiri-lo em segunda derivada em relação ao espectro adquirido em primeira derivada quando a $\Delta B'$ for menor do que 0,36 e 0,33 mT para linhas lorentziana e gaussiana, respectivamente.

A 6ª entrada da Tabela 7 e simulações efetuadas com o programa WINEPR SimFonia[®] (Bruker Analytische Messtechnik GmbH) variando-se a forma da linha simulada e medindo-se as amplitudes $Y''_{\text{Mín}}$ e $Y''_{\text{Máx}}$ fornecem a relação dada na Figura 46.

FIGURA 46 - Relação entre as amplitudes da linha em 2ª derivada e a forma da linha simulada.

Esta relação pode ser utilizada para estimar-se a forma da linha experimental como é mostrado na Figura 47 para o sinal do rubi sintético. Diferentes formas de linha em campo alto e baixo, como o mostrado na Figura 47, é relatado em Poole (1983).

FIGURA 47 - Emprego da relação dada na Figura 46 para estimativa da forma da linha do espectro do rubi sintético.

Os radicais livres orgânicos de substâncias húmicas normalmente apresentam saturação não homogênea, resultado de envelopes de sinais de ressonância muito próximos. Isto provoca um alargamento não homogêneo das linhas de ressonância e nestes casos a forma da linha tende para gaussiana. Na prática obtêm-se linhas voigtianas que são deconvoluções de linhas lorentzianas com gaussianas (Stoneham, 1972).

6.2.3 FATORES EXPERIMENTAIS

6.2.3.1 Potência das microondas

A amplitude do sinal de RPE, desde que não haja saturação do sinal, é proporcional à $P^{1/2}$, onde P é a potência das microondas. Então para se otimizar a aquisição deve-se utilizar a maior potência das microondas abaixo da saturação. Para a obtenção da potência de saturação adquirem-se vários espectros, variando-se P , mede-se Y' e a seguir monta-se um gráfico deste valor contra $P^{1/2}$. A seguir, traça-se uma reta a partir da origem e para valores de $P^{1/2}$ que Y' é colinear não há a saturação

do sinal (Figura 48a). Outra forma de obter-se este valor é dividir Y' por $P^{1/2}$ (Gehring et al., 1993), o sinal não está saturado para valores constantes desta razão (Figura 48b). Como se pode observar nas figuras o primeiro procedimento pode fornecer valores errôneos da potência de saturação.

FIGURA 48 - Potência de saturação do “strong pitch”, (a) Y' versus $P^{1/2}$; (b) $Y' P^{1/2}$ versus $P^{1/2}$.

Em amostras com ocorrência de interação dipolar o aumento da potência das microondas intensifica muito este sinal. Além disto, em certas situações, a corrente no diodo de detecção pode variar durante a varredura do campo magnético sendo impossível a correta sintonia do equipamento, nestas situações há a necessidade de adquirir-se o espectro com uma potência abaixo da ideal.

6.2.3.2 Amplitude de modulação

A amplitude do sinal de RPE e a relação Sinal/Ruído são proporcionais à amplitude de modulação, porém ela leva a distorção do sinal, tanto alargamento quanto distorção da área sob a linha de absorção, sendo que a linha lorentziana é mais sensível à distorção induzida pela modulação. Para se ter uma distorção da linha

menor do que 1% a amplitude de modulação precisa ser menor do que $0,26 \Delta B'$ para a linha lorentziana e menor do que $0,35 \Delta B'$ para a linha gaussiana (Poole, 1983).

6.2.3.3 Correção da linha de base

Devido às limitações, já discutidas, do emprego das aproximações $Y' \Delta B'^2$ e $Y'' \Delta B'^3$ para o cálculo da área sob as linhas de absorção é preferível obter esta área por dupla integração digital, porém para isto é necessário a correção da linha de base em amostras que apresentem o espectro de RPE com linhas largas. Isto pode ser efetuado adquirindo-se dois espectros, um com potência abaixo da saturação do sinal de interesse e outro onde este sinal é saturado, a seguir utiliza-se o espectro com sinal saturado como linha de base e por subtração espectral obtém-se o espectro corrigido (Figura 49).

FIGURA 49 - Correção da linha de base utilizando a saturação do sinal do radical livre orgânico. Amostra de ácidos húmicos extraídos pelo *MI* (capítulo 5) do tratamento plantio direto na profundidade de 0-5 cm.

Os espectros de mais de 50 amostras diferentes, após a correção da linha de base conforme descrito, apresentaram valores de Y' em média 87 % (± 6 %) daqueles

dos espectros originais, indicando que uma saturação quase completa do sinal do radical livre orgânico foi obtida e que não houve uma grande variação entre diferentes amostras sendo, portanto, este método adequado para a correção da linha de base em espectros com linhas largas, inclusive sinais de Mn^{2+} , Cu^{2+} e VO^{2+} .

Outra alternativa para o ajuste da linha de base é o uso de simulações (Figura 50), onde ajustam-se funções tais como a gaussiana, lorentziana ou voigt. Uma vantagem adicional desta técnica é a possibilidade da obtenção de importantes parâmetros dos sinais de ressonância, tais como área, largura e forma da linha.

FIGURA 50 - Correção da linha de base utilizando simulações. Amostra de ácidos húmicos extraídos pelo *MI* (capítulo 5) do tratamento cultivo mínimo na profundidade de 5-10 cm.

7 FATORES QUE AFETAM A ANÁLISE QUANTITATIVA DE RADICAIS LIVRES ORGÂNICOS POR RPE

7.1 RESUMO

Analizou-se o efeito da umidade e íons metálicos na determinação da concentração de radicais livres orgânicos em amostras de húmus por RPE. O aumento da umidade da amostra levou a uma diminuição na concentração de radicais livres orgânicos, provavelmente devida à recombinação, e diminuição da largura de linha ($\Delta B'$), atribuída a um T_2 maior causado pelo aumento da mobilidade molecular (menor tempo de correlação). Íons diamagnéticos não afetaram a concentração de radicais livres orgânicos, enquanto que íons paramagnéticos (Fe^{3+} , Mn^{2+} e Cu^{2+}) provocaram uma intensa diminuição na concentração destes. Este efeito pode ser associado com o aumento da taxa de relaxação por interação dipolar nas maiores concentrações de íons paramagnéticos (acima de 0,01%) visto que neste caso o parâmetro de não homogeneidade diminui para valores menores que 1. Já a diminuição na concentração dos radicais livres orgânicos nas menores concentrações de íons paramagnéticos (abaixo de 0,01%) pode ser devida a interações de troca e/ou mudanças no equilíbrio das reações destes radicais livres orgânicos.

7.2 INTRODUÇÃO

Devido à possibilidade de recombinação dos radicais livres orgânicos (Martin-Neto et al., 1990), a umidade da amostra pode afetar a quantificação destes radicais por RPE, assim como os processos de relaxação por variações nos seus tempos de correlação (Poole, 1983; Weil et al., 1994). Adicionalmente, a presença de íons paramagnéticos pode afetar os processos de relaxação dos radicais livres e, dependendo da magnitude deste efeito, o sinal pode tornar-se não detectável por RPE. Logo, estes fatores devem ser levados em consideração quando análises quantitativas por RPE são executadas.

O método de saturação progressiva por potência das microondas pode ser utilizado na avaliação da taxa de relaxação assim como diferenciar entre as contribuições de troca e dipolar no aumento da taxa de relaxação. A contribuição dipolar ocorre quando um elétron de relaxação lenta está na proximidade de um com relaxação rápida (Galli et al., 1996). A interação de troca ocorre quando há a sobreposição de orbitais moleculares e está relacionada com a capacidade dos elétrons de formarem ligações químicas (Weil et al., 1994).

Visto que as substâncias húmicas frequentemente apresentam íons metálicos na forma de complexos ou adsorvidos, avaliou-se o efeito da adição de íons paramagnéticos e diamagnéticos e também da umidade na concentração de radicais livres orgânicos de uma amostra de húmus de turfeira. Adicionalmente, utilizando a técnica da saturação progressiva por potência das microondas, avaliaram-se os processos de relaxação dos radicais livres orgânicos na tentativa de identificar-se os mecanismos envolvidos nas alterações da concentração de radicais livres orgânicos.

7.3 MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de húmus de turfeira foram obtidas pela secagem ao ar do material orgânico de turfa sem qualquer tratamento químico. As análises elementares (C, H, N, S) destas amostras foram efetuadas em um equipamento Fisons Instruments EA 1108 CHNS, e os espectros de ressonância magnética nuclear no estado sólido de ^{13}C utilizando polarização cruzada e rotação segundo o ângulo mágico (^{13}C CP-MAS NMR) foram obtidos em um espectrômetro Varian Inova 400 operando a 100,6 MHz para o ^{13}C . Foram utilizados rotores cilíndricos de zircônia com diâmetro externo de 5 mm e “end-cap” de Kel-F carregados com aproximadamente 50 mg de amostra. Utilizou-se rotação de 8 kHz em uma sonda com MAS da Doty Scientific. Os decaimentos livres de indução (FID) foram adquiridos com largura espectral de 50 kHz e os dados foram coletadas em um tempo de aquisição de 12,8 ms. Utilizou-se uma seqüência de CP-MAS padrão (Wilson, 1987) que incluía um pulso de preparação de ^1H de 4 μs , 1 ms de tempo de contato e 1s de tempo de espera para relaxação. Os deslocamentos químicos são expressos em ppm em relação ao tetrametilsilano (TMS). Os resultados destas análises são dados na Tabela 8.

TABELA 8 - Resultados das análises elementar e de ^{13}C CP-MAS NMR.

Região (ppm)	^{13}C -RMN Atribuição	%	Análise Elementar (mg g ⁻¹)	
0-51	alquila	38,1	C	211,1
51-63	metoxila aa	6,9	H	32,0
63-95	O-alquila	17,7	N	6,9
95-110	di-O-alquila	4,5	S	37,4
110-142	aromático	15,7		
142-160	O-aromático	5,3		
160-190	caboxila	6,6		
190-230	carbonila	5,2		

Para o estudo do efeito da umidade, uma amostra do húmus foi moída em moinho vibratório e secada em dessecadores a vácuo sobre P_2O_5 (assumido como sendo 0% de umidade massa/massa). A seguir, alíquotas deste húmus foram colocadas em recipientes fechados e em equilíbrio com soluções saturadas de KOH, $MgCl_2$, NaCl e KCl que provêem umidades atmosféricas de 9, 33, 75 e 84% respectivamente (Lide, 1996). As amostras foram mantidas nesses recipientes por uma semana. Os teores de umidade obtidos foram de 0,8; 4,2; 6,2 e 7,1%. Metade de cada amostra foi desidratada novamente sobre P_2O_5 visando verificar-se a reversibilidade do efeito da umidade absorvida pelas amostras.

Para o estudo da interação com íons metálicos alíquotas da amostra de húmus, moída e seca, foram tratadas com soluções preparadas com sulfato de Na^+ , Zn^{2+} , Al^{3+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} e Cu^{2+} . As concentrações de metais utilizadas foram tais que resultassem em conteúdos de: 0,001; 0,01; 0,1; 0,5; 1; 2; 4 e 8% (massa/massa). Para se evitar a hidrólise do metal as soluções foram preparadas com água ajustada a pH 2 com H_2SO_4 . Uma amostra de referência (pH 2 sem adição de íons metálicos) também foi preparada.

As suspensões foram preparadas pela adição de 200 mg de húmus em 100 mL das soluções de referência ou de íons metálicos. O pH das suspensões obtidas foi ajustado para 4 e estas suspensões foram mantidas em agitação durante a noite e então liofilizadas, moídas em moinho vibratório e armazenadas em dessecadores a vácuo sobre P_2O_5 . Adicionalmente amostras de húmus e de $Fe_2(SO_4)_3$ foram secas sobre P_2O_5 e mecanicamente misturadas em moinho vibratório a conteúdos de Fe^{3+} de 0; 1 e 8%. Este experimento fora efetuado visando verificar o efeito da presença de íons paramagnéticos, sem reação com a amostra de húmus, na detecção dos radicais livres orgânicos.

As medidas foram realizadas em um espectrômetro de RPE Bruker EMX (Banda X) à temperatura ambiente. O parâmetro g foi medido contra padrão de DPPH - 2,2-difenil-1-picril-hidrazila ($g = 2,0036$).

Para as análises quantitativas tubos de RPE ($\varnothing$ 2,5 mm) foram preenchidos, em duplicata, com amostras de húmus a altura de 50 mm. A concentração de radicais livres orgânicos, expressa em spins $(g\ C)^{-1}$, foi estimada levando-se em conta a massa e o conteúdo de C da amostra utilizada. Os tubos empregados para o estudo da umidade foram fechados com Parafilm “M”[®] (American National CanTM) e as medidas das amostras com íons metálicos foram realizadas sob fluxo de N_2 . Os radicais livres orgânicos foram quantificados utilizando um cristal de rubi sintético como padrão secundário calibrando-se contra amostra de “strong pitch” de acordo com o método de Singer (Singer, 1959; Martin-Neto et al., 1991). A área sob o sinal integrado foi obtido por simulações (seção 6.2).

As curvas de saturação progressiva por potência das microondas foram obtidas entre 200 nW e 200 mW (60-0 dB), com uma amplitude de modulação de 0,1 mT. Os parâmetros experimentais para análise quantitativa foram: potência das microondas de 0,2 mW (30 dB); amplitude de modulação de 0,05 mT. Para as medidas de $\Delta B'$ os parâmetros foram: potência das microondas de 0,02 mW (40 dB); amplitude de modulação de 0,05 mT.

Os dados de saturação progressiva por potência foram ajustados pela seguinte expressão empírica (Galli et al., 1996):

$$Y' = KP^{1/2} \left(1 + PP_{1/2}^{-1} \right)^{-b/2} \quad (11)$$

onde Y' é a amplitude pico a pico do sinal de RPE em primeira derivada, K é uma constante, P é a potência das microondas, $P_{1/2}$ é a potência das microondas a meia

saturação, e b é o parâmetro de não homogeneidade. $P_{1/2}$ têm uma relação inversa com o produto $T_1 T_2$ e para o espectro em primeira derivada, $b = 1$ no limite de saturação não homogênea e $b = 3$, no limite homogênea. Valores de b menores do que 1 podem ser utilizados para se calcular a magnitude do aumento da taxa de relaxação por interação dipolar. Os ajustes foram feitos com a extensão de saturação igual a dois conforme descrito em Galli et al. (1996).

7.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O espectro de RPE do húmus apresentou apenas um sinal de ressonância estreito e intenso (Figura 51) a $g = 2,0036 (\pm 0,0001)$ e $\Delta B' = 0,462 \text{ mT} (\pm 0,004 \text{ mT})$ atribuído a radicais livres orgânicos (Riffaldi e Schnitzer, 1972; Senesi, 1990a; Martin-Neto, 1991; Jezierski et al., 1998). Sinais de íons paramagnéticos não foram detectados à temperatura ambiente e o valor g das amostras submetidas aos diferentes tratamentos não variou.

FIGURA 51 - Espectro de RPE da amostra de húmus não tratado mostrando em detalhe o sinal dos radicais livres orgânicos.

O aumento da umidade da amostra levou a uma diminuição linear de $\Delta B'$ (Figura 52a) e este efeito foi revertido quando as amostras foram desidratadas novamente. Esta diminuição em $\Delta B'$ pode ser atribuída a um maior T_2 devido ao aumento da mobilidade molecular, pois T_2 , em amostras sólidas, aumenta com a diminuição do tempo de correlação (Poole, 1983).

FIGURA 52 - (a) Largura da linha ($\Delta B'$) em função da umidade e (b) concentração de radicais livres orgânicos.

A diminuição na concentração de radicais livres orgânicos com o aumento da umidade (Figura 52b) foi provavelmente devida à recombinação dos radicais livres orgânicos (Martin-Neto et al., 1990), pois este efeito não foi totalmente reversível quando as amostras foram desidratadas novamente (Figura 52b) e o parâmetro b , obtido a partir das curvas de saturação, foi praticamente constante e não se correlacionou com a concentração de radicais livres orgânicos ($R = 0,18$).

A $\Delta B'$ do sinal dos radicais livres orgânicos teve uma alta correlação ($R = 0,997$) com o parâmetro $P_{1/2}$ (Figura 53), ajustado pela Eq. (11).

FIGURA 53 - Largura da linha ($\Delta B'$) do sinal dos radicais livres orgânicos de amostras de húmus a diferentes umidades em função da potência das microondas a meia saturação ($P_{1/2}$) com a extensão de saturação igual a 2.

As amostras tratadas com $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ misturado a seco e as tratadas com íons paramagnéticos (Fe^{3+} , Mn^{2+} e Cu^{2+}) apresentaram, nos espectros de RPE, uma linha larga ($\Delta B' > 15$ mT) atribuída à interação dipolar devida à presença de materiais ferri/ferromagnéticos, e o Y' desta linha larga correlacionou-se com o conteúdo de íon adicionado. As amostras tratadas com Mn^{2+} apresentaram um sexteto característico ($g = 2,00$; $A = 9,5$ mT) atribuídos a complexos de Mn^{2+} octaédrico em

esfera externa (McBride, 1978) e aquelas tratadas com Cu^{2+} um típico componente axial ($g_{\perp} = 2,07$; $g_{\parallel}$ não resolvido). Por outro lado, as amostras tratadas com Fe^{3+} não apresentaram sinais de ressonância específicos à temperatura ambiente.

A adição de íons diamagnéticos (Na^+ , Zn^{2+} ou Al^{3+}) e a mistura a seco de $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ não afetou a concentração de radicais livres orgânicos nem a $\Delta B'$ deste sinal. Por outro lado, o tratamento com íons paramagnéticos levou a uma diminuição exponencial da concentração de radicais livres orgânicos (Figura 54) e aumento de $\Delta B'$ do sinal remanescente. Para as amostras tratadas com Mn^{2+} a concentração de radicais livres orgânicos teve uma alta correlação linear ($R = -0,99$) com a amplitude do sinal de ressonância do Mn^{2+} octaédrico em esfera externa (Figura 55).

FIGURA 54 - Concentração de radicais livres orgânicos em função da adição de íons.

FIGURA 55 - Concentração de radicais livres orgânicos em função da amplitude do sinal de Mn^{2+} octaédrico em esfera externa medida no espectro em segunda derivada (ressonância em campo mais alto - $M_I = -5/2$).

Drozd e Jezierski (1994) encontraram menores concentrações de radicais livres orgânicos em substâncias húmicas extraídas de solos contaminados com Cu^{2+} . Sendo que Jezierski, et al. (1998) concluíram que este efeito seria devido a uma diminuição na produção e estabilização dos radicais livres orgânicos causadas pelo Cu^{2+} , porém os dados aqui apresentados indicam que este efeito poderia ter sido causado por uma diminuição “*a posteriori*” da concentração de radicais livres orgânicos detectáveis por RPE, diminuição esta devida à presença de íons paramagnéticos. Esta interpretação é consistente com os resultados de Jezierski, et al. (2000a,b) cujos trabalhos com ácidos húmicos de diferentes origens indicam que este efeito “*a posteriori*” pode ser geral para todas as substâncias húmicas.

