UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Ciência e Engenharia de Materiais

PÓS-GRADUAÇÃO INTERUNIDADES EM CIÊNCIA E ENGENHARIA DE MATERIAIS

ESTUDOS DE INTERAÇÕES HIDROFÓBICAS EM SUBSTÂNCIAS HÚMICAS E COMPONENTES DO SOLO UTILIZANDO ANÁLISES ESPECTROSCÓPICAS

Autor: Marcelo Luiz Simões

Orientador: Dr. Ladislau Martin Neto

USP/IFSC/SBI

8-2-001695

Tese apresentada ao programa de pós-graduação Interunidades (EESC / IFSC / IQSC), como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciência e Engenharia de Materiais.

São Carlos/SP

2005

Simões, Marcelo Luiz

“Estudos de interações hidrofóbicas em substâncias húmicas e componentes do solo utilizando análises espectroscópicas”

Marcelo Luiz Simões – São Carlos, 2005

**Tese (Doutorado) – Interunidades Ciência e Engenharia de Materiais da
Universidade de São Paulo, 2005 – páginas: 147**

Área: Interunidades Ciência e Engenharia de Materiais

Orientador: Dr. Ladislau Martin Neto

1. Substâncias Húmicas

1. Título

MEMBROS DA COMISSÃO JULGADORA DA TESE DE DOUTORADO DE MARCELO LUIZ SIMÕES APRESENTADA À ÁREA INTERUNIDADES CIÊNCIA E ENGENHARIA DE MATERIAIS, UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, EM 12/08/2005.

COMISSÃO JULGADORA:

Dr. Ladislau Martin Neto (Orientador e Presidente) – EMBRAPA

Prof. Dr. Oswaldo Baffa Filho – FFCLRP/USP

Prof. Dr. Julio César Rocha – UNESP

Prof. Dr. Antonio José da Costa Filho – IFSC/USP

Profa. Dra. Eny Maria Vieira - IQSC/USP

***“Ponho folhas e hastes e, se me ajudardes, Senhor,
mesmo planta de acaso solitária, dou espigas e
devolvo, em muitos grãos, o grão perdido inicial,
salvo por milagre, que a terra fecundou.”***

Trecho do poema “Oração do Milho” de Cora Coralina

DEDICO ESTE TRABALHO

Ao Senhor Deus e à sua infinita bondade.

À minha esposa Gi, pelo carinho e pela compreensão nos momentos de ausência. Ao meu querido filho Igor, que mostra-me a cada dia que a vida é um aprendizado constante. À minha mãe Maria, que fez dos seus dias, dias de seus filhos, e ao meu pai Benedito, exemplo de trabalho e humildade.

Às minhas queridas irmãs, cunhados e sobrinhos, pelo carinho e pela união
que criamos nos momentos difíceis.

À Dona Elena (sogra), ao Seu Odagmar (sogro) e à minha cunhadinha
Taíse, pelo carinho que tiveram e têm comigo e com o meu filho Igor,
fazendo muitas vezes o papel de pai.

Ao pessoal da Embrapa Instrumentação Agropecuária, pelo excelente
ambiente de trabalho nesses quase vinte anos.

AGRADECIMENTOS

É impossível citar todas as pessoas que auxiliaram no desenvolvimento deste trabalho, peço desculpas a essas que, por um acaso, não foram citadas abaixo. Algumas foram essenciais e, sem elas tudo teria sido muito mais difícil. A elas minha eterna gratidão.

Ao Dr. Ladislau Martin-Neto, pela orientação, amizade, confiança, cobrança e incentivo fundamentais neste trabalho e durante toda a jornada, desde o mestrado. Os meus mais sinceros agradecimentos.

Ao Prof. Dr. Sérgio Mascarenhas, pelo enorme incentivo nos estudos e pelo exemplo de como devemos continuar sendo humildes, apesar de todas as transformações que sofremos. Jamais me esquecerei da saudosa D. Bartira e nossas aulas de inglês.

Ao Dr. Silvio Crestana, pela amizade e por ensinar-me a olhar para frente, mas de vez em quando parar e analisar para onde estamos indo. Além das cartas de apresentação para ingresso no mestrado e doutorado.

Ao Dr. Paulo E. Cruvinel, pela amizade e apoio constante desde a graduação. Minha gratidão pelo grande esforço realizado para meu retorno ao CNPDIA.

Enfim à todos os chefes gerais e imediatos da Embrapa Instrumentação Agropecuária (Dr. Luiz H.C. Mattoso, Dr. Clóvis I. Biscegli, Dr. Luiz A. Colnago, Dr. Carlos M.P. Vaz, Dr. Álvaro M. da Silva, Socorro, Francisco), pela infra-estrutura cedida, durante o período que foram chefes e, por permitirem conciliar minhas atividades do dia a dia dentro da empresa desde a graduação até a realização deste trabalho.

À USP, por meio do Curso de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais, em especial ao presidente da CPG, Prof. Dr. Antonio Carlos Hernandes.

As secretárias da Pós-Graduação, em especial à Wladerez.

Ao Prof. Dr. Antonio J. da Costa-Filho/IFSC e ao Prof. Dr. Otaciro R. Nascimento/IFSC, exemplos de cooperação científica, pelas discussões e simulação dos espectros de RPE.

À Dra. Julieta A. Ferreira pelas sugestões e discussões fundamentais no trabalho.

Ao Dr. Wilson T. L. da Silva e à Dra. Débora M.B.P. Milori, pelas discussões e sugestões relevantes no trabalho.

À todos os pesquisadores da Embrapa Instrumentação Agropecuária, sempre dispostos a colaborar.

Ao Prof. Dr. Cimélio Bayer/UFRGS, ao MSc. Denizart Bolonhezi/IAC e ao Dr. Antonio L. Cerdeira/Embrapa Meio Ambiente, pelas amostras de solos.

À Aline, pelas amostras de AH e à Flavia e Adriana, pela valiosa ajuda na preparação das amostras.

Ao Ferrazini, pela inestimável ajuda no conserto do equipamento de RPE e ao Renê, pela grande força no laboratório de química.

Ao Odemilson, pela amizade e ajuda na correção dos textos e ao Ednaldo, pela amizade e caronas na madrugada.

Às bibliotecárias e estagiárias da Embrapa Instrumentação Agropecuária, pelos serviços oferecidos.

Ao Prof. Dr. Júlio C. Rocha e à Luciana C. de Oliveira, ambos do laboratório de Química Ambiental/UNESP Araraquara, por realizar o fracionamento molecular.

À Profa. Dra. Maria O. de O. Rezende, Diva, Jussara e Marcelo do Laboratório de Química Ambiental/IQSC-USP, pela análise de COD.

A todos os orientados e bolsistas, em especial ao Fabio Leite, pela amizade que criamos devido ao algo em comum.

Enfim, a todos os colegas que, no dia a dia, no trabalho ou na Universidade, ajudaram-me, se não com ações com exemplos.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE TABELAS.....	v
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vii
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
INTRODUÇÃO.....	1
Objetivos.....	2
Apresentação dos capítulos da tese.....	3
1 REVISÃO DA LITERATURA.....	5
1.1 Matéria orgânica do solo.....	5
1.2 A importância das substâncias húmicas.....	7
1.2.1 Interações hidrofóbicas.....	9
1.3 Breve histórico dos avanços científicos na área de substâncias húmicas...	11
1.4 Modelos estruturais para as substâncias húmicas.....	14
1.5 Efeito estufa e o sequestro de carbono no solo.....	18
2 FUNDAMENTO TEÓRICO DAS TÉCNICAS E METODOLOGIAS UTILIZADAS.....	23
2.1 Espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica.....	23
2.1.1 Metodologia de marcador de spin.....	24
2.2 Espectroscopia de fluorescência de luz UV-visível.....	33
2.2.1 Supressão da fluorescência.....	34
3 EXTRAÇÃO, FRACIONAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS ÁCIDOS HÚMICOS.....	39
3.1 INTRODUÇÃO.....	39
3.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
3.2.1 Os solos utilizados.....	40
3.2.2 Extração e fracionamento das substâncias húmicas.....	41
3.2.3 Caracterização das amostras de ácidos húmicos.....	43
3.2.3.1 Análise elementar.....	43
3.2.3.2 Espectroscopia de UV-visível.....	43
3.2.3.3 Espectroscopia de RPE.....	43
3.2.3.4 Espectroscopia de ¹³ C RMN no estado sólido.....	44
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
3.3.1 Caracterização das amostras de ácido húmico.....	46
3.3.1.1 Análise elementar.....	46
3.3.1.2 Espectroscopia de UV-visível.....	48
3.3.1.3 Espectroscopia de RPE.....	50
3.3.1.4 Espectroscopia de ¹³ C RMN.....	52
3.3.2 Correlação entre as informações obtidas pela análise elementar e pelas análises espectroscópicas.....	54
3.4 CONCLUSÕES.....	56

4 AVALIAÇÃO DA CONFORMAÇÃO ESTRUTURAL DE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS UTILIZANDO A METODOLOGIA DE MARCADOR DE SPIN.....	57
4.1 INTRODUÇÃO.....	57
4.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	59
4.2.1 Amostras de ácido húmico e ácido fúlvico.....	59
4.2.2 Marcadores de spin.....	60
4.2.3 Interação com os marcadores de spin.....	61
4.2.4 Delineamento experimental.....	61
4.2.5 Análises de RPE.....	63
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	64
4.3.1 Marcadores de spin.....	64
4.3.1.1 Interação entre diferentes marcadores de spin e ácido húmico.....	65
4.3.2 Influência de parâmetros experimentais na interação entre marcador de spin e ácido húmico.....	68
4.3.2.1 pH.....	68
4.3.2.1.1 Avaliação da reversibilidade da conformação estrutural do ácido húmico.....	71
4.3.2.2 Tempo de hidratação.....	74
4.3.2.3 Concentração iônica.....	77
4.3.2.4 Frações baseadas no tamanho molecular.....	80
4.3.2.5 Concentração de ácido húmico.....	83
4.3.3 Comportamento espectral dos marcadores 5-SASL e 16-SASL na presença do ácido húmico.....	88
4.3.4 Sítios hidrofóbicos em ácido fúlvico.....	91
4.4 CONCLUSÕES.....	97
5 INTERAÇÕES HIDROFÓBICAS EM DIFERENTES ÁCIDOS HÚMICOS E COMPONENTES DO SOLO.....	100
5.1 INTRODUÇÃO.....	100
5.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	102
5.2.1 Supressão de fluorescência.....	102
5.2.1.1 Amostras utilizadas.....	102
5.2.1.2 Análises de fluorescência.....	103
5.2.2 Metodologia de marcador de spin.....	105
5.2.2.1 Interações hidrofóbicas em diferentes ácidos húmicos.....	105
5.2.2.1.1 Amostras utilizadas.....	105
5.2.2.2 Sítios hidrofóbicos em diferentes componentes do solo.....	106
5.2.2.2.1 Amostras utilizadas.....	106
5.2.2.3 Análises de RPE.....	107
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	108
5.3.1 Correlação das características químicas dos ácidos húmicos com os dados fornecidos pela supressão de fluorescência e pela metodologia de marcador de spin.....	108
5.3.1.1 Supressão de fluorescência.....	108
5.3.1.1.1 Correlação de K_{CO} com as características químicas dos ácidos húmicos.....	109
5.3.1.2 Marcador de spin.....	112

5.3.1.2.1 Correlação dos sítios hidrofóbicos com as características químicas dos ácidos húmicos.....	114
5.3.2 Sítios hidrofóbicos em diferentes componentes do solo.....	115
5.3.2.1 Fração mineral e orgânica.....	115
5.3.2.2 Substâncias não húmicas.....	118
5.3.2.3 Substâncias húmicas.....	121
5.3.3 Interação do marcador 5-SASL com ácidos húmicos de diferentes origens.....	124
5.3.4 Possibilidades de aplicação da metodologia de marcador de spin para estudos de problemas ambientais.....	125
5.4 CONCLUSÕES.....	128
CONCLUSÕES GERAIS.....	131
TRABALHOS FUTUROS.....	134
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	135

Figura 2.8 – Diagrama do processo de supressão dinâmica. $f(t)$ é a função da excitação; $\gamma = \tau_0^{-1}$ é a taxa de decaimento do fluoróforo na ausência do supressor k_s é a constante de supressão bimolecular e $[S]$ é a concentração do supressor.....	35
Figura 2.9 – Diagrama do processo de supressão estática.....	36
Figura 2.10 – Gráfico da equação de Stern-Volmer. F_0/F é razão entre as intensidades de fluorescência na ausência e presença, respectivamente, do supressor S , e K_E é a constante de interação entre o fluoróforo e o supressor...	38
Figura 3.1 – Diagrama simplificado do procedimento de extração de substâncias húmicas sugerido pela IHSS (Adaptado de Stevenson, 1994).....	42
Figura 3.2 – Ilustração do processo de condensação aromática influenciando na razão atômica H/C.....	47
Figura 3.3 – Espectro de absorção de luz UV-visível obtido para a amostra ST6, indicando as absorbâncias em 465 nm e 665 nm.....	48
Figura 3.4 – Espectro de RPE típico de ácidos húmicos (AH) em estado sólido, mostrando o sinal do radical livre orgânico (RLO). I é a intensidade do sinal e ΔH_{pp} é a largura de linha tomada pico a pico e g é o fator giromagnético.....	50
Figura 3.5 – Espectros de ^{13}C RMN dos ácidos húmicos no estado sólido utilizando a técnica VACP-MAS.....	52
Figura 4.1 – Estruturas químicas dos marcadores de spin. a) TEMPO; b) 5-SASL; c) 16-SASL e d) 5-MSSL.....	60
Figura 4.2 – Esquematização do procedimento experimental utilizado nos experimentos para análises da reversibilidade conformacional. As apóstrofes indicam diferentes pH para uma mesma suspensão.....	62
Figura 4.3 – Espectro de RPE dos marcadores de spin em solução aquosa. a) TEMPO e b) 5-SASL e 16-SASL. A concentração final dos marcadores de spin foi de $0,01 \text{ mmol L}^{-1}$	64
Figura 4.4 – Espectros de RPE do marcador 5-MSSL. a) Em água e b) em clorofórmio (CHCl_3). Nos dois solventes a concentração do marcador 5-MSSL foi de $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$	65
Figura 4.5 – Espectros de RPE de diferentes marcadores de spin na presença da suspensão de ácido húmico (3 g L^{-1}) em pH 4,5 após aproximadamente 10 minutos de interação. a) TEMPO ($0,01 \text{ mmol L}^{-1}$) e b) 5-SASL ($0,01 \text{ mmol L}^{-1}$).....	66
Figura 4.6 – Espectros de RPE do marcador 5-MSSL ($0,1 \text{ mmol L}^{-1}$) na presença da suspensão de ácido húmico (3 g L^{-1}) em diferentes pH e tempos de interação. a) 1 dia em pH 4,7 e b) 7 dias em pH 7,5.....	68
Figura 4.7 – Espectros de RPE experimental (em preto) e simulado (em vermelho) do marcador 5-SASL ($0,01 \text{ mmol L}^{-1}$) na presença da suspensão de ácido húmico (3 g L^{-1}) em diferentes pH (referenciados na figura). As análises foram feitas após aproximadamente 10 minutos de interação.....	69
Figura 4.8 – Porcentagem relativa de moléculas do marcador 5-SASL ($0,01 \text{ mmol L}^{-1}$) nos sítios hidrofóbicos menos expostos ao meio (internos) do ácido húmico (3 g L^{-1}) em função do pH.....	70
Figura 4.9 – Espectros de RPE (normalizados) do marcador 5-SASL ($0,01 \text{ mmol L}^{-1}$) na presença da suspensão de ácido húmico (3 g L^{-1}). Análises realizadas após 1 dia de interação em pH 8,0. Na legenda do gráfico, as apóstrofes indicam que as análises foram feitas sempre no mesmo	

pH, porém as suspensões de ácido húmico permaneceram em pH 4,0 por 5 dias antes de interagir com o marcador de spin.....	72
Figura 4.10 – Razão entre a área da componente imobilizada (I) e a soma de I e da componente livre (II), definida como razão $I/(I+II)$. As áreas foram retiradas dos espectros de RPE do marcador 5-SASL ($0,01 \text{ mmol L}^{-1}$) na presença da suspensão de ácido húmico (3 g L^{-1}) adquiridos após 1 dia de interação. No eixo x, as apóstrofes indicam que as análises foram feitas sempre no mesmo pH (4,0), porém as suspensões de ácido húmico permaneceram em pH 8,0 antes de interagirem com o marcador de spin.....	73
Figura 4.11 – Espectro de RPE do marcador 5-SASL ($0,01 \text{ mmol L}^{-1}$) na presença da suspensão de ácido húmico (3 g L^{-1}) obtida após 5 dias de agitação em pH 4,5. Análise de RPE realizada após aproximadamente 10 minutos de interação.....	74
Figura 4.12 – Espectro de RPE do marcador 5-SASL ($0,01 \text{ mmol L}^{-1}$) na presença de suspensões de ácido húmico (3 g L^{-1}) obtida a partir de 10 minutos de agitação em pH 4,0. A análise de RPE realizada após aproximadamente 10 minutos de interação.....	75
Figura 4.13 – Espectro de RPE do marcador 5-SASL ($0,01 \text{ mmol L}^{-1}$) na presença da suspensão de ácido húmico (3 g L^{-1}). Para obter esta suspensão a amostra de ácido húmico foi dissolvida em solução de bicarbonato de sódio (NaHCO_3) (pH em torno de 8) agitada por 10 minutos e reajustado o pH para aproximadamente 4 com solução de ácido clorídrico (HCl). A análise de RPE foi realizada após aproximadamente 10 minutos.....	76
Figura 4.14 – Espectros de RPE do marcador 5-SASL ($0,01 \text{ mmol L}^{-1}$) na presença da suspensão de ácido húmico (3 g L^{-1}) em pH 7,5 com diferentes concentrações de cloreto de sódio (NaCl) (referenciadas na figura).....	78
Figura 4.15 – Espectros de RPE do marcador 5-SASL ($0,01 \text{ mmol L}^{-1}$) na presença das suspensões das frações de ácido húmico (3 g L^{-1}) com diferentes tamanhos moleculares ($F_1 > 100$; $F_4: 30-10$ e $F_5 < 10 \text{ kDa}$), em pH 4,5.....	81
Figura 4.16 – Espectros de RPE do marcador 5-SASL ($0,01 \text{ mmol L}^{-1}$) na presença das suspensões das frações de ácido húmico (3 g L^{-1}) com diferentes tamanhos moleculares ($F_1 > 100$; $F_4: 30-10$ e $F_5 < 10 \text{ kDa}$), em pH 6,5.....	82
Figura 4.17 – Áreas normalizadas das componentes alargada e livre obtidas após a integração dupla dos espectros de RPE do marcador 5-SASL ($0,01 \text{ mmol L}^{-1}$) na presença da suspensão de ácido húmico (AH) (pH 4,5) com diferentes concentrações.....	84
Figura 4.18 – Espectros de RPE do marcador 5-SASL ($0,01 \text{ mmol L}^{-1}$) na presença de suspensões de ácido húmico com diferentes concentrações (referenciadas no gráfico). Análises realizadas em pH 6,5.....	85
Figura 4.19 – Espectro de RPE do marcador 5-SASL ($10 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$) na suspensão de ácido húmico ($0,3 \text{ g L}^{-1}$), em pH 4,5.....	86
Figura 4.20 – Espectros de RPE experimental (em preto) e simulado (em vermelho) dos marcadores 5-SASL e 16-SASL na presença da suspensão de ácido húmico (3 g L^{-1}) em pH 4,5. A concentração de ambos os marcadores foi de $0,01 \text{ mmol L}^{-1}$	89

Figura 4.21 – Proposta de ilustração para os marcadores 5-SASL e 16-SASL no sítio hidrofóbico do ácido húmico, sugerindo que o marcador de spin na posição 16 tenha maior liberdade que na posição 5.....	90
Figura 4.22 – Espectros de RPE do marcador 5-SASL (0,01 mmol L ⁻¹) na presença da solução de ácido fúlvico com diferentes concentrações (apresentadas na figura) e pH. a) pH 4,0 e b) pH 8,0.....	92
Figura 4.23 – Espectros de RPE do marcador 5-MSSL (0,1 mmol L ⁻¹) na presença da solução de ácido fúlvico com diferentes concentrações em pH 4,0. a) 5 g L ⁻¹ e b) 50 g L ⁻¹	93
Figura 4.24 – Espectros de RPE do marcador 5-MSSL (0,1 mmol L ⁻¹) na presença da solução de ácido fúlvico em diferentes relações. a) 5 g L ⁻¹ e b) 50 g L ⁻¹ . Análises realizadas em pH 8,0.....	93
Figura 4.25 – Espectro de RPE do marcador 5-SASL (0,01 mmol L ⁻¹) na presença da solução de ácido fúlvico (100 g L ⁻¹) em pH 4,0 (em preto). Em azul está o sinal simulado, em verde a componente 1 e em azul a componente 2.....	95
Figura 5.1 – Estrutura química do pireno (PI).....	102
Figura 5.2 – Geometria da cubeta de quartzo e as simbologias dos dados geométricos assumidos nas medidas de fluorescência para correção do IFE, I_0 representa o feixe de luz de excitação.....	104
Figura 5.3 – Gráfico da equação de Stern-Volmer para o pireno (PI) (0,7 µmol L ⁻¹) em presença de diferentes ácidos húmicos (AH). Análise realizada em pH 5,0. F_0/F é razão entre as intensidades de fluorescência (em 373 nm) na ausência e presença do AH, respectivamente.....	108
Figura 5.4 – Razão $I/(I+II)$ obtida dos espectros de RPE do marcador 5-SASL (0,01 mmol L ⁻¹) na presença dos ácidos húmicos (AH), pH 4,5. O valor apresentado no eixo y refere-se à razão $I/(I+II)$ normalizada pela quantidade de carbono orgânico dissolvido (COD) referente a cada amostra de AH.....	113
Figura 5.5 – Espectros de RPE do marcador 5-SASL (0,01 mmol L ⁻¹) na presença de diferentes componentes do solo Podzólico Vermelho Escuro (3 g L ⁻¹) em pH 4,5. a) fração argila; b) solo tratado com solução de ácido fluorídrico (HF) e c) ácido húmico (AH).....	116
Figura 5.6 – Espectros de RPE do marcador 5-SASL (0,01 mmol L ⁻¹) na presença do polissacarídeo “Blue dextran” (3 g L ⁻¹) em diferentes pH. a) pH 4,5 e b) pH 6,5.....	119
Figura 5.7 – Espectros de RPE do marcador 5-SASL e seus respectivos espectros simulados na presença de diferentes substâncias húmicas. a) ácido fúlvico (AF) e b) ácido húmico (AH). As condições experimentais foram iguais (pH próximo de 4,5), exceto pelas concentrações utilizadas: AF (100 g L ⁻¹) e AH (3 g L ⁻¹).....	122
Figura 5.8 – Espectros de RPE do marcador 5-SASL (0,01 mmol L ⁻¹) na presença de suspensões (pH 4,5) de ácido húmico (AH) (3 g L ⁻¹) de diferentes origens. a) AH de origem aquática e b) AH de origem terrestre.....	124
Figura 5.9 – Espectros de RPE do marcador 5-SASL (0,01 mmol L ⁻¹) na suspensão da amostra do solo Podzólico Vermelho Escuro tratada com solução de ácido fluorídrico (HF) (3 g L ⁻¹). Análise realizada após 10 minutos de interação. a) pH ~4,5 e b) pH ~6,5.....	126

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 – Breve histórico dos avanços científicos sobre a composição química e o modelo estrutural das substâncias húmicas (SH).....	12
Tabela 3.1 – Tipos de solos e suas respectivas características granulométricas.	40
Tabela 3.2 – Tipos de solos, incluindo suas respectivas profundidades de coleta, sistemas de manejo, período sob cada tipo de manejo e sistema de rotação de cultura.....	41
Tabela 3.3 – Atribuições dos deslocamentos químicos nos espectros de ^{13}C VACP-MAS RMN (Knicker <i>et al.</i> , 1996).....	45
Tabela 3.4 – Composição elementar e as razões atômicas O/C e H/C dos ácidos húmicos.....	46
Tabela 3.5 – Valores da razão E_4/E_6 dos ácidos húmicos, determinados com dados obtidos por espectroscopia de absorção no UV-visível.....	49
Tabela 3.6 – Concentrações de radicais livres orgânicos (RLO), em spins g^{-1} de C, dos ácidos húmicos, determinados com dados obtidos por espectroscopia de RPE.....	51
Tabela 3.7 – Porcentagem da área de cada agrupamento químico em relação à área total nos espectros de ^{13}C VACP-MAS RMN dos ácidos húmicos.....	53
Tabela 3.8 – Aromaticidade (f_a) e polaridade (P) dos ácidos húmicos, fornecida pela quantificação da área dos espectros obtidos por ^{13}C VACP-MAS RMN.....	54
Tabela 3.9 – Valores dos parâmetros fornecidos pela análise elementar (razões atômicas H/C e O/C) e pelas espectroscopias de UV-visível (razão E_4/E_6), RPE (concentração de spins) e ^{13}C RMN VACP-MAS (aromaticidade (f_a) e polaridade (P)) dos ácidos húmicos (AH).....	55
Tabela 3.10 – Coeficiente de correlação linear (R) entre a razão atômica H/C, razão E_4/E_6 , concentração de spins (Spins) e aromaticidade (f_a), fornecidas pela análise elementar, espectroscopia de UV-visível, RPE e ^{13}C RMN.....	55
Tabela 4.1 – Razão entre a área da componente imobilizada (I) pela soma de I e da componente livre (II) (razão $I/(I+II)$) obtida dos espectros de RPE do marcador 5-SASL ($0,01 \text{ mmol L}^{-1}$) na presença da suspensão de ácido húmico (AH) em diferentes concentrações de cloreto de sódio (NaCl) e de pH.....	79
Tabela 4.2 – Parâmetros obtidos da simulação dos espectros de RPE dos marcadores de spin (5-SASL e 16-SASL) na presença da suspensão de ácido húmico. A_{xx} , A_{yy} e A_{zz} são as componentes do tensor hiperfino nuclear, e $R_{\perp}$ a taxa de difusão rotacional.....	89
Tabela 4.3 – Parâmetros obtidos da simulação dos marcadores de spin. A_{xx} , A_{yy} e A_{zz} são as componentes do tensor hiperfino nuclear, $R_{\perp}$ a taxa de difusão rotacional e ($Pop. (\%)$) a porcentagem de moléculas do marcador de spin em cada componente.....	95
Tabela 5.1 – Valores do coeficiente de interação (K_{CO}) entre o PI e os ácidos húmicos (AH), obtidos por meio da utilização da equação de Stern-Volmer. Análises realizadas em pH 5.....	109
Tabela 5.2 – Coeficiente de correlação linear (R) entre o coeficiente de interação (K_{CO}) do PI e a razão atômica O/C e H/C, razão E_4/E_6 , concentração de spins (Spins), fração aromática (f_a) e polaridade (P) dos ácidos húmicos.....	109

Tabela 5.3 – Momento de dipolo elétrico de algumas ligações químicas (Gauthier <i>et al.</i> , 1986).....	110
Tabela 5.4 – Porcentagem de carbono (% C), determinada pela análise elementar, da fração argila, do solo tratado com solução de ácido fluorídrico (HF) e do ácido húmico (AH) do Podzólico Vermelho Escuro.....	118
Tabela 5.5 – Parâmetros obtidos da simulação do 5-SASL na presença do ácido fúlvico (AF) e do ácido húmico (AH). A_{xx} , A_{yy} e A_{zz} são as componentes do tensor hiperfino nuclear, $R_{\perp}$ a taxa de difusão rotacional e <i>Pop.</i> é a população percentual de moléculas do marcador de spin em cada componente.....	123
Tabela 5.6 – Porcentagem da área de cada agrupamento químico em relação à área total nos espectros de ^{13}C CP-MAS e VACP-MAS RMN de ácidos húmicos (AH) de diferentes origens.....	125

LISTA DE ABREVIATURAS

AF	Ácido(s) fúlvico(s)
AH	Ácido(s) húmico(s)
CM	Cultivo mínimo
CO	Carbono orgânico
COO ⁻	Grupo carboxilato
COOH	Grupo carboxílico
MOS	Matéria orgânica do solo
MSSL	Marcador de spin com o grupo metil ester
PC	Plantio convencional
PD	Plantio direto
PI	Pireno
SH	Substâncias húmicas
SnH	Substâncias não húmicas
RMN	Ressonância magnética nuclear
RPE	Ressonância paramagnética eletrônica
SASL	Marcador de spin derivado do ácido esteárico
UV-vis	Absorção eletrônica no ultravioleta e visível

RESUMO

A avaliação da ocorrência de interações hidrofóbicas em substâncias húmicas torna-se importante pois este tipo de interação pode afetar a dinâmica e a reatividade de contaminantes apolares no ambiente e influenciar no controle biogeoquímico do carbono no solo, podendo contribuir para a mitigação do efeito estufa. Entretanto, devido à heterogeneidade química das substâncias húmicas associada à baixa energia envolvida neste tipo de interação, evidências ou detecções experimentais são difíceis. Neste trabalho avaliou-se a ocorrência de interações hidrofóbicas em substâncias húmicas e também em alguns componentes do solo utilizando a metodologia de marcador de spin, detectável por ressonância paramagnética eletrônica, e a supressão de fluorescência. A utilização de diferentes marcadores de spin (TEMPO, 5-SASL, 16-SASL e 5-MSSL) possibilitou avaliar que a interação estabelecida com o ácido húmico é predominantemente hidrofóbica. A forte imobilização do marcador 5-SASL no ácido húmico foi confirmada pela diminuição dos valores da taxa de difusão rotacional obtida por simulação espectral (10^9 s^{-1} em água e 10^6 s^{-1} em presença do ácido húmico). Da análise do comportamento espectral do marcador de spin, observou-se que a conformação estrutural do ácido húmico depende, além do pH, da concentração iônica. Em pH 7,5, foi observado que a utilização de concentrações iônicas acima de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de cloreto de sódio favoreceu a formação de sítios hidrofóbicos menos expostos ao meio aquoso (internos). O tempo de hidratação e a concentração de ácido húmico também influenciaram na formação destes sítios. Os experimentos com variação de concentração de ácido húmico e de marcador de spin sugeriram que a estruturação de sítios hidrofóbicos internos, observados principalmente abaixo de pH 5, seja devida à agregação de várias estruturas húmicas menores. Embora tenha sido observada a existência de sítios hidrofóbicos no ácido fúlvico, este apresentou maior dificuldade de agregação em comparação ao ácido húmico, o que foi atribuído ao seu caráter mais hidrofílico. Dos experimentos de supressão de fluorescência, observou-se que a interação do pireno foi influenciada pelas características químicas dos ácidos húmicos extraídos de diferentes solos e sistemas de manejo. Os dados mostraram que quanto maior a aromaticidade do ácido húmico maior foi a interação, sugerindo que as interações estabelecidas ocorrem predominantemente por meio de forças de van der Waals. Não se obteve correlações significativas entre a porcentagem estimada de moléculas de marcadores de spin imobilizadas nos sítios hidrofóbicos internos com as características químicas dos ácidos húmicos. Este comportamento sugeriu que estes sítios podem estar mais associados à conformação estrutural do que à composição química dos ácidos húmicos. Também foi analisado o comportamento espectral do marcador de spin na presença de alguns componentes do solo (fração argila, solo tratado com ácido fluorídrico e ácido húmico). Pelos resultados não se observou imobilização do marcador de spin na fração argila (caulinita), diferentemente do que foi observado para o solo tratado com ácido fluorídrico e ácido húmico. As diferenças na imobilização dos marcadores de spin foram atribuídas aos diferentes teores de carbono de cada amostra.

ABSTRACT

Hydrophobic interactions can play an important role on the dynamics and reactivity of the apolar organic compounds in the environment as well as the organic carbon dynamic in the global system, and eventually contribute to mitigation of greenhouse effect. However, due to the chemical heterogeneity of humic substances and the low energy involved in the hydrophobic interactions experimental evidences are very difficult to be obtained. In this work, hydrophobic interactions in the humic substances and some soil components were evaluated through spin labeling, detected by electronic paramagnetic resonance, and fluorescence quenching. Using different spin labels (TEMPO, 5-SASL, 16-SASL and 5-MSSL), it was possible to observe that the interactions established with humic acids are mainly hydrophobic. The decrease of the values of the rotational diffusion rates, obtained from spectral simulation, from 10^9 s^{-1} in water to 10^6 s^{-1} in the presence of humic acid indicated that the spin label was strongly immobilized in the humic acid. The results from the analysis of spectral anisotropy of the spin label showed that conformational aspects of the humic acid are dependent on pH value and ionic strength. For pH around 7.5 and using ionic strength above 0.1 mol L^{-1} of sodium chloride was noticed an increase in the formation of inner hydrophobic sites. It was noticed that the formation of inner hydrophobic sites also was influenced by hydration time and humic acid concentration. Data obtained using different humic acids and spin label concentration suggested that the inner hydrophobic sites formation (mainly at pH below 5) is due to the aggregation of small humic structures. The existence of inner hydrophobic sites was noticed in the fulvic acid. However, the fulvic acid presented more difficulty to form aggregates, in comparison with humic acid, due to its major hydrophilic characteristic. From data obtained by fluorescence quenching it was observed that the interaction of pyrene was influenced by chemical composition of humic acid samples extracted from different soils and tillage systems. An increase of interaction in samples with higher aromaticity degree was shown, which indicates that the van der Waals forces are prevailing. No correlation between the estimated percentages of spin label molecules immobilized in the inner hydrophobic sites and the chemical characteristics of humic acid samples was obtained. This behavior suggested that the hydrophobic sites in the humic acid are mainly related to structural conformation instead of chemical composition. The mobility trend of spin label in the presence of soil components (clay fraction, fluoridric acid treated soil and humic acid) was also analyzed. No spin label immobilization was noticed in the clay fraction (kaolinite). On the other hand strongly immobilized spin label in the fluoridric acid treated soil and humic acid were observed. The differences in the immobilization were attributed to the carbon content.

INTRODUÇÃO

A matéria orgânica do solo (MOS), composta pela mistura de resíduos de animais e de vegetais em vários estágios de decomposição ou de transformações químicas, é um dos maiores reservatórios de carbono da Terra. É constituída principalmente por substâncias húmicas (SH), representando 2/3 do carbono orgânico (CO) do solo, sendo o restante representado pelas substâncias não húmicas (SnH). As SH são constituídas por ácidos húmicos (AH), ácidos fúlvicos (AF) e humina. Além de atuarem na estruturação e fertilidade do solo, podem influenciar na dinâmica e reatividade de compostos orgânicos antropogênicos (pesticidas, hidrocarbonetos poliaromáticos e outros) em sistemas aquáticos e terrestres e no controle biogeoquímico do CO no ambiente.

Com relação à influência das SH na dinâmica de compostos orgânicos, há vários possíveis mecanismos de interação: ligações covalentes, iônicas e de hidrogênio, transferência de carga e interações hidrofóbicas. Contudo, estes mecanismos de interação com as SH não são ainda totalmente entendidos. No caso das interações hidrofóbicas, elas têm sido associadas à existência de sítios hidrofóbicos nas SH. Contudo, a heterogeneidade química das SH e a baixa energia envolvida neste tipo de interação dificultam a obtenção de evidências experimentais e, conseqüentemente, dos fatores que a influenciam.

Além da função importante na dinâmica de compostos orgânicos apolares, há a possibilidade da influência das interações hidrofóbicas no seqüestro de CO no solo. Esta proposta foi baseada nas observações de que as interações hidrofóbicas entre as SH parecem ser a principal causa da bioresistência e o longo período de permanência destas substâncias no solo. Com isto, as interações hidrofóbicas poderiam se tornar

um mecanismo para reduzir a emissão de dióxido de carbono (CO_2) do solo, podendo contribuir para a mitigação do efeito estufa.

Apesar dos avanços da pesquisa na área de SH, ainda não existe um modelo explicando consistentemente a composição química, a estrutura, o tamanho, a reatividade e a conformação das SH, e os modelos existentes geram controvérsias e discussões. A maior dificuldade encontrada para a obtenção de um modelo é a heterogeneidade química das SH e a influência da conformação estrutural, atribuída à ocorrência de interações intermoleculares, como ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas.

OBJETIVOS

Em todas as questões discutidas na introdução, observa-se a possibilidade de influência das SH no estabelecimento de interações hidrofóbicas. Sendo assim, a obtenção de dados experimentais que forneçam informações sobre a ocorrência deste tipo de interação em SH é bastante relevante.

O objetivo principal deste trabalho foi realizar um estudo sobre a ocorrência de interações hidrofóbicas em SH e componentes do solo utilizando análises espectroscópicas.

Para alcançar tal objetivo, foi:

- utilizado diferentes marcadores de spin e a espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) para estudos de interações hidrofóbicas;
- analisada a influência de variáveis como concentração e hidratação do AH, pH e concentração iônica do meio na estruturação dos sítios hidrofóbicos;

- obtida mais informações sobre a influência da conformação estrutural na formação de sítios hidrofóbicos em SH;
- utilizada a supressão de fluorescência em estudos de interação entre um modelo de composto hidrofóbico (pireno) e as SH;
- analisada a formação de sítios hidrofóbicos em AF e em AH de diferentes origens e;
- observada a ocorrência de interações hidrofóbicas em amostras em condições mais próximas das normalmente encontradas no ambiente, incorporando alguns componentes das frações mineral e orgânica do solo.

APRESENTAÇÃO DOS CAPÍTULOS DA TESE

Visando melhor compreensão do trabalho, a presente tese foi dividida em 5 capítulos. No capítulo 1, está apresentada uma revisão da literatura, com informações básicas sobre a MOS e a importância das SH, um breve histórico dos avanços científicos na área de SH, incluindo os modelos estruturais existentes e seus princípios, e as possibilidades de influência das interações hidrofóbicas em questões ambientais. O capítulo 2, apresenta o fundamento teórico das técnicas/metodologias utilizadas nos estudos sobre interações hidrofóbicas. Posteriormente, são apresentados os capítulos com os resultados obtidos, os quais foram elaborados no formato de artigo (contendo uma breve introdução, materiais e métodos, resultados e discussões e conclusões). No capítulo 3, foi feita a descrição das amostras utilizadas e realizada a caracterização por meio de composição elementar e análises espectroscópicas (UV-visível, Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN)). No capítulo 4, foi realizado um estudo da

conformação estrutural dos AH por meio da metodologia de marcador de spin. Foi avaliada a influência de vários parâmetros (pH, tempo de hidratação, concentração iônica, tamanho molecular e concentração de AH) na estruturação de sítios hidrofóbicos. Foram realizadas simulações dos espectros de RPE de diferentes marcadores de spin e obtidas informações como, mobilidade e polaridade. No capítulo 5, foram correlacionadas as características químicas de diferentes AH, fornecidas por meio da composição elementar e análises espectroscópicas, com o coeficiente de interação fornecido pela supressão de fluorescência, utilizando como fluoróforo o pireno. As características químicas foram correlacionadas também com os sítios hidrofóbicos estimados pela metodologia de marcador de spin. Além disto, foi analisada a formação de sítios hidrofóbicos em diferentes componentes do solo, tais como, fração argila (composta por caulinita), amostra de solo contendo todos os constituintes orgânicos (AH, AF e humina), e um tipo de polissacarídeo e de lignina, possíveis precursores das SH. Foram avaliadas também, algumas possibilidades de aplicação da metodologia de marcador de spin em estudos ambientais. Finalmente, são apresentadas as conclusões gerais do trabalho e algumas propostas para trabalhos futuros.

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Matéria orgânica do solo

A formação da matéria orgânica do solo (MOS) ocorre devido à mistura de resíduos de animais e de vegetais em vários estágios de decomposição ou de transformações químicas (Schulten & Schnitzer, 1995). Desta definição fica evidente que a estrutura física e química da MOS é dinâmica, ou seja, está em constante transformação. Esta transformação resulta da ação simultânea de microrganismos na síntese de compostos, tais como, amônia, nitratos, dióxido de carbono e outros, produzidos pela quebra de compostos orgânicos mais complexos e das transformações químicas, cujas velocidades de reação dependem da temperatura, umidade e pH do solo.

A MOS é o terceiro maior reservatório de carbono do planeta (Stevenson, 1994) com aproximadamente $15,5 \times 10^{14}$ kg de carbono (Lal, 2004), perdendo para o oceânico (de difícil controle do homem) e o geológico (que contribui somente para a emissão de carbono). Segundo Tate e Theng (1980), Duxbury *et al.* (1989) e Sollins *et al.* (1996), a resistência da MOS à decomposição está mais relacionada à sua proteção física pela fração mineral do solo do que à complexidade química das moléculas orgânicas. A diferente estabilidade da MOS à ação de decomposição dos microrganismos pode ser determinada pela sua complexidade química intrínseca (estabilidade química) e pelo seu grau de associação com a fração mineral do solo (estabilidade física) (Ghosh, 1980; Oades *et al.*, 1989; Theng *et al.*, 1989). A estabilidade química intrínseca da MOS está relacionada com o grau de aromaticidade das moléculas orgânicas constituintes, sendo que quanto maior a

aromaticidade maior a sua resistência à decomposição (Stout *et al.*, 1985). A estabilização da MOS pela associação com a fração mineral do solo pode ser dividida em estabilidade estrutural e coloidal, de acordo com a origem da proteção. A estabilidade estrutural provém da formação de agregados organominerais e, estando a MOS localizada no interior destes agregados fica protegida da ação dos microrganismos. A estabilidade coloidal é resultante da formação de ligações coordenadas entre a MOS e os cátions metálicos e minerais do solo (Beare *et al.*, 1994a, b; Sollins *et al.*, 1996).

A MOS pode ser dividida em substâncias não húmicas (SnH) e húmicas (SH). As SnH representam aproximadamente 1/3 do carbono orgânico (CO) do solo e as SH representam cerca de 2/3 (Schnitzer, 1991). Do ponto de vista da estabilidade química, as SnH apresentam alta taxa de decomposição e curto período de permanência no solo (Theng *et al.*, 1989; Andriullo *et al.*, 1990). Sua principal função é o fornecimento de nutrientes às plantas, por meio de sua mineralização, e de energia e carbono aos microrganismos do solo (Oades, 1989). As SH apresentam menor taxa de decomposição e, conseqüentemente, maior período de permanência no solo (Theng *et al.*, 1989), sendo sua função principal atuar sobre as condições físicas e químicas do solo.

As SnH e SH também podem ser subdivididas de acordo com a sua composição química. As SnH compreendem substâncias cujas características químicas são bem definidas, tais como, carboidratos, peptídeos, aminoácidos, proteínas, elementos gordurosos, ácidos orgânicos de baixa massa molar etc. As SH são amorfas, escuras e com grande conteúdo de grupos orgânicos, tais como, carboxílicos, fenólicos, enólicos, alcoólicos, quinonas dentre outros. Possuem massa molar aparente que varia de centenas a milhares de unidade de massa atômica

(u.m.a.) e são bastante resistentes à degradação química e biológica (Schnitzer, 1978; Stevenson, 1994; Schulten & Schnitzer, 1995). De acordo com suas características de solubilidade em meio aquoso, as SH podem ser divididas em ácido fúlvico (AF), ácido húmico (AH) e humina. O AF é solúvel em qualquer pH, o AH é solúvel em meio alcalino e a humina é insolúvel em qualquer pH (Stevenson, 1994).

A formação das SH deve-se ao resultado de um processo evolutivo do ciclo do CO no solo, causado por sucessivos ataques microbianos à SnH, com posterior polimerização de produtos de decomposição e de síntese microbiana (Stevenson, 1994), que interagem fortemente com a fração mineral do solo (Wershaw, 1993). No entanto, segundo Stevenson (1994), os mecanismos pelos quais as SH são formadas são inúmeros, devido à grande quantidade de possíveis estruturas precursoras e ao enorme número de possibilidades de interação entre elas.

1.2 A importância das substâncias húmicas

As SH desempenham funções importantes no solo, atuando nas propriedades físicas, químicas e biológicas (Stevenson, 1994). A seguir são citadas algumas das características das SH e como elas atuam nas propriedades do solo:

a) Propriedades físicas

- alta capacidade de retenção de água, com importante função reguladora nos processos erosivos no solo;
- proporciona ao solo uma forma esponjosa, facilitando o desenvolvimento das raízes;

- a coloração escura possibilita a retenção de calor no solo, beneficiando a germinação de sementes;
- forma agregados com argilas, facilitando a aeração e estruturação do solo.

b) Propriedades químicas

- regula a capacidade de troca catiônica (CTC) no solo formando complexos com íons micronutrientes (Fe^{3+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} e outros cátions monovalentes e polivalentes), permitindo a migração dos mesmos e tornando-os biodisponíveis para as plantas;
- complexa com metais potencialmente tóxicos (Cd, Cr, Hg, Pb e outros), diminuindo a sua biodisponibilidade no solo.

c) Propriedades biológicas

- permite o desenvolvimento de microrganismos no solo que produzem substâncias que protegem as plantas de doenças;
- favorece o desenvolvimento de microrganismos, como bactérias fixadoras de nitrogênio, que fornecem nutrientes às plantas.

Além destas funções no solo, as SH têm função importante na dinâmica de compostos orgânicos antropogênicos ou xenobióticos (pesticidas, hidrocarbonetos poliaromáticos e outros) no ambiente (Schwarzenbach, 1992; Vieira *et al.*, 1999) e no controle biogeoquímico do CO no ecossistema global (Piccolo, 1996). Diferentes mecanismos de interação podem ocorrer entre os compostos orgânicos e as SH, no entanto, a natureza e a extensão destes mecanismos não são totalmente entendidas

(Gunasekara *et al.*, 2003). Esta dificuldade pode ser atribuída ao fato de que os mecanismos são dependentes das propriedades físicas e químicas das SH, das condições experimentais ou ambientais, das propriedades físicas e químicas dos compostos orgânicos e de suas respectivas concentrações (Senesi, 1992). As principais interações são através de ligações covalentes (Senesi, 1992), iônicas (Weber *et al.*, 1969; Senesi *et al.*, 1987), mecanismos de transferência de carga (Piccolo *et al.*, 1992; Senesi *et al.*, 1995; Sposito *et al.*, 1996; Perminova *et al.*, 1999; Zhu *et al.*, 2004) e ligações de hidrogênio (Traghetta, 1997; Martin-Neto *et al.*, 2001) e interações hidrofóbicas.

1.2.1 Interações hidrofóbicas

A forte tendência das moléculas de água em estabelecer ligações de hidrogênio influencia suas interações com moléculas apolares que são incapazes de estabelecer tais ligações. Dependendo das características da molécula apolar (tamanho e forma) é possível que as moléculas de água fiquem em torno dela, mantendo suas possibilidades de estabelecimento de ligações de hidrogênio (Figura 1.1). A exata natureza deste ordenamento das moléculas de água em torno de uma molécula apolar ainda não é claro, sendo este ordenamento muitas vezes referenciado como estruturas tipo clatrato (Frank & Evans, 1945; Israelachvili, 1991) e o fenômeno como efeito hidrofóbico ou hidratação hidrofóbica (Israelachvili, 1991; Widom *et al.*, 2003).

Figura 1.1 – Estrutura tipo clatrato (que em latim significa “gaiola”) formado pelas moléculas de água em torno de uma molécula apolar (Adaptado de Israelachvili, 1991).

A hidratação hidrofóbica é acompanhada por uma variação negativa na entalpia, devido em parte às múltiplas interações de van der Waals, e uma variação negativa na entropia devido ao aumento da ordenação do sistema. Estes fatores termodinâmicos se compensam, porém, o termo associado à entropia é maior e, por isto, geralmente, a energia livre é positiva, segundo a equação 1.1 (Atkins, 1998). O aumento da livre do sistema explica a baixa solubilidade de moléculas apolares em água.

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (1.1)$$

onde, G é a energia livre de Gibbs, H é a entalpia, T é a temperatura e a S a entropia.

As interações hidrofóbicas estão estreitamente relacionadas com o efeito hidrofóbico. Segundo Israelachvili (1991), não há ligações associadas a este tipo de interação, sendo um fenômeno principalmente entrópico — o sistema procura uma minimização da superfície entre as parte hidrofílicas e hidrofóbicas de forma a se obter um sistema menos ordenado possível — ocorrido em meio aquoso entre duas substâncias que possuem a hidrofobicidade como propriedade comum.

As SH também podem influenciar a dinâmica de compostos apolares por meio de interações hidrofóbicas (Wershaw, 1993; Martin-Neto *et al.*, 2001; Ferreira *et al.*, 2001; Simpson *et al.*, 2004). Entre os compostos orgânicos que podem interagir por meio deste tipo de interação, estão os pesticidas apolares (Schwarzenbach, 1992, Martin-Neto *et al.*, 2001) e os hidrocarbonetos poliaromáticos, que estão entre os mais tóxicos contaminantes ambientais (Perminova *et al.*, 1999), as quais apresentam toxicidade mesmo em baixas concentrações (Salloum *et al.*, 2002). No entanto, a heterogeneidade química das SH e a baixa energia envolvida neste tipo de interação dificultam a obtenção de evidências experimentais e, conseqüentemente, dos fatores que a influenciam. Um aspecto importante deste tipo de interação é a dependência do arranjo conformacional das SH (Sposito *et al.*, 1996; Piccolo *et al.*, 1998; Wandruszka, 1998; Martin-Neto *et al.*, 2001; Ferreira *et al.*, 2002).