Para conteúdos de íons paramagnéticos iguais ou abaixo de 0,01% os parâmetros $P_{1/2}$ e b praticamente não sofreram variações (Figura 56). Entretanto, para conteúdos de íons paramagnéticos acima de 0,01%, o aumento do conteúdo destes levou a um aumento de $P_{1/2}$ e a uma diminuição do parâmetro b para menos do que 1, o que é característico de aumento da taxa de relaxação por interação dipolar. Já a

diminuição da concentração de radicais livres orgânicos, decorrente do tratamento com menores quantidades de íons paramagnéticos (abaixo de 0,01 %), indicou a ocorrência de interação de troca, pois não houve distorções das curvas de saturação (Galli, et al., 1996). Isto sugere a ocorrência de interação antiferromagnética entre os radicais livres orgânicos e os elétrons desemparelhados dos íons metálicos, e/ou uma mudança no equilíbrio das reações destes radicais livres orgânicos, como previamente sugerido por Jezierski, et al. (2000b).

FIGURA 56 - Parâmetros de saturação ajustados com a extensão de saturação igual a 2 em função da adição de íons paramagnéticos.

Na região de aumento da taxa de relaxação por interação dipolar (conteúdos de íons paramagnéticos acima de 0,01%), a concentração de radicais livres orgânicos teve uma alta correlação com o parâmetro b ($R = 0,95$) obtido com os dados de saturação de todos os tratamentos com íons paramagnéticos (Figura 57).

FIGURA 57 - Concentração de radicais livres orgânicos em função do parâmetro de não homogeneidade (*b*) com a extensão de saturação igual a 2.

A $\Delta B'$, por outro lado, teve uma alta correlação com o parâmetro $P_{1/2}$ ($R = 0,98$) (Figura 58) e o coeficiente linear ajustado foi menor no experimento com íons paramagnéticos do que com variação da umidade (Figura 58 e Figura 53, respectivamente).

FIGURA 58 - Largura da linha ($\Delta B'$) do sinal dos radicais livres orgânicos de amostras de húmus tratadas com íons paramagnéticos em função da potência das microondas a meia saturação ($P_{1/2}$) com a extensão de saturação igual a 2.

A alta correlação negativa entre a concentração de radicais livres orgânicos e o conteúdo de Mn^{2+} octaédrico em esfera externa corrobora o efeito dos íons paramagnéticos adsorvidos na detecção dos radicais livres orgânicos, visto que o conteúdo total de íons paramagnéticos não apresentou a mesma correlação.

Este efeito de diminuição da concentração de radicais livres orgânicos com íons paramagnéticos provavelmente seja devido à interação de troca a baixas concentrações de íons paramagnéticos e interação dipolar a altas concentrações. Visando relacionar o parâmetro de não homogeneidade (b) com o acoplamento dipolar Galli et al. (1996) simularam dados de saturação progressiva por potência para um radical com aumento da taxa de relaxação por interação dipolar. A comparação entre os valores de b obtidos aqui com aqueles simulados por Galli et al. (1996) indica que a relação entre $k_{1d}/k_{1\text{intrínseco}}$, onde k_{1d} é a taxa de relaxação spin rede dipolar e $k_{1\text{intrínseco}}$ é a taxa de relaxação spin rede intrínseca, atingiu valores de 200 ou mais, indício de um acoplamento dipolar muito forte entre os radicais livres orgânicos e um spin com relaxação rápida (T_2 curto).

O efeito diferenciado dos íons paramagnéticos utilizados na diminuição da concentração de radicais livres orgânicos pode ser devido às diferentes afinidades destes íons com as substâncias húmicas. As afinidades são $\text{Cu}^{2+} > \text{Fe}^{3+} > \text{Mn}^{2+}$ (Kabata-Pendias e Pendias, 1985). Assim Cu^{2+} e Fe^{3+} teriam um efeito maior na diminuição da concentração de radicais livres orgânicos do que o Mn^{2+} , mas em altas concentrações este teria um efeito equivalente ao Cu^{2+} (Figura 54) provavelmente devido ao maior momento magnético do Mn^{2+} (Poole, 1983).

O coeficiente linear entre $\Delta B'$ e o parâmetro $P_{1/2}$ foi maior no experimento de variação da umidade da amostra do que com a adição de íons paramagnéticos (Figura 53 e Figura 58). Portanto pequenas variações em $P_{1/2}$, com o aumento da umidade da

amostra, levaram a uma grande variação em $\Delta B'$ indicando que as variações deste parâmetro com a umidade da amostra foram devidas, principalmente, à variações em T_2 . Por outro lado grandes variações no parâmetro $P_{1/2}$, com a adição de íons paramagnéticos, levaram a pequenas variações em $\Delta B'$ indicando que, neste caso, houve também variações significativas em T_1 , provavelmente devidas à contribuição de k_{Id} a altos conteúdos de íons paramagnéticos.

7.5 CONCLUSÕES

Os dados aqui apresentados indicam que variações nos teores de umidade em amostras de húmus, e possivelmente em outros materiais orgânicos com radicais livres, pode levar a variações na concentração de radicais livres orgânicos e em $\Delta B'$. Assim este fator deve ser controlado o que pode ser conseguido secando-se todas as amostras em dessecadores a vácuo sobre P_2O_5 . Adicionalmente, os dados indicam que íons paramagnéticos adsorvidos no húmus, além da concentração efetiva de radicais livres orgânicos, podem afetar a área sob a linha de absorção de RPE. Devido a isto, os dados quantitativos de RPE devem ser analisados com cautela. Por outro lado, estes resultados abrem novas perspectivas nos estudos da interação de metais com substâncias húmicas.

8 PROPRIEDADES DA RELAXAÇÃO MAGNÉTICA DOS RADICAIS LIVRES ORGÂNICOS DETECTADOS POR RPE EM SUBSTÂNCIAS HÚMICAS

8.1 INTRODUÇÃO

O tratamento de amostras de húmus com íons paramagnéticos leva a uma diminuição exponencial da concentração de radicais livres orgânicos, alargamento da linha de ressonância e alterações nas curvas de saturação destes radicais livres. Estes efeitos são devidos, provavelmente, a mecanismos de relaxação (Novotny e Martin-Neto, 2000). O comportamento das curvas de saturação e da largura da linha com a variação da temperatura pode ser utilizado para inferir-se sobre os mecanismos envolvidos na relaxação magnética da espécie em estudo (Brudvig et al., 1984; Sahlin et al., 1987; Styring e Rutherford, 1988; Innes e Brudvig, 1989) e com a finalidade de comprovar a ocorrência de interação dipolar entre os radicais livres orgânicos e os íons paramagnéticos adicionados à amostra de húmus efetuaram-se medidas da largura da linha de ressonância (largura da linha pico a pico do sinal em

primeira derivada - $\Delta B'$) e das curvas de saturação progressiva por potência das microondas variando-se a temperatura.

8.2 MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de húmus comercial foram tratadas com soluções contendo sulfato férrico. As concentrações de Fe^{3+} utilizadas foram: 0; 0,001; 0,5 e 1% (massa/massa). Detalhes a respeito das amostras utilizadas e do tratamento efetuado são dados na seção 7.3.

As medidas de RPE dos radicais livres orgânicos foram realizadas em um espectrômetro Bruker EMX (Banda X) às temperaturas entre 100 e 250 K obtidas com um controlador de temperatura Bruker BVT 3000 utilizando N_2 líquido. As curvas de saturação progressiva por potência das microondas foram obtidas variando-se a potência das microondas entre 200 nW e 200 mW (60-0 dB), a amplitude de modulação utilizada foi de 0,1 mT e foram acumuladas 5 varreduras. O ajuste dos dados de saturação progressiva foi realizado conforme descrito na seção 7.3.

Para as medidas de $\Delta B'$ os parâmetros foram: potência das microondas de 0,02 mW (40 dB); amplitude de modulação de 0,05 mT; e 1 varredura.

8.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores dos parâmetros $P_{1/2}$ e de $\Delta B'$ assim como suas dependências com a temperatura foram alterados pela adição de Fe^{3+} acima de 0,001% (Figura 59a e b).

FIGURA 59 - Dependência com a temperatura do parâmetro ajustado $P_{1/2}$ (a) e $\Delta B'$ (b) em amostras com diferentes conteúdos de Fe^{3+} .

Estes resultados indicam que a adição de Fe^{3+} provocou alterações nas taxas e mecanismos de relaxação. A diminuição de $\Delta B'$ (aumento de T_2) com o aumento da temperatura (Figura 59b) é conhecida como efeito Leigh (Hirsh et al., 1992; Leigh, 1970) resultado da interação dipolar entre um par de centros paramagnéticos. Este efeito foi observado na amostra de referência (0% Fe^{3+}) (Figura 59b), indicando que, embora os sinais de metais paramagnéticos detectados nestas amostras por RPE foram de baixa intensidade e observáveis apenas a baixa temperatura, eles podem ter

interagido com o radical livre orgânico. A presença de Fe^{2+} não pode ser descartada visto que esta espécie não é detectada por RPE nas temperaturas utilizadas devido aos tempos de relaxação spin-spin muito curtos.

O aumento do parâmetro $P_{1/2}$ e diminuição de $\Delta B'$ com o aumento da temperatura indicam que a adição de Fe^{3+} alterou, também, o mecanismo de relaxação spin-rede, e como $P_{1/2}$ e $\Delta B'$ são inversamente proporcionais a $T_1 T_2$ e a T_2 , respectivamente, tem-se que:

$$P_{1/2} \Delta B'^{-1} = \alpha k_I \quad (12)$$

α é uma constante de proporcionalidade e k_I é a taxa de relaxação spin-rede que pode ser descrita como:

$$k_I = k_{Iesc} + k_{I\theta} \quad (13)$$

sendo k_{Iesc} a soma das contribuições isotrópicas: intrínseca e do acoplamento escalar de troca; e $k_{I\theta}$ a contribuição anisotrópica resultante da interação dipolar entre os dois centros paramagnéticos. Logo pôde-se estimar as alterações no tempo de relaxação spin-rede com a adição de Fe^{3+} mas não o mecanismo envolvido (k_{Iesc} ou $k_{I\theta}$).

A dependência com a temperatura da taxa de relaxação spin-rede, devida à adição de 0,001% de Fe^{3+} , não foi alterada, porém maiores conteúdos causaram uma significativa alteração dos valores de αk_I e da sua dependência com a temperatura (Figura 60), indicando mudanças na taxa e mecanismo de relaxação spin-rede.

FIGURA 60 - Dependência com a temperatura do produto $P_{1/2}$ pelo inverso de $\Delta B'$, que é proporcional a k_I , em amostras com diferentes conteúdos de Fe^{3+} .

O efeito da interação magnética dipolar no tempo de relaxação spin-rede (T_I) da espécie de relaxação lenta, neste caso os radicais livres orgânicos, depende do momento magnético efetivo da espécie de relaxação rápida (Fe^{3+}). Que por sua vez apresenta uma relação direta com a temperatura, logo o significativo aumento da inclinação das retas ($T^{0.77}$ para $T^{1.89}$) com a adição de Fe^{3+} (Figura 60) pode ser atribuído ao aumento do momento magnético efetivo deste com a temperatura, confirmando a ocorrência de interação dipolar, apesar de não ser possível descartar a ocorrência concomitante de interação de troca.

A diminuição dos parâmetros $P_{1/2}$ e k_I na maior concentração de Fe^{3+} (1%), assim como a maior inclinação das retas (Figura 59a e Figura 60), podem ser devidas ao acoplamento antiferromagnético dos íons de Fe^{3+} nesta concentração reduzindo assim o momento magnético efetivo destes íons. Neste caso a interação dipolar só ocorreria com os centros de Fe^{3+} no estado excitado paramagnético cuja população aumenta com o aumento da temperatura (Sahlin et al., 1987).

O fato da dependência com a temperatura do parâmetro $P_{1/2}$, $\Delta B'$ e k_I não ter se alterado com a adição de 0,001% de Fe^{3+} , embora tenha ocorrido diminuição da concentração de radicais livres orgânicos (Novotny e Martin-Neto, 2002), indicam que esta diminuição pode ser devida à interação de troca tornando alguns dos radicais livres orgânicos “silenciosos” (diamagnéticos ou com tempos de relaxação muito curtos) nas temperaturas utilizadas neste estudo.

8.4 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos confirmam a ocorrência de interação dipolar entre os radicais livres orgânicos e os íons de Fe^{3+} adicionados à amostra, porém não permitem nenhuma conclusão a respeito de uma possível interação de troca entre estas espécies. Por outro lado, a diminuição da concentração de radicais livres orgânicos com a adição de 0,001% de Fe^{3+} , sem alterações mensuráveis nas taxas de relaxação e nas suas dependências com a temperatura, são fortes indícios da formação de espécies diamagnéticas, ou com tempos de relaxação muito curtos, devido à interação de troca. O uso da técnica de RPE pulsada (Colvin et al., 1983; Brudvig et al., 1984; Hirsh et al., 1992; Galli et al., 1995), medidas a temperaturas mais baixas (He líquido) (Innes e Brudvig, 1989) e da concentração de spins a diferentes temperaturas (Sahlin et al., 1987) poderiam elucidar esta questão.

9 CARACTERIZAÇÃO POR ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA DE ÁCIDOS HÚMICOS EXTRAÍDOS DE SOLOS SUBMETIDOS A DIFERENTES SISTEMAS DE PREPARO

9.1 INTRODUÇÃO

O uso da espectroscopia de fluorescência para o estudo de alguns aspectos moleculares e quantitativos da estrutura e funcionalidade das substâncias húmicas tem recebido grande atenção por parte da comunidade científica. Esta técnica tem sido aplicada principalmente no estudo de substâncias húmicas aquáticas, entretanto com materiais de origem terrestre também tem se mostrada promissora (Senesi et al., 1991; Piana e Zahir, 2000).

Embora estruturas fluorescentes pareçam constituir a menor parte dos constituintes das substâncias húmicas, a fluorescência intrínseca destes compostos pode fornecer informações a respeito da sua estrutura, conformação e heterogeneidade, assim como de aspectos dinâmicos e quantitativos relacionados às interações intra e intermoleculares com outras espécies (Senesi, 1990b).

9.2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram extraídos os ácidos húmicos de um latossolo roxo distrófico, muito argiloso (Typic Haplortox) submetido a um experimento de sistemas de preparo do solo, instalado no verão de 1983/1984 em Campinas-SP (IAC). Os sistemas de preparo estudados foram: plantio convencional; cultivo mínimo; e plantio direto com milho e soja no verão. Foram coletadas amostras nas profundidades de 0-5; 5-10; 10-20 e 20-30 cm. Para a extração das substâncias húmicas do solo foi utilizado o método sugerido pela “International Humic Substances Society”, (Swift, 1996) utilizando como extrator o NaOH ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$). Este método foi modificado visando reduzir o conteúdo de íons metálicos (pré-tratamento das amostras de solo com uma solução de HCl) e aumentar a eficiência do extrator (dispersão do solo com o uso de vibração ultra-sônica). Detalhes sobre as amostras de solo e metodologia de extração são encontrados nos capítulos 3 e 5.

As análises de fluorescência na região do ultravioleta-visível (UV-Vis) foram realizadas em um espectrômetro de luminescência Perkin-Elmer modelo LS50B. As medidas foram efetuadas com amostras de ácidos húmicos em solução de NaHCO_3 a $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 8,5). A concentração de ácidos húmicos utilizada foi de 20 mg L^{-1} determinada pela região em que a intensidade da fluorescência com excitação em 243 nm foi proporcional a concentração.

Foram utilizados os modos bidimensionais (2-D) de excitação e emissão para todas as amostras e tridimensionais (3-D) de emissão-excitação e varredura síncrona com 20 nm de $\Delta\lambda$ ($\lambda_{\text{em}} - \lambda_{\text{exc}}$) para as amostras extraídas da primeira profundidade (0-5 cm) de todos os tratamentos de preparo do solo estudados e plantio direto (20-30 cm).

Os parâmetros de aquisição são dados na Tabela 9.

TABELA 9 - Parâmetros utilizados na aquisição dos espectros de fluorescência

Modo	X (resolução) nm	Y (resolução) nm
Excitação (2-D)	λ_{ex} 220-480 (0,5)	IF com λ_{em} 500*
Emissão (2-D)	λ_{em} 300-650 (0,5)	IF com λ_{ex} 243**
Emissão (2-D)	λ_{em} 470-650 (0,5)	IF com λ_{ex} 455**
Síncrona (2-D)	λ_{ex} 230-650 (0,5)	$\Delta\lambda$ 20
Síncrona (2-D)	λ_{ex} 230-650 (0,5)	$\Delta\lambda$ 80
Emissão-excitação (3-D)	λ_{ex} 230-470 (20)	λ_{em} 250-650 (0,5)
Síncrona (3-D)	$\Delta\lambda$ 20-260 (20)	λ_{ex} 230-650 (0,5)

* Medido a intensidade da fluorescência emitida em 500 nm

** Medido a intensidade da fluorescência com excitação em 243 e 455 nm, respectivamente.

As fendas de entrada e saída para todas as medidas foram de 10 nm e as velocidades de varredura foram de 2 nm s⁻¹ para os modos 2-D e 6 nm s⁻¹ para os 3-D.

9.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No espectro no modo tridimensional de emissão-excitação (Figura 61a) pode-se observar máximos nos comprimentos de onda de excitação/emissão ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$) em: 240/500; 455/510; e 250/462 nm, os valores de λ_{ex} são aproximados, pois a resolução espectral nesta dimensão foi de 20 nm (Tabela 9). O máximo de emissão em aproximadamente 500 nm praticamente não varia com o comprimento de onda de excitação (Ewald et al., 2000) e é típico de substâncias húmicas terrestres (Senesi et al., 1991).

No modo de excitação síncrona há uma maior resolução decorrente do estreitamento das bandas devido à multiplicação de duas funções, os padrões de distribuição das intensidades, ou seja, os espectros dos dois modos de varredura (emissão e excitação) que ocorrem simultaneamente (Senesi, 1990b). Este aumento da resolução pode ser observado no pico de excitação em 396 nm que não é bem definido no modo de emissão-excitação (Figura 61b). A relativa constância do pico

de emissão em 500 nm pode ser observada neste modo de varredura pela distribuição dos máximos na diagonal correspondente a este valor.

FIGURA 61 - Mapa de contorno dos espectros de fluorescência no modo tridimensional de emissão-excitação (a) e de excitação síncrona (b) de ácidos húmicos extraídos da amostra cultivo mínimo 0-5 cm.

Os espectros de fluorescência no modo de excitação com λ_{em} em 500 nm apresentaram picos em 243, 397, 433 e 455 nm (Figura 62). De acordo ao que já foi visto na seção 2.3.3.1, materiais mais humificados tendem a ter picos de fluorescência deslocados para o vermelho. E como se pretende estimar o grau de humificação das substâncias húmicas extraídas de solos submetidos a diferentes sistemas de preparo, um dos valores de λ_{ex} selecionado foi o maior valor que fornecesse um pico de emissão em 500 nm ($\lambda_{ex} = 455$ nm) e o outro que resultasse na máxima intensidade de emissão em 500 nm, ($\lambda_{ex} = 243$ nm) (Figura 62).

FIGURA 62 - Espectros de fluorescência no modo de excitação com emissão em 500 nm.

A intensidade de cultivo decresce na ordem plantio convencional > cultivo mínimo > plantio direto, e esta diferença parece afetar as características estruturais dos ácidos húmicos, refletidas nos espectros de fluorescência, visto que na mesma profundidade ácidos húmicos provenientes do solo submetido ao plantio convencional e/ou cultivo mínimo apresentaram as maiores intensidades de fluorescência na região de maior comprimento de onda em relação à região de menor comprimento de onda (Figura 62) indicando maior grau de humificação. Isto é melhor visualizado dividindo-se os espectros em diferentes regiões, similarmente ao proposto por Senesi et al. (1991) e Spark e Swift (1994), ou seja, integrando-se os espectros nestas regiões e a seguir calculando a razão entre as áreas obtidas referentes às regiões de moléculas mais humificadas com λ_{ex} longo (L), no intervalo

de 410-480 nm, pela de moléculas mais simples com λ_{ex} muito curto (MC), de 220-300 nm, e curto (C), de 300-360 nm (Figura 63).

Amostras: Sistemas de cultivo: PD = plantio direto; PC = plantio convencional;
CM = cultivo mínimo;
Profundidades: 1 = 0-5 cm; 2 = 2-10 cm; 3 = 10-20 cm; 4 = 20-30 cm.

FIGURA 63 - Razão entre as áreas sob diferentes regiões dos espectros de fluorescência no modo de excitação com emissão em 500 nm.

A discriminação dos ácidos húmicos com diferentes graus de humificação também pode ser obtida utilizando os espectros de fluorescência no modo bidimensional de excitação síncrona (Kalbitz et al., 1999), que apresenta um estreitamento dos picos de fluorescência sendo possível obter mais informações neste modo de varredura ou mesmo variar seletivamente a intensidade de determinado pico (Senesi, 1990b; Senesi et al., 1991). Isto pode ser observado na Figura 64, onde o modo de varredura síncrona com $\Delta\lambda$ de 80 nm forneceu um espectro mais rico em detalhes, com picos em 447, 435 e 397 nm. Utilizando um $\Delta\lambda$ de 20 nm obteve-se um espectro no qual o máximo em 472 nm foi realçado, e como com o aumento do grau de humificação espera-se uma redução na separação entre os níveis fundamental e primeiro excitado (menor $\Delta\lambda$) e um deslocamento para o vermelho (maior λ_{ex}), o

uso de um $\Delta\lambda$ de 20 nm é adequado para este tipo de análise. Normalmente utiliza-se um valor de $\Delta\lambda$ de 18 nm (Senesi et al., 1991; Kalbitz et al., 1999).

A comparação entre os espectros das amostras provenientes de diferentes tratamentos (Figura 64b) suporta a pressuposição acima, ou seja, para amostras mais humificadas (plantio convencional e cultivo mínimo 0-5 cm) a contribuição relativa da área do pico em 472 nm para o espectro total foi maior.

FIGURA 64 - Espectros de fluorescência bidimensionais comparativos entre os modos de excitação com emissão em 500 nm e varreduras síncronas com $\Delta\lambda$ de 20 e 80 nm (a) e síncrona com $\Delta\lambda$ de 20 nm (b).

Os espectros obtidos no modo de emissão apresentaram menos detalhes que os demais, especialmente com excitação em 455 nm, onde o espectro resumiu-se a uma banda larga centrada em 510 nm (Figura 65). Logo sua utilização como indicador de humificação é limitada, especialmente ao se considerar que a intensidade de fluorescência pode ser extinta por íons paramagnéticos como será demonstrado no capítulo 10. Com a excitação em 243 nm observou-se pequenos picos mal resolvidos em 497 e 467 nm e um ombro em aproximadamente 430 nm (Figura 66).

FIGURA 65 - Espectros de fluorescência bidimensionais no modo de emissão com excitação em 455 nm.

FIGURA 66 - Espectros de fluorescência bidimensionais no modo de emissão com excitação em 243 nm.

Comparando-se os espectros obtidos com aqueles reportados por Senesi et al. (1991) observou-se que os ácidos húmicos estudados não se enquadrariam em apenas um dos cinco grupos propostos por estes autores. A presença dos picos em 455 nm, no modo de excitação, e em 497 nm, no de emissão, assim como a similaridade dos espectros de varredura síncrona com $\Delta\lambda$ de 20 nm enquadrariam estas amostras na classe III (ácidos húmicos de solos *Terra Rossa* e Loamy, ambos cultivados). Por outro lado, os picos em 467 e 430 nm no modo de emissão, e 397 no modo de excitação, incluiriam as amostras analisadas no grupo dos ácidos húmicos de composto, sintetizados por fungos de solo e ácidos fúlvicos de solo e turfa (classe IV).

Outro detalhe interessante que diferenciou as amostras estudadas das apresentadas por Senesi e colaboradores (Senesi et al., 1991) são os espectros no modo de excitação que apresentaram elevada intensidade abaixo de 360 nm, que é um indicativo de substâncias simples e pouco humificadas. Estes resultados indicam que os ácidos húmicos estudados possuem um grau de humificação muito menor das amostras utilizadas como padrões pelos referidos autores e corrobora dados similares obtidos por diferentes técnicas indicando o baixo grau de humificação das substâncias húmicas extraídas de solos tropicais (Martin-Neto et al., 1991; Novotny, 1997).

9.4 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos demonstram a utilidade da espectroscopia de fluorescência para o estudo de substâncias húmicas, principalmente em relação a um interessante indicador do grau de humificação. Por outro lado, as peculiaridades das amostras analisadas, devidas provavelmente às condições climáticas em que elas foram formadas, ratificam a necessidade de inclusão de amostras provenientes de áreas tropicais em coleções de padrões e o uso destas em estudos metodológicos e de padronização.

10 EFEITO DO ÍON VANADILA (VO^{2+}) RESIDUAL NAS ANÁLISES ESPECTROSCÓPICAS DE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS

10.1 INTRODUÇÃO

A presença de íons metálicos, alguns deles paramagnéticos, em substâncias húmicas é uma regra e estes íons, principalmente os paramagnéticos, podem afetar os resultados das análises espectroscópicas, como é o caso da RMN (Preston et al., 1984; Preston, 1996; Smernik e Oades, 1999, 2000), da espectroscopia de fluorescência (Senesi, 1990b; Piana e Zahir, 2000) e da RPE (Jezierski et al., 2000a,b; Novotny e Martin-Neto, 2002), e embora este efeito possa prejudicar as análises quantitativas por estas técnicas ele pode ser utilizado como ferramenta para o estudo da estrutura das substâncias húmicas e da sua interação com íons metálicos.

Visto que a RPE é uma técnica que permite a detecção e análise semi-quantitativa de metais paramagnéticos assim como, em certas situações, inferir sobre os ligantes deste metal (Mangrich e Vugman, 1988; Senesi, 1990a; Martin-Neto et al., 1991) pode-se utilizar esta técnica com a finalidade de monitorar os conteúdos de metais paramagnéticos e sítios de coordenação e correlacionar estes dados com os obtidos por outras técnicas. Pode-se, desta forma, inferir sobre o efeito destes metais

nos resultados obtidos por estas técnicas assim como as possíveis estruturas envolvidas na formação de complexos destes íons.

10.2 MATERIAL E MÉTODOS

As amostras utilizadas foram as mesmas descritas em 9.2. Os espectros de RPE foram adquiridos em um espectrômetro de RPE Bruker EMX operando em banda X à temperatura ambiente. Para as análises quantitativas tubos de quartzo para RPE com diâmetro interno de 2,5 mm foram preenchidos, em duplicata, a uma altura de 50 mm com amostras de ácidos húmicos. Em média esta quantidade de amostra pesava 30 mg. Os parâmetros experimentais utilizados na quantificação foram para os radicais livres orgânicos: faixa de campo de 5 mT; potência das microondas de 0,2 mW (30 dB); amplitude de modulação de 0,05 mT e para os metais paramagnéticos: faixa de campo varrida 600 mT; potência das microondas de 20 mW (10 dB); e amplitude de modulação de 0,5 mT. A quantificação dos centros paramagnéticos foi realizada de acordo com o método de Singer (Singer, 1959; Martin-Neto et al., 1991). A área sob o sinal integrado dos radicais livres orgânicos foi obtida por simulação e do íon vanadila (VO^{2+}) foi obtida pela aproximação $Y' \Delta B'^2$ (Poole, 1983) utilizando a sexta linha perpendicular de ressonância ($M_I = -3/2$), pois esta foi intensa e relativamente isolada das demais linhas de ressonância do espectro (Figura 67). A área correspondente à totalidade de metais paramagnéticos detectáveis por RPE à temperatura ambiente foi obtida integrando-se duas vezes o sinal de RPE adquirido em primeira derivada com uma região de integração de 320 mT (210-530 mT). As curvas de saturação progressiva por potência das microondas foram obtidas conforme descrito em 7.3.

FIGURA 67 - Espectro de RPE da amostra de ácidos húmicos extraídos do tratamento cultivo mínimo na profundidade de 0-5 cm mostrando a linha de ressonância correspondente a $M_I = -3/2$ utilizada no cálculo da área do sinal do íon VO^{2+}

Os espectros de ^{13}C -RMN no estado sólido com polarização cruzada de amplitude variável e rotação segundo o ângulo mágico (^{13}C VACP-MAS NMR) foram adquiridos em um espectrômetro Varian Inova 400 operando a 100,6 MHz para o ^{13}C . Utilizaram-se rotores cilíndricos ($\varnothing$ 5 mm) de zircônia com “end-caps” de Kel-F carregados com aproximadamente 50 mg de amostra. A taxa de rotação segundo o ângulo mágico foi de 8 kHz. Os FID's foram adquiridos em uma largura espectral de 50 kHz e os dados foram coletados em um tempo de aquisição de 12,8 ms. Utilizou-se a seqüência de pulsos ^{13}C VACP-MAS que incluía um pulso de preparação de 1H de 4 μs , 1 ms de tempo de contato e 500 ms de tempo de espera para relaxação ($> 5 T_1H$). A rampa no canal do 1H foi de 110% a 60% (em kHz) da condição de Hartmann-Hahn conforme ajustes obtidos na seção 6.1.4. Os deslocamentos químicos foram expressos em ppm em relação ao tetrametilsilano (TMS).

Para o cálculo das áreas de cada região espectral dos espectros de RMN estes foram deconvoluídos em 27 picos individuais (função voigt) (Figura 68). A posição dos picos ajustados foi determinada pelo método da segunda derivada sendo que, caso um pico simples não ajustasse bem os dados experimentais, um novo pico era adicionado para melhorar o ajuste (Mao et al., 2000). As áreas dos picos ajustados foram agrupadas de acordo com as regiões de deslocamento químico dados na Tabela 10. As áreas das bandas laterais deconvoluídas dos grupos carboxila (254 e 94 ppm) e aromáticos não protonados (209 e 50 ppm) foram somados aos seus respectivos sinais isotrópicos.

Os espectros de fluorescência foram obtidos conforme descrito na seção 9.2 e os de UV-Vis foram adquiridos em um espectrômetro de UV-Vis Shimadzu modelo UV-1601PC na região de 800 a 200 nm dissolvendo-se 2 mg de ácidos húmicos em 10 mL de uma solução $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ de NaHCO_3 (Chen et al., 1977).

FIGURA 68 - Espectro de ^{13}C VACP-MAS NMR da amostra de ácidos húmicos extraídos do solo sob plantio convencional (20-30 cm) mostrando o espectro experimental, o resultado da deconvolução e os sinais deconvoluídos, assim como as bandas laterais.

10.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O íon vanadila foi quantificado por RPE, pois foi o seu sinal, dentre os íons paramagnéticos, que dominou o espectro de RPE (Figura 67). Este sinal apresentou um padrão anisotrópico que consistia da sobreposição de dois octupletos de interação hiperfina correspondentes aos componentes paralelos ($g_{\parallel} = 1,94$ e $A_{\parallel} = 18,9$ mT) e perpendiculares ($g_{\perp} = 1,95$ e $A_{\perp} = 7,7$ mT) do íon vanadila (VO²⁺; I = 7/2; S = 1/2; d¹) em complexo de esfera interna com os ácidos húmicos. Os valores de $g_{\parallel}$ e $A_{\parallel}$, que são utilizados para diagnóstico pela maior amplitude de variação em relação aos parâmetros perpendiculares, são consistentes com VO²⁺ coordenado a ligantes oxigenados no plano equatorial (Mangrich e Vugman, 1988; Parish, 1990; Gehring et al., 1993).

O conteúdo de VO²⁺ detectado nos ácidos húmicos apresentou uma alta correlação com o teor de C das amostras de solo (R = 0,92), indicando a importância da matéria orgânica do solo, e em especial dos ácidos húmicos, na geoquímica deste elemento (Kabata-Pendias e Pendias, 1985).

O conteúdo deste íon, detectável por RPE, teve uma alta correlação com diversos dos parâmetros obtidos por RMN, UV-Vis, fluorescência e RPE (Tabela 10) isto, a primeira vista, pode parecer uma importante limitação das técnicas empregadas, visto que os valores obtidos não dependem exclusivamente de características intrínsecas das amostras (por exemplo: estrutura e grau de humificação) como é frequentemente citado na literatura, porém este efeito pode ser utilizado para inferir a respeito da estrutura, reatividade e grupos funcionais envolvidos na formação dos complexos do VO²⁺ como será demonstrado a seguir.

TABELA 10 - Coeficientes de correlação entre os íons metálicos paramagnéticos e os dados obtidos pelas diferentes técnicas espectroscópicas.

Espectroscopia	Variáveis dependentes	Metais paramagnéticos ¹	
		VO ²⁺	Totais
¹³ C-RMN	alquila (0-45 ppm)	0,27	0,12
	metoxila, N-alquila (45-59 ppm)	0,65*	0,16
	O-alquila (59-91 ppm)	-0,92*	-0,27
	di-O-alquila (91-109 ppm)	-0,91*	-0,30
	aromático (109-143 ppm)	0,83*	0,28
	O-aromático (143-156 ppm)	0,93*	0,52
	carboxila (156-186 ppm)	-0,90*	-0,52
	carbonila (186-230 ppm)	0,37	0,01
	Hidrofilic. ²	-0,92*	-0,43
UV-Vis	E ₄	-0,18	-0,57
	E ₆	0,78*	0,28
	E ₄ /E ₆	-0,89*	-0,53
Fluorescência	Excitação em 455 nm (absoluta)	-0,87*	-0,43
	Excitação em 243 nm (absoluta)	-0,92*	-0,43
	Excitação em 243 nm, pico em 402 nm (absoluta)	-0,80*	-0,36
	Excitação em 243 nm, pico em 426 nm (absoluta)	-0,69*	-0,49
	Excitação em 243 nm, pico em 460 nm (absoluta)	-0,92*	-0,65*
	Excitação em 243 nm, pico em 502 nm (absoluta)	-0,77*	-0,20
	Excitação em 243 nm, pico em 516 nm (absoluta)	-0,92*	-0,57
	Excitação em 243 nm, pico em 532 nm (absoluta)	-0,88*	-0,68*
	Excitação em 243 nm, pico em 402 nm (relativa)	0,86*	0,64*
	Excitação em 243 nm, pico em 426 nm (relativa)	0,59*	0,32
	Excitação em 243 nm, pico em 460 nm (relativa)	0,59*	0,09
	Excitação em 243 nm, pico em 502 nm (relativa)	0,25	0,70*
	Excitação em 243 nm, pico em 516 nm (relativa)	-0,94*	-0,55
	Excitação em 243 nm, pico em 532 nm (relativa)	-0,26	-0,78*
RPE	Spins g ⁻¹	-0,89*	-0,32
	<i>b</i>	-0,87*	-0,08

¹ As correlações marcadas com um asterisco são significativas ao nível de 5% de probabilidade.

² Razão entre as áreas atribuídas aos grupos polares e apolares:

Hidrofilic. = (O-alq.+metox., N-alq.+di-O-alq.+O-arom.+carbox.+carbonila)/(alq.+arom.)

Elétrons desemparelhados de espécies paramagnéticas propiciam um eficiente mecanismo de relaxação para os spins nucleares (Wilson, 1987; Bovey, 1988) e os núcleos imediatamente vizinhos aos sítios de coordenação destas espécies paramagnéticas seriam os mais afetados (Smernik e Oades, 1999). Como no presente caso o conteúdo de VO²⁺ determinado por RPE teve uma alta correlação negativa com a área relativa dos grupos funcionais O-alquila, di-O-alquila e carboxila (156-186 ppm) (Tabela 10), o que pode ser atribuído à supressão do sinal de RMN dos

grupos funcionais envolvidos na formação dos complexos deste íon (Aime et al. 1996; Smernik e Oades 2000), concluí-se que os grupos funcionais de carboidratos (O-alquila e di-O-alquila) e carboxila tiveram uma importante contribuição na formação dos complexos do VO²⁺. Smernik e Oades (1999) concluíram que a maioria dos sítios de coordenação dos íons metálicos é do tipo ácido urônico, que são ácidos mono-carboxílicos derivados da oxidação do grupo terminal CH₂OH de aldoses a um grupo carboxila. Adicionalmente, Preston et al. (1984), utilizando medidas de T_{1ρ} de ¹H, concluíram que pode haver uma localização preferencial do Cu²⁺ na porção hidrofílica ou em carboidratos da matéria orgânica do solo.

A alta correlação positiva entre o VO²⁺ e os grupos Aromático e O-Aromático (Tabela 10) pode ser devida ao fato que, como as áreas das diferentes regiões espectrais são relativas, a perda seletiva dos sinais de grupos funcionais envolvidos na formação dos complexos do VO²⁺ levaria a um aumento relativo dos sinais que não foram afetados por este íon.

No presente estudo a maior afinidade do íon metálico pelos componentes hidrofílicos das amostras pode ser observada na Figura 69. Os dados experimentais foram melhor ajustados por uma função alométrica ($y = ax^b$), indicando uma não linearidade da supressão dos sinais de RMN.