1.3 Breve histórico dos avanços científicos na área de substâncias húmicas

A área da ciência do solo na qual se estuda a composição química e o modelo estrutural das SH, tem tido grandes avanços nas últimas décadas. Esta seção tem como objetivo fazer um breve levantamento em ordem cronológica destes avanços, sendo este apresentado na Tabela 1.1.

Tabela 1.1 – Breve histórico dos avanços científicos sobre a composição química e o modelo estrutural das substâncias húmicas*.

<i>Composição química</i>	<i>Modelo estrutural</i>
Maillard <i>et al.</i> (1916) sugerem que os AH resultam da interação entre açúcares reduzidos e aminoácidos ou aminas por meio de processos químicos.	
Fischer e Schrader (1921) propõem a teoria da lignina, na qual sugerem que a lignina é utilizada de forma incompleta pelos microrganismos, sendo o restante incorporado às SH.	
Fuchs (1931) propõe uma estrutura onde as SH são constituídas basicamente de anéis aromáticos substituídos por grupos hidroxilas e quinonas.	
Dragunov <i>et al.</i> (1948) propõem que os anéis aromáticos são ligados por grupos -CH ₂ - e -CN-.	
	Kononova (1961) introduz o conceito de sistema de polímeros para as SH.
	Visser (1964) propõe um modelo estrutural para as SH, supondo que estas seriam partículas globulares sólidas.
Flaig (1966) propõe a teoria do polifenol na qual as SH são formadas a partir da degradação aeróbica da lignina em monômeros fenólicos simples, os quais sofrem uma polimerização oxidativa.	
	Cameron <i>et al.</i> (1972a) propõem uma estrutura mais flexível e um formato elipsoidal com uma conformação polimérica espiralada aleatoriamente Schnitzer e Khan (1972) propõem o modelo polimérico macromolecular.
Buffle (1977) propõe um modelo onde as SH consistem de um grupo naftleno substituído por hidroxilas, carboxilas e cadeias alifáticas contendo grupos alcoólicos, metilas, carboxilas e carbonilas.	
Schnitzer (1978) propõe que as SH são compostas por grupos fenólicos e ácidos benzóicos.	Schnitzer (1978) sugere que os ácidos húmicos se mantêm agregados por ligações de H entre grupos fenólicos e ácidos benzóicos com espaços vazios de diversos tamanhos, podendo ser sítios de sorção para compostos orgânicos e inorgânicos com baixa massa molecular.

<i>Composição química</i>	<i>Modelo estrutural</i>
	Ghosh e Schnitzer (1980) propõem alterações da estrutura macromolecular variando do formato esférico ao filamentosos de acordo com as condições do meio.
	Wershaw (1986) propõe uma estrutura com conceitos de micelas com um interior hidrofóbico e superfície hidrofílica e a ideia de agregados mistos de moléculas anfifílicas interagindo por ligações de H e interações hidrofóbicas.
Schulten e Schnitzer (1993) verificam que as SH possuíam menos grupos aromáticos do que era proposto até então, contendo grandes porções alifáticas.	
	Piccolo <i>et al.</i> (1996a) mostram evidências que a estrutura macromolecular não pode ser totalmente polimérica dando origem à teoria supramolecular, que propõe que as SH resultam da associação de moléculas menores estabilizadas por forças fracas (ligações de H e interações hidrofóbicas).
Hu <i>et al.</i> (2000) detectam domínios cristalinos compostos de cadeias de polimetilenos relacionando-as com domínios hidrofóbicos nas SH.	
Mao <i>et al.</i> (2001) mostram que os carbonos ligados aos grupos metil (C-CH ₃) estão próximos de grupos alifáticos e de grupos O-álquil e não a grupos aromáticos. Com isto, 1/3 dos grupos aromáticos C-O não é fenólico (C-OH), mas sim ligado a um grupo metoxil (C-OCH ₃), como é típico da lignina.	
	Simpson (2002) apresenta evidências experimentais de que as SH são constituídas pela associação de moléculas menores, podendo coexistir moléculas com alta e baixa massa molecular, dependendo da origem e do método de extração.
	Diallo <i>et al.</i> (2003) não conseguem obter uma estrutura definitiva de um isômero em 3D para um AH de origem de solo, mas excluem os modelos que sugerem que as SH sejam macromoléculas com alta massa molecular ou a mistura de compostos orgânicos complexos e heterogêneos.

*Alguns trabalhos foram citados por Stevenson (1994), Schulten e Schnitzer (1997), Piccolo (2001) e Novotny (2002).

1.4 Modelos estruturais para as substâncias húmicas

Embora tenha havido avanços científicos, conforme mostrado na Tabela 1.1, ainda não existe um modelo estrutural para as SH explicando totalmente a composição química, a estrutura, a forma e o tamanho, sendo que os modelos existentes geram controvérsias e discussões (Clapp & Hayes, 1999; Burdon, 2001; Hayes & Clapp, 2001; MacCarthy, 2001; Piccolo, 2001).

A maior dificuldade encontrada na definição de um modelo para as SH é a heterogeneidade química, sendo que há uma variabilidade desta heterogeneidade de acordo com a origem (aquática ou terrestre) ou da localização geográfica. Um modelo consistente poderá prever de forma mais precisa o destino de compostos orgânicos antropogênicos no ambiente, além da compreensão de sua dinâmica. Além disto, poderá contribuir para o entendimento do sequestro de CO no solo e, avançar no conhecimento da dinâmica de formação e transformação das próprias SH. Atualmente dois modelos tentam explicar as características observadas para as SH, sendo eles:

Macromolecular: neste modelo as variações conformacionais das SH são similares às aquelas observadas nas macromoléculas biológicas, como proteínas, polissacarídeos, ácidos nucleicos e ligninas (Figura 1.2a) (Swift, 1989; 1999) e dependem da concentração das moléculas húmicas (Chen & Schnitzer, 1976), do pH (Senesi *et al*, 1996b) e da concentração iônica do meio (Ghosh & Schnitzer, 1980; Schnitzer, 1991). Além destas características, Schulten e Schnitzer (1995) propõem a existência de “vazios” de diferentes tamanhos, podendo ser hidrofóbicos ou hidrofílicos dentro das moléculas (Figura 1.2b). A existência de “vazios” foi corroborada pelo trabalho

de Wandruska (1998), que definiu a estrutura das SH como uma estrutura pseudo-micelar de natureza polimérica.

Figura 1.2 – Modelos conceituais propostos para a teoria macromolecular. (a) moléculas das substâncias húmicas aleatoriamente enoveladas (Swift, 1989). (b) ácido húmico proposto por Schulten e Schnitzer (1995). ● - carbono; ● - oxigênio; ○ - hidrogênio; ● - nitrogênio. As letras A, B e C indicam os espaços “vazios” na molécula capazes de interagir com outros compostos.

Supramolecular: neste modelo é proposto que as SH em solução formam agregados húmicos que são estabilizados por ligações fracas, tais como, ligações de hidrogênio e/ou interações hidrofóbicas. Além disto, é proposto que as SH são provenientes de produtos da degradação enzimática de plantas e complexos de ligninas (Wershaw, 1986; 1993). Este modelo foi embasado por Conte e Piccolo (1999) dando origem à teoria supramolecular (Piccolo, 2001; 2002), na qual as SH são formadas por moléculas pequenas e heterogêneas de várias origens, auto-organizadas em conformações supramoleculares, o que explicaria o grande tamanho molecular aparente das SH. No conceito supramolecular, os AF são associações de pequenas moléculas hidrofílicas dispersas em solução devido à repulsão eletrostática das

cargas negativas provenientes da dissociação dos grupos ácidos, como por exemplo, os carboxílicos, a qualquer valor de pH. Os AH são constituídos por associações de estruturas predominantemente hidrofóbicas (cadeias polimetilênicas $((CH_2)_n)$, ácidos graxos e esteróides), que são estabilizadas em pH neutro por forças dispersivas hidrofóbicas (van der Waals, $\pi - \pi$, e ligações CH- π), aumentando gradualmente seu tamanho com o decréscimo do pH até a sua precipitação. Segundo Piccolo (2001), a influência do pH ocorre por meio da protonação da molécula e conseqüente aumento das ligações de hidrogênio intermoleculares. O modelo supramolecular foi sustentado pelos resultados obtidos por Simpson (2002) e Simpson *et al.* (2002). Estes autores demonstraram que as SH extraídas de solos são formadas por uma mistura de substâncias agregadas de baixa massa molar (em torno de 2000 Da) e propuseram um modelo estrutural (Figura 1.3) para ilustrar como as principais estruturas identificadas nas SH poderiam formar um agregado na presença de cátions metálicos de ocorrência natural nos ecossistemas terrestres.

Figura 1.3 – Modelo estrutural das substâncias húmicas proposto por Simpson *et al.* (2002). As unidades vermelhas representam os cátions metálicos, as unidades pretas os polissacarídeos, as unidades azuis os polipeptídios, as unidades verdes as cadeias alifáticas e as unidades marrons os fragmentos aromáticos provenientes da lignina.

Diallo *et al.* (2003), utilizando dados experimentais e métodos computacionais, excluíram os modelos nos quais é sugerido que as SH sejam macromoléculas com alta massa molecular ou a mistura de compostos orgânicos complexos e heterogêneos e observaram que as estruturas existentes possuem as características necessárias para formar supramoléculas. Apesar dos importantes avanços, não conseguiram um modelo de isômero em três dimensões (3D) definitivo para um dado AH, sendo que apenas alguns isômeros prováveis foram propostos, os quais são mostrados na Figura 1.4.

Figura 1.4 – Modelos estruturais de isômeros para um dado ácido húmico de solo em 3D propostos por Diallo *et al.* (2003). Átomos de carbono estão em preto, átomos de oxigênio em vermelho, átomos de nitrogênio em azul, átomos de enxofre em amarelo e os átomos restantes são de hidrogênio.

Apesar dos inquestionáveis avanços promovidos pelo surgimento do modelo propondo que as SH sejam uma mistura de moléculas reativas e heterogêneas, ele ainda apresenta inúmeras limitações (Clapp & Hayes, 1999; Burdon, 2001; Hayes & Clapp, 2001; MacCarthy, 2001; Piccolo, 2001).

Logo, após mais de um século de pesquisa na área de SH, não se obteve um modelo que explique consistentemente todos os dados experimentais obtidos por diferentes técnicas, considerando tanto as frações químicas quanto físicas de solos de diferentes origens, e que contemple também a conformação estrutural. Neste sentido, trabalhos desenvolvendo metodologias de análise e/ou gerando resultados que contribuam para o desenvolvimento de um modelo consistente são de grande importância.

1.5 Efeito estufa e o seqüestro de carbono no solo

O efeito estufa é o termo utilizado para descrever o mecanismo que o planeta Terra tem para manter sua temperatura média em torno de 14 °C, e é importante salientar que este efeito é benéfico para o planeta. No entanto, considerando modelos matemáticos, o aumento do efeito estufa pode causar impactos ambientais catastróficos decorrentes do aumento da temperatura do planeta, conforme foi mostrado pelo relatório do IPCC¹.

A atmosfera terrestre é altamente transparente à luz solar, porém cerca de 35% da radiação incidente é refletida para o espaço, ficando os outros 65% retidos. Isto se deve principalmente à absorção dos raios infravermelhos pelos gases dióxido de carbono (CO₂), metano (CH₄), óxido nitroso (N₂O) e ozônio (O₃) presentes na

¹ Intergovernmental Panel on Climate Change 2001.

atmosfera, os quais totalizam menos de 1% da atmosfera. Na medida em que há um aumento da emissão destes gases para a atmosfera aumenta-se também a radiação retida e, conseqüentemente, o efeito estufa.

Tem ocorrido crescente aumento da emissão dos gases causadores do efeito estufa, sendo que somente os Estados Unidos da América aumentaram em quase 8 vezes a sua emissão de CO₂ para a atmosfera no último século (Figura 1.5). O aumento da emissão de CO₂ se deve à utilização de combustíveis fósseis (petróleo, gás e carvão), à destruição das florestas e também às práticas agrícolas. Segundo Schlesinger (1997), a emissão de CO₂ entre 1860 e 1980, devido à utilização de combustíveis fósseis, foi de 5×10^{15} g C/ano. Neste mesmo período, a atividade agrícola emitiu 8×10^{14} g C/ano, ou seja, a agricultura contribui de forma significativa para o aumento do efeito estufa.

Figura 1.5 – Emissão de dióxido de carbono (CO₂) pelos EUA durante o período de 1890 e 1998 (Adaptado de Palumbo *et al.*, 2004).

Práticas agrícolas, geralmente, leva ao esgotamento do reservatório de CO no solo devido a diversos fatores: i) desflorestamento e queima da biomassa no solo; ii) inadequado manuseio da fertilidade; iii) remoção de resíduos vegetais; e

iv) utilização do sistema de plantio convencional com excessivo uso de pesticidas e outros compostos químicos (Lal, 2002).

O seqüestro de carbono pelo solo ocorre quando o aporte de CO no solo é maior que a quantidade mineralizada que retorna à atmosfera sob a forma de CO₂. O principal mecanismo de seqüestro de CO no solo é por meio da formação de agregados organominerais e, quanto maior e mais estável for o agregado maior será o seqüestro de CO. O aumento da porção estável dos agregados e a localização do CO no solo são duas estratégias ou mecanismos utilizados no seqüestro de CO (Figura 1.6) (Lal & Kimble, 1997). Dentro destas estratégias, técnicas específicas para o aumento do seqüestro de CO incluem: i) o uso de cobertura vegetal e produção contínua com o objetivo de incrementar os agregados; ii) culturas rotativas e adubação balanceada para produção máxima de biomassa tanto na superfície quanto no perfil do solo; iii) permanência dos resíduos vegetais e sua incorporação ao solo; e iv) criação de mecanismos para o aumento da humificação destes resíduos (Lal, 1997).

Figura 1.6 – Diagrama dos mecanismos de seqüestro de carbono orgânico (CO) no solo (Adaptado de Lal & Kimble, 1997).

Segundo Piccolo *et al.* (1999), uma outra possibilidade de seqüestro de CO₂ no solo é via proteção hidrofóbica. Esta proposta foi baseada no fato de que as interações hidrofóbicas entre compostos hidrofóbicos parecem ser a principal causa da bioresistência das SH e o seu longo período de permanência no solo (Piccolo, 1996). E também nos trabalhos de Lichtfouse *et al.* (1995) e de Almendros *et al.* (1996) que mostraram que compostos hidrofóbicos, tais como, lignina e ácidos graxos, derivados de resíduos de plantas e atividades microbianas são incorporados nas frações da MOS mais estáveis. Com isto, Piccolo *et al.* (1999), Piccolo e Mbagwu (1999), Conte *et al.* (2001), Buurman *et al.* (2002), Spaccini *et al.* (2002) e Conte *et al.* (2004) propuseram que a aplicação no solo de SH com características hidrofóbicas poderia reduzir a mineralização da MOS pelo aumento do seqüestro do

CO nos domínios hidrofóbicos. Desta forma, a proteção hidrofóbica pode se tornar uma ferramenta para limitar a decomposição da MO lábil no solo e, conseqüentemente, reduzir a emissão de CO₂ e mitigar o efeito estufa (Piccolo *et al.*, 1999). No entanto, há necessidade de obtenção de mais informações sobre a ocorrência de interações hidrofóbicas nas SH. Um melhor entendimento destas interações pode contribuir nas avaliações de quão importante é a proteção hidrofóbica no mecanismo de seqüestro de CO no solo.

2 FUNDAMENTO TEÓRICO DAS TÉCNICAS E METODOLOGIAS UTILIZADAS

2.1 Espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica

O fenômeno de ressonância paramagnética eletrônica (RPE) somente pode ser observado quando a amostra investigada contiver átomos ou moléculas com pelo menos um elétron desemparelhado. Neste tipo de experimento a amostra é submetida a um campo magnético estático para que os elétrons dos átomos ou moléculas percam a degenerescência de spin e os níveis Zeeman eletrônicos sejam estabelecidos (Poole & Farach, 1987; Knowles *et al.*, 1976; Weil *et al.*, 1994).

Outras interações, além da Zeeman, podem ocorrer, isto porque o campo magnético em que uma determinada partícula pode estar submetida não é devido apenas ao campo externo H_0 , podendo dar origem a outros desdobramentos dos níveis de energia. Estes outros campos magnéticos, que se somam vetorialmente a H_0 , são decorrentes do movimento orbital dos elétrons e do momento magnético das partículas vizinhas. Estas interações são:

- interação dipolar – ocorre devido ao acoplamento entre os momentos magnéticos das partículas e é dependente da orientação (anisotropia) e da distância ($1/r^3$), não havendo a necessidade de contato entre as partículas;

- interação hiperfina (elétron desemparelhado interage com o spin nuclear do seu próprio núcleo) e super-hiperfina (elétron desemparelhado interage com o spin nuclear de núcleos vizinhos) – ocorrem devido ao acoplamento dos momentos

magnéticos dos elétrons via interação de contato (contato de Fermi), ou seja, estas interações ocorrem somente quando o elétron tem uma probabilidade finita de densidade no núcleo.

2.1.1 Metodologia de marcador de spin

Os primeiros trabalhos utilizando marcadores de spin foram os de Ohnishi e McConnell (1965) e Stone *et al.* (1965). Marcadores de spin são radicais livres estáveis, detectáveis por RPE (Knowles *et al.*, 1976; Weil *et al.*, 1994). Sendo geralmente utilizados como sondas em amostras biológicas (Costa-Filho *et al.*, 2003; Nascimento *et al.*, 2003; Citadini *et al.*, 2005), os mais utilizados são os marcadores de spin que contém o grupo nitróxido. Estes grupos são estáveis até cerca de 80 °C e no intervalo de pH entre 3,0 e 10,0 (Campbell e Dwek, 1984; Baffa, *et al.*, 1985).

Nos radicais nitróxidos o momento magnético do elétron não interage somente com o campo magnético externo mas também com o momento magnético nuclear do nitrogênio – interação hiperfina – dando origem a outros desdobramentos dos níveis de energia (Knowles *et al.*, 1976; Weil *et al.*, 1994).

Quando existe a interação hiperfina isotrópica a condição de ressonância se transforma em:

$$h\nu = g\beta H_0 + \frac{1}{2}a_0M_I \quad (2.1)$$

onde:

h é a constante de Planck

ν é a frequência aplicada perpendicularmente ao campo magnético H_0

g é o fator giromagnético do elétron

β é o magnéton de Bohr

a_0 é a constante de desdobramento hiperfino

M_I é o numero quântico do spin nuclear

A condição de ressonância é satisfeita para três valores do campo, originando um espectro com três linhas de ressonância. O fator g define a posição da linha central com relação ao campo e o desdobramento hiperfino a_0 pode ser representado no espectro como a distância entre duas linhas adjacentes.

A interação hiperfina depende, em parte, da densidade do elétron desemparelhado no átomo de nitrogênio. O elétron livre, localizado no orbital $2p\pi$ da ligação N-O (Figura 2.1) interage com o spin nuclear do nitrogênio ($I = 1$), por isto cada nível resulta em três devido aos três valores permitidos do número quântico de spin nuclear ($M_I = -1, 0, +1$), obedecendo a regra de quantização, onde o número de linhas é igual a $|2I + 1|$ (Knowles, 1976; Campbell e Dwek, 1984; Weil *et al.*, 1994). Desta forma, o espectro resultante possui três linhas hiperfinas, conforme mostrado na Figura 2.2.

Figura 2.1 – Representação do orbital $2p\pi$ da ligação N-O do grupo nitróxido do marcador de spin (Adaptado de Wrigglesworth, 1983).

Figura 2.2 – Níveis de Zeeman do radical nitróxido ($S = 1/2$ e $I = 1$) e ilustração das linhas de ressonância (Knowles *et al.*, 1976).

Uma característica importante da metodologia de marcador de spin é a anisotropia espectral (Campbell & Dwek, 1984), ou seja, a posição e a separação das três linhas hiperfinas é dependente da orientação do eixo molecular do grupo

nitróxido em relação ao campo magnético. Sendo assim, a anisotropia espectral está associada à mobilidade do marcador de spin que apresenta grande sensibilidade ao ambiente no qual se encontra, podendo fornecer informações sobre a viscosidade ou indicando a ocorrência de interações neste ambiente. A Figura 2.3 apresenta os espectros obtidos paralelamente aos eixos x , y e z em relação ao campo magnético.

Figura 2.3 – Espectros de RPE do marcador de spin contendo o grupo nitróxido paralelo aos eixos x , y e z em relação ao campo magnético (H_0) (Adaptado de Campbell & Dwek, 1984).

Na Figura 2.4, cada espectro mostrado é a soma de todos os espectros em todas as orientações intermediárias entre cada eixo (Figura 2.3).

Figura 2.4 – Anisotropia dos espectros de RPE do marcador de spin contendo o grupo nitróxido sob várias condições de movimento. a) espectro isotrópico: movimento aleatório em solução não viscosa (“marcador livre”); b) movimento anisotrópico (“marcador moderadamente imobilizado”) em uma orientação aleatória em meio viscoso; c) espectro similar à amostra policristalina com movimento aleatoriamente orientado e rígido em uma solução congelada (“marcador fortemente imobilizado”) (Knowles *et al.*, 1976; Campbell & Dwek, 1984; Ferreira, 2002).

Quando o marcador de spin encontra-se em uma solução não viscosa, o movimento molecular é aleatório e rápido o suficiente para cancelar o efeito anisotrópico (“marcador livre”) (Figura 2.4a), dando origem a constante de separação hiperfina isotrópica (a_0), que é a média de todas as constantes hiperfinas na direção x , y e z ($a_0 = 1/3(A_{xx} + A_{yy} + A_{zz})$). No entanto, quando o marcador de spin tem seu movimento axial limitado (solução viscosa), há uma parcial média destas separações hiperfinas, podendo-se medir as constantes de separação hiperfinas na direção x , y e z (Figura 2.4b). Como o grupo nitróxido apresenta uma simetria axial, as constantes hiperfinas na direção x e y são coincidentes, portanto obtém-se $A_{xx} = A_{yy} = A_{\perp}$ e $A_{zz} = A_{\parallel}$. Quando o marcador de spin está fortemente imobilizado, o seu espectro é semelhante ao de amostras policristalinas, sendo possível apenas obter diretamente no espectro o valor da constante hiperfina $A_{\parallel}$, pois a constante hiperfina $A_{\perp}$ é incomensurável devido ao alargamento espectral ocasionado pela sobreposição de linhas na região central do espectro (Figura 2.4c) (Knowles, 1976; Campbell e Dwek, 1984).

A mobilidade do marcador de spin pode ser quantificada em termos do tempo de correlação rotacional (τ_c), o qual é definido como o tempo de reorientação do principal componente de movimento do marcador de spin. Para este parâmetro a região de movimento rápido tem $\tau_c < 10^{-9}$ s, a região de movimento intermediário 10^{-9} s $< \tau_c < 10^{-7}$ s, e de movimento lento $\tau_c > 10^{-7}$ s, sendo que, τ_c pode ser calculado por meio da seguinte equação (Knowles *et al.*, 1976; Campbell e Dwek, 1984):

$$\tau_c = KW_0 \left[\left(\frac{h_0}{h_{-1}} \right)^{1/2} - 1 \right] \quad (2.2)$$

onde, W_0 é a largura de linha; $K = 6,5 \times 10^{-10}$; e h_0 e h_{-1} são as alturas das linhas do meio campo e do campo alto, respectivamente (Figura 2.5).

Figura 2.5 – Espectro de RPE mostrando os parâmetros utilizados na determinação do tempo de correlação rotacional (τ_c) do marcador de spin contendo o grupo nitróxido.

A anisotropia da constante de separação hiperfina é uma consequência da particular simetria da distribuição de carga em uma molécula. Moléculas paramagnéticas isoladas, como o marcador de spin com o grupo nitróxido, têm sua distribuição de carga distorcida pela polaridade do meio. A constante de separação isotrópica a_0 é um indicativo da polaridade relativa do meio, sendo esse valor obtido pela obtenção dos valores de a_0 do marcador de spin em ambientes com diferentes polaridades. Assim, a_0 é maior em ambientes muito polares e decresce em um ambiente menos polar, como exemplo no hexano. Os diferentes valores de a_0 são devidos à interação hiperfina que depende em parte da probabilidade do elétron desemparelhado estar sobre o átomo de nitrogênio (Figura 2.6).

Figura 2.6 – Estrutura eletrônica do radical nitróxido. (a) meio com menor polaridade e (b) meio com maior polaridade (Campbell & Dwek, 1984).

Considerando a estrutura eletrônica do radical nitróxido representado pelas duas formas, quanto maior a polaridade do meio mais a estrutura (b) é favorecida devido à possibilidade de ligação de hidrogênio. Esta estrutura aumenta a densidade de elétron no átomo de nitrogênio resultando em maiores valores de a_0 . Por outro lado, quando a ligação de hidrogênio é menos provável, assim como em meio não polar, o elétron livre permanece próximo do átomo de oxigênio ($I = 0$) (estrutura a), decrescendo a interação com o spin nuclear do átomo de nitrogênio (Knowles *et al.*, 1976; Campbell e Dwek, 1984).