FIGURA 69 -Hidrofilicidade determinada por ^{13}C VACP-MAS NMR em função do conteúdo de VO^{2+} determinado por RPE.

O fato de que os grupos O-aromáticos aparentemente não estavam envolvidos na formação dos complexos do VO^{2+} , embora existam propostas afirmando que estes grupos são importantes para a formação destes complexos (Mangrich e Vugman, 1988), não é surpreendente visto que Smernik e Oades (1999) já relataram resultados semelhantes com outros íons. Esta aparente controvérsia pode ser devida ao fato que boa parte do sinal atribuído a grupos O-aromáticos possa ser de grupos metoxilas aromáticas de resíduos da lignina ao invés de grupos fenólicos, pois o sinal do C metoxílico, cuja atribuição foi confirmada no experimento de ^{13}C VACP-MAS NMR com desacoplamento defasado (Figura 70), foi relativamente intenso nas amostras estudadas, principalmente nas camadas mais superficiais, e estes grupos teriam baixa capacidade de formarem complexos de VO^{2+} diferentemente dos grupos fenólicos que seriam hábeis em formarem tais complexos, como sugeriram Mangrich e Vugman (1988).

FIGURA 70 - Espectros de ^{13}C VACP-MAS NMR e ^{13}C VACP-MAS NMR com desacoplamento defasado (DD) de 70 μs da amostra de ácidos húmicos extraídos do solo sob plantio convencional (0-5 cm).

A possibilidade destas correlações serem espúrias, ou seja, correlações casuais não caracterizando uma relação de causa e efeito, supondo que as amostras com maiores conteúdos de VO^{2+} fossem as que apresentassem, intrinsecamente, menores conteúdos de grupos funcionais oxigenados não se justifica visto que estes grupos são hábeis em formarem complexos de coordenação (Stevenson, 1994) e os dados de RPE são consistentes com VO^{2+} coordenado a ligantes oxigenados. Além disto, o efeito da supressão de sinais de RMN por íons paramagnéticos é bem fundamentado teórica e experimentalmente (Wilson, 1987; Bovey, 1988; Aime et al., 1996; Smernik e Oades, 1999, 2000).

É interessante ressaltar que as correlações entre os grupos determinados por RMN e o conteúdo total de metais paramagnéticos, que inclui a linha larga ($\Delta B' = 72 \text{ mT}$) centrada em $g \cong 2$ atribuída à interação dipolar entre íons de Fe^{3+} próximos (Goodman e Hall, 1994), não foram significativas, indicando que apenas os íons especificamente ligados aos ácidos húmicos, tais como o VO^{2+} coordenado a

grupos oxigenados, afetariam as análises por RMN, comprovando experimentalmente hipóteses semelhantes propostas na literatura (Pfeffer et al., 1984; Preston et al., 1984, 1989b; Smernik e Oades, 1999, 2000). Outras implicações importantes destas observações são que a análise elementar dos íons paramagnéticos não substituiria a análise por RPE, pois aquela forneceria dados totais e nenhuma informação a respeito dos sítios de coordenação destes íons, e que o tratamento de amostras com soluções contendo íons paramagnéticos não garante que os íons complexos formados sejam similares àqueles dos íons residuais, principalmente ao se levar em conta que estes íons residuais persistiram durante a exaustiva extração e purificação dos ácidos húmicos, sendo portanto de difícil substituição por outros. Esta hipótese pode explicar os resultados em que não se observou supressão seletiva de sinais de RMN pelo tratamento das amostras com íons paramagnéticos (Vassalo et al., 1987; Preston et al., 1989b; Smernik e Oades, 1999).

Em relação à espectroscopia na região do UV-Vis (Tabela 10) obteve-se uma correlação positiva entre o VO²⁺ e a absorção em 665 nm (E₆). Espectros de fotoacústica de complexos de VO²⁺ com ácidos húmicos apresentam uma banda de absorção larga centrada em 629 nm (Mangrich e Vugman, 1988), logo pode-se atribuir este aumento de absorção na região de 665 nm à presença do complexo de VO²⁺ e isto acarretaria uma diminuição na relação E₄/E₆ com o aumento do conteúdo de VO²⁺ (Tabela 10).

Observou-se o fenômeno de extinção da intensidade de emissão fluorescente pelo VO²⁺ (“quenching”) tanto para a excitação em 243 quanto em 455 nm (Tabela 10). O mesmo efeito foi observado para o modo de excitação com emissão em 500 nm (R = -0,91), porém as razões entre as áreas das diferentes regiões espectrais, obtidas conforme descrito no capítulo 9, com a finalidade de obter-se um indicador

do grau de humificação das substâncias húmicas, não apresentaram correlações significativas com o conteúdo de VO^{2+} ou total de metais paramagnéticos (correlações menores do que $|0,1|$) confirmando a utilidade deste indicador.

Similarmente à hidrofilicidade observou-se uma não linearidade do efeito do VO^{2+} na extinção da fluorescência (Figura 71).

FIGURA 71 - Área absoluta sob os espectros de emissão fluorescente (emissão com excitação em 243 nm) em função do conteúdo de VO^{2+} determinado por RPE.

A formação de complexos de íons paramagnéticos leva a uma drástica redução da intensidade de fluorescência e, segundo Senesi (1990b), os grupos fluoróforos, essencialmente estruturas aromáticas e alifáticas altamente insaturadas com duplas conjugadas, estariam diretamente envolvidos na formação destes complexos, sendo que esta afirmação é questionável pela dificuldade de se imaginar tais estruturas envolvidas na formação de complexos, exceto grupos fenólicos hábeis em formarem quelatos tais como salicilato e ftalato. Além disto os resultados obtidos por RMN já discutidos e os dados da literatura reforçam este questionamento, pois indicam que os grupos hidrofílicos têm uma importante contribuição para a formação

de complexos. Logo é possível inferir que o efeito do íon paramagnético na fluorescência pode “difundir-se” na amostra afetando grupos não diretamente envolvidos na formação dos complexos ou então que os grupos hidrofílicos também contribuem para a fluorescência de ácidos húmicos. Assim novos estudos, eventualmente com compostos modelo, poderiam ser executados visando elucidar esta questão.

O efeito da extinção de fluorescência reduziu a área absoluta de todos os picos deconvoluídos com excitação em 243 nm (Tabela 10), porém a área relativa dos 3 primeiros picos aumentou (correlação positiva com o conteúdo de VO²⁺) e a área do 5º diminuiu (Tabela 10), ou seja, há uma maior diminuição do pico deconvoluído centrado em 516 nm ou eventual deslocamento para o azul (menor comprimento de onda) de alguma banda de emissão. Isto pode ser devido à maior extinção da intensidade de fluorescência das emissões em maior comprimento de onda ou aumento da separação de energia entre o estado fundamental e o primeiro estado singlete excitado. Como já visto em 2.3.3.1, a presença de átomos de O e N na estrutura das substâncias húmicas provoca um deslocamento da emissão fluorescente para o vermelho, então, o íon VO²⁺, coordenado a grupos oxigenados, suprimiria preferencialmente as bandas de emissão associadas a esses grupos. O aumento da absorção em 665 nm com o aumento do conteúdo de VO²⁺, discutido anteriormente, também pode ter contribuído para a maior redução da intensidade relativa de fluorescência na região de maior comprimento de onda pelo efeito de filtro interno (Senesi, 1990b; Spark e Swift, 1994), pois as moléculas de ácidos húmicos com maior conteúdo de VO²⁺ absorveriam mais eficientemente a luz emitida por fluorescência nesta região.

As amostras com maior conteúdo de VO^{2+} apresentaram menor concentração de radicais livres orgânicos (Tabela 10 e Figura 72). A formação de complexos de metais paramagnéticos pelas substâncias húmicas pode levar à redução do conteúdo de radicais livres orgânicos detectados por RPE (Jezierski et al., 2000a,b) e isto pode ser atribuído às alterações no equilíbrio químico de reações envolvendo radicais livres ou interações de troca ou dipolar entre estes radicais e o metal paramagnético. Visto que o parâmetro b foi sempre menor do que 1, indicativo de interação dipolar, e apresentou uma correlação negativa com o conteúdo deste íon (Tabela 10), pode-se concluir que a diminuição da concentração de radicais livres orgânicos seja devida à interação dipolar destes com os íons VO^{2+} (Novotny e Martin-Neto, 2000, 2002).

FIGURA 72 - Radicais livres orgânicos em função do conteúdo de VO^{2+} , ambos determinados por RPE.

10.4 CONCLUSÕES

O VO²⁺ residual afetou os resultados obtidos pelas técnicas espectroscópicas de UV-Vis, ¹³C-RMN, RPE e fluorescência, confirmando que outros fatores, além de características intrínsecas dos ácidos húmicos, devem ser levados em consideração ao se interpretar os dados espectroscópicos. Todavia, esta influência de íons paramagnéticos pode ser utilizada na avaliação das interações entre ácidos húmicos e íons metálicos e, no presente caso, foi possível inferir que os sítios de coordenação do VO²⁺ são possivelmente associados a estruturas carboxílicas e de carboidratos. Adicionalmente, a supressão do sinal dos radicais livres orgânicos e da fluorescência pode indicar a proximidade destes radicais e dos fluoróforos com os sítios de coordenação, ou a fácil difusão do efeito paramagnético pela estrutura dos ácidos húmicos.

11 CROMATOGRAFIA POR EXCLUSÃO DE TAMANHO EM VIDRO DE POROSIDADE CONTROLADA DE ÁCIDOS HÚMICOS E ANÁLISE POR ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA DAS FRAÇÕES CROMATOGRÁFICAS

11.1 INTRODUÇÃO

Atualmente há uma intensa e estimulante discussão no meio científico sobre a estrutura, forma e tamanho das moléculas de substâncias húmicas (Schulten e Schnitzer, 1993, 1997; Swift, 1999; Wershaw, 1986, 1993, 1999; Piccolo, et al., 1996, 1999; Piccolo, 2000, 2001; Piccolo e Conte, 2000; Simpson et al., 2000), e em diversos artigos que sustentam esta discussão foi empregado o fracionamento e análise das substâncias húmicas utilizando a cromatografia de exclusão por tamanho (Swift, 1999; Wershaw, 1986, 1993, 1999; Piccolo, et al., 1996, 1999; Piccolo, 2000, 2001; Piccolo e Conte, 2000). De fato esta discussão tem despertado tanto a atenção da comunidade científica que a revista Soil Science publicou uma série de artigos

com considerações dos defensores de cada uma das propostas de modelo (estrutura macromolecular, associação molecular de pequenas unidades e estrutura micelar ou pseudo micelar). A iniciativa surgiu em virtude das divergências mantidas pelos participantes de um simpósio ocorrido nos Estados Unidos em 1997 (Clapp e Hayes, 1999), porém o embate está longe de terminar. Recentemente (julho/2000), no 10º encontro internacional da IHSS ocorrido em Toulouse-França diversas discussões acaloradas tiveram lugar em plenária em função deste tema e neste mesmo congresso de 116 artigos apresentados nos tópicos Origem e Caracterização e Novas Técnicas vinte e cinco foram relacionados ao tamanho molecular das substâncias húmicas.

Na série de artigos publicados na Soil Science alguns tratavam de possíveis artefatos, passíveis de ocorrerem quando do uso da cromatografia de exclusão por tamanho, e equívocos na interpretação dos resultados obtidos (Clapp e Hayes, 1999; De Nobili e Chen, 1999; Perminova, 1999; Swift, 1999). Assim fica clara a necessidade de experimentos criteriosos e uso de técnicas cromatográficas mais “robustas” visando minimizar estes problemas. Neste sentido a cromatografia de exclusão em vidro de porosidade controlada apresenta uma grande vantagem em relação aos clássicos géis orgânicos: ela é relativamente inerte à maioria das substâncias (Danneberg, 1977).

11.2 MATERIAL E MÉTODOS

O sistema cromatográfico utilizado foi um Biologic LP System (Biorad) constituído de uma bomba peristáltica, sistemas de válvulas e misturador de eluentes, detectores de condutividade e de UV-Vis (254 e 280 nm) equipado com uma célula de fluxo e um coletor de frações. O sistema estava conectado a um microcomputador

que registrava os cromatogramas. Utilizou-se uma coluna cromatográfica de vidro (Biorad) com 10 mm de diâmetro interno e 500 mm de comprimento que foi preenchida com vidro de porosidade controlada (“controlled pore glass” - CPG, Electronucleonics, Fairfield, NJ) de 120-200 mesh e diâmetro de poros de 16,5 nm. O eluente utilizado foi uma solução de NaHCO_3 ($0,05 \text{ Mol L}^{-1}$) preparada com água deionizada. Este eluente foi previamente evacuado a fim de minimizar-se o problema com gases dissolvidos.

O valor K_d dos cromatogramas, como uma medida do tamanho molecular, foi calculado utilizando a Eq. (14):

$$K_d = (V_e - V_0) (V_t - V_0)^{-1} \quad (14)$$

V_e é o volume eluído, V_0 é o volume morto e V_t o volume total, estes valores foram obtidos pela eluição de uma solução aquosa teste contendo 0,5 % de “blue dextran 2000” (massa molar = $2 \cdot 10^6$; Pharmacia), o V_t era determinado pela condutividade do eluente.

A coluna não foi calibrada com padrões de diferentes tamanhos moleculares pois os ácidos húmicos são formados por uma mistura heterogênea de substâncias com diferentes formas moleculares resultando que cada grupo de compostos terá uma relação diferente entre K_d e o logaritmo da massa molar (Kuiters e Mulder, 1993). Cameron et al. (1972a) mostraram que o comportamento hidrodinâmico dos ácidos húmicos é diferente daquele de proteínas globulares e dextranas utilizadas na calibração de colunas, de tal forma que curvas de calibração obtidas com estes padrões não servem para as estimativas do tamanho molecular de ácidos húmicos.

As amostras de ácidos húmicos utilizadas foram as mesmas descritas em 9.2. Para as análises e fracionamento foram dissolvidos 5 mg das amostras de ácidos húmicos em 10 mL da solução de eluente, agitou-se esta solução durante 12 h em

agitador orbital ajustado para 200 rpm e a seguir injetou-se 1,1 mL desta solução na coluna cromatográfica utilizando uma válvula injetora com “loop”. O fluxo de eluente utilizado foi de 5 mL min⁻¹.

Os espectros de fluorescência das frações cromatográficas obtidas foram adquiridos conforme descrito na seção 9.2 sendo que, quando necessário, as frações foram diluídas para que a intensidade da fluorescência fosse proporcional à concentração. Os parâmetros de aquisição são dados na Tabela 11.

TABELA 11 - Parâmetros utilizados na aquisição dos espectros de fluorescência

Modo	X (resolução) nm	Y (resolução) nm
Excitação (2-D)	λ_{ex} 220-480 (0,5)	IF com λ_{em} 500*
Emissão (2-D)	λ_{em} 300-650 (0,5)	IF com λ_{ex} 240**
Emissão (2-D)	λ_{em} 470-650 (0,5)	IF com λ_{ex} 450**
Síncrona (2-D)	λ_{ex} 220-650 (0,5)	$\Delta\lambda$ 20
Síncrona (2-D)	λ_{ex} 220-650 (0,5)	$\Delta\lambda$ 80
Emissão-excitação (3-D)	λ_{ex} 230-470 (20)	λ_{em} 250-650 (0,5)
Síncrona (3-D)	$\Delta\lambda$ 20-260 (20)	λ_{ex} 220-650 (0,5)

* Medido a intensidade da fluorescência emitida em 500 nm

** Medido a intensidade da fluorescência com excitação em 240 e 450 nm, respectivamente
As fendas de entrada e saída para todas as medidas foram de 10 nm e as velocidades de varredura foram de 2 nm s⁻¹ para os modos 2-D e 6 nm s⁻¹ para os 3-D.

11.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os cromatogramas dos ácidos húmicos analisados foram caracterizados por dois picos cromatográficos, um com K_d de aproximadamente 0 e outro com K_d = 0,65 (Figura 73), sendo que a proporção de ácidos húmicos com menor tamanho molecular aumentou com a profundidade (pico com K_d = 0,65)

FIGURA 73 - Cromatogramas de amostras de ácidos húmicos extraídos do solo sob plantio direto.

Entretanto, ao subtrair-se o cromatograma da amostra de ácidos húmicos provenientes da camada de 0-5 cm daquele da camada de 20-30 cm, observou-se que o pico com maior Kd era formado por dois picos sobrepostos (Figura 74) sendo o pico com $K_d = 0,42$ mais abundante nas camadas mais superficiais.

FIGURA 74 - Cromatogramas de amostras de ácidos húmicos extraídos das camadas de 0-5 e 20-30 cm e resultado da subtração destes dois cromatogramas e seus picos deconvoluídos.

Como a coluna cromatográfica foi curta demais para separar estes picos, utilizou-se este cromatograma resultante da subtração para efetuar os ajustes iniciais

dos picos cromatográficos (Figura 74). A seguir, utilizando as estimativas iniciais de posição, largura e forma dos picos, efetuou-se os ajustes dos demais cromatogramas e definição das frações (Figura 75). As frações foram coletadas nos seguintes intervalos de K_d : -0,15 a 0,21 (fração A); 0,21 a 0,48 (fração B1); 0,48 a 0,95 (fração B2); e 0,95 a 1,5 (fração C).

FIGURA 75 - Cromatogramas de amostras de ácidos húmicos extraídos do solo sob plantio direto (0-5 cm), mostrando os picos deconvoluídos e frações coletadas.

O aumento da proporção de ácidos húmicos de menor tamanho molecular com a profundidade ocorreu em todos os tratamentos sendo que na área sob plantio direto houve um claro gradiente com a profundidade e nas áreas onde ocorreu um maior distúrbio do solo a distribuição do tamanho molecular dos ácidos húmicos foi mais homogênea, principalmente nas primeiras camadas (Figura 76).

Amostras: Sistemas de cultivo: PD = plantio direto; PC = plantio convencional; CM = cultivo mínimo;

Profundidades: 1 = 0-5 cm; 2 = 2-10 cm; 3 = 10-20 cm; 4 = 20-30 cm.

FIGURA 76 - Área dos picos deconvoluídos dos cromatogramas das amostras de ácidos húmicos.

O aumento da proporção de ácidos húmicos de menor tamanho molecular aparente é melhor visualizado calculando-se a contribuição relativa da área do pico 3 ($K_d = 0,57$) em porcentagem da área total do cromatograma. Esta contribuição relativa do pico 3 correlacionou-se negativamente com o conteúdo de VO^{2+} , determinado por RPE conforme descrito na seção 10.2, (Figura 77). Isto pode ser devido ao efeito agregante de metais polivalentes ligados aos ácidos húmicos (MacCarthy e Mark, 1976; Ryan e Weber, 1982; Gamble et al., 1985; Teasdale, 1987; Wershaw, 1989, 1999; Reid et al., 1991; Aster et al., 1997).

FIGURA 77 - Contribuição relativa (em %) da área do terceiro pico deconvoluído ($K_d = 0,57$) dos cromatogramas de ácidos húmicos em função do conteúdo de VO^{2+} determinado por RPE.

Os espectros no modo tridimensional de emissão-excitação e de excitação síncrona (Figura 78) das frações B1, B2 e C foram semelhantes entre si e similares àqueles dos ácidos húmicos não fracionados (seção 9.3).

FIGURA 78 - Mapa de contorno dos espectros de fluorescência no modo tridimensional de emissão-excitação (a) e de excitação síncrona (b) da fração B2 de ácidos húmicos extraídos da amostra plantio direto 0-5 cm.

Já os espectros da fração A apresentaram máximos deslocados para o azul (menores comprimentos de onda) e uma intensidade de fluorescência significativamente reduzida (Figura 79). Estes espectros são semelhantes àqueles descritos por Senesi et al. (1991) de ácidos húmicos extraídos de lodo de esgoto. Os resultados confirmam a utilidade da cromatografia por exclusão de tamanho para o fracionamento de ácidos húmicos visto que pelo método clássico de fracionamento químico baseado em características de solubilidade estas frações seriam consideradas como uma única fração homogênea, os ácidos húmicos.

FIGURA 79 - Mapa de contorno dos espectros de fluorescência no modo tridimensional de emissão-excitação (a) e de excitação síncrona (b) da fração A de ácidos húmicos extraídos da amostra plantio direto 0-5 cm.

Com exceção dos espectros de emissão com excitação em 450 nm, todos os espectros da fração B2 apresentaram-se deslocados para o vermelho, enquanto que os da fração A o deslocamento foi para o azul (Figura 80). Isto está em desacordo com os dados obtidos por Ewald et al. (1988) e Korshin e Violleau (2000), nos quais frações de maior tamanho molecular apresentaram espectros com máximos de

emissão deslocados para o vermelho. Porém este deslocamento para o vermelho pode ser devido a um maior grau de humificação (seção 9.3) da fração B2. Substâncias húmicas, fracionadas por cromatografia de exclusão, podem gerar frações com elevado tamanho molecular aparente cujo grau de humificação é baixo (Novotny et al., 1999).

FIGURA 80 - Espectros de fluorescência das diferentes frações cromatográficas dos ácidos húmicos extraídos da área sob plantio direto (10-20 cm). Modos de: (a) emissão com excitação em 240 nm; (b) excitação com emissão em 500 nm; (c) síncronas com $\Delta\lambda$ de 20 nm e (d) 80 nm.

O deslocamento dos espectros para o vermelho da fração B2 diminui consideravelmente nas amostras de ácidos húmicos extraídos da maior profundidade. Isto é melhor visualizado dividindo-se os espectros em diferentes regiões e calculando a relação entre as áreas destas regiões (seção 9.3) (Figura 81).

Amostras: Sistemas de cultivo: PD = plantio direto; PC = plantio convencional; CM = cultivo mínimo;
 Profundidades: 1 = 0-5 cm; 2 = 2-10 cm; 3 = 10-20 cm; 4 = 20-30 cm.

FIGURA 81 - Razão entre as áreas sob diferentes regiões dos espectros de fluorescência (excitação com emissão em 500 nm). MC: 220 - 300 nm e L: 410 - 480 nm.

Os espectros no modo de emissão com excitação em 450 nm das frações cromatográficas foram semelhantes entre si, exceto por diferenças nas intensidades (Figura 82). A falta de detalhes nestes espectros também foi observada nas amostras de ácidos húmicos não fracionadas pela cromatografia (capítulo 9). A correlação entre a área sob estes espectros e o grau de humificação determinado pela razão entre as áreas de diferentes regiões espectrais, conforme descrito no capítulo 9, não foi significativa ($R = 0,42$) e confirma a limitação do uso da área sob os espectros no modo de emissão com excitação em 450 nm como um indicador do grau de humificação.

FIGURA 82 - Espectros de fluorescência, modo de emissão com excitação em 450 nm, das diferentes frações cromatográficas dos ácidos húmicos extraídos da área sob plantio direto (10-20 cm). $IF_{máx}$ é a intensidade de fluorescência no máximo.

11.4 CONCLUSÕES

Os ácidos húmicos extraídos das camadas mais superficiais apresentaram uma maior contribuição de estruturas com maior tamanho molecular aparente e este parâmetro correlacionou-se com o conteúdo de VO^{2+} residual detectado nos ácidos húmicos, indicando que a presença destas estruturas com maior tamanho molecular pode ser devida ao efeito agregante de metais polivalentes.

A fração cromatográfica com maior tamanho molecular aparente (fração A) foi a que apresentou espectros típicos de ácidos húmicos menos humificados enquanto que aquela com tamanho intermediário (fração B2) seria a fração mais humificada sendo que esta diferença no grau de humificação entre as frações cromatográficas diminuiu nas amostras extraídas da camada de 20-30 cm.

12 ANÁLISE MULTIVARIADA DOS DADOS ESPECTROSCÓPICOS

12.1 INTRODUÇÃO

Como visto no capítulo 10, a presença de íons paramagnéticos residuais nas substâncias húmicas pode afetar os resultados espectroscópicos obtidos. Logo a interpretação direta destes resultados, correlacionando-os com características intrínsecas das amostras, tal como grau de humificação, pode ser equivocada. Daí surge a questão se é possível isolar o efeito dos íons paramagnéticos de tal forma que seja possível “aproveitar” os dados espectroscópicos obtidos para inferir-se a respeito da estrutura das substâncias húmicas. Uma técnica que pode ser útil para isto é a estatística multivariada, em especial a análise de componentes principais, como será mostrado a seguir.

12.1.1 ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS

Os métodos estatísticos multivariados compreendem um conjunto de técnicas com o objetivo de analisar experimentos onde se avalia todo um conjunto de variáveis simultaneamente. Uma destas técnicas é a análise de componentes

principais que tem principalmente duas aplicações: reduzir o número de variáveis e detectar uma estrutura na relação entre as variáveis.

Normalmente, em conjuntos de dados com muitas variáveis, alguns grupos de variáveis movem-se junto, ou seja, estas variáveis são correlacionadas. Uma das razões para isto é que mais de uma variável pode estar medindo o mesmo comportamento de “governo” ou “força motriz” deste sistema, exemplo disto é o efeito do íon VO^{2+} sobre as análises espectroscópicas (capítulo 10). Em muitos sistemas há somente algumas destas forças motrizes, porém uma variedade de técnicas instrumentais permite medir diversas variáveis do sistema submetidas às mesmas forças motrizes. Quando isto acontece, pode-se tirar proveito desta redundância de informações, simplificando-se o problema substituindo um grupo de variáveis correlacionadas por uma única nova variável.

A análise de componentes principais é um método quantitativamente rigoroso para obter-se esta simplificação. Este método gera um novo conjunto de variáveis, chamado fatores ou componentes principais sendo que cada fator é uma combinação linear das variáveis originais. Todos os fatores são ortogonais a cada outro assim não há nenhuma informação redundante. Porém há uma infinidade de modos para se construir uma base ortogonal de dados sendo que a vantagem do método das componentes principais é que a variância é maximizada dentro de cada fator extraído do conjunto original de dados. Ou seja, as novas variáveis geradas são, além de não correlacionadas, aquelas com máxima variância.

Algumas das vantagens da análise de componentes principais, como técnica para redução do número de variáveis, são: a ortogonalidade das novas variáveis, ou seja elas não são correlacionadas de modo que não se têm informações “redundantes” e; a manutenção de boa parte da variância total do conjunto original

de dados. Isto é conseguido pois as variáveis não são eliminadas do modelo como seria o caso para a seleção de variáveis numa regressão múltipla, e sim se atribuí um “peso” menor para as variáveis de menor variância. Devido à ortogonalidade das novas variáveis é possível isolar diferentes efeitos (forças motrizes), pois cada componente principal terá um comportamento independente.

Quadros et al., 1996, estudando as características químicas e físicas de solos cultivados com eucalipto, utilizaram a análise de componentes principais e reduziram um conjunto original de 6 variáveis preditas e 92 preditoras para apenas 2 e 20 variáveis, respectivamente, e de posse destas novas variáveis conseguiram correlacionar certas características do solo com a produtividade do eucalipto e concluíram que a análise de componentes principais, associada à análise de regressão, pode ser um método adequado para se avaliar a produtividade do eucalipto.

Novotny et al., 1999 utilizaram a análise de componentes principais para a redução do número de variáveis e identificação da estrutura na relação entre as variáveis e conseguiram gerar novas variáveis, incluindo uma que serviu de indicadora da intensidade de cultivo em um experimento de diferentes sistemas de preparo do solo.

12.2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados os dados espectroscópicos e cromatográficos obtidos conforme descrito nos capítulos 10 e 11, respectivamente. Efetuou-se um pré-processamento dos dados pela translação dos dados espectrais (centrar os dados na média) e, a seguir, utilizando o programa MATLAB[®] (The Math Works Inc.),

efetuiu-se a análise de componentes principais extraindo-se dois fatores visto que em todos os casos dois fatores capturaram no mínimo 90% da variância total.

Os seguintes códigos foram utilizados para identificar os tratamentos de preparo do solo: plantio convencional (PC); cultivo mínimo (CM); e plantio direto (PD) e para as profundidades: 0-5 cm (1); 5-10 cm (2); 10-20 cm (3) e 20-30 cm (4). Assim o código das amostras será, por exemplo: PC1 - plantio convencional 0-5 cm.

12.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para os espectros de fluorescência a primeira componente principal, que capturou mais de 97% da variância total em todos os modos de aquisição dos espectros, teve uma alta correlação com o conteúdo de VO^{2+} indicando que praticamente toda a variância dos dados foi devida ao efeito deste íon (Tabela 12).

TABELA 12 - Variância capturada e correlação com o conteúdo de VO^{2+} das componentes principais atribuídas ao efeito deste íon

Espectroscopia		Variância capturada (%)	Correlação com o VO^{2+}
Fluorescência	Emis. ($\lambda_{\text{ex}} = 243 \text{ nm}$)	99,98	-0,92
	Emis. ($\lambda_{\text{ex}} = 455 \text{ nm}$)	99,81	-0,93
	Exc. ($\lambda_{\text{em}} = 500 \text{ nm}$)	97,36	-0,95
^{13}C -RMN		24,73	-0,95
Radicais livres orgânicos (RPE)		64,61	-0,88

Os carregamentos das segundas componentes principais dos dados de fluorescência apresentaram um deslocamento para o vermelho, ou seja, carregamentos positivos para maiores comprimentos de onda e negativos para os menores (Figura 83). Visto que isto é típico de substâncias húmicas mais humificadas (seção 2.3.3.1), pode-se associar esta componente principal com o grau de humificação e quanto maior os escores desta componente maior a humificação.

FIGURA 83 - Carregamentos das segundas componentes principais dos dados de fluorescência: Emissão com excitação em 240 nm (0,16 % da variância); Emissão com excitação em 450 nm (0,02 % da variância); Excitação com emissão em 500 nm (2,57 % da variância).

Os escores fatoriais da segunda componente principal extraída dos espectros de excitação com emissão em 500 nm indicaram que o aumento da intensidade de cultivo gerou ácidos húmicos mais humificados na camada de 0-5 (Figura 84). As amostras de ácidos húmicos provenientes da camada de 20-30 cm foram as que apresentaram o menor grau de humificação.

FIGURA 84 - Escores fatoriais da segunda componente principal (2,6% da variância total) extraída dos espectros de fluorescência, modo de excitação com emissão em 500 nm.

A primeira componente principal extraída dos espectros de ^{13}C VACP-MAS NMR capturou 67% da variância total e as regiões espectrais com maiores carregamentos foram aquelas associadas à lignina (aromáticos, O-aromáticos e metoxila) e C-alquila terminal (Figura 85a). Já a segunda componente principal (25% da variância total) apresentou os maiores carregamentos nas regiões espectrais de grupos possivelmente coordenados ao VO^{2+} tais como carboxila, O-alquila e di-O-alquila (Figura 85b), o que foi confirmado pela alta correlação obtida entre os escores desta componente principal e o conteúdo de VO^{2+} (Tabela 12).

FIGURA 85 - Carregamentos das componentes principais extraídas dos espectros de ^{13}C VACP-MAS NMR. (a) primeira CP e (b) segunda.

Os escores da primeira componente principal claramente diferenciaram as amostras de ácidos húmicos provenientes dos diferentes tratamentos (Figura 86) sendo que na camada mais superficial (0-5 cm), e em menor proporção na camada de 5-10 cm, quanto mais intenso o cultivo maior o escore. Logo há um aparente acúmulo de estruturas associadas à lignina e C-alquila de cadeias longas nas áreas sob cultivo mais intenso. Como estas estruturas normalmente diminuem com a humificação (Preston, 1996; Guggenberger et al., 1994), pode-se concluir que embora o cultivo mais intenso do solo leve a produção de ácidos húmicos mais

humificados, como indicado pelos dados de fluorescência, estes ácidos húmicos possuem elevado conteúdo de resíduos de lignina e C-alquila de cadeia longa, indicando que estas estruturas apresentam uma maior recalcitrância nestas condições.

FIGURA 86 - Escores fatoriais da primeira componente principal (66,8% da variância total) extraída dos espectros de ^{13}C VACP-MAS NMR.

Nas profundidades de 10-20 e 20-30 cm os valores dos escores são semelhantes entre os diferentes sistemas de cultivo sendo bem menores na maior profundidade, indicando que o efeito do cultivo sobre os ácidos húmicos limita-se às camadas superiores e que a contribuição de estruturas associadas à lignina é pequena nos ácidos húmicos obtidos da camada de 20-30 cm.

As duas componentes principais extraídas dos dados de RPE indicaram que o sinal dos radicais livres orgânicos dos ácidos húmicos provavelmente não seja devido a um único centro paramagnético sendo que o VO^{2+} suprimiu preferencialmente o sinal de baixo campo (Figura 87). Isto indica uma maior interação do VO^{2+} com os radicais livres orgânicos cujo sinal de ressonância apresenta um maior valor-g, o que pode ser devido à natureza destes radicais visto que, em radicais livres orgânicos, o aumento da densidade eletrônica do elétron desemparelhado sobre átomos de oxigênio provoca um aumento do valor-g (seção 2.2.3.6).

FIGURA 87 - Carregamentos das duas primeiras componentes principais dos dados de RPE

Já a segunda componente principal (25% da variância total) indicou a mesma tendência para a humificação demonstrada pelas componentes principais dos dados de fluorescência e ^{13}C -RMN (Figura 88).

FIGURA 88 - Escres fatoriais da segunda componente principal (25,3% da variância total). Dados dos espectros de RPE

12.4 CONCLUSÕES

Observou-se que o íon VO^{2+} afetou os resultados espectroscópicos obtidos por diferentes técnicas (RPE, RMN e fluorescência), de tal sorte que a interpretação direta dos resultados não seria possível visto que boa parte da variabilidade observada não era decorrente das características intrínsecas das amostras de ácidos húmicos, tal como o grau de humificação. Devido a isto, foram utilizadas técnicas multivariadas com o objetivo de isolar-se o efeito deste íon obtendo-se novas variáveis independentes dele. Estas novas variáveis foram utilizadas para estimar-se o grau de humificação e para avaliar-se o “real” efeito do cultivo sobre os ácidos húmicos.

O cultivo mais intenso do solo levou à produção de ácidos húmicos mais humificados, como indicado pelos dados de fluorescência e RPE, principalmente nas camadas mais superficiais (até 10 cm), e com maiores conteúdos de estruturas associadas à lignina e C-alquila de cadeia longa. Além disto, observou-se que o sinal dos radicais livres orgânicos dos ácidos húmicos era devido a pelo menos dois centros paramagnéticos distintos sendo que o VO^{2+} suprimiu preferencialmente o sinal com maior valor-g, atribuído a radicais livres orgânicos onde o elétron desemparelhado estaria deslocalizado sobre átomos de oxigênio.

13 CONCLUSÕES GERAIS

Neste trabalho foi demonstrado que outros fatores, além da concentração intrínseca de radicais livres orgânicos, podem afetar as análises quantitativas por RPE, em especial a presença de íons paramagnéticos que alteram as taxas de relaxação dos radicais livres orgânicos e levam a supressão do sinal de RPE destes.

Em relação aos sistemas de preparo do solo, observou-se que o preparo mais intenso deste, com o plantio convencional e cultivo mínimo, levou a uma redistribuição do C orgânico no perfil do solo, sendo que com o plantio direto houve um acúmulo superficial da matéria orgânica, porém sem diferenças significativas no estoque de C no solo. Essa distribuição do C foi seguida pelo vanadila detectado por RPE nas amostras de ácidos húmicos, ou seja, nas camadas onde havia mais C houve um maior conteúdo deste íon.

Este íon paramagnético afetou drasticamente os resultados das análises espectroscópicas levando a supressão: dos sinais de ^{13}C -RMN de grupos hidrofílicos; dos radicais livres orgânicos detectáveis por RPE; e da intensidade de fluorescência. Entretanto, nos espectros de excitação com emissão em 500 nm, o deslocamento das bandas de fluorescência para o vermelho, característico de estruturas mais humificadas, e que pode ser representado numericamente pela razão entre as áreas das diferentes regiões espectrais, não se correlacionou com o conteúdo de vanadila,

indicando que este parâmetro pode ser utilizado para a avaliação do grau de humificação de ácidos húmicos.

As amostras provenientes do solo submetido ao plantio convencional e/ou cultivo mínimo apresentaram um maior grau de humificação que aquelas do plantio direto, especialmente nas camadas mais superficiais. Este resultado é consistente com o grau de distúrbio do solo que é diferente em cada um dos sistemas de preparo e onde o maior distúrbio levou à degradação seletiva das estruturas mais lábeis (menos humificadas).

Pela supressão seletiva dos sinais de ^{13}C -RMN dos grupos carboxilas e daqueles associados aos carboidratos podê-se inferir que estas estruturas possivelmente estejam diretamente envolvidas na formação dos complexos do vanadila, assim como a supressão dos sinais de fluorescência e de RPE dos radicais livres orgânicos indicaram que estes radicais e estruturas fluorescentes também podem estar envolvidas na formação dos complexos deste íon ou então o efeito do íon paramagnético possa difundir-se facilmente pela estrutura dos ácidos húmicos.

Adicionalmente, os ácidos húmicos com maior conteúdo de vanadila apresentaram um maior tamanho molecular aparente, indicando um possível efeito agregante deste íon.