2.2 Espectroscopia de fluorescência de luz UV-visível

Substâncias luminescentes apresentam espectros eletrônicos que são caracterizados pela energia de transição entre o estado não excitado (fundamental) e excitado da molécula. A transição de um estado fundamental para um estado excitado corresponde ao espectro de absorção e a transição na direção oposta corresponde ao espectro de emissão (luminescência) (Campbell & Dwek, 1984; Krasovitskii & Bolotin, 1987).

A absorção de energia por moléculas orgânicas na região do ultravioleta produz mudanças em sua energia eletrônica resultantes da transição dos elétrons de valência. A relação entre a energia absorvida em uma transição eletrônica (ΔE) e a frequência (ν) da radiação eletromagnética é dada por $\Delta E = h\nu$, onde h é a constante

de Plank. A energia absorvida é dependente da diferença de energia entre o estado fundamental e o estado excitado. Quanto menor a diferença de energia maior o comprimento de onda de absorção (Atkins, 1998).

Quando ocorre a absorção de energia e, caso não seja suficiente para ionizar ou dissociar a molécula, esta permanecerá no estado excitado por um determinado tempo chamado de tempo de vida do estado excitado e, para retornar ao estado fundamental a energia absorvida deve ser dissipada. Isto normalmente ocorre por decaimentos não radiativos em que o excesso de energia é transferido na forma de vibrações, rotações e translações (Atkins, 1998). Porém, quando a dissipação de energia pela molécula é feita pela emissão de um fóton tem-se um decaimento radiativo que é a fotoluminescência.

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 eV, logo, os fótons absorvidos ou emitidos quando tais alterações ocorrem estão nas regiões do visível e ultravioleta do espectro eletromagnético (Atkins, 1998).

No estado fundamental, em muitas moléculas, os elétrons ocupando o mesmo orbital possuem spins antiparalelos. O spin resultante S é zero, enquanto que o nível de multiplicidade, dado pela quantidade $|2S + 1|$, é igual a unidade. Tal estado de energia é referido como singleto (S). Se a transição para um estado excitado é acompanhada pelo reverso do spin de um dos elétrons, o spin total tornará unitário e a multiplicidade será três. Tal estado excitado é conhecido como estado tripleto (T). Se a absorção de um quantum de luz não traz nenhuma mudança na multiplicidade, o estado excitado correspondente será o estado singleto S_1 . Caso o primeiro estado

eletrônico excitado tiver a mesma multiplicidade de spin do estado eletrônico fundamental, a emissão será denominada fluorescência, caso contrário a emissão será denominada fosforescência.

A transição singleto-singlete ($S_0 \rightarrow S_1$) associado com a absorção de um “*quantum*” de luz pode resultar de uma transferência da valência de elétrons π de uma molécula para o orbital antiligante π^* (transição $S_0 \rightarrow S_{\pi-\pi^*}$) ou da transferência do mesmo orbital de n-elétrons de um heteroátomo, se um heteroátomo está presente (transição $S_0 \rightarrow S_{n\pi^*}$). Uma transição do tipo $S_0 \rightarrow S_{n\pi^*}$ é possível caso a molécula contenha C=C, -N=N-, C=N, -NO₂, e outros grupos.

Em uma molécula pode haver uma transição tanto de um estado excitado S_1 para estado fundamental S_0 , tendo emitido um “*quantum*” de luz, ou para o nível tripleto T_1 , tendo sofrido “intersystem crossing” (transição entre estados com diferentes multiplicidades) (Figura 2.7). Desde que o tempo de vida de uma molécula excitada no estado T_1 seja muito maior do que no estado S_1 , a probabilidade da perda de energia não radioativa (“intersystem crossing” e conversão interna relaxação rotacional-vibracional) é muito maior no estado T_1 . Com relação às escalas temporais tem-se que: $S_1 \rightarrow S_0$ (fluorescência) é de 10^{-9} s e $T_1 \rightarrow S_0$ (fosforescência) é de $10^{-7} - 10^{-5}$ s.

Figura 2.7 – Níveis de energia eletrônicos e vibracionais em uma molécula poliatômica, e caminhos de transições radioativas (absorção, fluorescência, fosforescência) e não-radioativas (conversão interna e “intersystem crossing”) (Krasovitskii & Bolotin, 1987).

A análise do diagrama apresentado na Figura 2.7 mostra que a energia de emissão é tipicamente menor que a de absorção, o que é conhecido como deslocamento de Stokes (Lakowicz, 1999).

2.2.1 Supressão da fluorescência

O processo de supressão é qualquer processo que diminua a intensidade da fluorescência. Em geral, há três tipos de processo de supressão: dinâmica, estática e aparente (Lakowicz, 1999). Na dinâmica ocorrem colisões entre o supressor e o fluoróforo, estando este último no estado excitado e retornando ao estado fundamental em um processo não radiativo (Figura 2.8), sendo esta supressão descrita pela equação de Stern-Volmer (Campbell & Dwek, 1984; Lakowicz, 1999).

Figura 2.8 – Diagrama do processo de supressão dinâmica. $f(t)$ é a função da excitação; $\gamma = \tau_0^{-1}$ é a taxa de decaimento do fluoróforo na ausência do supressor k_s é a constante de supressão bimolecular e $[S]$ é a concentração do supressor.

A equação de Stern-Volmer pode ser obtida considerando as intensidades da fluorescência na ausência e presença do supressor. A intensidade da fluorescência para um dado fluoróforo é proporcional à sua concentração no estado excitado $[Fluo^*]$, sendo que sob constante incidência de luz, uma constante população do estado excitado é estabelecida, portanto, $d[Fluo^*]/dt=0$. Na ausência do supressor, esta equação diferencial é descrita por:

$$\frac{d[Fluo^*]}{dt} = f(t) - \gamma[Fluo^*]_0 = 0 \quad (2.3)$$

sendo $\gamma = (\Gamma + k_{nr})$, onde Γ é o decaimento radioativo e k_{nr} o não radioativo. Na presença do supressor a equação diferencial é descrita por:

$$\frac{d[Fluo^*]}{dt} = f(t) - (\gamma + k_s[S])[Fluo^*] = 0 \quad (2.4)$$

Note que com a presença do supressor há uma taxa de decaimento adicional, $k_s[S]$. Com contínua excitação a população no estado excitado é constante e as derivadas das equações 2.3 e 2.4 são eliminadas. Após isto, dividindo a equação 2.4 pela 2.3, tem-se:

$$\frac{f(t) - \gamma[Fluo^*]_0}{f(t) - (\gamma + k_s[S])[Fluo^*]} = 1 \quad (2.5)$$

Rearranjo a equação 2.5, tem-se:

$$\frac{F_0}{F} = \frac{\gamma + k_s[S]}{\gamma} = 1 + k_s\tau_0[S] = 1 + K_D[S] \quad (2.6)$$

que é a equação de Stern-Volmer. Nesta equação, F_0 e F são as intensidades da fluorescência na ausência e presença do supressor, respectivamente, e $k_s \tau_0 = K_D$.

Na supressão estática é formado um complexo não fluorescente entre o fluoróforo e o supressor, sendo que este complexo absorve a luz incidente retornando ao estado fundamental sem emissão de luz, portanto não requerendo difusões ou colisões moleculares (Figura 2.9).

Figura 2.9 – Diagrama do processo de supressão estática.

A associação entre o fluoróforo e o supressor pode ser representada pela seguinte equação:

onde, $[Fluo]$ é a concentração do fluoróforo não complexado, $[Fluo-S]$ é a concentração do complexo formado entre eles e K_E é a constante de interação. Se o complexo formado é totalmente não fluorescente, então a fração total de fluoróforo, $[Fluo]_0$, é dada por:

$$[Fluo]_0 = [Fluo] + [Fluo - S] \quad (2.8)$$

Substituindo em 2.7, tem-se:

$$K_E = \frac{[Fluo]_0 - [Fluo]}{[Fluo][S]} = \frac{[Fluo]_0}{[Fluo][S]} - \frac{1}{[S]} \quad (2.9)$$

Rearranjando a equação 2.9 e substituindo a concentração de fluoróforo pelas intensidades de fluorescência, tem-se:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_E [S] \quad (2.10)$$

Nota-se nesta equação que a dependência entre F_0 / F e $[S]$ é linear e é idêntica à observada para a supressão dinâmica (equação 2.6), exceto pelo fato de que aqui a constante de supressão é de interação.

A supressão aparente não é um processo de supressão como os anteriores, mas sim devido à atenuação da luz incidente e/ou absorção da luz emitida pelo excesso de fluoróforo e/ou pela absorção de luz incidente ou emitida do fluoróforo pelo supressor (Gauthier *et al.*, 1986; Spark & Swift, 1994; Lakowicz, 1999).

Com relação aos processos de supressão, há várias formas de se determinar se é dinâmico ou estático: i) observação da magnitude de k_s e do decréscimo na intensidade, sendo que muitas vezes não se pode atribuir este decréscimo a uma supressão dinâmica; ii) observação cuidadosa do espectro de absorção do fluoróforo, pois a supressão dinâmica afeta somente o estado excitado do mesmo e com isto, não se espera alterações no espectro de absorção; iii) por meio de experimentos com variação de temperatura, pois a supressão dinâmica depende da taxa de difusão, e desde que, em temperaturas mais altas há maiores coeficientes de difusão, espera-se um aumento da constante bimolecular e, além disto, altas temperaturas podem resultar na dissociação de complexos fracamente ligados e; iv) determinação do tempo de vida τ_0 , sendo que para a supressão estática não há alteração neste parâmetro, diferentemente da dinâmica, sendo este método o mais preciso para a determinação do tipo de processo de supressão (Lakowicz, 1999; Backhus *et al.*, 2003).

A utilização da supressão de fluorescência para determinação de K_E baseia-se na característica do fluoróforo emitir fluorescência somente quando não há formação de complexo não fluorescente. Como consequência disto, a fração de fluoróforo que interagiu com o supressor pode ser determinada diretamente pela observação da diminuição da intensidade da fluorescência (Gauthier *et al.*, 1986) (equação 2.10). Para obtenção de K_E , basta graficar F_0/F vs $[S]$, sendo que deste gráfico a inclinação da reta é K_E (Figura 2.10). Nos estudos onde o supressor são as SH tem sido mostrado que a supressão é predominantemente estática (Schlautman & Morgan, 1993; Backhus *et al.*, 2003). Nestas situações $[S]$ é concentração de SH e, normalmente, encontra-se K_{CO} , que é K_E dividido pela porcentagem de carbono orgânico (CO) na unidade de massa de $[S]$ utilizada, o que é definido como o coeficiente de interação (Gauthier *et al.*, 1986).

Figura 2.10 – Gráfico da equação de Stern-Volmer. F_0/F é razão entre as intensidades de fluorescência na ausência e presença, respectivamente, do supressor S , e K_E é a constante de interação entre o fluoróforo e o supressor.

3 EXTRAÇÃO, FRACIONAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS ÁCIDOS HÚMICOS

3.1 INTRODUÇÃO

Em solos minerais, os constituintes orgânicos – ácido húmico (AH), ácido fúlvico (AF) e humina – estão fortemente associados entre si e com a fração mineral do solo, sendo geralmente necessário realizar um procedimento de extração e fracionamento químico, quando são utilizadas análises espectroscópicas para caracterização (Dai & Johnson, 1999; Bayer *et al.*, 2000). O procedimento comumente utilizado para extração das substâncias húmicas (SH) é o sugerido pela IHSS (International Humic Substances Society) (Stevenson, 1994). Este método tem se mostrado aplicável a muitos tipos de solos pois não requer grandes aparatos experimentais, podendo ser utilizado como um método padrão para comparações (Swift, 1996).

Inúmeras técnicas analíticas têm sido utilizadas na caracterização das SH (Stevenson, 1994), dentre elas estão as espectroscopias de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) (Martin-Neto *et al.*, 1998; Olk *et al.*, 2000; Rosa *et al.*, 2005), de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) (Preston, 1996; Perez *et al.*, 2004) e de Absorção de UV-visível (Piccolo *et al.*, 2002; Baker & Spencer, 2004) e análise elementar (Chefetz *et al.*, 2000; Simpson *et al.*, 2003).

O objetivo deste capítulo é descrever as amostras e caracterizá-las por meio da análise elementar, UV-visível, RPE e RMN. O embasamento teórico destas técnicas não será apresentado por existirem bons materiais didáticos referentes aos correlatos assuntos e suas aplicações em estudos sobre SH – UV-visível (Cantor &

Schimmel, 1980; Steveson, 1994; Atkins, 1998), RPE (Poole & Farach, 1987; Knowles *et al.*, 1976; Senesi, 1992; Weil *et al.*, 1994) e RMN (Knowles, 1976; Mehring, 1983; Wilson, 1987; 1990; Preston, 1996).

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1 Os solos utilizados

Os AH foram extraídos de dois tipos de solos brasileiros, um Oxisol e um Podzólico Vermelho Escuro, sendo as mineralogias destes solos apresentadas na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 – Tipos de solos e suas respectivas características granulométricas.

Solo	Argila (g kg ⁻¹)	Silte (g kg ⁻¹)	Areia (g kg ⁻¹)
Oxisol	553	307	140
Podzólico Vermelho Escuro	220	240	540

O solo Oxisol foi coletado no campo experimental do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), localizado em Ribeirão Preto/SP. O solo Podzólico Vermelho Escuro foi coletado no campo experimental da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), localizado em Eldorado do Sul/RS. Em ambos os campos experimentais as amostras foram coletadas em diferentes profundidades, sistemas e anos de manejo e sistemas de rotação de cultura, conforme mostrado na Tabela 3.2.

Tabela 3.2 – Tipos de solos, incluindo suas respectivas profundidades de coleta, sistemas de manejo, período sob cada tipo de manejo e sistema de rotação de cultura.

Tipo de solo	*Abreviatura	Prof. (cm)	Sistema de manejo	Anos de manejo	Rotação de cultura
Oxisol	PD1	0-10	direto	3	cana de açúcar
Oxisol	PD2	10-20	direto	3	cana de açúcar
Oxisol	CM3	0-10	mínimo	3	cana de açúcar
Podzólico Verm. Esc.	PC4	0-5	convencional	9	aveia+leguminosa/ milho+caupi
Podzólico Verm. Esc.	PD5	0-5	direto	9	aveia+leguminosa/ milho+caupi

* PD, PC e CM são abreviaturas de plantio direto, convencional e cultivo mínimo, respectivamente.

Na Tabela 3.2 há uma coluna denominada abreviatura, cuja finalidade é definir como as amostras serão referidas no decorrer do trabalho. Foi utilizada também a mesma nomenclatura para os AH extraídos de cada tipo de solo.

3.2.2 Extração e fracionamento das substâncias húmicas

O procedimento de extração (Stevenson, 1994) foi realizado no Laboratório de Preparação de Amostras da Embrapa Instrumentação Agropecuária, São Carlos/SP. O diagrama simplificado do procedimento utilizado está apresentado na Figura 3.1.

Figura 3.1 – Diagrama simplificado do procedimento de extração de substâncias húmicas sugerido pela IHSS (Adaptado de Stevenson, 1994).

Na diálise foram utilizadas membranas da marca Spectrapor com tamanho molecular de 6000 a 8000 Da, e ativadas segundo o procedimento descrito por McPhie (1971). A diálise foi realizada até ser obtido teste negativo da presença de Cl^- feito pela adição de AgNO_3 .

3.2.3 Caracterização das amostras de ácidos húmicos

3.2.3.1 Análise elementar

As análises elementares foram realizadas para obtenção das porcentagens de carbono (C), hidrogênio (H), nitrogênio (N) e enxofre (S) das amostras secas utilizando o equipamento marca Carlo Erba, pertencente à Universidade Federal de São Carlos/SP. As análises foram realizadas em duplicata e a determinação da porcentagem de oxigênio (O) foi obtida pela diferença: $O \% = 100 - \%(C+N+H+S)$, descontando o teor de cinza de cada amostra.

3.2.3.2 Espectroscopia de UV-visível

Para a obtenção dos espectros de absorção eletrônica foram dissolvidos 20 mg de AH em 1 L de solução aquosa de bicarbonato de sódio (NaHCO_3) $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (Chen *et al.*, 1977). Foi utilizado o equipamento marca Shimadzu modelo UV-1601-PC, pertencente ao Laboratório de Espectroscopia da Embrapa Instrumentação Agropecuária, São Carlos/SP. As análises foram realizadas em duplicata para a obtenção do desvio médio, com varredura de 800 nm a 200 nm.

3.2.3.3 Espectroscopia de RPE

Os espectros de RPE foram adquiridos utilizando o espectrômetro marca Bruker modelo EMX, operando em banda X (9 GHz), à temperatura ambiente, pertencente à Embrapa Instrumentação Agropecuária, São Carlos/SP. Para a análise

quantitativa, tubos de quartzo foram preenchidos com as amostras secas anotando-se as respectivas massas para posterior normalização dos dados. Para a obtenção das áreas dos sinais foi utilizada a aproximação $I \times (\Delta H_{PP})^2$ (Poole, 1967), onde I é a intensidade do sinal e ΔH_{PP} é a largura de linha do sinal tomada pico a pico. Para determinação da concentração de spins utilizou-se o método do padrão secundário (Singer, 1959) com um cristal de rubi sintético 0,5% Cr^{3+} em uma estrutura cristalina de Al_2O_3 e comparou-se a área dos sinais das amostras de SH com a de um padrão ("strong pitch", obtido da Bruker) com concentração de spins conhecida (Weil *et al.*, 1994). Os parâmetros experimentais foram: 0,2 mW para a potência das microondas (determinada por experimento de saturação de potência); 100 kHz para frequência de modulação; 0,1 mT para amplitude de modulação; 2,56 ms para constante de tempo; e 10,24 ms para tempo de conversão. As análises foram realizadas em duplicata para a obtenção do desvio médio com, no mínimo, 4 varreduras por determinação.

3.2.3.4 Espectroscopia de ^{13}C RMN no estado sólido

A técnica utilizada foi a VACP-MAS (do inglês, "Variable Amplitude Cross Polarization Magic Angle Spinning") (Peersen *et al.*, 1993). Foi utilizado o espectrômetro marca Varian modelo Unity INova 400, pertencente à Embrapa Instrumentação Agropecuária, São Carlos/SP. Para a obtenção dos espectros foi verificada a homogeneidade do campo magnético, verificado o campo central para o sinal do ^1H (ajuste "offset"), determinada a largura de pulso de 90° para o canal do ^1H e do ^{13}C , otimizada a condição de Hartmann-Hahn, determinada a potência do desacoplador e ajustado o ângulo mágico. As amostras foram colocadas em rotor de zirconia de 5 mm com tampas de Kel-F. A rotação em torno do "ângulo mágico" foi

de aproximadamente 7 kHz. Os parâmetros experimentais foram: tempo de contato de 1 ms e tempo de repetição de 0,5 s. Os espectros foram divididos de acordo com o deslocamento químico (em ppm) de cada grupo funcional (Knicker *et al.*, 1996). Como referência do deslocamento químico dos espectros foi utilizado o hexametilbenzeno (HMB). As atribuições de cada agrupamento químico e sua respectiva posição no espectro estão apresentadas na Tabela 3.3.

Tabela 3.3 – Atribuições dos deslocamentos químicos nos espectros de ^{13}C VACP-MAS RMN (Knicker *et al.*, 1996).

Deslocamento químico (ppm)	Agrupamento químico	Abreviação
0 – 45	Metil e metilenos, C terciário e quaternário	<i>alquil C</i>
45 – 90	O/N-alquil, C de amino ácidos, C terciário e quaternário	<i>O-alquil C</i>
90 – 110	Aromáticos e olefinas (C/H substituído), C anomérico de carboidratos	<i>di-O-alquil C</i>
110 – 140	Aromáticos	<i>Arom C</i>
140 – 160	Fenólicos	<i>O-Arom C</i>
160 – 185	Carboxílico	<i>COO</i>
185 – 230	Carbonil	<i>CO</i>

Posteriormente, cada região foi integrada para a obtenção das áreas dos respectivos agrupamentos químicos. A partir das áreas das regiões, foram calculadas a aromaticidade (f_a) e a polaridade (P), de acordo com as seguintes razões:

$$f_a = \frac{((AromC) + (O - Arom))}{0 - 230 \text{ ppm}} \quad (3.1)$$

$$P = \frac{((O - \text{alquilC}) + (di - O - \text{alquilC}) + (O - AromC) + (COO) + (CO))}{((AromC) + (\text{alquilC}))} \quad (3.2)$$

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Caracterização das amostras de ácido húmico

3.3.1.1 Análise elementar

Os valores obtidos com a análise elementar, assim como as razões atômicas H/C e O/C, estão apresentados na Tabela 3.4.

Tabela 3.4 – Composição elementar e as razões atômicas O/C e H/C dos ácidos húmicos.

Amostra	% C ^a	% H ^a	% N ^a	% S ^a	% O ^b	O/C	H/C
PD1	49,74	4,27	5,48	0,74	36,87	0,56	1,03
PD2	51,08	4,41	5,24	0,87	35,80	0,53	1,04
CM3	50,89	4,57	5,64	0,83	35,57	0,52	1,08
PC4	48,09	4,91	4,25	0,76	36,29	0,57	1,23
PD5	44,52	4,91	3,91	0,70	40,16	0,68	1,32
ST6 ^c	58,13	3,68	4,14	0,44	32,73	0,44	0,76

^a Desvio médio < 0,1%. ^b Valores obtidos pela diferença (%O=100-(C+H+N+S)) e considerado o teor de cinza. ^c Amostra referência de AH de solo de clima temperado (cód. 1S102H) adquirida da IHSS.

Os valores fornecidos pela análise elementar estão próximos daqueles encontrados na literatura (Stevenson, 1994, Simpson *et al.*, 2003). A partir destes valores pôde-se calcular a razões atômicas O/C e H/C. A razão O/C é uma estimativa da quantidade de grupos funcionais contendo oxigênio, indicando a quantidade de grupos polares como os carboxílicos (COOH). Quanto maior esta razão maior a

quantidade destes grupos químicos (Rice & MacCarthy, 1991). Desta forma, a partir da razão O/C pode-se ter uma estimativa indireta da polaridade. A razão H/C tem sido utilizada como uma estimativa indireta de ligações químicas do tipo HC=CH em SH (Gauthier *et al.*, 1987) e, conseqüentemente, da aromaticidade. Quanto menor a razão H/C maior a aromaticidade (Bravard & Righi, 1991). A Figura 3.2 ilustra o processo de condensação aromática influenciando na razão atômica H/C.

Figura 3.2 – Ilustração do processo de condensação aromática influenciando na razão atômica H/C.

A razão O/C variou de 0,44 a 0,68, valores estes referentes às amostras ST6 e PD5, respectivamente, resultando em uma variação de aproximadamente 54%. A razão H/C variou de 0,76 a 1,32, sendo estes valores referentes às amostras ST6 e PD5, respectivamente, resultando em uma variação de aproximadamente 73%. Apesar desta variação significativa entre estas amostras os valores estão compreendidos ou próximos dos reportados na literatura (0,21 a 0,52 para a razão O/C e 0,80 a 1,37 para a razão H/C) (Stevenson, 1994, Kopinke *et al.*, 2001). Dos

valores obtidos observa-se que a variação foi significativamente menor quando comparados AH extraídos do mesmo tipo de solo. Comparando-se apenas os AH extraídos dos solos brasileiros (PD1, PD2, CM3, PC4 e PD5) constata-se que aquelas extraídas do Podzólico Vermelho Escuro (PC4 e PD5) apresentaram maior polaridade e menor aromaticidade.

3.3.1.2 Espectroscopia de UV-visível

A espectroscopia de UV-visível tem sido utilizada em estudos sobre SH (Hur & Schlautman, 2003) para a obtenção da razão E_4/E_6 , definida como a razão da absorbância em 465 nm pela 665 nm (da Silva *et al.*, 1997; Christl *et al.*, 2000). A Figura 3.3 apresenta o espectro de UV-visível típico dos AH analisados.

Figura 3.3 – Espectro de absorção de luz UV-visível obtido para a amostra ST6, indicando as absorbâncias em 465 nm e 665 nm.

Na Tabela 3.5 são apresentados os valores da razão E_4/E_6 dos AH utilizados.

Tabela 3.5 – Valores da razão E_4/E_6 dos ácidos húmicos, determinados com dados obtidos por espectroscopia de absorção no UV-visível.

Amostra	Razão E_4/E_6
PD1	$4,76 \pm 0,04^a$
PD2	$4,84 \pm 0,04$
CM3	$4,95 \pm 0,01$
PC4	$5,16 \pm 0,04$
PD5	$5,09 \pm 0,08$
ST6	$4,14 \pm 0,03$

^a Desvio médio.