A análise multivariada dos dados obtidos possibilitou o isolamento destes efeitos do vanadila e as novas variáveis obtidas pela técnica dos componentes principais, independentes do conteúdo deste íon, indicaram que o cultivo mais intenso do solo levou ao acúmulo relativo de estruturas mais recalcitrantes e com maiores conteúdos de estruturas associadas à lignina e C-alquila de cadeia longa. Além disto observou-se que o sinal dos radicais livres orgânicos dos ácidos húmicos era devido à pelo menos dois centros paramagnéticos distintos sendo que o VO^{2+}

suprimiu preferencialmente o sinal com maior valor-g, atribuído a radicais livres orgânicos cujo elétron desemparelhado estaria deslocalizado sobre átomos de oxigênio.

14 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abragam, A., Bleaney, B. 1986. Electron paramagnetic resonance of transition ions. New York, Dover.
- Aime, S., Bertini, I., Luchinat, C. 1996. Considerations on high resolution solid state NMR in paramagnetic molecules. *Coord. Chem. Rev.* 150, 221-242.
- Akim, L.G., Bailey, G.W. 1998. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 62, capa.
- Alberts, J.J., Schindler, J.E., Miller, R.W., Nutter, D.E. 1974. Elemental mercury evolution mediated by humic acid. *Science*. 184, 895-897.
- Alberts, J.J., Takács, M., Egeberg, P.K. 2000. Total luminescence fluorescence spectral characteristics of natural organic matter (NOM) size fractions as defined by ultrafiltration and high performance size exclusion chromatography. In: 10th International Meeting of the International Humic Substances Society (2000 : Toulouse-França). *Anais...* Toulouse, IHSS. p. 147-148.
- Andriulo, A.E., Galantini, J.A., Pecorari, C., Torioni, E. 1990. Materia organica del suelo en la región pampeana; I. Un método de fraccionamento por tamizado. *Agrochimica*. 34, 475-489.
- Angers, D.A., Voroney, R.P., Cote, D. 1995. Dynamics of soil organic matter and corn residues as affected by tillage practices. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 59, 1311-1315.
- Angers, D.A., Bolinder, M.A., Carter, M.R., Gregorich, E.G., Drury, C.F., Liang, B.C., Voroney, R.P., Simard, R.R., Donald, R.G., Beyaert, R.P., Martel, J. 1997. Impact of tillage practices on organic carbon and nitrogen storage in cool, humid soils of eastern Canada. *Soil Tillage Res.* 41, 191-201.
- Arshad, M.A., Ripmeester, J.A., Schnitzer, M. 1988. Attempts to improve solid-state carbon-13 NMR spectra of whole mineral soils. *Can. J. Soil Sci.* 68, 593-602.
- Aster, B., Bergh, J.V., Burba, P. 1997. Characterization of aquatic humic substances and their metal species by using ligand exchange (EDTA) and multistage-ultrafiltration. In: 2^o Encontro Brasileiro sobre Substâncias Húmicas (1997 : São Carlos-SP). *Anais...* São Carlos, EMBRAPA-CNPDI. p. 131-134.
- Atkins, P.W. 1998. *Physical chemistry*. 6th. ed. Oxford, Oxford University Press.
- Bailey, G.W., Schevchenko, S.M., Yu, Y.S., Kamermans, H. 1997. Combining scanning tunneling microscopy and computer simulation of humic substances: Citric acid, a model. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 61, 92-101.
- Baldock, J.A., Oades, J.M., Vassallo, A.M., Wilson, M.A. 1990. Solid-state CP/MAS ¹³C NMR analysis of bacterial and fungal cultures isolated from a soil incubated with glucose. *Aust. J. Soil Res.* 28, 213-225.
- Baldock, J.A., Oades, J.M., Waters, A.G., Peng, X., Vassallo, A.M., Wilson, M.A. 1992. Aspect of the chemical structure of soil organic materials as revealed by solid-state ¹³C NMR spectroscopy. *Biogeochemistry*. 16, 1-42

- Barak, P., Chen Y. 1992. Equivalent radii of humic macromolecules from acid-base titration. *Soil Sci.* 154, 184-195.
- Barančíková, G., Senesi, N., Brunetti, G. 1997. Chemical and spectroscopic characterization of humic acids isolated from different Slovak soil types. *Geoderma*. 78, 251-266.
- Barton, D.H.R., Schnitzer, M. 1963. A new experimental approach to the humic acid problem. *Nature*, 198, 217-218.
- Batjes, N.H. 1996. Total carbon and nitrogen in the soils of the world. *Eur. J. Soil Sci.* 47, 151-163.
- Bayer, C., Mielniczuk, J. 1997. Características químicas do solo afetadas por métodos de preparo e sistemas de cultura. *R. bras. Ci. Solo*. 21, 105-112.
- Bayer, C., Mielniczuk, J., Amado, T.J.C., Martin-Neto, L., Fernandes, S.V. 2000. Organic matter storage in a sandy clay loam Acrisol affected by tillage and cropping systems in southern Brazil. *Soil & Tillage Research*, 54, 101-109.
- Belin, C., Quellec, C., Lamotte, M., Ewald, M., Simon, P. 1993. Characterization by fluorescence of the dissolved organic matter in natural water application to fractions obtained by tangencial ultrafiltration and XAD resin isolation. *Environ. Technol.* 14, 1131-1144.
- Blois, M.S.Jr., Brown, H.W., Mailing, J.E. 1961. Precision g-value measurements of free radicals of biological interest. In: Blois, M.S.Jr., Brown, H.W., Lemmon, R.M., Lindlom, R.O., Weissbluth, M. (Eds.) *Free radicals in biological systems*. New York, Academic. p. 117-131.
- Bohn, H.L. 1982. Estimate of organic carbon in world soils: II. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 46, 1118-1119.
- Borges, G. de O. 1993. Capítulo I: Resumo histórico do plantio direto no Brasil. In: CNPT-EMBRAPA, FUNDACEP-FECOTRIGO e FUNDAÇÃO ABC (Ed.). *Plantio Direto no Brasil. Passo Fundo, Aldeia Norte*. p. 13-17.
- Borin, M., Menini, C., Sartori, L. 1997. Effects of tillage systems on energy and carbon balance in north-eastern Italy. *Soil Tillage Res.* 40, 209-226.
- Bovey, F.A. 1988. *Nuclear magnetic resonance spectroscopy*. 2nd ed. San Diego, Academic Press.
- Boyd, S.A., Sommers, L.E., Nelson, D.W., West, D.X. 1983. Copper(II) binding by humic acid extracted from sewage sludge: an electron spin resonance study. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 47, 43-46.
- Bravard, S., Righi, D. 1991. Characterization of fulvic and humic acids from an Oxisol-Spodosol toposequence of Amazonia, Brazil. *Geoderma*. 48, 151-162.
- Bremner, J.M., Lees, H. 1949. Studies on soil organic matter. Part II. the extraction of organic matter from soil by neutral reagents. *J. Agr. Sci.* 39, 274-278.
- Brudvig, G.W., Blair, D.F., Chan, S.I. 1984. Electron spin relaxation of Cu_A and cytochrome *a* in cytochrome *c* oxidase. *J. Biol. Chem.* 259, 11001-11009.
- Buffle, J., Greter, F.L., Haerdi, W. 1977. Measurement of complexation properties of humic and fulvic acids in natural-waters with lead and copper ion-selective electrodes. *Anal. Chem.* 49, 216-222.
- Buffle, J. 1990. The analytical challenge posed by fulvic and humic compounds. *Anal. Chim. Acta*. 232, 1-2.
- Bunce, N.J. 1987. Introduction to the interpretation of electron spin resonance spectra of organic radicals. *J. Chem. Educ.* 64, 907-914.
- Cameron, R.S., Swift, R.S., Thornton, B.K., Posner, A.M. 1972a. Calibration of gel permeation chromatography materials for use with humic acid. *J. Soil Sci.* 23, 342-349.

- Cameron, R.S., Thornton, B. K., Swift, R. S., Posner A.M. 1972b. Molecular weight and shape of humic acid from sedimentation and diffusion measurements on fractionated extracts. *J. Soil Sci.* 23, 395-408.
- Carrington, A., McLachlan, A.D. 1967. Introduction to magnetic resonance. New York, Harper & Row.
- Catroux, G., Schnitzer, M. 1987. Chemical, spectroscopic, and biological characteristics of the organic matter in particle size fractions separated from an Aquoll. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 51, 1200-1207.
- Chen, Y., Schnitzer, M. 1976. Scanning electron-microscopy of a humic-acid and of a fulvic-acid and its metal and clay complexes. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 40, 682-686.
- Chen, Y., Senesi, N., Schnitzer, M. 1977. Information provided on humic substances by E4/E6 ratios. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 41, 352-358.
- Cheshire, M.V., Berrow, M.L., Goodman, B.A., Mundie, C.M. 1977. Metal distribution and nature of some Cu, Mn and V complexes in humic and fulvic acid fractions of soil organic matter. *Geochim. Cosmochim. Acta.* 41, 1131-1138.
- Cheshire, M.V., McPhail, D.B. 1996. Hyperfine splitting in the electron spin resonance solution spectra of humic substances. *European J. Soil Sci.* 47, 205-213.
- Clapp, C.E., Hayes, M.H.B. 1999. Sizes and shapes of humic substances. *Soil Sci.* 164, 777-789.
- Coelho Neto, J.A. 1992. Processamento de sinais de ressonância paramagnética eletrônica. Projeto de um sistema de varredura rápida para R.P.E. Rio de Janeiro. Dissertação (Mestrado). Instituto de Física, Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- Colnago, L.A., Martin-Neto, L., Miyazawa, M., Vieira, E.M., Bonagamba, T.J., Panepucci, H. 1997. Estudo da razão E₄/E₆ e aromaticidade por RMN de C¹³ em estado sólido da AH de um Latossolo roxo. In: 2^o Encontro Brasileiro sobre Substâncias Húmicas (1997 : São Carlos). Anais... São Carlos, EMBRAPA-CNPDIA. p. 167.
- Colvin, J.T., Rutter, R., Stapleton, H.J., Hager, L.P. 1983. Zero-field splitting of Fe³⁺ in horseradish peroxidase and of Fe⁴⁺ in horseradish peroxidase compound I from electron spin relaxation data. *Biophys. J.* 41, 105-108.
- Conte, P., Piccolo, A., van Lagen, B., Buurman, P., de Jager, P.A. 1997. Quantitative aspects of solid-state ¹³C NMR spectra of humic substances from soils of volcanic systems. *Geoderma.* 80, 327-338.
- Dai, K.H., Johnson, C.E. 1999. Applicability of solid-state ¹³C CP/MAS NMR analysis in Spodosols: chemical removal of magnetic materials. *Geoderma.* 93, 289-310.
- Danneberg, O.H. 1973. Über die Extraktion von Huminstoffen aus Schwarzerde. *Bodenkultur.* 24, 111-119.
- Danneberg, O.H. 1977. Chromatography of humic substances on controlled pore glass. In: Soil organic matter studies. v. II. Wien, International Atomic Energy Agency. p. 67-98.
- Darst, B.C., Murphy, L.S. 1989. Soil Organic Matter: An integral ingredient in crop production. *Better Crops Plant Food.* 74, 4-5.
- De Maria, I.C., Castro, O.M. 1993. Fósforo, potássio e matéria orgânica em um latossolo roxo, sob sistemas de manejo com milho e soja. *R. bras. Ci. Solo.* 17, 471-477.
- De Nobili, M., Chen, Y. 1999. Size exclusion chromatography of humic substances: limits, perspectives and prospectives. *Soil Sci.* 164, 825-833.

- Derpsch, R. 1984. Capítulo 1: Histórico, requisitos, importância e outras considerações sobre o plantio direto no Brasil. In: Centro Acadêmico "Luiz de Queiroz", Torrado, P.V., Aloisi, R.R. (Coord.). Plantio Direto no Brasil. Campinas, Fundação Cargill. p. 1-12.
- Dick, W.A., McCoy, E.L., Edwards, W.M., Lal, R. 1991. Continuous application of no-tillage to Ohio soils. *Agron. J.* 83, 65-73.
- Dobrovolskii, V.V. 1997. Biospheric cycles of heavy metals and regulatory role of soil. *Eurasian Soil Science.* 30, 371-380.
- Dormaar, J.F. 1974. Molecular-sieve chromatography of humic substances extracted with chelating resin from chernozemic Ah horizons. *Plant Soil.* 41, 51-64.
- Drago, R.S. 1992. Physical methods for chemists. 2nd ed. Orlando, Saunders.
- Drozd, J., Jezierski, A. 1994. Electron spin resonance studies on humus compounds isolated from soils contaminated by copper smelters. In: Senesi, N., Miano, T. (Ed.) *Humic Substances in the Global Environment and Implications on Human Health.* Amsterdam, Elsevier. p. 1119-1124.
- Dudley, R.L., Fyfe, C.A. 1982. Evaluation of the quantitative reliability of the ¹³C CP/MAS technique for the analysis of coals and related materials. *Fuel.* 61, 651-657.
- Ellert, B.H., Bettany, J.R. 1995. Calculations of organic matter and nutrients stored in soil under contrasting management. *Can. J. Soil Sci.* 75, 529-538.
- Elsass, F., Olivier, D. 1978. Infra red and electron spin resonance studies of clays representative of the sedimentary evolution of the Basin of Autun. *Clay Miner.* 13, 299-308.
- EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Serviço Nacional de Levantamento e Conservação). 1979. Manual de métodos de análises de solo. Rio de Janeiro, Ministério da Agricultura.
- Ewald, M., Berger, P., Visser, S.A. 1988. UV-visible absorption and fluorescence properties of fulvic acids of microbial origin as function of their molecular weights. *Geoderma.* 43, 11-20.
- Ewald, M., Parlanti, E., Lamotte, M., Ohayon-Courtes, C. 2000. Characterization of natural organic matter in various thermal waters by three-dimensional spectrofluorometry. In: 10th International Meeting of the International Humic Substances Society (2000 : Toulouse-França). *Anais... Toulouse, IHSS.* p. 171-174.
- Farmer, V.C., Russel, J.D. 1966. Effects of particle size and structure on the vibrational frequencies of layer silicates. *Spectrochimica Acta.* 22, 389-398.
- Ferreira, J.A., Nascimento, O.R., Martin-Neto, L. 2001. Hydrophobic interactions between spin-label 5-SASL and humic acid as revealed by ESR spectroscopy. *Environ. Sci. Technol.* 35, 761-765.
- Filip, Z., Cheshire, M.V., Goodman, B.A., McPhail, D.B. 1985. The occurrence of copper, iron, zinc and others elements and the nature of some copper and iron complexes in humic substances from municipal refuse disposed in a landfill. *Sci. Total Environ.* 44, 1-16.
- Fischer, F., Schrader, H. 1921. The origin and chemical structure of coal. *Brennstoff chem.* 2, 37-45.
- Flaig, W., Beutelspacher E Rietz. 1975. Chemical Composition and Physical Properties of Humic Substances. In: Gieseking, J.E. (Ed.). *Soil Components.* Vol. 1. New York, Springer. p. 35-57.
- Fontecha, J., Swaisgood, H.E. 1995. Interaction of sucrose ester with casein micelles as characterized by size-exclusion chromatography. *J. Dairy Sci.* 78, 2660-2665.

- Franzluebbers, A.J., Arshad, M.A. 1996. Water-stable aggregation and organic matter in four soils under conventional and zero tillage. *Can. J. Soil Sc.* 76, 387-393.
- Freitas, J.C.C, Bonagamba, T.J. 1999. Fundamentos e Aplicações da Ressonância Magnética Nuclear. Os Núcleo Atômicos e a RMN. Rio de Janeiro, AUREMN.
- Fründ, R., Lüdemann, H. -D. 1989. The quantitative analysis of solution- and CPMAS-C-13 NMR spectra of humic material. *Sci. Total Environ.* 81/82, 157-168.
- Fründ, R., Haider, K., Lüdemann, H.-D. 1994. Impacts of soil management practices on the organic matter structure – investigation by CPMAS ¹³CNMR-spectroscopy. *Z. Pflanzenernähr. Bodenk.* 157, 2935.
- Fuchs, W. 1931. *Die Chemie der Kohle*. Berlin, Springer.
- Galli, C., Atta, M., Andersson, K.K., Gräslund, A., Brudvig, G.W. 1995. Variations of the diferric exchange coupling in the R2 subunit of ribonucleotide reductase from four species as determined by saturation-recovery EPR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* 117, 740-746.
- Galli, C., Innes, J.B., Hirsh, D.J., Brudvig, G.W. 1996. Effects of dipole-dipole interactions on microwave progressive power saturation of radicals in proteins. *J. Magn. Reson., Series B.* 110, 284-287.
- Gamble, D.S., Langford, C.H., Underdown, A.W. 1985. Light scattering measurements of Cu(II)-fulvic acid complexing: the interdependence of apparent complexing capacity and aggregation. *Org. Geochem.* 8, 35-39.
- Gehring, A.U., Fry, I.V., Sposito, G. 1993. The chemical form of vanadium (IV) in kaolinite. *Clays Clay Miner.* 41, 662-667.
- Gerke, J. 1992. Phosphate, aluminium and iron in the soil solution of three different soils in relation to varying concentrations of citric acid. *Z. Pflanzernähr. Bodenk.* 155, 339-343.
- Gerritse, R.G., Van Driel, W. 1984. The relationship between adsorption of trace metals, organic matter, and pH in temperate soils. *J. Environ. Qual.* 13, 197-204.
- Gerzabek, M.H., Ullah, S.M. 1989. Humic substances in soils from Bangladesh, Namibia and Canada. *International Agrophysics.* 5, 197-203.
- Ghosh, K., Schnitzer, M. 1980. Macromolecular structures of humic substances. *Soil Sci.* 129, 266-276.
- Gil, V.M.S., Geraldes, C.F.G.C. 1987. *Ressonância Magnética Nuclear*. Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian.
- Glackin, J.J. 1976. Chemistry: The black art? *J. Chem. Educ.* 53, 267.
- Gonzalez-Vila, F.J., Lentz, H., Lüdemann, H.-D. 1976. FT-¹³C nuclear magnetic resonance spectra of natural humic substances. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 72, 1063-1070.
- Goodman, B.A., Cheshire, M.V. 1975. The bonding of vanadium in complexes with humic acids: an electron paramagnetic study. *Geochim. Cosmochim. Acta.* 39, 1711-1713.
- Goodman, B.A., Hall, P. L. 1994. Electron paramagnetic resonance spectroscopy. In: Wilson, M.J. (Ed.) *Clay Mineralogy: Spectroscopic and Chemical Determinative Methods*. London, Chapman e Hall. p. 173-225.
- Guggenberger, G., Christensen, B.T., Zech, W. 1994. Land-use effects on the composition of organic matter in particle-size separates of soil: I. lignin and carbohydrate signature. *Eur. J. Soil Sci.* 45, 449-458.
- Günther, H. 1995. *NMR spectroscopy - Basic principles, concepts, and applications in chemistry*. 2nd ed. New York, Wiley.