A razão E_4/E_6 está relacionada com o grau de condensação dos anéis aromáticos das SH (Stevenson, 1994). Tem sido utilizada como uma forma de estimar a aromaticidade (Piccolo *et al.*, 1992; Hevia *et al.*, 2003), sendo que quanto menor a razão E_4/E_6 maior o grau de aromaticidade das SH.

Da Tabela 3.5 observa-se que a razão E_4/E_6 variou de 4,14 a 5,16, valores referentes às amostras ST6 e PC4. O menor valor da razão E_4/E_6 obtido para a amostra ST6 sugere que esta amostra possui maior aromaticidade. Entre as amostras extraídas de solos brasileiros, observa-se que as extraídas do solo Oxisol (PD1, PD2, CM3) tendem a ser um pouco mais aromática que as extraídas do solo Podzólico Vermelho Escuro (PC4 e PD5). Comparando amostras extraídas do mesmo tipo de solo e considerando o desvio médio, pode-se dizer que as amostras possuem aromaticidade similar.

3.3.1.3 Espectroscopia de RPE

O sinal do radical livre orgânico (RLO) em SH (Figura 3.4), detectável por RPE, é atribuído a semiquinonas, possivelmente, conjugadas a anéis aromáticos, sendo estes grupos formados na MOS pela desidrogenação oxidativa de compostos fenólicos (Riffaldi & Schnitzer, 1972; Stevenson, 1994). É uma hipótese, pois não há ainda consenso sobre a origem exata do sinal de radical livre em SH (Senesi, 1990; Cheshire & McPhail, 1996).

Figura 3.4 – Espectro de RPE típico de ácidos húmicos (AH) em estado sólido, mostrando o sinal do radical livre orgânico (RLO). I é a intensidade do sinal e ΔH_{PP} é a largura de linha tomada pico a pico e g é o fator giromagnético.

Tem sido mostrado que quanto maior concentração de RLO maior a humificação da MOS (Senesi, 1990; Martin-Neto *et al.*, 1991; Martin-Neto *et al.*, 1994b; Martin-Neto *et al.*, 1998; Olk *et al.*, 2000; Novotny & Martin-Neto, 2002; Pajaczkowska *et al.*, 2003; Perez *et al.*, 2004). Normalmente a maior humificação está relacionada à formação de compostos mais aromáticos (Kögel-Knaber *et al.*,

1991; Leinweber *et al.*, 1993). Com isto, a determinação da concentração de RLO, fornece uma estimativa indireta do grau de aromaticidade das SH. A Tabela 3.6 apresenta os valores da concentração de RLO para os AH.

Tabela 3.6 – Concentrações de radicais livres orgânicos (RLO), em spins g^{-1} de C, dos ácidos húmicos, determinados com dados obtidos por espectroscopia de RPE.

Amostra	spins g^{-1} de C ($\times 10^{17}$)
PD1	$5,44 \pm 0,12$
PD2	$5,02 \pm 0,01$
CM3	$6,03 \pm 0,08$
PC4	$3,65 \pm 0,04$
PD5	$2,91 \pm 0,08$
ST6	$10,45 \pm 0,33$

Por esta tabela observa-se que a concentração de RLO variou de $2,91 \times 10^{17}$ a $10,45 \times 10^{17}$ spins g^{-1} de C, indicando uma variação considerável da aromaticidade entre as amostras. Pode-se dizer que há uma variação de no máximo 3,6 vezes (entre as amostras ST6 e PD5) e no mínimo 1,1 vez maior (entre as amostras PD1 e PD2). Considerando apenas os AH extraídos dos solos brasileiros (PD1, PD2, CM3, PC4 e PD5) observa-se que os valores são comparáveis aos reportados em outros trabalhos para AH também extraídos de solos brasileiros (Bayer *et al.*, 2000; Bayer *et al.*, 2002; Dick *et al.*, 2005). Observa-se também que os AH extraídos do solo Podzólico Vermelho Escuro (PC4 e PD5) apresentaram em torno de 70% menos spins g^{-1} de C do que os AH extraídos do solo Oxisol (PD1, PD2 e CM3). Realizando a comparação entre os AH extraídos do mesmo tipo de solo observa-se menor variação nos valores da concentração de spins.

3.3.1.4 Espectroscopia de ^{13}C RMN

A espectroscopia de RMN permite a identificação de grupos químicos e obtenção direta de características estruturais dos AH (Wilson, 1987; Preston, 1996).

A Figura 3.5 mostra os espectros de ^{13}C VACP-MAS RMN dos AH utilizados.

Figura 3.5 – Espectros de ^{13}C RMN dos ácidos húmicos no estado sólido utilizando a técnica VACP-MAS.

Os dados de RMN confirmam a grande heterogeneidade química dos AH, conforme tem sido reportado na literatura (Stevenson, 1994; Preston, 1996; Knicker *et al.*, 1996; Zech *et al.*, 1997). Apesar de possuírem basicamente os mesmos tipos de grupos funcionais, os AH utilizados possuem áreas diferentes nos espectros, sugerindo diferenças nas quantidades destes grupos entre cada amostra. O espectro da amostra ST6 difere mais das demais amostras, as quais apresentam um comportamento espectral similar a outros AH extraídos de solos brasileiros (Perez *et al.*, 2004). A Tabela 3.7 apresenta os valores das áreas relativas dos espectros de cada grupo funcional dos AH.

Tabela 3.7 – Porcentagem da área de cada agrupamento químico em relação à área total nos espectros de ^{13}C VACP-MAS RMN dos ácidos húmicos.

Grupos funcionais	Amostra					
	PD1	PD2	CM3	PC4	PD5	ST6
<i>Alquil C</i>	24,3	25,8	24,1	28,9	27,4	31,0
<i>O-Alquil C</i>	12,1	12,9	11,9	13,3	14,4	10,3
<i>di-O-Alquil C</i>	22,1	21,8	23,1	26,6	28,2	17,3
<i>Arom C</i>	19,4	17,8	19,0	14,2	13,7	23,6
<i>O-Arom</i>	6,3	6,0	6,9	5,5	5,7	5,5
<i>COO</i>	11,0	10,7	10,8	9,8	8,9	8,5
<i>CO</i>	4,6	4,7	4,1	1,5	1,6	3,3

Da Tabela 3.7 é observado que, invariavelmente, os AH possuem caráter mais alifático do que aromático. A partir das áreas relativas calculou-se a aromaticidade (f_a) e a polaridade (P), segundo as razões apresentadas no item 3.2.3.4. Estes valores são apresentados na Tabela 3.8.

Tabela 3.8 – Aromaticidade (f_a) e polaridade (P) dos ácidos húmicos, fornecida pela quantificação da área dos espectros obtidos por ^{13}C VACP-MAS RMN.

Amostra	f_a	P
PD1	0,26	1,28
PD2	0,24	1,29
CM3	0,26	1,32
PC4	0,20	1,32
PD5	0,19	1,43
ST6	0,29	0,82

Da Tabela 3.8 observa-se que a maior variação para a aromaticidade foi encontrada para as amostras PD5 e ST6 (aproximadamente 53%). Para a polaridade a maior variação foi de aproximadamente 74%, também sendo para as amostras PD5 e ST6. Analisando apenas o solo Oxisol, a variação da aromaticidade foi de no máximo 8% e, para a polaridade de no máximo 3%. Para o solo Podzólico Vermelho Escuro esta variação foi de no máximo, 5% e 8%, para a aromaticidade e polaridade, respectivamente. Com isto, os valores de f_a e P , somente tem alguma variação significativa quando comparados AH extraídos de tipos de solos diferentes. De forma geral, observa-se a seguinte tendência com relação à aromaticidade: $\text{ST6} > \text{PD1} \cong \text{PD2} \cong \text{CM3} > \text{PC4} \cong \text{PD5}$.

3.3.2 *Correlação entre as informações obtidas pela análise elementar e pelas análises espectroscópicas*

A Tabela 3.9 apresenta os valores de todos os parâmetros fornecidos pela análise elementar (razão atômica H/C e O/C) e pelas espectroscopias de RPE (concentração de spins) e de ^{13}C RMN (aromaticidade (f_a) e polaridade (P)), as quais foram utilizadas para caracterização dos AH.

Tabela 3.9 – Valores dos parâmetros fornecidos pela análise elementar (razões atômicas H/C e O/C) e pelas espectroscopias de UV-visível (razão E_4/E_6), RPE (concentração de spins) e ^{13}C RMN VACP-MAS (aromaticidade (f_a) e polaridade (P)) dos ácidos húmicos (AH).

Parâmetros	Amostras de AH					
	PD1	PD2	CM3	PC4	PD5	ST6
H/C	1,03	1,04	1,08	1,23	1,32	0,76
O/C	0,56	0,53	0,52	0,57	0,68	0,44
E_4/E_6	4,76	4,84	4,95	5,16	5,09	4,14
Spins	5,44	5,02	6,03	3,65	2,91	10,45
f_a	0,26	0,24	0,26	0,20	0,19	0,29
P	1,28	1,29	1,32	1,32	1,43	0,82

A Tabela 3.10 apresenta as correlações entre os parâmetros H/C, E_4/E_6 , concentração de spins e f_a , os quais estão relacionados com a aromaticidade dos AH.

Tabela 3.10 – Coeficiente de correlação linear (R) entre a razão atômica H/C, razão E_4/E_6 , concentração de spins (Spins) e aromaticidade (f_a), fornecidas pela análise elementar, espectroscopia de UV-visível, RPE e ^{13}C RMN.

R*	H/C	E_4/E_6	Spins
E_4/E_6	0,95	-	-
Spins	-0,91	-0,87	-
f_a	-0,94	-0,85	0,96

*Probabilidade (p) de $R=0 \leq 0,03$.

O melhor ajuste foi linear e em todos as correlações obtiveram-se bons valores para o coeficiente de correlação linear (R). Os bons valores de R, com a correlação sendo direta ou inversa, de acordo com a informação que cada parâmetro fornece, sugerem uma mesma tendência com relação à aromaticidade entre os AH.

Com relação à polaridade, é possível correlacionar os parâmetros O/C e P . Pelo ajuste linear obteve-se $R=0,83$, sugerindo apenas uma mesma tendência com

relação aos dois parâmetros correlacionados e, conseqüentemente, à polaridade dos AH.

De forma geral, as boas correlações encontradas entre todos os parâmetros fornecidos pelas diferentes técnicas utilizadas diminuem a probabilidade da correlação ser casual, ou seja, sem causa e efeito.

3.4 CONCLUSÕES

Com o objetivo de caracterizar os AH utilizou-se a análise elementar e as espectroscopias de UV-visível, RPE e ^{13}C VACP-MAS RMN. A partir dos dados da análise elementar foram obtidas as razões atômicas O/C e H/C. Da espectroscopia de RPE foi analisada a concentração de spins e de ^{13}C VACP-MAS RMN obteve-se informações sobre grupos funcionais. A partir destas informações, foi possível a obtenção de características como a aromaticidade e a polaridade. Os AH somente apresentaram uma variabilidade mais significativa, com relação à aromaticidade e polaridade, quando comparados AH extraídos de tipos de solos diferentes. Invariavelmente, a amostra ST6 apresentou maior aromaticidade e menor polaridade. De forma geral, entre os AH extraídos de solos brasileiros, observou-se que as amostras extraídas do solo Oxisol (PC1, PC2 e CM3) apresentaram maior aromaticidade e menor polaridade do que as extraídas do solo Podzólico Vermelho Escuro (PC4 e PD5).

4 AVALIAÇÃO DA CONFORMAÇÃO ESTRUTURAL DE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS UTILIZANDO A METODOLOGIA DE MARCADOR DE SPIN

4.1 INTRODUÇÃO

O entendimento da dinâmica conformacional das substâncias húmicas (SH) torna-se importante, pois esta dinâmica pode influenciar na biodisponibilidade, mobilidade e destino de compostos orgânicos antropogênicos no ambiente (Conte & Piccolo, 1999). Dependendo da conformação estrutural, as SH podem influenciar diferentemente na capacidade de reter compostos orgânicos (Ahmad *et al.*, 2002; Hur & Schlautman, 2003), influenciando na ativação, neutralização ou degradação destes compostos (Avena & Wilkinson, 2002).

Wershaw (1999), em estudos de agregação molecular para SH, propôs uma estrutura onde agregados mistos de moléculas anfifílicas interagem por ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas, possuindo interior hidrofóbico e superfície hidrofílica. Contudo, a dinâmica conformacional das SH e os fatores que influenciam esta dinâmica, como por exemplo, a concentração (Guetzloff & Rice, 1994; Chien *et al.*, 1997) e métodos de análise (Varga *et al.*, 2000), além do modelo estrutural (Clapp & Hayes, 1999, Hayes & Clapp, 2001) e dos mecanismos de interação, são ainda pontos de controvérsias (Simpson *et al.*, 2003).

Geralmente, estudos sobre as interações com SH são realizados sob condições de equilíbrio ou pseudo-equilíbrio como, por meio de medidas de fluorescência (Jones & Indig, 1996), por meio de medidas de turbidez (Senesi *et al.*, 1997), por meio das análises de curvas de interação iônica (Brown *et al.*, 1999), por meio de isotermas de adsorção (Namjesnick-Dejanovic *et al.*, 2000) e por dados de

espalhamento de luz (Manning *et al.*, 2000). Experimentos examinando a dinâmica dos processos são menos freqüentes, embora haja alguns estudos da cinética de interação das SH com: i) sondas fluorescentes (Ragle *et al.*, 1997; Engebretson *et al.*, 1998; Wandruszka, 1998); ii) superfícies óxidas por meio da reflectometria (Avena & Koopal, 1999); iii) a atrazina por meio de medidas de relaxação magnética utilizando a Ressonância Magnética Nuclear (RMN) (Chien *et al.*, 1997). Entretanto, a dinâmica conformacional ainda não é totalmente entendida.

Segundo Varga *et al.* (2000), o modelo estrutural com conceito micelar (Tanford, 1973) para SH não pode ser confirmado unicamente pelas variações de retenção de volume com a adição de ácidos orgânicos por meio da cromatografia por exclusão de tamanho, conforme havia sido mostrado por Piccolo *et al.* (1996b).

O trabalho de Ferreira *et al.* (2001) foi o primeiro a utilizar a Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) em conjunto com a metodologia de marcador de spin em estudos sobre SH, fornecendo informações sobre a conformação estrutural e propondo a existência de dois tipos de sítios hidrofóbicos no ácido húmico (AH) dependentes do pH. Os resultados obtidos por Ferreira *et al.* (2001) mostraram a potencialidade da metodologia de marcador de spin na obtenção de informações sobre SH.

Com o intuito de obter mais informações sobre SH utilizando a metodologia de marcador de spin, este capítulo teve como objetivo analisar a ocorrência de outros tipos de interações nos sítios hidrofóbicos, observando a influência do pH e da concentração iônica do meio, do tempo de hidratação, da concentração e do tamanho molecular das SH na estruturação destes sítios. Com relação ao tamanho molecular, há trabalhos determinando as características químicas de frações com diferentes tamanhos moleculares (Christl *et al.*, 2000; Araújo *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2004) e a

influência na interação com espécies metálicas (Sargentini Jr. *et al.*, 2001). No entanto, trabalhos analisando a influência do tamanho molecular na conformação estrutural das SH são ainda incipientes.

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1 Amostras de ácido húmico e ácido fúlvico

O solo utilizado para extração do ácido húmico (AH) foi o Podzólico Vermelho Escuro coletado no campo experimental da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), localizado em Eldorado do Sul/RS (Tabela 3.1). A fração de ácido fúlvico (AF) foi extraída do solo Latossolo Roxo, coletado na Fazenda de Ensino e Pesquisa da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP/Campus Jaboticabal/SP. Para extração foi utilizado o procedimento sugerido pela IHSS (International Humic Substances Society) (Stevenson, 1994).

Na preparação das suspensões de AH foi utilizada água deionizada para minimizar a presença de íons paramagnéticos. Para a obtenção das suspensões de AH, concentrações pré-definidas (em g L⁻¹) foram deixadas sob agitação constante por 5 dias à temperatura ambiente. O mesmo procedimento foi utilizado para a obtenção das soluções aquosas de AF, com agitação por 1 dia. No caso do AH foi utilizada a parte em suspensão para interação com os marcadores de spin.

Para a obtenção das frações com diferentes tamanhos moleculares, o AH foi fracionado utilizando o sistema de fracionamento seqüencial por ultrafiltração com base no tamanho molecular, segundo a metodologia descrita por Rocha *et al.* (2000). As frações obtidas foram F₁ > 100; F₂ : 100-50; F₃ : 50-30; F₄ : 30-10 e F₅ < 10 kDa.

Este procedimento foi realizado no Instituto de Química/UNESP Campus Araraquara/SP. As amostras contendo as frações com diferentes tamanhos moleculares foram liofilizadas. Após isto, utilizando a concentração de 3 g L^{-1} , as amostras foram agitadas por 5 dias, para posterior interação com o marcador de spin.

4.2.2 Marcadores de spin

Os marcadores de spin utilizados foram: a) TEMPO (2,2,6,6-tetrametil-1-piperidina); b) 5-SASL (2-(3-carboxilpropil)4,4-dimetil-2-tridecil-3-oxazolidina); c) 16-SASL (2-(14-carboxitetradecil)-2-etil-4,4-dimetil-3-oxazolidina); e d) 5-MSSL (2-(4-metoxil-4-oxobutil)-4,4-dimetil-2-tridecil-3-oxazolidina). Os marcadores foram obtidos da Sigma-Aldrich. As estruturas químicas destes marcadores estão apresentadas na Figura 4.1.

Figura 4.1 – Estruturas químicas dos marcadores de spin. a) TEMPO; b) 5-SASL; c) 16-SASL e d) 5-MSSL.

As soluções aquosas dos marcadores foram obtidas a partir da evaporação dos solventes orgânicos das soluções estoques (1 mmol L^{-1}) do TEMPO, 5-SASL e 16-SASL (em metanol) e do 5-MSSL (em clorofórmio). As concentrações finais dos marcadores variaram de $1 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ a $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$, valores estes abaixo da concentração micelar crítica (Ge *et al.*, 1990). O pH foi ajustado com solução de ácido clorídrico (HCl) e de hidróxido de sódio (NaOH) e monitorado diariamente. As soluções aquosas dos marcadores, denominadas ‘referência’, foram mantidas sob agitação constante, sendo alíquotas coletadas desde minutos até dias após o preparo.

4.2.3 Interação com os marcadores de spin

Após a evaporação dos solventes orgânicos das soluções estoques dos marcadores de spin em um Becker, as amostras de interesse, em condições (concentração, pH e concentração iônica) pré-estabelecidas, eram adicionadas para interação. Após a adição, as amostras foram mantidas sob agitação constante até a análise de RPE. O pH foi monitorado e, quando necessário, foi reajustado utilizando solução de HCl ou de NaOH. Após manter as condições experimentais necessárias eram coletadas alíquotas das amostras para posterior análise de RPE.

4.2.4 Delineamento experimental

Nos experimentos para avaliação da reversibilidade da conformação estrutural do AH, o seguinte procedimento experimental foi realizado: suspensões estoque de AH (3 g L^{-1}) em pH 4,0 e 8,0 foram agitadas por 5 dias. Após este período de agitação foi retirada uma alíquota ($500 \text{ } \mu\text{L}$) de cada suspensão para interação com

os marcadores de spin por um dia, sendo realizada após este período a análise de RPE. No volume restante das suspensões estoque foi alterado o pH de 4,0 para 8,0 e vice-versa. Nestas condições as suspensões foram agitadas novamente por 5 dias e, após este período, foi retirada uma segunda alíquota de cada suspensão para interação com os marcadores por 1 dia e realizada a análise de RPE. Em seguida, o pH de cada suspensão foi reajustado para o valor inicial, e nesta condição as suspensões foram agitadas novamente por 5 dias. Em seguida, foi retirada uma terceira alíquota de cada suspensão para interação com o marcador 5-SASL por 1 dia e, posteriormente, adquirido o espectro de RPE. Um esquema do procedimento experimental está apresentado na Figura 4.2.

Figura 4.2 – Esquematização do procedimento experimental utilizado nos experimentos para análises da reversibilidade conformacional. As apostrofes indicam diferentes pH para uma mesma suspensão.

Nos experimentos efetuados para analisar a influência do efeito de hidratação, suspensões do AH foram obtidas a partir da utilização da concentração de 3 g L^{-1} , agitadas por períodos diferentes (aproximadamente 10 minutos e 5 dias). Suspensões de AH também foram obtidas a partir da utilização de bicarbonato de sódio (NaHCO_3) $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, com agitação por 10 minutos.

Nos experimentos para avaliação do efeito da concentração iônica do meio, suspensões de AH foram preparadas a partir de uma solução estoque de cloreto de sódio (NaCl) 2 mol L^{-1} . As análises foram realizadas em pH 7,5.

4.2.5 Análises de RPE

Os espectros de RPE foram adquiridos utilizando o espectrômetro marca Bruker modelo EMX, operando em banda X (~9,8 GHz) com cavidade ressonante esférica modelo ER4122 SHQ com alto Q, à temperatura ambiente. Para a obtenção dos espectros, alíquotas das amostras ‘referência’ e marcadores de spin/amostras de interesse foram colocadas em microcapilares de 50 μL , sendo estes capilares colocados dentro de um tubo de quartzo com 2,5 cm de diâmetro interno para posterior análise. O volume de amostra colocado dentro do microcapilar foi de aproximadamente 25 μL , tomando-se o cuidado de que houvesse amostra em toda a extensão da cavidade ressonante, de maneira que pudesse comparar as intensidades dos espectros. Os parâmetros de análise foram: potência das microondas de 5 mW; ganho de 1×10^5 , frequência de modulação de 100 kHz e amplitude de modulação de 0,05 mT. Para as análises com o marcador 5-MSSL utilizou-se potência das microondas de 20 mW e amplitude de modulação de 0,2 mT.

Nos experimentos quantitativos fez-se a integração dupla dos espectros de RPE (com a linha de base corrigida e subtraído o sinal do radical livre orgânico do AH) utilizando o software WINEPR da Bruker. As componentes em baixo campo foram escolhidas por serem menos influenciadas pela presença do sinal do radical livre orgânico inerente das SH e que está na mesma posição da linha hiperfina $M_I=0$ dos marcadores de spin. Para a obtenção dos espectros simulados foi utilizado o software NLSL e com os parâmetros magnéticos (tensor g — $g_{xx}=2,0086$; $g_{yy}=2,0063$; $g_{zz}=2,0025$) propostos por Ge *et al.* (1990). A base teórica e os algoritmos utilizados por este software estão apresentados em detalhe no trabalho de Budil *et al.* (1996).

250000 100000 0 100000 200000

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Marcadores de spin

Como referência foram obtidos os espectros de RPE dos marcadores de spin em solução aquosa. A Figura 4.3 apresenta os espectros de RPE dos marcadores TEMPO, 5-SASL e 16-SASL. Os valores da constante hiperfina (a_0) foram de 1,72 mT (TEMPO) e de 1,57 mT (5-SASL e 16-SASL) e do tempo de correlação (τ_c) $< 10^{-9}$ s, que são valores típicos de marcador livre.

Figura 4.3 – Espectro de RPE dos marcadores de spin em solução aquosa. a) TEMPO e b) 5-SASL e 16-SASL. A concentração final dos marcadores de spin foi de $0,01 \text{ mmol L}^{-1}$.

Para o marcador 5-MSSL, não foram observadas prontamente as linhas hiperfinas (típicas de marcador livre) (Figura 4.4a) devido à sua baixa solubilidade em meio aquoso. Somente foi possível observar as linhas hiperfinas deste marcador de spin em clorofórmio (Figura 4.4b).

Figura 4.4 – Espectros de RPE do marcador 5-MSSL. a) Em água e b) em clorofórmio (CHCl_3). Nos dois solventes a concentração do marcador 5-MSSL foi de $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$.

Com isso, a aquisição de espectros de RPE dos marcadores de spin com comportamento espectral (grau de imobilização, valor de a_0 e τ_c) diferente dos adquiridos quando deles somente em água (Figuras 4.3 e 4.4a), indica a ocorrência de interações com as SH.

4.3.1.1 Interação entre diferentes marcadores de spin e ácido húmico

Considerando a existência de sítios com características hidrofóbicas em AH, observada por Ferreira *et al.* (2001), foi analisado o comportamento espectral de marcadores de spin com diferentes hidrofobicidades na presença do AH. Para isso, foram utilizados os marcadores TEMPO e 5-SASL. As análises foram feitas em similares condições químicas (pH, concentração de AH e tempo de interação). Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 4.5.

Figura 4.5 – Espectros de RPE de diferentes marcadores de spin na presença da suspensão de ácido húmico (3 g L^{-1}) em pH 4,5 após aproximadamente 10 minutos de interação. a) TEMPO ($0,01 \text{ mmol L}^{-1}$) e b) 5-SASL ($0,01 \text{ mmol L}^{-1}$).

É observado que para o marcador TEMPO há somente três linhas hiperfinas com a_0 igual a $1,72 \text{ mT}$ e $\tau_c < 10^{-9} \text{ s}$. Valores similares aos obtidos quando do marcador em água, indicando que o TEMPO não está imobilizado no AH. Para avaliar a possibilidade de que o processo de difusão seja lento, análises de RPE foram feitas após 3 dias de interação. Contudo, não se observou qualquer alteração

espectral que indicasse uma interação entre o marcador TEMPO e o AH após este período (dado não apresentado). Um comportamento espectral bastante diferente foi obtido para o marcador 5-SASL, onde é observada a sobreposição de duas componentes, uma alargada (imobilizada) indicando que o marcador de spin está fortemente imobilizado no AH, e uma não alargada (livre) indicando que o marcador de spin possui maior grau de mobilidade (Figura 4.5b). O indicativo de que o marcador TEMPO não apresentou afinidade pelo AH e a imobilização do 5-SASL no AH, e considerando a característica mais hidrofóbica do 5-SASL, fornecem evidências de que a interação ocorrida entre o 5-SASL e o AH é predominantemente hidrofóbica.

Uma possível limitação do uso do marcador TEMPO é que, devido ao menor tamanho molecular deste marcador de spin em relação ao marcador 5-SASL, pode estar ocorrendo um equilíbrio rápido entre marcador TEMPO e o AH. Com relação ao 5-SASL, a limitação é a presença do grupo carboxílico (COOH) na sua estrutura química (Figura 4.1b). Esta limitação está no fato de que não é possível afirmar que o comportamento espectral observado seja atribuído somente às interações hidrofóbicas entre as moléculas do marcador de spin e o AH. Devido à presença deste grupo químico, há a possibilidade de ocorrer também interações iônicas ou ligações de hidrogênio entre o marcador 5-SASL e o AH. A utilização do marcador 5-MSSL limita a ocorrência destes tipos de ligações e aumenta a probabilidade de interações hidrofóbicas entre o marcador de spin e AH (Ge *et al.*, 1990) e exclui a possibilidade de equilíbrio rápido entre marcador de spin e o AH, pois possui tamanho molecular similar ao marcador 5-SASL.

A Figura 4.6 apresenta espectros de RPE do marcador 5-MSSL na presença do AH em diferentes pH.

Figura 4.6 – Espectros de RPE do marcador 5-MSSL ($0,1 \text{ mmol L}^{-1}$) na presença da suspensão de ácido húmico (3 g L^{-1}) em diferentes pH e tempos de interação. a) 1 dia em pH 4,7 e b) 7 dias em pH 7,5.

Como qualquer sinal de RPE do marcador 5-MSSL com características de marcador imobilizado nas suspensões de AH indica uma interação entre o marcador e o AH, esses resultados indicam que a interação ocorre por meio de interações hidrofóbicas. Além disso, observa-se que o comportamento espectral do 5-MSSL é similar ao do marcador 5-SASL, sugerindo que o grupo COOH não está envolvido na interação com o AH.

4.3.2 *Influência de parâmetros experimentais na interação entre marcador de spin e ácido húmico*

4.3.2.1 *pH*

A Figura 4.7 mostra espectros de RPE do marcador 5-SASL na presença do AH em diferentes pH e seus respectivos espectros simulados. Nestes espectros é observado que a componente imobilizada e livre variam significativamente em intensidade uma em relação à outra, dependendo do pH. A imobilizada é mais evidente em meio ácido, principalmente em $\text{pH} \leq 5,5$. Em $\text{pH} > 6,5$, as três linhas

hiperfinas (componente livre) tornam-se mais evidente e são típicas de marcador com maior grau de mobilidade ($a_0 = 1,58 \text{ mT}$ e $\tau_c < 10^{-9} \text{ s}$).

Figura 4.7 – Espectros de RPE experimental (em preto) e simulado (em vermelho) do marcador 5-SASL ($0,01 \text{ mmol L}^{-1}$) na presença da suspensão de ácido húmico (3 g L^{-1}) em diferentes pH (referenciados na figura). As análises foram feitas após aproximadamente 10 minutos de interação.

A partir da simulação dos espectros de RPE adquiridos, foi obtida uma estimativa da população de moléculas do marcador 5-SASL associada à componente imobilizada. Desta forma, obteve-se uma estimativa da quantidade de sítios hidrofóbicos menos expostos ao meio aquoso (internos) em função do pH (Figura 4.8).

Figura 4.8 – Porcentagem relativa de moléculas do marcador 5-SASL ($0,01 \text{ mmol L}^{-1}$) nos sítios hidrofóbicos menos expostos ao meio (internos) do ácido húmico (3 g L^{-1}) em função do pH.

Por estes dados observa-se que, em pH próximo de 5, começa a ser evidenciada a diminuição destes sítios e que em pH 8,1, não há indicativos de sua existência. Ferreira *et al.* (2001) propuseram como uma possível explicação para a influência do pH na formação de sítios hidrofóbicos, a protonação e desprotonação de grupos funcionais dos AH, tais como, os grupos carboxílicos (COOH), e a conseqüente influência na conformação estrutural. Para $\text{pH} \leq 5$, a maior parte dos grupos funcionais estão protonados, minimizando a repulsão eletrostática e permitindo a ocorrência de ligações de hidrogênio. Nesta situação, a conformação estrutural dos AH está menos expandida e favorece a estruturação de sítios

hidrofóbicos mais protegidos do meio aquoso. Nestes sítios, devido a ausência de água, o marcador possui baixa mobilidade. Para $\text{pH} > 5$, começa a ocorrer a desprotonação dos COOH , tornando-os íons carboxilatos (COO^-), resultando no aumento na repulsão eletrostática entre as cargas dos grupos funcionais. Nesta situação, a conformação estrutural dos AH está mais expandida, desfavorecendo a estruturação de sítios hidrofóbicos internos. Os dados quantitativos obtidos neste trabalho mostram que a diminuição dos sítios hidrofóbicos internos começa a ser evidenciada em pH próximo do valor de pK_a dos COOH das SH (em torno de 5) (Stevenson, 1994), confirmando a forte influência destes grupos funcionais. O decréscimo não tão acentuado na quantidade de sítios hidrofóbicos internos, próximo do valor de pK_a dos COOH , sugere que estes grupos ácidos estão distribuídos em diferentes estruturas químicas no AH.

Outra explicação, porém menos plausível, é a mudança conformacional da estrutura do AH causada pela presença do marcador de spin. Esta última hipótese é pouco provável, levando-se em consideração a baixa concentração e a característica pouca reativa das moléculas de marcador de spin (Campbell & Dwek, 1984).

4.3.2.1.1 Avaliação da reversibilidade da conformação estrutural do ácido húmico

No item 4.3.2.1 foi observada a forte influência do pH na conformação estrutural do AH. No entanto, é importante também avaliar se as alterações conformacionais apresentam comportamento reversível. A Figura 4.9 apresenta os experimentos de reversibilidade, conforme procedimento descrito no item 4.2.4.

Figura 4.9 – Espectros de RPE (normalizados) do marcador 5-SASL ($0,01 \text{ mmol L}^{-1}$) na presença da suspensão de ácido húmico (3 g L^{-1}). Análises realizadas após 1 dia de interação em pH 8,0. Na legenda do gráfico, as apóstrofes indicam que as análises foram feitas sempre no mesmo pH, porém as suspensões de ácido húmico permaneceram em pH 4,0 por 5 dias antes de interagir com o marcador de spin.

Pelos espectros de RPE adquiridos em pH 8,0, não se observa a componente imobilizada associada aos sítios hidrofóbicos menos expostos ao meio aquoso, indicando que a conformação estrutural está expandida. A permanência da suspensão de AH por um período de 5 dias em meio ácido (pH 4,0), ou seja, na conformação menos expandida, não influenciou no comportamento espectral.

Foi observado um comportamento similar quando as análises foram feitas em pH 4,0. Apesar da suspensão de AH ter permanecido na conformação estrutural mais expandida (em pH 8,0), sempre foram detectados os sítios hidrofóbicos internos ajustando o pH para 4,0. A partir da quantificação das áreas das componentes imobilizada e livre do marcador de spin obteve-se uma estimativa da quantidade de moléculas imobilizadas nos sítios hidrofóbicos internos. A quantificação foi feita por

meio da comparação da área da componente imobilizada (I) em relação à da livre (II) (Figura 4.7), sendo esta estimativa fornecida pelo cálculo da razão $I/(I+II)$. Assim, esta razão varia de 0 a 1, e quanto maior o seu valor maior a quantidade de moléculas de marcador de spin imobilizadas, ou seja, associadas a componente imobilizada. Os dados mostraram que apesar da suspensão ter permanecido em pH 8,0 por 5 dias, uma vez retornado ao pH 4,0, a maioria das moléculas do marcador de spin se imobilizam no AH (Figura 4.10). Isto sugere, não ter havido alterações significativas na capacidade de formação de sítios hidrofóbicos internos devido à permanência do AH na conformação mais expandida. Com isso, os resultados indicam que a conformação estrutural apresenta comportamento de reversibilidade.

Figura 4.10 – Razão entre a área da componente imobilizada (I) e a soma de I e da componente livre (II), definida como razão $I/(I+II)$. As áreas foram retiradas dos espectros de RPE do marcador 5-SASL ($0,01 \text{ mmol L}^{-1}$) na presença da suspensão de ácido húmico (3 g L^{-1}) adquiridos após 1 dia de interação. No eixo x, as apóstrofes indicam que as análises foram feitas sempre no mesmo pH (4,0), porém as suspensões de ácido húmico permaneceram em pH 8,0 antes de interagirem com o marcador de spin.

4.3.2.2 Tempo de hidratação

A Figura 4.11 mostra os espectros de RPE do marcador 5-SASL na presença da suspensão de AH obtida após 5 dias de agitação em torno de pH 4,5. A análise foi feita após aproximadamente 10 minutos de interação.

Figura 4.11 – Espectro de RPE do marcador 5-SASL ($0,01 \text{ mmol L}^{-1}$) na presença da suspensão de ácido húmico (3 g L^{-1}) obtida após 5 dias de agitação em pH 4,5. Análise de RPE realizada após aproximadamente 10 minutos de interação.

Os dados mostram que após o período aproximado de 10 minutos de interação já foi observada a componente imobilizada típica de marcador de spin com baixa mobilidade molecular. Isto sugere que os sítios hidrofóbicos internos estavam estruturados e facilmente acessíveis às moléculas do marcador de spin. A baixa intensidade da componente livre indica que a maioria das moléculas do marcador de spin está imobilizada nos sítios hidrofóbicos internos do AH. Um comportamento espectral bastante diferente foi obtido quando a suspensão foi agitada em condições similares de pH (aproximadamente 4,0) e com concentrações de 3 g L^{-1} , porém por somente por 10 minutos (Figura 4.12).

Figura 4.12 – Espectro de RPE do marcador 5-SASL ($0,01 \text{ mmol L}^{-1}$) na presença de suspensões de ácido húmico (3 g L^{-1}) obtida a partir de 10 minutos de agitação em pH 4,0. A análise de RPE realizada após aproximadamente 10 minutos de interação.

Na Figura 4.12 não se observa a componente imobilizada indicando a imobilização do marcador de spin nos sítios hidrofóbicos internos, apesar das condições serem apropriadas para que isto ocorra ($\text{pH} \leq 4,5$ e concentração de 3 g L^{-1} de AH). Pelo espectro de RPE são detectadas somente as três linhas típicas de marcador livre. Considerando que a única diferença na preparação das suspensões de AH que interagiram com o marcador de spin (Figura 4.11 e 4.12) foi o tempo de agitação (5 dias ou 10 minutos, respectivamente), isto sugere a influência do tempo de hidratação do AH na estruturação dos sítios hidrofóbicos.

Para avaliar a relação entre a rápida imobilização do marcador de spin e a hidratação das amostras de AH, foi preparada uma solução a partir da agitação da amostras de AH em pH próximo de 8 (utilizando solução de NaHCO_3) por 10 minutos e reajustado o pH para 4 com solução de HCl. Após isto, permitiu-se a interação com o marcador de spin por 10 minutos para posterior análise de RPE (Figura 4.13).

Figura 4.13 – Espectro de RPE do marcador 5-SASL ($0,01 \text{ mmol L}^{-1}$) na presença da suspensão de ácido húmico (3 g L^{-1}). Para obter esta suspensão a amostra de ácido húmico foi dissolvida em solução de bicarbonato de sódio (NaHCO_3) (pH em torno de 8) agitada por 10 minutos e reajustado o pH para aproximadamente 4 com solução de ácido clorídrico (HCl). A análise de RPE foi realizada após aproximadamente 10 minutos.

Na Figura 4.13 observa-se a componente imobilizada, indicando que o marcador de spin está imobilizado no AH. Este comportamento espectral é similar ao obtido quando a suspensão foi obtida após 5 dias de agitação e sem a utilização de NaHCO_3 (Figura 4.11).

Assim, utilizando mesmo tempo interação, porém com as suspensões de AH obtidas em condições químicas distintas, os espectros foram bastante diferentes (Figura 4.11 e 4.12). Isto sugere que a imobilização do marcador de spin depende mais da condição química em que se encontra o AH do que do tempo de interação. Uma possível explicação para estes experimentos é que quando a suspensão de AH é obtida em meio alcalino, a conformação mais expandida facilita a hidratação da estrutura, o que explica em parte a solubilidade dos AH observada em meio alcalino (Stevenson, 1994). Neste processo de hidratação ocorre a estruturação dos sítios

hidrofóbicos, o que está de acordo com a não observação destes quando o tempo de preparação da suspensão foi muito curto, ou seja, insuficiente para formação dos sítios hidrofóbicos.

Desta forma, os dados sugerem que a imobilização do marcador de spin pode estar mais associada com a hidratação do AH e, conseqüentemente, da estruturação dos sítios hidrofóbicos, do que com o tempo de interação entre o marcador de spin e o AH.

4.3.2.3 Concentração iônica

A Figura 4.14 apresenta os espectros de RPE do marcador de 5-SASL na presença de AH (3 g L^{-1}) em pH próximo de 7,5 e com diferentes valores de concentração iônica, variando-se a concentração de cloreto de sódio (NaCl) do meio.

Os espectros de RPE mostram que o aumento da concentração iônica do meio induziu ao aumento da quantidade de sítios hidrofóbicos internos, verificado pelo surgimento da componente imobilizada. Esta alteração espectral ocasionou a variação dos valores estimados da razão $I/(I+II)$ (Tabela 4.1). Desta tabela observa-se que, estando a suspensão de AH em valores pH próximos (em torno de 7,5), a razão $I/(I+II)$ apresenta valores significativamente diferentes devido à presença do NaCl. Os valores para a razão $I/(I+II)$ foram de aproximadamente 0,5 e 0,9, quando da ausência e presença de NaCl (2 mol L^{-1}), respectivamente. O valor de 0,9 para a razão $I/(I+II)$, quando da presença de NaCl (2 mol L^{-1}), é similar ao valor obtido (aproximadamente 1,0) quando a análise foi feita em pH 4,5 sem a presença de NaCl.

Figura 4.14 – Espectros de RPE do marcador 5-SASL ($0,01 \text{ mmol L}^{-1}$) na presença da suspensão de ácido húmico (3 g L^{-1}) em pH 7,5 com diferentes concentrações de cloreto de sódio (NaCl) (referenciadas na figura).

Tabela 4.1 – Razão entre a área da componente imobilizada (I) pela soma de I e da componente livre (II) (razão I/(I+II)) obtida dos espectros de RPE do marcador 5-SASL ($0,01 \text{ mmol L}^{-1}$) na presença da suspensão de ácido húmico (AH) em diferentes concentrações de cloreto de sódio (NaCl) e de pH.

Concentração de NaCl (mol L^{-1})	Concentração de AH (g L^{-1})	pH	Razão I/(I+II)
0	3,0	4,5	1,0
0	3,0	7,6	0,5
2,0	3,0	7,5	0,9

Wandruszka (1998), utilizando a espectroscopia de fluorescência, observou fenômeno semelhante em experimentos com variação da concentração iônica. Fazendo uma abordagem das SH como uma macromolécula de natureza polimérica, Wandruszka (1998) observou acréscimo de microambientes intramoleculares hidrofóbicos com a adição de sais, e atribui esse fenômeno à neutralização das cargas negativas, oriundas dos COO^- , pelo cátion Na^+ , provenientes da dissociação do sal. Conforme mostrado no item 4.3.2.1, o pH influenciou fortemente na conformação estrutural do AH, influenciando na quantidade de sítios hidrofóbicos internos. A maior ou menor influência foi atribuída a protonação (em $\text{pH} \leq 5$) e desprotonação ($\text{pH} > 5$) dos grupos ácidos, principalmente os COOH e, conseqüentemente, a uma menor ou maior repulsão eletrostática entre os íons COO^- . Com isso, estes experimentos dão mais sustentação aos dados que mostraram a influência dos íons COO^- na conformação estrutural do AH, corroborando com os resultados obtidos por Wandruska (1998), os quais sugeriram que também a concentração iônica pode influenciar na conformação estrutural das SH. Contudo, Wandruska (1998) utilizou concentrações menores de AH ($< 10 \text{ mg L}^{-1}$) do que as utilizadas nestes experimentos (3 g L^{-1}), propondo que a adição de sais favoreceu a formação de microambientes intramoleculares hidrofóbicos. Neste trabalho, não há dados experimentais que permitam fazer uma abordagem polimérica das SH e avaliar a existência de sítios

hidrofóbicos de natureza intramolecular, porém observa-se que adição de sais favoreceu a estruturação de sítios hidrofóbicos capazes de imobilizar o marcador de spin.

A formação de sítios hidrofóbicos com o aumento da concentração iônica observada neste trabalho não corrobora com os resultados de Schlautman & Morgan (1993), os quais observaram uma diminuição da interação entre compostos orgânicos apolares quando o aumento da concentração iônica do meio, utilizando a metodologia de supressão de fluorescência. O decréscimo da interação foi explicado com base na diminuição do tamanho das regiões hidrofóbicas das SH ocasionada pela constrição entre cargas elétricas. Analisando os resultados obtidos neste trabalho, se tal mecanismo ocorresse, o marcador de spin seria “expulso” dos sítios hidrofóbicos e, não estando imobilizado no AH, apresentaria o aspecto de marcador livre, o que não foi observado (Figura 4.14).

4.3.2.4 Frações baseadas no tamanho molecular

O AH foi fracionado em 5 frações com tamanhos moleculares diferentes ($F_1 > 100$; $F_2 : 100-50$; $F_3 : 50-30$; $F_4 : 30-10$ e $F_5 < 10$ kDa). As Figuras 4.15 e 4.16 apresentam os espectros de RPE do marcador 5-SASL após interação com as frações F_1 , F_4 e F_5 em pH 4,5 e 6,5, respectivamente.

Pela análise dos espectros de RPE constata-se que em ambos pH o comportamento espectral foi semelhante aos obtidos com o AH não fracionado (Figura 4.7), havendo as componentes imobilizada e livre, sendo estas mais ou menos evidente dependendo do pH. Este comportamento espectral foi discutido no item 4.3.2.1 e está associado à existência de sítios hidrofóbicos no AH. Para pH 4,5

(Figura 4.14) observa-se que entre as frações F_1 e F_4 os espectros são similares e, embora não apresentados, o comportamento espectral das frações F_2 e F_3 foi semelhante às frações F_1 e F_4 . Um comportamento espectral um pouco diferente foi observado para a fração F_5 , para a qual observa-se que a componente livre é mais evidente em relação à imobilizada. Esta alteração sugere que, para esta fração, há um decréscimo de sítios hidrofóbicos menos expostos ao meio aquoso.

Figura 4.15 – Espectros de RPE do marcador 5-SASL ($0,01 \text{ mmol L}^{-1}$) na presença das suspensões das frações de ácido húmico (3 g L^{-1}) com diferentes tamanhos moleculares ($F_1 > 100$; $F_4: 30-10$ e $F_5 < 10 \text{ kDa}$), em pH 4,5.

Em pH 6,5 (Figura 4.16), o comportamento espectral é também semelhante ao obtido quando do AH não fracionado em diferentes tamanhos moleculares. Os

espectros dão indícios da componente imobilizada, porém sendo mais evidente a componente livre. Novamente, somente para a fração F_5 há uma pequena diferença com relação às demais frações, para a qual o indício de sítios hidrofóbicos menos expostos ao meio aquoso (internos) é ainda menos evidente.

Figura 4.16 – Espectros de RPE do marcador 5-SASL ($0,01 \text{ mmol L}^{-1}$) na presença das suspensões das frações de ácido húmico (3 g L^{-1}) com diferentes tamanhos moleculares ($F_1 > 100$; $F_4: 30\text{-}10$ e $F_5 < 10 \text{ kDa}$), em pH 6,5.

Alguns trabalhos têm mostrado diferenças na composição química das SH entre frações com diferentes tamanhos moleculares, principalmente com relação à presença de estruturas aromáticas e alifáticas (Tombácz, 1999; Christl *et al.*, 2000; Rosa *et al.*, 2001; Araújo *et al.*, 2002; Wong *et al.*, 2002; Duarte *et al.*, 2003; Rocha

& Rosa, 2003; Li *et al.*, 2004). Nos trabalhos em que foram analisados AH de solo (Christl *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2004) (mesma origem do AH fracionado neste trabalho), a tendência observada foi uma maior quantidade de carbono alifático para as frações maiores e uma maior quantidade de carbono aromático para as frações menores. Nas frações menores, além dos aromáticos, foi observado maior quantidade de grupos contendo oxigênio. Desta forma, embora existam diferenças significativas na composição química entre as frações, tanto nas menores quanto nas maiores frações, observou-se a presença de estruturas com características hidrofóbicas. Uma hipótese para explicar esses resultados é que, apesar das frações terem diferentes tamanhos moleculares, e possivelmente características químicas diferentes, há estruturas químicas nestas frações capazes de formar sítios hidrofóbicos para imobilizar o marcador de spin. O indicativo de menor imobilização do marcador de spin na fração F₅, pode ser atribuído à maior quantidade de grupos polares.

Conforme apresentado no item 4.3.2, os diferentes graus de imobilização do marcador de spin foram atribuídos às alterações da conformação estrutural, com conseqüente estruturação de sítios hidrofóbicos no AH. Assim, os resultados deste experimento sugerem que a dinâmica conformacional e a estruturação de sítios hidrofóbicos no AH foram pouco influenciadas pelo tamanho molecular, ao menos até 10 kDa.

4.3.2.5 Concentração de ácido húmico

Com o objetivo de avaliar a influência da concentração de AH na estruturação de sítios hidrofóbicos, foram feitos experimentos com a variação da concentração de AH. Os resultados estão apresentados na Figura 4.17.

Figura 4.17 – Áreas normalizadas das componentes imobilizada e livre obtidas após a integração dupla dos espectros de RPE do marcador 5-SASL (0,01 mmol L⁻¹) na presença da suspensão de ácido húmico (AH) (pH 4,5) com diferentes concentrações.

A obtenção das áreas relativas às componentes imobilizada e livre (Figura 4.17) mostrou que em decorrência do aumento da concentração de AH em suspensão há um acréscimo na quantidade de moléculas de marcador imobilizadas no AH, influenciando no aumento da área da componente imobilizada, ou seja, há um acréscimo de sítios hidrofóbicos protegidos do meio aquoso. Para concentrações abaixo de um determinado valor (aproximadamente 0,37 g L⁻¹) não há indicativos espectrais significativos da imobilização do marcador, mesmo estando a suspensão de AH em pH 4,5, o que favorece a ocorrência destes sítios. Em pH 6,5 foi observado que somente há um indicativo da componente imobilizada em concentrações acima de 1,0 g L⁻¹ (Figura 4.18), confirmando a maior dificuldade de agregação com o aumento do pH. Isto sugere que a estruturação de sítios hidrofóbicos mais protegidos do meio aquoso é dependente da concentração de estruturas húmicas, e que pH

influencia na concentração necessária para observar a imobilização do marcador de spin.

Figura 4.18 – Espectros de RPE do marcador 5-SASL (0,01 mmol L⁻¹) na presença de suspensões de ácido húmico com diferentes concentrações (referenciadas no gráfico). Análises realizadas em pH 6,5.

Foi avaliada a hipótese de que houvesse sítios hidrofóbicos mesmo em baixas concentrações de AH, no entanto, estes sítios poderiam não estar sendo detectados por haver muito mais moléculas de marcador de spin do que sítios hidrofóbicos. Para isto, foi realizado um experimento onde a concentração do marcador 5-SASL foi diminuída proporcionalmente ao decréscimo da concentração de AH. O resultado deste experimento está apresentado na Figura 4.19.