- Hagaman, E.W., Chambers, R.R., Woody, M.C. 1986. Determination of the fraction of organic carbon observable in coals and coal derivatives measured by high-resolution solid state carbon-13 nuclear magnetic resonance spectrometry. *Anal. Chem.* 58, 387-394.
- Hall, K.J., Lee, G.F. 1974. Molecular size characterization of organic matter in a meromictic lake. *Water Res.* 8, 239-251.
- Harrold, L.L., Edwards, W.M. 1972. A severe rainstorm test of no-till corn. *J. Soil and Water Cons.* 27, 30.
- Hatcher, P.G., Schnitzer, M., Dennis, L.W., Maciel, G.E. 1981. Aromaticity of humic substances in soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 45, 1089-1094.
- Havlin, J.L., Kissel, D.E., Maddux, L.D., Claassen, M.M., Long, J.H. 1990. Crop rotation and tillage effects on soil organic carbon and nitrogen. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 54, 448-452.
- Hediger, S., Meier, B.H., Kurur, N.D., Bodenhausen, G., Ernst, R.R. 1994. NMR cross polarization by adiabatic passage through the Hartmann-Hahn condition (APHH). *Chem. Phys. Letters*, 223, 283-288.
- Hemminga, M.A., Buurman, P. 1997. Editorial: NMR is soil science. *Geoderma.* 80, 221-224.
- Hermann, R., Gerke, J. 1992. Clomplexation of iron (III) to humic substances of a humic podzol at pH 2.5 - 6.4 - quantification of the organically complexed iron by pyrophosphate extraction. *Z. Pflanzenernähr. Bodenk.* 155, 229-232.
- Hirsh, D.J., Beck, W.F., Innes, J.B., Brudvig, G.W. 1992. Using saturation-recovery EPR to measure distances in proteins: applications to photosystem II. *Biochemistry.* 31, 532-541.
- Hu, W., Mao, J., Xing, B., Schmidt-Rohr, K. 2000. Poly(methylene) Crystallites in Humic Substances Detected by Nuclear Magnetic Resonance. *Environ. Sci. Technol.* 34, 530-534.
- Inbar, Y., Chen, Y., Hadar, Y. 1989. Solid-state carbon-13 nuclear magnetic resonance and infrared spectroscopy of composted organic matter. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 53, 1695-1701.
- Innes, J.B., Brudvig, G.W. 1989. Location and magnetic relaxation properties of the stable tyrosine radical in photosystem II. *Biochemistry.* 28, 1116-1125.
- Jelinski, L.W., Melchior, M.T. 2000. High-resolution NMR of Solids. *Appl. Spectros. Rev.* 35, 25-93.
- Jerzykiewicz, M., Drozd, J., Jezierski, A. 1999. Organic radicals and paramagnetic metal complexes in municipal solid waste composts. An EPR and chemical study. *Chemosphere* 39, 253-268.
- Jezierski, A., Drozd, J., Jerzykiewicz, M., Chen, Y., Kaye, K.J. 1998. EPR in the environmental control: copper complexes and free radicals in soil and municipal solid waste compost. *Appl. Magn. Reson.* 14, 275-282.
- Jezierski, A., Czechowski, F., Jerzykiewicz, M., Chen, Y., Drozd, J. 2000a. Electron paramagnetic resonance (EPR) studies on stable and transient radicals in humic acids from compost, soil, peat and brown coal. *Spectrochim. Acta A* 56, 379-385.
- Jezierski, A., Czechowski, F., Jerzykiewicz, M., Drozd, J. 2000b. EPR investigation of structure of humic acids from compost, soil, peat and soft brown coal upon oxidation and metal uptake. *Appl. Magn. Reson.* 18, 127-136.
- Jones, J.N., Moody, J.E., Shear, G.M., Moschler, W.W., Lillard, J.H. 1968. The no-tillage system for corn (*Zea mays* L.). *Agron. J.* 60, 17-20.
- Kabata-Pendias, A., Pendias, H. 1985. Trace Elements in Soils and Plants. 3th ed. Boca Raton, CRC.

- Kalbitz, K., Geyer, W., Geyer, S. 1999. Spectroscopic properties of dissolved humic substances – a reflection of land use history in a fen area. *Biogeochem.* 47, 219-238.
- Kinchesh, P., Powlson, D.S., Randall, E.W. 1995. ^{13}C NMR studies of organic matter in whole soils: I. Quantitation possibilities. *Eur. J. Soil Sci.* 46, 125-138.
- Kitchen, N.R., Havlin, J.L., Westfall, D.G. 1990. Soil sampling under no-till banded phosphorus. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 54, 1661-1665.
- Kleinhempel, D. 1970. Beziehungen einiger Huminstoffkennzahlen zum Ertrag auf Schwarzerdestandorten. *Albrecht-Thaer-Archiv.* Bd. 14, 1.
- Kögel-Knabner, I., Zech, W., Hatcher, P.G. 1988. Chemical composition of the organic matter in forest soils: III. The humus layer. *Z. Pflanzernähr. Bodenk.* 151, 331-340.
- Kögel-Knabner, I., Zech, W., Hatcher, P.G. 1991. Chemical structural studies of forest soil humic acids: aromatic carbon fraction. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 55, 241-247.
- Kononova, M.M. 1966. *Soil Organic Matter.* Oxford, Pergamon Press.
- Korshin, G., Violleau, D. 2000. Correlation between molecular weight and fluorescence emission in studies of NOM chlorination. In: 10th International Meeting of the International Humic Substances Society (2000 : Toulouse-França). *Anais... Toulouse, IHSS.* p. 73-76.
- Kuiters, A.T., Mulder, W. 1993. Complexometric gel permeation chromatography of soluble humic substances using Sephadex G-25. *J. Soil Sci.* 44, 501-512.
- Kutsch, H. 1985. Zur Verwendung von chelatisierenden Harzen bei der Extraktion von Huminstoffen aus Mineralböden. *Landwirtsch. Forschung.* 38, 245-254.
- Lakatos, B., Tibai, T., Meisel, J. 1977. EPR spectra of humic acids and their metal complexes. *Geoderma.* 19, 319-338.
- Lal, R. 1997. Long-term tillage and maize monoculture effects on a tropical Alfisol in western Nigeria. II. Soil chemical properties. *Soil Tillage Res.* 42, 161-174.
- Leigh Jr., J.S. 1970. ESR rigid-lattice line shape in a system of two interacting spins. *J. Chem. Phys.* 52, 2608-2612.
- Leinweber, P., Fründ, R., Reuter, G. 1993. A ^{13}C -NMR study on the formation of soil organic matter from grass residues. *Z. Pflanzernähr. Bodenk.* 156, 415-420.
- Levesque, M. 1972. Fluorescence and gel filtration of humic compounds. *Soil Sci.* 113, 346-353.
- Lide, D.R. 1996. *Handbook of Chemistry and Physics.* 77th ed. Boca Raton, CRC.
- Lovley, D.R., Coates, J.D., Blunt-Harris, E.L., Phillips, E.J.P., Woodward, J.C. 1996. Humic substances as electron acceptors for microbial respiration. *Nature.* 382, 445-448.
- Lynch, J.M. 1984. Interactions between biological processes, cultivation and soil structure. *Plant Soil.* 76, 307-318.
- MacCarthy, P., Mark Jr., H.B. 1976. An evaluation of Job's method of continuous variations as applied to soil organic matter-metal ion interactions. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 40, 267-276.
- Machado, P.L.O. de A., Gerzabek, M.H. 1993. Tillage and crop rotation on humic substances of a Typic Haplorthox from southern Brazil. *Soil Tillage Res.* 26, 227-236.
- Maillard, L.C. 1913. Formation de la matière humique par action de polypeptides sur sucres. *C. R. Acad. Sci.* 156, 148-149

- Maillard, L.C. 1916. Synthesis of humus-like substances by the interaction of amino acids and reducing sugars. *Ann. Chim. Phys.* 5, 258-317.
- Mangrich, A.S., Vugman, N.V. 1988. Bonding parameters of vanadyl ion in humic acid from the Jucu river estuarine region, Brazil. *Sci. Total Environ.* 75, 235-241.
- Mangrich, A.S., Lermen, A. W., Santos, E. J., Gomes, R. C., Coelho, R. R. R., Linhares, L. F., Senesi, N. 1998. Electron paramagnetic resonance and ultraviolet-visible spectroscopic evidence for copper porphyrin presence in actinomycete melanins from soils. *Biol. Fertil. Soils.* 26, 341-345.
- Mao, J., Hu, W., Schmidt-Rohr, K., Davies, G., Ghabbour, E.A., Xing, B. 2000. Quantitative Characterization of Humic Substances by Solid-State Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 64, 873-884.
- Marschner, H., Romheld, V., Horst, W.J., Martin, P. 1986. Root-induced changes in the rhizosphere - importance for the mineral-nutrition of plants. *Z. Pflanz. Bodenkunde.* 149, 441-456.
- Martin-Neto, L., Tabak, M., Nascimento, O.R., 1990. Effect of hydration in metHb: reversible changes monitored by ESR of iron. *J. Inorg. Biochem.* 40, 309-321.
- Martin-Neto, L., Nascimento, O.R., Talamoni, J., Poppi, N.R. 1991. EPR of micronutrients-humic substances complexes extracted from a Brazilian soil. *Soil Sci.* 51, 369-376.
- Martin-Neto, L., Andriulo, A. E., Tragheta, D. G. 1994b. Effects of cultivation on ESR spectrum of organic matter from soil size fractions of a mollisol. *Soil Sci.* 157, 365-372.
- Martin-Neto, L., Vieira, E.M., Sposito, G. 1994a. Mechanism of atrazine sorption by humic acid: A spectroscopic study. *Environ. Sci. Technol.* 28, 1867-1873.
- Martin-Neto, L., Rossel, R., Sposito, G. 1998. Correlation of spectroscopy indicators of humification with mean annual rainfall along a grassland climosequence. *Geoderma.* 81, 305-311.
- Matzner, E. 1992. Factors controlling Al-activity in soil solutions in an acid forest soil of the German solling area. *Z. Pflanzernähr. Bodenk.* 155, 333-338.
- McBride, M.B. 1978. Transition metal bonding in humic acid: an ESR study. *Soil Sci.* 126, 200-209.
- Meads, R.E., Malden, P. J. 1975. Electron spin resonance in natural kaolinites containing Fe^{3+} and other transition metal ions. *Clay Miner.* 10, 313-345.
- Mendelovici, E., Yariv, S.H., Villalba, R. 1979. Iron-bearing kaolinite in Venezuelan laterites: 1. Infrared spectroscopy and chemical dissolution evidence. *Clay Miner.* 14, 323-331.
- Merten, G.H., Mielniczuk. 1991. Distribuição do sistema radicular e dos nutrientes em Latossolo Roxo sob dois sistemas de preparo de solo. *R. bras. Ci. Solo.* 15, 369-374.
- Meyer, V.R. 1993. *Practical High-Performance Liquid Chromatography*. New York, Wiley.
- Miano, T.M., Sposito, G., Martin, J.P. 1988. Fluorescence spectroscopy of humic substances. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 52, 1016-1019.
- Miano, T.M. 1990. Fractionation of water-soluble sugars in two humus profile by thin-layer chromatography. *Z. Pflanzernähr. Bodenk.* 153, 241-244.
- Miller, W.P., McFee, W.W. 1983. Distribution of cadmium, zinc, copper, and lead in soils of industrial northwestern Indiana. *J. Environ. Qual.* 12, 29-33.
- Milori, D. M. B. P., Bayer, C., Bagnato, V. S., Mielniczuk, J., Martin-Neto, L. 1999. Determinação do grau de humificação de ácidos húmicos de solo através de

- fotoluminescência. In: 3^o Encontro Brasileiro sobre Substâncias Húmicas (1999 : Santa Maria). Anais... Santa Maria, UFSM. p. 207-209.
- Milori, D. M. B. P., Bayer, C., Bagnato, V. S., Mielniczuk, J., Martin-Neto, L. 2000. Fluorescence spectroscopy as alternative approach to study humification degree in soil humic acids. In: 10th International Meeting of the International Humic Substances Society (2000 : Toulouse-França). Anais... Toulouse, IHSS. p. 97-100.
- Mohamad, S.A., Danneberg, O.H., Schaffer, K., Gerzabek, M.H. 1993. Schonende Extraktion und chromatographische Kennzeichnung von Huminstoffen in Müll- und Müllklärschlammkomposten. *Bodenkultur*. 44, 219-227.
- Moody, J.E, Shear, G.M., Jones Jr., J.N. 1961. Growing corn without tillage. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.* 25, 516-517.
- Müller, L., Kumar, A., Baumann, T., Ernst, R.R. 1974. Transient Oscillations in NMR Cross-Polarization Experiments in Solids. *Phys. Rev. Letters*. 32, 1402-1406.
- Newman, R.H., Tate, K.R., Barron, P.F., Wilson, M.A. 1980. Towards a direct, non-destructive method of characterising soil humic substances using ¹³C NMR. *J. Soil Sci.* 31, 623-631.
- Newman, R.H., Tate, K.R. 1984. Use of alkaline soil extracts for ¹³C NMR characterization of humic substances. *J. Soil Sci.* 35, 47-54.
- Neyroud, J.A., Schnitzer, M. 1972. The chemistry of high molecular weight fulvic acid fractions. *Can. J. Chem.* 52, 4123-4132.
- Niemeyer, J., Chen, Y., Bollag, J. -M. 1992. Characterization of humic acids, composts, and peat by diffuse reflectance Fourier-transform infrared spectroscopy. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 56, 135-140.
- Nordén, B., Bohlin, E., Nilsson, M., Albano, A., Röckner, C. 1992. Characterization of particle size fractions of peat. An integrated biological, chemical, and spectroscopic approach. *Soil Sci.* 153, 383-396.
- Novotny, E.H. 1997. Extração, Fracionamento e Caracterização Espectroscópica da Matéria Orgânica do Solo. Curitiba. Dissertação (Mestrado). Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.
- Novotny, E.H., Tragheta, D.G., Mangrich, A.S. 1997. Extração, fracionamento e caracterização espectroscópica da matéria orgânica do solo. In: 2^o. Encontro Brasileiro sobre Substâncias Húmicas. (1997 : São Carlos-SP). Anais... São Carlos, EMBRAPA-CNPDA. p. 177.
- Novotny, E.H., Blum, W.E.H., Gerzabek, M.H., Mangrich, A.S. 1999. Soil Management System Effects on Size Fractionated Humic Substances. *Geoderma*. 92, 87-109.
- Novotny, E.H., Martin-Neto, L. 1999. Propriedades coloidais da matéria orgânica. In: Santos, G.A., Camargo, F.A.O. (Ed.). *Fundamentos da matéria orgânica do solo: ecossistemas tropicais e subtropicais*. Porto Alegre, Genesis. p. 41-67.
- Novotny, E.H., Martin-Neto, L. 2000. Factors affecting quantitative organic free radical analysis by EPR. In: 10th International Meeting of the International Humic Substances Society (2000 : Toulouse-França). Anais... Toulouse, IHSS. p. 85-90.
- Novotny, E.H., Martin-Neto, L. 2002. Effects from humidity and metal ions on the free radical analysis of peat humus. *Geoderma*. 106, 305-317.
- Oades, J.M., Gillman, G.P., Uehara, G. 1989. Interaction of Soil Organic Matter and Variable Charge Clays. In: Oades (Ed.). *Dynamics of Soil Organic Matter in Tropical Ecosystems*. Honolulu, University of Hawaii. p. 69-95.

- Olk, D.C., Cassman, K.G., Fan, T.W.M. 1995. Characterization of two humic acids fractions from a calcareous vermiculitic soil: implications for the humification process. *Geoderma*. 65, 195-208.
- Olk, D.C., Brunetti, G., Senesi, N. 1999. Organic matter in double-cropped lowland rice soils: Chemical and spectroscopic properties. *Soil Sci.* 164, 633-649.
- Oniki, T., Takahama, U. 1994. Effects of reaction time, chemical reduction, and oxidation, on ESR in aqueous solutions of humic acids. *Soil Sci.* 158, 204-210.
- Opella, S.J., Frey, M.H., Cross, T.A. 1979. Selection of nonprotonated carbon resonances in solid-state nuclear magnetic resonance. *J. Am. Chem. Soc.* 101, 5854-5856.
- Orlov, D.S. 1985. *Humus Acids of Soils*. Rotterdam, A. A. Balkema.
- Paim, S., Linhares, L.F., Mangrich, A.S., Martin, J.P. 1990. Characterization of fungal melanins and soil humic acids by chemical analysis and infrared spectroscopy. *Biol. Fertil. Soils*. 10, 72-76.
- Parish, R.V. 1990. *NMR, NQR, EPR and Mössbauer spectroscopy in inorganic chemistry*. London, Elis Horwood.
- Parker, T.W. 1969. A classification of kaolinites by infrared spectroscopy. *Clay Miner.* 8, 135-141.
- Pavia, D.L., Lampman, G.M., Kriz, G.S. 1996. *Introduction to spectroscopy*. 2nd ed. New York, Saunders.
- Peersen, O. B., Wu, X., Kustanovich, I., Smith, S.O. 1993. Variable-amplitude cross-polarization MAS NMR. *J. Magn. Reson. A*. 104, 334-339.
- Perminova, I.V. 1999. Size exclusion chromatography of humic substances: complexities of data interpretation attributable to non-size exclusion effects. *Soil Sci.* 164, 834-840.
- Pfeffer, P.E., Gerasimowicz, W.V., Piotrowski, E.G. 1984. Effect of paramagnetic iron on quantitation in carbon-13 cross polarization magic angle spinning nuclear magnetic resonance spectrometry of heterogeneous environmental matrices. *Anal. Chem.* 56, 734-741.
- Phillips, S.H., Young Jr., H.M. 1973. *No-tillage farming*. Milwaukee, Reiman.
- Piana, M.J., Zahir, O. 2000. Investigation of metal binding of humic substances using fluorescence emission and synchronous-scan spectroscopy. *J. Environ. Sci. Health*. B35, 87-102.
- Piccolo, A., Stevenson, F.J. 1982. Infrared spectra of Cu^{2+} , Pb^{2+} , and Ca^{2+} complexes of soil humic substances. *Geoderma*. 27, 195-208.
- Piccolo, A., Mbagwu, J.S.C. 1994. Humic substances and surfactants effects on the stability of two tropical soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 58, 950-955.
- Piccolo, A., Nardi, S., Concheri, G. 1996a. Macromolecular changes of humic substances induced by interaction with organic acids. *Eur. J. Soil Sci.* 47, 319-328.
- Piccolo, A., Nardi, S., Concheri, G. 1996b. Micelle-like conformation of humic substances as revealed by size exclusion chromatography. *Chemosphere*. 33, 595-602.
- Piccolo, A., Pietramellara, G., Mbagwu, J.S.C. 1997. Use of humic substances as soil conditioners to increase aggregate stability. *Geoderma*. 75, 267-277.
- Piccolo, A. 1998. Hydrophobic interactions controlling molecular sizes of humic molecules in soils. Effects on the accumulation and decomposition of soil organic matter. In: 16th. World Congress of Soil Science. (1998 : Montpellier-France). Anais... Montpellier, International Soil Science Society. CD-ROM.