Figura 4.19 – Espectro de RPE do marcador 5-SASL ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$) na suspensão de ácido húmico ($0,3 \text{ g L}^{-1}$), em pH 4,5.

O espectro de RPE da Figura 4.19 é similar ao obtido quando se utilizou $0,3 \text{ g L}^{-1}$ de AH e não se manteve a proporção na concentração entre marcador de spin e AH, diferenciando-se apenas pela menor relação sinal/ruído. Com isto, a inexistência de sítios hidrofóbicos em baixas concentrações não pode ser atribuída a um artefato experimental. Além disto, tem-se a evidência de que as SH não sejam macromoléculas, pois, se fossem era de se esperar que houvesse macromoléculas capazes de imobilizar o marcador de spin.

Com isso, há evidências experimentais de que a estruturação de sítios hidrofóbicos depende, além do pH e da concentração iônica do meio e de estruturas húmicas. Sugerindo que a formação dos agregados húmicos é devida principalmente à associação de várias estruturas húmicas menores, havendo uma concentração mínima, cujo valor é dependente do pH, que possibilite a estruturação de ambientes hidrofóbicos que sejam capazes de imobilizar o marcador de spin. Em pH 4,5 a agregação deve ter ocorrido predominantemente por meio do estabelecimento de

ligações de hidrogênio. Em pH 6,5, há um desfavorecimento das ligações de hidrogênio devido à desprotonação, principalmente dos grupos COOH. Nesta situação a agregação deve ter ocorrido também por meio de interações hidrofóbicas. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Simpson (2002), que realizando análises de difusão por ^1H RMN, observou que a agregação das SH dependeu da concentração desta substância em solução. Segundo Simpson (2002), levando-se em consideração que as análises foram realizadas em pH próximo de 12, eles propuseram que a agregação deva ocorrer, em parte, por meio de interações hidrofóbicas e forças de van der Waals, pois neste pH, a possibilidade de estabelecimento de ligações de hidrogênio é minimizada.

Segundo Piccolo (2001), não é apropriado a utilização do conceito clássico de micelas (Tanford, 1973) para moléculas de SH devido à sua heterogeneidade. Além disto, os resultados neste trabalho mostraram significativa influência do pH na determinação da concentração mínima necessária para agregação e estruturação dos sítios hidrofóbicos internos. Apesar disto, há trabalhos na literatura que, por meio de outras técnicas e metodologias, propuseram a existência de estruturas tipo micelas para as SH (Wershaw, 1993; Guetzloff & Rice, 1994; Wandruszka, 1998). Há trabalhos (Ragle *et al.*, 1997; Engebretson & Wandruszka, 1998; Wandruszka, 1998), que utilizando baixa concentração de SH ($<25 \text{ mg L}^{-1}$) e em meio alcalino, sugeriram a existência de pseudomicelas com características hidrofóbicas e de natureza intramolecular. Considerando que abaixo de $0,37 \text{ g L}^{-1}$ não foi possível detectar a presença de sítios hidrofóbicos, é sugerido que os sítios observados pela metodologia de marcador de spin não sejam de natureza intramolecular. Contudo, não é excluída a possibilidade de existência das “pseudomicelas intramoleculares” (Wandruszka,

1998), porém pelos dados obtidos por meio da metodologia de marcador spin elas não foram detectadas.

4.3.3 Comportamento espectral dos marcadores 5-SASL e 16-SASL na presença do ácido húmico

Por meio da simulação dos espectros foi possível inferir sobre a polaridade e mobilidade do marcador de spin nos sítios hidrofóbicos. Estes dados foram obtidos por meio da análise de a_0 (média das componentes do tensor hiperfino nuclear (A_{xx} , A_{yy} , A_{zz})) e de $R_{\perp}$ (taxa de difusão rotacional). O parâmetro dinâmico, $R_{\perp}$, representa a taxa de difusão do grupo nitróxido em torno do eixo perpendicular ao eixo de simetria de rotação.

Os resultados obtidos mostraram um bom ajuste entre o espectro experimental e o simulado (Figura 4.20). A Tabela 4.2 apresenta os melhores valores da simulação para as componentes do tensor hiperfino nuclear, A_{xx} , A_{yy} , A_{zz} , e das taxas de difusão rotacional, $R_{\perp}$, do marcador 5-SASL em água (marcador livre), do 5-SASL e do 16-SASL na presença do AH em pH 4,5.

Figura 4.20 – Espectros de RPE experimental (em preto) e simulado (em vermelho) dos marcadores 5-SASL e 16-SASL na presença da suspensão de ácido húmico (3 g L^{-1}) em pH 4,5. A concentração de ambos os marcadores foi de $0,01 \text{ mmol L}^{-1}$.

Tabela 4.2 – Parâmetros obtidos da simulação dos espectros de RPE dos marcadores de spin (5-SASL e 16-SASL) na presença da suspensão de AH. A_{xx} , A_{yy} e A_{zz} são as componentes do tensor hiperfino nuclear, e $R_{\perp}$ a taxa de difusão rotacional*.

Amostra	A_{xx}	A_{yy}	A_{zz}	a_0	$R_{\perp} (\text{s}^{-1})$
5-SASL (em água)	6,5	5,2	35,6	15,8	$1,7 \times 10^9$
5-SASL + AH	6,6	5,6	33,1	15,1	$4,4 \times 10^6$
16-SASL + AH	6,6	5,6	32,9	15,0	$21,0 \times 10^6$

(i) Os valores das componentes do tensor magnético g utilizados para simulação foram:

$g_{xx} = 2,0086$; $g_{yy} = 2,0063$; $g_{zz} = 2,0025$ (Ge *et al.*, 1990).

(ii) As componentes do tensor A estão em Gauss.

(iii) $a_0 = (A_{xx} + A_{yy} + A_{zz})/3$.

Com base na Tabela 4.2, observa-se que não houve alterações significativas nos valores de A_{xx} , A_{yy} e A_{zz} , e conseqüentemente de a_0 , entre os marcadores 5-SASL e 16-SASL na presença do AH. Isto sugere que ambos os marcadores estão em um ambiente com a mesma polaridade. Contudo, não é possível afirmar que não há uma

variação de polaridade dentro dos sítios, sendo necessário utilizar outros marcadores com o grupo nitróxido em outras posições da cadeia alifática do ácido esteárico de forma a se obter um perfil de polaridade.

Com relação ao valor de $R_{\perp}$, este diminui de aproximadamente 10^9 s^{-1} (em água) para valores entre 10^6 - 10^7 s^{-1} (na presença do AH), indicando a significativa diminuição da mobilidade dos marcadores de spin quando da presença do AH. O valor para $R_{\perp}$ de $4,4 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ para o 5-SASL e $21,0 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ para 16-SASL, sugere que a mobilidade do 5-SASL é menor do que a do 16-SASL. Uma hipótese para explicar as diferentes mobilidades é que estando o grupo polar (COOH) da estrutura química dos marcadores de spin em contato com a água, o grupo nitróxido do 5-SASL esteja em uma região no início do sítio com limitada mobilidade. Para o 16-SASL, o grupo nitróxido deve estar em uma região mais no interior do sítio, onde sua mobilidade é maior do que a do 5-SASL. A Figura 4.21 apresenta esta proposta ilustrativamente.

Figura 4.21 – Proposta de ilustração para os marcadores 5-SASL e 16-SASL no sítio hidrofóbico do ácido húmico, sugerindo que o marcador de spin na posição 16 tenha maior liberdade que na posição 5.

É importante ressaltar que para uma melhor compreensão, há necessidade de se obter mais dados experimentais (marcadores com o grupo nitróxido em outras posições da cadeia) e simulados (Citadini *et al.*, 2005). Contudo, os resultados

sugerem que compostos orgânicos apolares com pequenas diferenças químicas em suas estruturas podem ter mobilidades diferentes nos sítios hidrofóbicos do AH.

4.3.4 Sítios hidrofóbicos em ácido fúlvico

Os ácidos fúlvicos (AF) são solúveis em meio aquoso em qualquer pH (Stevenson, 1994). Desta forma, eles têm grande influência no transporte e destino de compostos orgânicos antropogênicos em sistemas aquáticos naturais (Koopal *et al.*, 2001; Rocha & Rosa, 2003).

Por ter sido observado neste trabalho a influência da conformação estrutural do AH na imobilização do marcador de spin (item 4.3.2) foi realizado um experimento para também avaliar o comportamento conformacional do AF em função do pH e da concentração. Os resultados obtidos são apresentados nas Figuras 4.22 e 4.23.

Figura 4.22 – Espectros de RPE do marcador 5-SASL ($0,01 \text{ mmol L}^{-1}$) na presença da solução de ácido fúlvico com diferentes concentrações (apresentadas na figura) e pH. a) pH 4,0 e b) pH 8,0.

Os espectros mostram que a imobilização do marcador 5-SASL somente é observada quando utilizadas concentrações de AF maiores que 5 g L^{-1} . No item 4.3.2.5 obteve-se que a imobilização do marcador 5-SASL em presença do AH, utilizando condições químicas similares (pH), ocorreu quando se utilizou aproximadamente $0,5 \text{ g L}^{-1}$. Desta forma, tem-se que é necessário maior concentração de AF do que AH para observar a imobilização do marcador de spin.

Quando analisado o comportamento espectral do marcador de spin em diferentes pH (4,0 e 8,0), porém com mesma concentração de AF (50 g L^{-1}),

observou-se que a imobilização do marcador de spin ocorreu somente em pH 4. Em pH 8, a imobilização do marcador de spin somente foi observada quando se utilizou 100 g L^{-1} . Comportamento similar foi observado, com relação à influência do pH e da concentração de AF, quando utilizado o marcador 5-MSSL (Figuras 4.23 e 4.24), indicando a ocorrência de interações de natureza hidrofóbica.

Figura 4.23 – Espectros de RPE do marcador 5-MSSL ($0,1 \text{ mmol L}^{-1}$) na presença da solução de ácido fúlvico com diferentes concentrações em pH 4,0. a) 5 g L^{-1} e b) 50 g L^{-1} .

Figura 4.24 – Espectros de RPE do marcador 5-MSSL ($0,1 \text{ mmol L}^{-1}$) na presença da solução de ácido fúlvico em diferentes relações. a) 5 g L^{-1} e b) 50 g L^{-1} . Análises realizadas em pH 8,0.

Esses experimentos indicam que, em relação ao AH, o AF possui maior dificuldade para estruturar sítios hidrofóbicos capazes de imobilizar o marcador de spin. Isto sugere que o AF possui maior dificuldade de agregação. Os dados corroboram com os obtidos por Lead *et al.* (2000), que pela determinação do coeficiente de difusão por fluorescência, observaram maior dificuldade de agregação para o AF.

Da análise de ^{13}C VACP-MAS RMN do AF (dado não apresentado) obteve-se que a polaridade (P), obtida por meio da utilização da equação 3.2 (item 3.2.3.4), foi de 1,77. Este valor é 1,73 vez maior (em média) que os valores de P obtidos para as amostras de AH (capítulo 3). Isto indica que o AF possui maior quantidade de grupos funcionais com características polares do que o AH. Este dado corrobora com trabalhos reportados na literatura (Stevenson, 1994, Gondar *et al.*, 2005; Piccolo *et al.*, 2005) mostrando que os AF possuem maior quantidade de grupos hidrofílicos do que os AH. Com isto, o maior caráter hidrofílico dos AF pode explicar a sua maior dificuldade de agregação e estruturação de sítios hidrofóbicos.

A partir da simulação dos espectros de RPE do marcador 5-SASL em presença do AF, foi observado que o melhor ajuste na simulação dos espectros foi obtido quando foram utilizadas duas componentes, definidas componente 1 e 2 (Figura 4.25).

Figura 4.25 – Espectro de RPE do marcador 5-SASL ($0,01 \text{ mmol L}^{-1}$) na presença da solução de ácido fúlvico (100 g L^{-1}) em pH 4,0 (em preto). Em azul está o sinal simulado, em verde a componente 1 e em azul a componente 2.

A partir da simulação dos espectros de RPE foram obtidos os valores da constante hiperfina (a_0) e das taxas de difusão rotacional (R_L) (Tabela 4.3).

Tabela 4.3 – Parâmetros obtidos da simulação dos marcadores de spin. A_{xx} , A_{yy} e A_{zz} são as componentes do tensor hiperfino nuclear, R_L a taxa de difusão rotacional e (*Pop. (%)*) a porcentagem de moléculas do marcador de spin em cada componente*.

Componente	A_{xx}	A_{yy}	A_{zz}	a_0	$R_L \text{ (s}^{-1}\text{)}$	<i>Pop. (%)</i>
1	6,5	5,2	33,6	15,1	$3,8 \times 10^6$	9,4
2	6,6	5,6	30,5	14,2	$35,5 \times 10^6$	90,6

*(i) Os valores das componentes do tensor magnético g utilizados para simulação foram:

$g_{xx} = 2,0086$; $g_{yy} = 2,0063$; $g_{zz} = 2,0025$ (Ge *et al.*, 1990).

(ii) As componentes do tensor A estão em Gauss.

(iii) $a_0 = (A_{xx} + A_{yy} + A_{zz})/3$.

A Tabela 4.3 mostra que as componentes 1 e 2 apresentaram diferentes valores de a_0 e R_L . A existência de duas componentes e os diferentes valores de a_0 e R_L sugerem a existência de dois sítios hidrofóbicos com características diferentes. Os

sítios associados à componente 1 possuem maior polaridade e os sítios associados à componente 2 possuem menor polaridade. Contudo, os valores de a_0 e $R_\perp$ da componente 1 são bastante similares aos obtidos para a componente imobilizada do marcador 5-SASL em presença do AH (Tabela 4.2), diferentemente da componente 2. Assim, uma outra possibilidade para explicar a existência da componente 2 em presença do AF é que esta seja devido a interações dipolares ou de troca (Weil *et al.*, 1994) entre os próprios marcadores de spin. Esta possibilidade é plausível, pois os espectros simulados do 5-SASL em presença do AH também apresentaram duas componentes, porém, uma indicando marcador livre. Considerando a maior complexidade estrutural do AH (Stevenson, 1994; Clapp & Hayes, 1999; Simpson, 2002) e a menor concentração utilizada nos experimentos (3 g L^{-1}) em relação aos 100 g L^{-1} do AF, é mais provável para o AH a detecção de diferentes tipos de sítios hidrofóbicos. Desta forma, é proposto que a componente 2 não está associada à existência de sítios hidrofóbicos com características diferentes, mas sim há um processo físico.

Apesar da observação de sítios hidrofóbicos em concentrações maiores do que as normalmente encontradas no ambiente (Thurman & Malcolm, 1981), os resultados trazem contribuições para o desenvolvimento de um modelo para as SH. Neste sentido, os resultados mostraram que, assim como para os AH, os AF podem também formar sítios hidrofóbicos. A capacidade de formar estes sítios depende, assim como observado para o AH, do pH. No entanto, a maior quantidade de grupos polares do AF, confirmada pela análise de ^{13}C VACP-MAS RMN, dificulta a capacidade de agregação e, conseqüentemente, de formar os sítios hidrofóbicos.

4.4 CONCLUSÕES

Por meio da metodologia de marcador de spin foi possível obter informações sobre as interações estabelecidas entre AH e marcadores de spin. Utilizando os marcadores TEMPO, 5-SASL, 16-SASL e 5-MSSL foi possível concluir que as interações estabelecidas com o AH são predominantemente hidrofóbicas. Os resultados mostraram forte influência do pH na estruturação de sítios hidrofóbicos menos expostos ao meio aquoso no AH, mostrando a afinidade hidrofóbica entre o marcador de spin e estes sítios, principalmente, em meio ácido ($\text{pH} \leq 5$). O valor de 10^6 s^{-1} para a taxa de difusão rotacional (R_L) confirma a pouca mobilidade do marcador de spin nestes sítios, quando comparado ao valor de R_L de 10^9 s^{-1} do marcador de spin somente em água.

Dados quantitativos mostraram que a diminuição da componente imobilizada (associada aos sítios hidrofóbicos menos expostos ao meio aquoso) começa a ser evidenciada em pH próximos de 5. Este valor está próximo do pK_a dos COOH dos AH (em torno de 5), confirmando a influência dos grupos COOH na conformação estrutural dos AH, provavelmente por meio do estabelecimento de ligações de hidrogênio entre eles ($\text{pH} \leq 5$) e repulsão eletrostática quando da ionização destes grupos ($\text{pH} > 5$). Apesar do pH influenciar fortemente na conformação estrutural dos AH, esta apresenta um comportamento de reversibilidade.

Os resultados mostraram uma rápida imobilização do marcador 5-SASL no AH, indicando que os sítios hidrofóbicos estavam estruturados e facilmente acessíveis ao marcador de spin. Experimentos utilizando suspensões do AH obtidas sob condições diferentes (tempo de agitação e solubilização) sugerem que a imobilização do marcador de spin pode estar mais associada à hidratação do AH e,

conseqüentemente, estruturação dos sítios hidrofóbicos, do que com o tempo de interação entre o marcador de spin e o AH.

Os resultados com variação da concentração iônica do meio, utilizando NaCl, sugerem a ocorrência de interações eletrostáticas entre cargas negativas (provavelmente os COO^-) oriundas do AH e positivas (Na^+) oriundas da dissociação do sal. A neutralização das cargas negativas contribui para a conformação estrutural menos expandida, favorecendo a formação de sítios hidrofóbicos menos expostos ao meio aquoso.

Utilizando frações de AH com diferentes tamanhos moleculares não foram observadas variações significativas nos espectros de RPE do marcador 5-SASL na presença das diferentes frações. Considerando que os diferentes graus de imobilização do marcador de spin foram atribuídos às alterações da conformação estrutural, com conseqüente estruturação de sítios hidrofóbicos no AH, os resultados sugerem que a dinâmica conformacional do AH foi pouco influenciada pelo tamanho molecular, ao menos para frações maiores que 10 kDa.

Experimentos com variação da concentração de AH e do marcador de spin sugeriram que a formação dos agregados húmicos é devida principalmente à associação de várias estruturas húmicas menores. Foi constatado que há uma concentração mínima que possibilita a observação dos sítios hidrofóbicos mais protegidos do meio aquoso. Foi verificado também que essa concentração mínima é significativamente diferente entre o AH e AF. Em meio ácido e para as suspensões de AH, a concentração mínima foi de aproximadamente $0,37 \text{ g L}^{-1}$. Para as soluções de AF, a concentração mínima foi de aproximadamente 50 g L^{-1} . Esses valores podem sofrer variações significativas com a variação do pH. A maior dificuldade de

agregação e formação de sítios hidrofóbicos no AF foi atribuída ao seu maior caráter mais hidrofílico, confirmado pela análise de ^{13}C VACP-MAS-RMN.

Dados obtidos por simulação mostraram que os marcadores 5-SASL e 16-SASL imobilizados no AH apresentaram valores diferentes para $R_{\perp}$ ($4,4 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ para o 5-SASL e $21,0 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ para o 16-SASL), indicando diferentes mobilidades dos marcadores nos sítios hidrofóbicos. Com isto, a influência da interação hidrofóbica na dinâmica de compostos orgânicos apolares é modulada pela conformação estrutural do AH, mas também se sugere que ela dependa da estrutura química do composto.

5 INTERAÇÕES HIDROFÓBICAS EM DIFERENTES ÁCIDOS HÚMICOS E COMPONENTES DO SOLO

5.1 INTRODUÇÃO

Além de atuar na estruturação e fertilidade do solo, a MOS tem função importante na complexação de íons, de superfícies minerais e de compostos orgânicos (Schwarzenbach *et al.*, 1992). Com relação aos compostos orgânicos, a MOS pode influenciar tanto na sua dinâmica (Rebhun *et al.*, 1998; Haitzer *et al.*, 1999; Backhus *et al.*, 2003) quanto na sua toxicidade (Perminova *et al.*, 2001). Esta influência é modulada de maneiras diferentes, devido às possíveis interações que podem ocorrer (Zhu *et al.*, 2004) e à heterogeneidade da MOS (Ahmad *et al.*, 2001).

Estudos têm mostrado discrepâncias quanto às influências das características químicas da MOS (como aromaticidade, polaridade e alifaticidade) na interação com compostos apolares. Ahmad *et al.* (2001) observaram que quanto maior a aromaticidade e menor a alifaticidade da MOS maior foi a interação com os compostos orgânicos apolares. No entanto, não excluíram a possibilidade de que grupos polares estivessem influenciando na sorção. A forte influência da aromaticidade também foi observada por Perminova *et al.* (1999) utilizando SH de várias origens. Por outro lado, Mao *et al.* (2002), Salloum *et al.* (2002) e Sachleben *et al.* (2004) encontraram uma correlação positiva entre a sorção de compostos orgânicos apolares e a fração alifática não oxigenada das SH.

Também não há consenso com relação à polaridade das MOS. Por exemplo, Chiou *et al.* (1998) encontraram uma correlação negativa entre o coeficiente de sorção de compostos orgânicos apolares e a quantidade de grupos polares da MOS.

No entanto, Chin *et al.* (1997) não encontraram uma correlação entre a quantidade de oxigênio e a sorção do composto orgânico apolar (pireno). Por outro lado, Kile *et al.* (1999) encontraram correlação negativa entre o coeficiente de partição e porcentagem de carbono polar (grupos alifáticos oxigenados mais grupos carboxílicos e carbonilas). Contudo, a correlação obtida com os grupos aromáticos (incluindo os fenólicos) foi muita baixa. Estas discrepâncias encontradas na literatura podem ser causadas pelas diferenças na composição química da MOS, podendo inclusive os grupos aromáticos, alifáticos e polares influenciarem no processo de interação e haver um sinergismo entre as frações aromáticas, alifáticas e polares. Segundo Hur & Schlautman (2003), a influência das SH na sorção de compostos orgânicos pode depender além de suas características químicas, também de sua origem e de suas características biogeoquímicas.

Além de não haver um consenso com relação às características químicas, os mecanismos de sorção entre os compostos orgânicos antropogênicos e a MOS não são ainda bem entendidos (Gunasekara *et al.*, 2003). Isto pode ser em parte atribuído ao fato de não haver informações sobre estruturas específicas da MOS, conforme sugerido por Simpson *et al.* (2001). As discrepâncias obtidas têm também sido atribuídas à influência da conformação (Hur & Schlautman, 2003; Simpson *et al.*, 2003), porém poucos trabalhos têm avaliado esta possibilidade (Ferreira *et al.*, 2001, Martin-Neto *et al.*, 2001, Avena & Wilkinson, 2002; Simpson *et al.*, 2004). Assim, a obtenção de mais dados que avaliem a influência das características químicas de SH na interação com compostos orgânicos apolares é de grande valia, bem como a avaliação da influência da conformação estrutural das SH no mecanismo de interação.

Com base nestas informações, neste capítulo, foram utilizados dois compostos apolares (o fluoróforo pireno e o marcador de spin 5-SASL) para avaliar a magnitude das interações hidrofóbicas ocorridas entre estes compostos e diferentes AH, correlacionando-as com as características químicas de cada amostra. Além disto, foi analisada a ocorrência de sítios hidrofóbicos em outros componentes do solo. Como técnicas analíticas utilizou-se a supressão de fluorescência e a de marcador de spin por RPE.

5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

5.2.1 Supressão de fluorescência

5.2.1.1 Amostras utilizadas

Os AH utilizados foram descritos e caracterizados no capítulo 3. Como fluoróforo foi utilizado o pireno (PI) (Figura 5.1), obtido da Fluka, previamente recristalizado em etanol absoluto.

Figura 5.1 – Estrutura química do pireno (PI).

Foram preparadas soluções estoque de cada amostra de AH (500 mg L^{-1}) em água deionizada e dissolvidas em $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH. Preparou-se uma solução estoque de PI em metanol com uma concentração de $0,02 \text{ mmol L}^{-1}$. Posteriormente à

evaporação do solvente orgânico de um volume predefinido da solução estoque do PI, adicionou-se 3 mL de água deionizada. A concentração final de PI em solução aquosa foi de aproximadamente $0,7 \mu\text{mol L}^{-1}$, valor próximo do limite de solubilidade em água ($0,69 \mu\text{mol L}^{-1}$) (Ganaye *et al.*, 1997). Para ajuste do pH foram utilizadas soluções de HCl e NaOH. Antes da aquisição do espectro de emissão de fluorescência do PI na ausência do AH, as soluções aquosas contendo PI permaneceram em equilíbrio por trinta minutos, protegidas da luz. Posteriormente, foram adicionadas alíquotas (10 μL) das soluções estoques de AH, agitadas por um minuto e deixadas em equilíbrio por três minutos (Gauthier *et al.*, 1986; Schlautman & Morgan, 1993; Backhus *et al.*, 2003). A cada alíquota adicionada adquiria-se o espectro de emissão de fluorescência do PI. Entre cada análise fechava-se a fenda de excitação para evitar a fotodegradação do PI. A concentração final de AH em solução variou entre 0 a 10 mg L^{-1} .