- Piccolo, A. 1999. Atmospheric CO₂ and alteration of Global Climate. In: 3^o Encontro Brasileiro sobre Substâncias Húmicas (1999 : Santa Maria). Anais... Santa Maria, UFSM. p. 145.
- Piccolo, A., Conte, P., Cozzolino, A. 1999. Effects of mineral and monocarboxylic acids on the molecular association of dissolved humic substances. *Eur. J. Soil Sci.* 50, 1-8.
- Piccolo, A. 2000. From humic supra-molecular self-associations to stable polymeric structures via enzymatic and biomimetic catalyses. In: 10th International Meeting of the International Humic Substances Society (2000 : Toulouse-França). Anais... Toulouse, IHSS. p. 295.
- Piccolo, A., Conte, P. 2000. Molecular size of humic substances. Supramolecular associations versus macromolecular polymers. *Adv. Environ. Res.* 3, 508-521.
- Piccolo, A. 2001. The supramolecular structure of humic substances. *Soil Sci.* 166, 810-832.
- Pionke, H.B., Corey, R.B. 1967. Relations between acidic aluminum and soil ph, clay and organic matter. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.* 31, 749-752.
- Pohlman, A.A., McColl, J.G. 1988. Soluble organics from forest litter and their role in mineral dissolution. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 52, 265-271.
- Poole, C.P. 1983. Electron spin resonance: A comprehensive treatise on experimental techniques. 2nd ed. New York, Wiley.
- Preston, C.M., Dudley, R.L., Fyfe, C.A., Mathur, S.P. 1984. Effects of variations in contact times and copper contents in a ¹³C CPMAS study of samples of four organic soils. *Geoderma*. 33, 245-253.
- Preston, C.M., Blackwell, B.A. 1985. Carbon-13 nuclear magnetic resonance for a humic and a fulvic acid: signal-to-noise optimization, quantitation, and spin echo techniques. *Soil Sci.* 139, 88-96.
- Preston, C.M., Axelson, D.E., Lévesque, M., Mathur, S.P., Diné, H., Dudley, R.L. 1989a. Carbon-13 CPMAS NMR and chemical characterization of particle-size separates of peats differing in degree of decomposition. *Org. Geochem.* 14, 393-403.
- Preston, C.M., Schnitzer, M., Ripmeester, J.A. 1989b. A spectroscopic and chemical investigation on the de-ashing of a humin *Soil Sci. Soc. Am. J.* 53, 1442-1447.
- Preston, C.M., Newman, R.H., Rother, P. 1994. Using CP-MAS NMR to assess effects of cultivation on the organic matter of particle size fractions in a grassland soil. *Soil Sci.* 157, 26-35.
- Preston, C.M. 1996. Applications of NMR to soil organic matter analysis: history and prospects. *Soil Sci.* 161, 144-166.
- Probst, R., Damme, A., Huard, E., Driard, J., Leydecker, J.P. 1989. Infrared study of structural OH in kaolinite, dickite, nacrite, and poorly crystalline kaolinite at 5 to 600 K. *Clays Clay Miner.* 37, 464-468.
- Quadros, R.M.B., Bellote, A.F.J., Novotny, E.H., Bognola, I.A., Cardoso, A., Marques, J. 1996. Aplicabilidade da análise fatorial na avaliação da produtividade de *Eucalyptus grandis*. In: XIII Congresso Latinoamericano de Ciência do Solo (1996 : Águas de Lindóia-SP). Anais... Campinas, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. CD-ROM.
- Redon, J.L., Serna, C.J. 1981. IR spectra of powder hematite: effects of particle size and shape. *Clay Miner.* 15, 375-382.
- Reicosky, D.C., Dugas, W.A., Torbert, H.A. 1997. Tillage-induced soil carbon dioxide loss from different cropping systems. *Soil Tillage Res.* 41, 105-118.

- Reicosky, D.C. 1999. Soil management and CO₂ sequestration. In: 3^o Encontro Brasileiro sobre Substâncias Húmicas (1999 : Santa Maria). Anais... Santa Maria, UFSM. p. 135-144.
- Reid, P.M., Wilkinson, A.E., Tipping, E., Jones, M.N. 1991. Aggregation of humic substances in aqueous media as determined by light-scattering methods. *J. Soil Sci.* 42, 259-270.
- Riffaldi, R., Schnitzer, M. 1972. Electron spin resonance spectrometry of humic substances. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 36, 301-305.
- Rosell, R.A., Ortiz, M.I., Quevedo, L. 1971. A comparison of the effectiveness of various extractants for determining humus quality in a calcareous soil. *Soil Sci. Plant Anal.* 2, 275-282.
- Rouxhet, P.G., Samudacheata, N., Jacobs, H., Anton, O. 1977. Attribution of the OH stretching bands of kaolinite. *Clay Miner.* 12, 171-180.
- Russell, J.D., Fraser, A.R. 1994. Infrared methods. In: Wilson, M.J. (Ed.) *Clay Mineralogy: Spectroscopic and Chemical Determinative Methods*. London, Chapman e Hall. p. 11-67.
- Ryan, D.K., Weber, J.H. 1982. Fluorescence quenching titration for determination of complexing capacities and stability constants of fulvic acid. *Anal. Chem.* 54, 986-990.
- Saab, S.C., Mello, N.C., Colnago, L.A., Conceição, M., Novotny, E.H., Martin-Neto, L. 1999. Anéis Aromáticos Condensados e Relação E₄/E₆: Estudo de Ácidos Húmicos por ¹³C NMR CPMAS Usando Desacoplamento Defasado. In: XXVII Congresso Brasileiro de Ciência do Solo (1999 : Brasília). Anais... Brasília, EMBRAPA-Cerrados. CD-ROM. Número: T044-7.
- Sahlin, M., Petersson, L., Gräslund, A., Ehrenberg, A., Sjöberg, B.-M., Thelander, L. 1987. Magnetic interaction between the tyrosyl free radical and the antiferromagnetically coupled iron center in ribonucleotide reductase. *Biochemistry.* 26, 5541-5548.
- Saison, C., Perrin-Ganier, C., Morel, J.-L. 2000. The use of fluorescence quenching to study the binding of phenanthrene to dissolved organic matter. In: 10th International Meeting of the International Humic Substances Society (2000 : Toulouse-França). Anais... Toulouse, IHSS. p. 389-392.
- Schmidt, M.W.I., Knicker, H., Hatcher, P.G., Kögel-Knabner, I. 1997. Improvement of ¹³C and ¹⁵N CPMAS NMR spectra of bulk soils, particle size fractions and organic material by treatment with hydrofluoric acid (10 %). *Eur. J. Soil Sci.* 48, 319-328.
- Schnitzer, M., Skinner, S.I.M. 1969. Free radicals in soil humic compounds. *Soil Sci.* 108, 383-390.
- Schnitzer, M., Khan, S.U. 1978. *Soil Organic Matter*. Amsterdam, Elsevier.
- Schnitzer, M., Lévesque, M. 1979. Electron spin resonance as a guide to the degree of humification of peats. *Soil Sci.* 127, 140-145.
- Schnitzer, M. 1991. Soil organic matter-the next 75 years. *Soil Sci.* 151, 41-58.
- Schulten, H.-R., Schnitzer, M. 1993. A state of the art structural concept for humic substances. *Naturwissenschaften.* 80, 29-30.
- Schulten, H.-R., Schnitzer, M. 1995. Three-dimensional models for humic acids and soil organic matter. *Naturwissenschaften.* 82, 487-498.
- Schulten, H.-R., Schnitzer, M. 1997. Chemical model structures for soil organic matter and soils. *Soil Sci.* 162, 115-130.
- Senesi, N., Schnitzer, M. 1977. Effects of pH, reaction time, chemical reduction and irradiation on ESR spectra of fulvic acid. *Soil Sci.* 123, 224-234.

- Senesi, N., Bocian, D.F., Sposito, G. 1985. Electron spin resonance investigation of copper(II) complexation by soil fulvic acid. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 49, 114-119.
- Senesi, N., Steelink, C. 1989. Application of ESR spectroscopy to the study of humic substances. In: Hayes, M.H.B., MacCarthy, P., Malcolm, R.L., Swift, R.S. (Eds.) *Humic substances II. In search of structure*. Chichester, Wiley. p. 373-407.
- Senesi, N. 1990a. Application of Electron Spin Resonance (ESR) Spectroscopy in Soil Chemistry. *Advances in soil science*, V.14. New York, Springer.
- Senesi, N. 1990b. Molecular and quantitative aspects of the chemistry of fulvic acids and its interactions with metal ions and organic chemicals. Part II. The fluorescence spectroscopy approach. *Anal. Chim. Acta.* 232, 77-106.
- Senesi, N., Miano, T.M., Provenzano, M.R., Brunetti, G. 1991. Characterization, differentiation, and classification of humic substances by fluorescence spectroscopy. *Soil Sci.* 152, 259-271.
- Senesi, N., Saiz-Jimenez, Miano, T.M. 1992. Spectroscopic characterization of metal-humic acid-lixes complexes of earthworm-composted organic wastes. *Sci. Total Environ.* 117/118, 111-120.
- Senesi, N., Miano, T.M., Brunetti, G. 1996a. Humic-like substances in organic amendments and effects on native soil humic substances. In: Piccolo, A. (Ed.) *Humic substances in terrestrial ecosystems*. Amsterdam, Elsevier. p. 531-593.
- Senesi, N., Rizzi, F.R., Dellino, P., Acquafredda, P. 1996b. Fractal dimension of humic acids in aqueous suspension as a function of pH and time. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 60, 1773-1780.
- Shear, G.M., Moschler, W.W. 1969. Continuous corn by the no-tillage and conventional methods: a six-year comparison. *Agron. J.* 61, 524-526.
- Shevchenko, S.M., Bailey, G.W. 1998. Modeling sorption of soil organic matter on mineral surfaces: wood-derived polymers on mica. *Supramol. Sci.* 5, 143-157.
- Silverstein, R.M., Bassler, G.C., Morrill, T.C. 1991. *Spectrometric identification of organic compounds*. 5th ed. New York, Wiley.
- Simpson, A.J., Kingery, W.L., Hayes, M.H.B., Spraul, M., Humpfer, E., Dvortsak, P., Kerssebaum, R., Godejohann, M., Hofmann, M. 2000. The structure and associations of organic molecules in the terrestrial environment. In: 10th International Meeting of the International Humic Substances Society (2000 : Toulouse-França). *Anais... Toulouse, IHSS*. p. 1109-1112.
- Singer, L.S. 1959. Synthetic ruby as a secondary standard for the measurement of intensities in electron paramagnetic resonance. *J. Appl. Phys.* 30, 1463-1464.
- Smernik, R.J., Oades, J.M. 1999. Effects of added paramagnetic ions on the ¹³C CP/MAS NMR spectrum of a de-ashed soil. *Geoderma.* 89, 219-248.
- Smernik, R.J., Oades, J.M. 2000. The use of spin counting for determining quantitation in solid state ¹³C NMR spectra of natural organic matter. 1. Model systems and the effects of paramagnetic impurities. *Geoderma.* 96, 101-129.
- Smernik, R.J. 2002. Solid state ¹³C NMR characterisation of natural organic matter (NOM). Disponível na Internet. <http://www.waite.adelaide.edu.au/NMR/> em 15 de abril de 2002.
- Sombroek, W.G., Nachtergaele, F.O., Hebel, A. 1993. Amounts, dynamics and sequestrations of carbon in tropical and subtropical soils. *Ambio.* 22, 417-426.
- Spark, K.M., Swift, R.S. 1994. Investigation of some of the parameters affecting the fluorescence spectra of humic substances. In: Senesi, N, Miano, T. (Ed.). *Humic substances in the global environment and implications on human health*. Amsterdam, Elsevier. p. 153-160.
- Sposito, G. 1989. *The Chemistry of Soils*. New York, Oxford University.

- Sposito, G., Martin-Neto, L., Yang, A. 1996. Atrazine complexation by soil humic acids. *J. Environ. Qual.* 25, 1203-1209.
- Staley, T.E, Edwards, W.M., Scott, C.L., Owens, L.B. 1988. Soil microbial biomass and organic component alterations in a no-tillage chronosequence. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 52, 998-1005.
- Starsinic, M., Otake, Y., Walker Jr., P.L, Painter, P.C. 1984. Application of FT-i.r. spectroscopy to the determination of COOH groups in coal. *Fuel.* 63, 1002-1007.
- Steelink, C., Tollin, 1962. Stable free radicals in soil humic acid. *Biochimica Biophysica Acta*, 59, 25-34.
- Stevenson, F.J, Goh, K.M. 1971. Infrared spectra of humic acids and related substances. *Geochim. Cosmochim. Acta.* 35, 471-483.
- Stevenson, F.J. 1994. *Humus Chemistry: Genesis, composition, reactions.* 2nd ed. New York, Wiley.
- Stoneham, A.M. 1972. Linewidths with gaussian and lorentzian broadening. *J. Phys. D: Appl. Phys.* 5, 670-672.
- Stout, J.D., Goh, K.M., Rafter, T.A. 1995. Chemistry and turnover of naturally occurring resistant organic compounds in soil. In: Paul, E.A., Ladd, J.N. (Eds.). *Soil Biochemistry.* New York, Marcel Dekker. v.5, p. 1-73.
- Styring, S.A., Rutherford, A.W. 1988. The microwave power saturation of SII_{slow} varies with the redox state of the oxygen-evolving complex in photosystem II. *Biochemistry.* 27, 4915-4923.
- Swift, R.S., Posner, A.M. 1971. Gel chromatography of humic acid. *J. Soil Sci.* 22, 237-249.
- Swift, R.S. 1996. Organic matter characterization. In: Sparks, et al. (Eds.) *Methods of soil analysis. Part 3. Chemical methods.* Soil Sci. Soc. Am. Book Series: 5. Madison, Soil Sci. Soc. Am. p. 1018-1020.
- Swift, R.S. 1999. Macromolecular properties of soil humic substances: fact, fiction, and opinion. *Soil Sci.* 164, 790-802.
- Takács, M., Alberts, J.J., Schalles, J. 2000. Fluorescence spectral changes of natural organic matter (NOM) along a riverine salinity gradient. In: 10th International Meeting of the International Humic Substances Society (2000 : Toulouse-França). *Anais... Toulouse, IHSS.* p. 35-37.
- Teasdale, R.D. 1987. Copper-induced indefinite aggregation of humic substances: theoretical consequences for copper-binding behaviour. *J. Soil Sci.* 38, 433-442.
- Theng, B.K.G., Tate, K.R., Sollins, P. 1989. Constituents of organic matter in temperate and tropical soils. In: Coleman, D.C., Oade, J.M., Uehara, G. (Ed.) *Dynamics of Soil Organic Matter in tropical Ecosystems.* Honolulu, University of Hawaii. p. 5-32.
- Title, R.S. 1963. Electron paramagnetic resonance spectra of Cr⁺, Mn²⁺ and Fe³⁺ in cubic ZnS. *Phys. Rev.* 131, 623-627.
- Vassalo, A.M., Wilson, M.A., Collin, P.J., Oades, P.J., Waters, A.G., Malcolm, R.L. 1987. Structural analysis of geochemical samples by solid-state nuclear magnetic resonance spectrometry. Role of paramagnetic material. *Anal. Chem.* 59, 558-562.
- Veeman, W.S. 1997. Nuclear magnetic resonance, a simple introduction to the principles and applications. *Geoderma.* 80, 225-242.
- Visser, S.A. 1964. A physico-chemical study of the properties of humic acids and their changes during humification. *J. Soil Sci.* 15, 202-219.
- Wander, M.M., Traina, S.J. 1996. Organic matter fractions from organically and conventionally managed soils: I. Carbon and nitrogen distribution. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 60, 1081-1087.

- Wander, M.M., Bidart, M.G., Aref, S. 1998. Tillage impacts on depth distribution of total and particulate organic matter in three Illinois soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 62, 1704-1711.
- Wang, Z.-D., Gamble, D.S., Langford, C.H. 1990. Interaction of atrazine with Laurentian fulvic acid: binding and hydrolysis. *Anal. Chim. Acta* 232, 181-188.
- Weil, J.A., Bolton, J.R., Wertz, J.E. 1994. *Electron paramagnetic resonance: Elementary theory and practical applications*. New York, Wiley.
- Wershaw R.L. 1986. A new model for humic materials and their interactions with hydrophobic organic chemicals in soil-water or sediment-water systems. *J. Contam. Hydrol.* 1, 29-45.
- Wershaw, R.L. 1989. Application of membrane model to the sorptive interactions of humic substances. *Environ. Health Perspect.* 83, 191-203.
- Wershaw, R.L. 1993. Model for humus in soils and sediments. *Environ. Sci. Technol.* 27, 814-816.
- Wershaw, R.L. 1999. Molecular aggregation of humic substances. *Soil Sci.* 164, 803-813.
- Wickman, H.H., Klein, M.P., Shirley, D.A. 1965. Paramagnetic resonance of Fe^{3+} in polycrystalline ferrichrome A. *J. Chem. Phys.* 42, 2113-2116.
- Wilson, M.A., Pugmire, R.J., Zilm, K.W., Goh, K.M., Heng, S., Grant, D. 1981a. Cross-polarization ^{13}C NMR spectroscopy with “magic angle” spinning characterizes organic matter in whole soils. *Nature*, 294, 648-650.
- Wilson, M.J., Russel, J.D., Tait, J.M., Clark, D.R., Fraser, A.R., Stephen, I. 1981b. A Swelling hematite/layer-silicate complex in weathered granite. *Clay Miner.* 16, 261-278.
- Wilson, M.A. 1987. *NMR techniques and applications in geochemistry and soil chemistry*. Oxford, Pergamon Press.
- Wilson, M.A. 1990. Application of nuclear magnetic resonance spectroscopy to organic matter whole soils. In: MacCarthy, P., Clapp, C.E., Malcolm, R.L., Bloom, P.R. (Ed.) *Humic substances in soil and Crop Sciences; Selected Readings*. Madison, American Society of Agronomy and Soil Science Society of America. p. 221-260.
- Zsolnay, A., Baigar, E., Jimenez, M., Steinweg, B., Saccomandi, F. 1998. Differentiating with fluorescence spectroscopy the sources of dissolved organic matter in soils subjected to drying. *Chemosphere.* 38, 45-50.