5.2.1.2 Análises de fluorescência

Nas análises de emissão de fluorescência os parâmetros experimentais foram: excitação em 335 nm, varredura de 350 a 450 nm, fendas de excitação e emissão de 2,5 nm e velocidade de varredura de 60 nm min^{-1} . Foi utilizado o espectrômetro marca PerkinElmer modelo LS 50B, pertencente à Embrapa Instrumentação Agropecuária/São Carlos-SP. Como os AH absorvem tanto na região de excitação (335 nm) como da emissão (373 nm), característica esta conhecida como efeito de filtro interno (IFE, do inglês “Inner Filter Effect”), utilizou-se a equação desenvolvida por Gauthier *et al.* (1986) para correção das intensidades da fluorescência.

$$\frac{F_{corr}}{F_{obs}} = \frac{2,3dA_{ex}}{1 - 10^{-dA_{ex}}} 10^{gA_{em}} \frac{2,3sA_{em}}{1 - 10^{-sA_{em}}} \quad (5.1)$$

onde:

F_{obs} intensidade de fluorescência observada

F_{corr} intensidade de fluorescência corrigida

A_{ex} absorvância no comprimento da excitação

A_{em} absorvância no comprimento da emissão

d é o comprimento da cubeta

s é a espessura do feixe de luz de excitação

$$g = \frac{d - s}{2}$$

A Figura 5.2 mostra os dados geométricos da cubeta (d , g e s) utilizados pela equação 5.1.

Figura 5.2 – Geometria da cubeta de quartzo e as simbologias dos dados geométricos assumidos nas medidas de fluorescência para correção do IFE, I_0 representa o feixe de luz de excitação.

Para o cálculo do coeficiente de interação (K_{CO}) foi utilizada a equação 2.10 (Capítulo 2, item 2.2.1).

5.2.2 Metodologia de marcador de spin

5.2.2.1 Estudos de interações hidrofóbicas em diferentes ácidos húmicos

5.2.2.1.1 Amostras utilizadas

O marcador de spin utilizado foi o 5-SASL (Figura 4.1b). A concentração final deste marcador spin nos experimentos foi de $0,01 \text{ mmol L}^{-1}$. Os AH utilizados foram descritos e caracterizados no capítulo 3. Para a obtenção das suspensões de AH em meio aquoso, os AH (3 g L^{-1}) foram deixados sob agitação constante por 5 dias à temperatura ambiente. Estas suspensões foram obtidas a partir da utilização de soluções tamponadas (Assumpção & Morita, 1968). Os tampões utilizados foram o ácido acético/acetato (pH 4,5) e o tampão fosfato monobásico de potássio/fosfato dibásico de potássio (pH 6,5).

Para determinação do carbono orgânico dissolvido (COD) de cada suspensão de AH pelo método de oxidação, foi utilizado o equipamento marca Shimadzu modelo TOC-VCPH pertencente ao Laboratório de Química Ambiental do Instituto de Química de São Carlos-IQSC/SP. As curvas analíticas foram construídas com padrão de biftalato de potássio para análise de carbono total, e carbonato de sódio anidro e carbonato de sódio e hidrogênio para análise de carbono inorgânico. O COD foi obtido pela diferença entre o carbono total e o carbono inorgânico.

5.2.2.2 *Sítios hidrofóbicos em diferentes componentes do solo*

5.2.2.2.1 *Amostras utilizadas*

O marcador de spin utilizado foi o 5-SASL (Figura 4.1b). A concentração final deste marcador de spin nos experimentos foi de 0,01 mmol L⁻¹.

No fracionamento físico utilizou-se o solo Podzólico Vermelho Escuro (Tabela 3.1). O método usado foi o de fracionamento por sedimentação (Jackson, 1973). As frações físicas obtidas foram argila (<2 µm), fração silte (2-53 µm) e fração areia (>53 µm). Para a obtenção da suspensão da fração argila, a fração mineral utilizada para interação com o marcador de spin, utilizou-se a concentração de 3 g L⁻¹, agitada durante 5 dias.

Para a obtenção de amostra de solo contendo apenas a fração orgânica (mantendo seus constituintes orgânicos – AH, AF e humina) o solo Podzólico Vermelho Escuro foi tratado com ácido fluorídrico (HF), de acordo com o procedimento descrito por Gonçalves *et al.* (2003). Após este tratamento, para obter-se uma suspensão desta amostra, utilizou-se a concentração de 3 g L⁻¹, agitada por 5 dias.

Foi utilizada a lignina sulfonada, adquirida da Melbar, e o polissacarídeo “Blue Dextran 2000” adquirido da Pharmacia. Para a obtenção das soluções aquosas destes compostos, foi utilizada a concentração de 3 g L⁻¹, agitadas por 1 dia.

O AH utilizado foi extraído do solo Podzólico Vermelho Escuro (Tabela 3.1) e a fração de AF extraída de um Latossolo Roxo, coletado na Fazenda de Ensino e Pesquisa da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP/Campus Jaboticabal/SP. O procedimento de extração foi descrito no capítulo 3, item 3.2.2.

Como AH de origem aquática foi utilizada a amostra referência 1S101H obtida da IHSS (International Humic Substances Society).

Na preparação das amostras o pH foi ajustado utilizando solução de NaOH ou de HCl e monitorado diariamente, sendo considerada a variação máxima de $\pm 0,2$.

5.2.2.3 *Análises de RPE*

Os procedimentos para interação entre marcador 5-SASL e as amostras de interesse e os parâmetros experimentais para a obtenção dos espectros de RPE foram descritos no capítulo 4, itens 4.2.3 e 4.2.5.

Nos experimentos quantitativos realizou-se a integração dupla dos espectros de RPE (com a linha de base corrigida e subtraído o sinal do radical livre orgânico) utilizando o software WINEPR da Bruker. O valor estimado da quantidade de moléculas do marcador 5-SASL imobilizadas no AH foi obtido por meio da razão $I/(I+II)$, onde I e II, indicam a componente imobilizada e livre, respectivamente, conforme definida no capítulo 4.

Para a obtenção dos espectros simulados foi utilizado o software NLSL, com as componentes tensor magnético g obtidas de Ge *et al.* (1990). A base teórica e os algoritmos utilizados por este software estão apresentados em detalhe no trabalho de Budil *et al.* (1996).

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1 Correlação das características químicas dos ácidos húmicos com os dados fornecidos pela supressão de fluorescência e pela metodologia de marcador de spin

5.3.1.1 Supressão de fluorescência

Após análise dos espectros de emissão de fluorescência do PI na ausência e presença dos AH foi utilizada a equação de Stern-Volmer (equação 2.10) para a obtenção dos gráficos (Figura 5.3).

Figura 5.3 – Gráfico da equação de Stern-Volmer para o pireno (PI) ($0,7 \mu\text{mol L}^{-1}$) em presença de diferentes ácidos húmicos (AH). Análise realizada em pH 5,0. F_0/F é razão entre as intensidades de fluorescência (em 373 nm) na ausência e presença do AH, respectivamente.

A partir das análises dos gráficos obtidos foi determinado o coeficiente de interação (K_{CO}) entre o PI e os diferentes AH. Os resultados mostraram que os

valores obtidos de K_{CO} (Tabela 5.1) variaram de $1,57 \times 10^5 \text{ mL g}^{-1}$ a $3,27 \times 10^5 \text{ mL g}^{-1}$.

Estes valores estão próximos dos reportados na literatura para SH (Perminova *et al.*, 1999; Backhus *et al.*, 2003).

Tabela 5.1 – Valores do coeficiente de interação (K_{CO}) entre o PI e os ácidos húmicos (AH), obtidos por meio da utilização da equação de Stern-Volmer. Análises realizadas em pH 5.

Amostra de AH	$K_{CO}(\text{mL g}^{-1}) \times 10^5$
PD1	$2,11 \pm 0,10^a$
PD2	$2,35 \pm 0,10$
CM3	$2,55 \pm 0,20$
PC4	$1,77 \pm 0,10$
PD5	$1,57 \pm 0,12$
ST6	$3,27 \pm 0,17$

^a Desvios médios.

5.3.1.1.1 Correlação de K_{CO} com as características químicas dos ácidos húmicos

A Tabela 5.2 apresenta os coeficientes de correlação linear (R) entre o coeficiente interação K_{CO} e a razões atômicas O/C e H/C, razão E_4/E_6 , concentração de spins (Spins), fração aromática (f_a) e polaridade (P) dos AH. Para simplificação estes parâmetros serão definidos como “macroparâmetros”.

Tabela 5.2 – Coeficiente de correlação linear (R) entre o coeficiente de interação (K_{CO}) do PI e a razão atômica O/C e H/C, razão E_4/E_6 , concentração de spins (Spins), fração aromática (f_a) e polaridade (P) dos ácidos húmicos.

Parâmetro molecular	R ^a
O/C	-0,93
H/C	-0,95
E_4/E_6	-0,87
Spins	0,95
f_a	0,92
P	-0,88

^a As correlações são estatisticamente significantes com $p \leq 0,05$.

Pelos dados apresentados na Tabela 5.2 observa-se uma boa correlação linear entre K_{CO} e os macroparâmetros. As tendências fornecidas pela proporcionalidade (direta ou inversa) de R mostraram que quanto maior a aromaticidade e menor a polaridade, maior foi o valor de K_{CO} . Analisando os dados fornecidos por ^{13}C VACP-MAS RMN e com relação a alifaticidade, não se obteve qualquer tipo de correlação. O valor fornecido pelo ajuste linear foi de $R=0,24$. Então, com relação à influência das características químicas dos AH na interação com o PI, tem-se a seguinte tendência: quanto maior a aromaticidade e menor a polaridade, maior foi o valor de K_{CO} , não sendo observada correlação com os grupos alifáticos.

Em termos dos mecanismos de interação, é difícil afirmar a ocorrência de somente um tipo de interação e qual seria o mais importante. Estes podem ser por meio de interações hidrofóbicas, predominantemente do tipo van der Waals, devido ao caráter apolar da molécula do PI e a existência de grupos hidrofóbicos nos AH. No caso dos dipolos induzidos, a facilidade de indução depende da polarizabilidade da molécula (capacidade que os elétrons tem para responder às alterações do campo elétrico) (Solomons, 1990). Como um momento de dipolo elétrico molecular pode ser estimado por meio da soma do vetor entre as ligações, a polarizabilidade molecular pode ser estimada. Abaixo (Tabela 5.3) está o momento de dipolo elétrico de algumas ligações.

Tabela 5.3 – Momento de dipolo elétrico de algumas ligações químicas (Gauthier *et al.*, 1986).

ligação	momento de dipolo elétrico
C-C	0,64
C=C	1,66
C-H	0,65
C=O	1,16
C-Cl	2,61

Então, com o aumento do número de ligações C=C, espera-se um aumento da polarizabilidade molecular e, assim, da intensidade da interação de van der Waals entre uma molécula e outra. Como consequência disto, o aumento da aromaticidade dos AH pode aumentar a polarizabilidade molecular e aumentar a interação AH-PI (Chin *et al.*, 1997; Uhle *et al.*, 1999). Estas observações estão consistentes com as correlações encontradas neste trabalho entre K_{CO} e os dados associados à aromaticidade.

Outro possível mecanismo é do tipo doador-receptor de elétrons π , proposto recentemente por Zhu *et al.* (2004). Este mecanismo foi atribuído ao caráter doador de elétrons de compostos aromáticos, tais como o PI, e a existência de estruturas aromáticas nos AH, como os grupos semiquinona, com caráter aceitador de elétrons (Zhu *et al.*, 2004). Neste trabalho observou-se uma boa correlação com a concentração de spins (Tabela 5.2), lembrando-se que o sinal do radical livre orgânico (RLO) em SH tem sido atribuído a grupos semiquinonas. Desta forma, a possibilidade de ocorrência do mecanismo tipo doador-aceitador de elétrons π não pode ser desconsiderada.

Independente do mecanismo, a interação observada utilizando-se baixas concentrações de AH ($\leq 10 \text{ mg L}^{-1}$), corrobora com os dados de Simpson *et al.* (2004), obtidos por medidas de relaxação magnética. Isto é importante, pois em sistemas aquáticos naturais as concentrações normalmente encontradas para a matéria orgânica dissolvida estão próximas de 15 mg L^{-1} (Aiken *et al.*, 1985), sendo que as SH aquáticas contribuem com cerca de 50% do carbono orgânico dissolvido (Rocha & Rosa, 2003). Desta forma, a influência das SH deve ser considerada quando dos estudos da dinâmica de hidrocarbonetos poliaromáticos nos sistemas aquáticos naturais.

5.3.1.2 Marcador de spin

De maneira geral, foi observado comportamento espectral similar do marcador 5-SASL na presença dos diferentes AH. Os espectros de RPE consistiram de uma componente imobilizada (I) e livre (II), variando de intensidade dependendo do pH, conforme mostrado no capítulo 4, item 4.3.2.1. Os valores da razão $I/(I+II)$ não variaram significativamente entre os AH (dados não apresentados). Somente foram observadas variações significativas quando a razão $I/(I+II)$ foi normalizada pelo carbono orgânico dissolvido (COD) de cada suspensão de AH (Figura 5.4). A razão $I/(I+II)$ foi normalizada pela quantidade COD referente a cada suspensão de AH para minimizar prováveis fontes de erro. A normalização pelo COD é devida aos AH serem estruturas compostas, principalmente, por carbono. Além disso, nos estudos sobre interações com os marcadores de spin utiliza-se o sobrenadante da suspensão, e os dados obtidos no item 4.3.2.5 mostraram que a estruturação de sítios hidrofóbicos é dependente da concentração de AH em suspensão. Desta forma, a normalização pelo COD é uma maneira de minimizar possíveis variações na concentração de AH em suspensão quando da interação com o marcador de spin.

Figura 5.4 – Razão $I/(I+II)$ obtida dos espectros de RPE do marcador 5-SASL ($0,01 \text{ m mol L}^{-1}$) na presença dos ácidos húmicos (AH), pH 4,5. O valor apresentado no eixo y refere-se à razão $I/(I+II)$ normalizada pela quantidade de carbono orgânico dissolvido (COD) referente a cada amostra de AH.

Mesmo após a normalização pelo COD a variação do valor da razão $I/(I+II)$ somente foi significativa quando comparadas amostras extraídas de tipo de solos diferentes. Como as variações nas características químicas das amostras, apresentadas no capítulo 3, foram mais significativas entre as amostras extraídas de diferentes tipos de solos, esses resultados sugerem que o tipo de solo pode influenciar na dinâmica de conformação estrutural dos AH e, conseqüentemente, na quantidade de sítios hidrofóbicos menos expostos ao meio aquoso e na interação com compostos apolares.

5.3.1.2.1 *Correlação dos sítios hidrofóbicos com as características químicas dos ácidos húmicos*

A correlação entre os valores estimados de sítios hidrofóbicos, obtidos por meio da razão $(I/(I+II))/COD$ (Figura 5.4), e os parâmetros razão atômica H/C, O/C, razão E_4/E_6 , concentração de spins, f_a e P (que foram definidos como “macroparâmetros”) não forneceu valores de R significativos. A correlação com grupos funcionais obtidos por ^{13}C VACP-MAS RMN também não forneceu valores de R significativos. A única correlação linear que pode ser considerada significativa foi com os grupos polares (fenólicos, carboxílicos e carbonilas) ($R=-0,88$, $p=0,02$). Somente esta correlação não é suficiente para estabelecer uma relação entre as características químicas dos AH e os sítios hidrofóbicos. As baixas correlações sugerem que os sítios hidrofóbicos podem estar mais associados à conformação estrutural do que à composição química dos AH. Esta possível explicação é corroborada pelo trabalho de Simpson *et al.* (2003) que obtiveram baixa correlação entre os coeficientes obtidos por meio de isotermas de sorção entre o fenantreno e diferentes AH que apresentavam espectros de ^{13}C CP-MAS RMN similares. Está consistente também com os dados de Ahmad *et al.* (2001), os quais obtiveram variações significativas nos coeficientes de sorção de diferentes compostos orgânicos apolares entre solos com quantidade de grupos funcionais similares, determinado por ^{13}C CP-MAS RMN. Em ambos trabalhos (Ahmad *et al.*, 2001; Simpson *et al.*, 2003) foi sugerido que apenas as características químicas não podiam explicar os resultados obtidos, levantando a hipótese de que a conformação dos AH pode ter papel importante no processo, de acordo com o que foi sugerido neste trabalho.

5.3.2 Sítios hidrofóbicos em diferentes componentes do solo

5.3.2.1 Fração mineral e orgânica

Com objetivo de avaliar a ocorrência de interações hidrofóbicas nas frações do solo e quais as características destas frações que influenciam neste tipo de interação, foi avaliado o comportamento espectral do marcador 5-SASL na presença das frações minerais e orgânicas do solo. Os resultados destes experimentos estão apresentados na Figura 5.5.

Figura 5.5 – Espectros de RPE do marcador 5-SASL ($0,01 \text{ mmol L}^{-1}$) na presença de diferentes componentes do solo Podzólico Vermelho Escuro (3 g L^{-1}) em pH 4,5. a) fração argila; b) solo tratado com solução de ácido fluorídrico (HF) e c) ácido húmico (AH).

Os dados apresentados na Figura 5.5 mostram que para a fração argila não há evidências de imobilização do marcador de spin, pois não se observa a componente imobilizada, sugerindo que compostos orgânicos apolares não têm afinidade hidrofóbica significativa por estas superfícies minerais. As três linhas hiperfinas observadas são características do marcador com alta mobilidade; isto é confirmado pelos valores estimados de a_0 (1,58 mT) e de τ_c ($<10^{-9}$ s) (Figura 5.5a), valores estes similares aos obtidos quando o marcador está somente em água.

Com relação ao solo tratado com HF, há indícios de imobilização do marcador, devido ao alargamento espectral ocorrido na posição da linha $M_I = 0$ (Figura 5.5b). É importante salientar que os resultados obtidos com o solo tratado com HF são bastante importantes. Isto porque o tratamento do solo com HF foi feito para remover somente a fração mineral e com ela as estruturas paramagnéticas, de forma a possibilitar a análise por RPE. Desta forma, a MOS com os seus constituintes, SH (AH, AF e humina) e SnH, está mais próxima da condição em que se encontra no ambiente. Logo, há um indicativo de que no ambiente há a possibilidade de ocorrência de interações hidrofóbicas com compostos orgânicos apolares. Para o AH, há uma evidente imobilização do marcador constatada pela existência da componente imobilizada (Figura 5.5c), discutido em detalhe no capítulo 4, item 4.3.1

Há muitas diferenças nas características destas três amostras, entre elas está a quantidade de carbono, o que é listado pela Tabela 5.4.

Tabela 5.4 – Porcentagem de carbono (% C), determinada pela análise elementar, da fração argila, do solo tratado com solução de ácido fluorídrico (HF) e do ácido húmico (AH) do Podzólico Vermelho Escuro.

Amostra	% C
argila	2,5
solo tratado c/ HF	16,6
AH	49,8

Existe um paralelo entre a quantidade de MOS e a quantidade de carbono, pois, baseado em dados empíricos tem sido freqüentemente utilizado que a $MOS = 1,727 \times \%C$ (Stevenson, 1994). Desta forma, as amostras com maior porcentagem de C possuem maior quantidade de matéria orgânica. Como foi observado que a imobilização do marcador de spin foi mais evidente em presença do AH (Figura 5.5c), e este possui maior porcentagem de C, os resultados indicam a influência da MOS nas interações hidrofóbicas. Assim, quanto maior a quantidade de MOS maior foi a evidência deste tipo de interação. Estes resultados estão consistentes com dados da literatura que têm mostrado aumento de sorção de compostos apolares com o aumento do conteúdo de MOS (Schwarzenbach *et al.*, 1992; Ahmad *et al.*, 2001).

5.3.2.2 Substâncias não húmicas

Conforme mencionado no Capítulo 1, item 1.1, a MOS é composta por SH e SnH. Uma hipótese é que as SH seriam resultantes de sucessivos ataques microbianos às SnH, com posterior polimerização de produtos de decomposição e de síntese microbiana (Stevenson, 1994). Sabe-se que alguns dos componentes das SnH são carboidratos e lignina, podendo estes compostos serem possíveis precursores das SH (Schnitzer, 1991; Stevenson, 1994). No caso dos carboidratos, estes ocorrem

principalmente como polissacarídeos (Schnitzer, 1991). Recentemente, foi mostrado por Sachleben *et al.* (2004) que as SnH podem ter influência significativa na dinâmica de compostos orgânicos apolares no ambiente. Contudo, devido a enorme heterogeneidade da MOS é bastante complicada a extração de compostos totalmente isolados (Simpson *et al.*, 2004). Segundo Schnitzer (1991), no caso dos carboidratos, eles estão fortemente associados a outros compostos e sua extração não é trivial. Por estes motivos, foram utilizados compostos sintéticos. Os compostos utilizados foram o polissacarídeo “Blue Dextran” e a lignina sulfonada. A Figura 5.6 mostra os espectros de RPE do marcador 5-SASL em presença do “Blue dextran” em pH 4,5 e 6,5.

Figura 5.6 – Espectros de RPE do marcador 5-SASL ($0,01 \text{ mmol L}^{-1}$) na presença do polissacarídeo “Blue dextran” (3 g L^{-1}) em diferentes pH. a) pH 4,5 e b) pH 6,5.

Pelos resultados não se observou indício de imobilização do marcador em presença do “Blue dextran”. Este comportamento espectral do marcador de spin foi

também obtido para a lignina sulfonada (dado não apresentado), sugerindo pouca afinidade hidrofóbica do marcador 5-SASL pelos compostos analisados. Isto pode ser atribuído ao caráter hidrofílico dos compostos utilizados, decorrente da grande quantidade de grupos polares (Sagfors & Starck, 1988; Schnitzer, 1991), corroborando com a menor afinidade observada para o AF (capítulo 4, item 4.3.4), que também apresentou caráter hidrofílico. Com isto, a maior ou menor interação hidrofóbica não está relacionada apenas com a quantidade de carbono, mas também em que tipo de grupo químico ele se encontra, pois, por exemplo, os polissacarídeos contêm uma quantidade significativa deste elemento químico.

Outro dado é que os compostos utilizados são macromoléculas possuindo alta massa molar. O “Blue dextran” possui massa molar de 2000 kDa, maior que os valores normalmente encontrados na literatura para os AH (Stevenson, 1994; Piccolo, 2001). Isto sugere que a estrutura possuir grande tamanho molecular pode ser uma condição necessária, mas não suficiente, para a formação de sítios hidrofóbicos.

Os trabalhos de Lichtfouse *et al.* (1995) e Almendros *et al.* (1996) mostraram que há uma preservação seletiva do ataque microbiológico à determinadas SnH, como a lignina, sendo estas posteriormente incorporadas à MOS. Simpson (2002) sugeriu a existência de estruturas semelhantes à lignina e polissacarídeos em AH. Assim, não está excluída a possibilidade da influência das SnH nos processos de sorção de compostos orgânicos apolares, pois na MOS elas não são encontradas isoladamente. No caso dos carboidratos eles estão fortemente associados a outras estruturas presentes na MOS (Schnitzer, 1991).

5.3.2.3 *Substâncias húmicas*

O item 5.3.2.1 mostrou que houve uma forte relação entre a porcentagem de C e, conseqüentemente da quantidade de MOS, e a formação de sítios hidrofóbicos. Sendo a MOS constituída principalmente por SH (AH, AF e humina) (Schnitzer, 1991; Stevenson, 1994; MacCarthy, 2001), foi feita uma análise comparativa entre dois de seus constituintes, AH e AF. A Figura 5.7 mostra os espectros de RPE experimental e simulado do marcador 5-SASL na presença destes constituintes orgânicos.

a)

b)

Figura 5.7 – Espectros de RPE do marcador 5-SASL e seus respectivos espectros simulados na presença de diferentes substâncias húmicas. a) ácido fúlvico (AF) e b) ácido húmico (AH). As condições experimentais foram iguais (pH próximo de 4,5), exceto pelas concentrações utilizadas: AF (100 g L^{-1}) e AH (3 g L^{-1}).

A Tabela 5.5 apresenta os melhores valores obtidos na simulação para as componentes do tensor hiperfino nuclear, A_{xx} , A_{yy} , A_{zz} , das taxas de difusão rotacional, R_L , e da população do marcador em cada componente. Para facilitar o entendimento das discussões, o espectro simulado do AH será definido como

componente principal, apesar de que há duas componentes (imobilizada e livre), conforme discutido no capítulo 4.

Tabela 5.5 – Parâmetros obtidos da simulação do 5-SASL na presença do ácido fúlvico (AF) e do ácido húmico (AH)*. A_{xx} , A_{yy} e A_{zz} são as componentes do tensor hiperfino nuclear, $R_{\perp}$ a taxa de difusão rotacional e $Pop.$ é a população percentual de moléculas do marcador de spin em cada componente.

Amostra	Componente	A_{xx}	A_{yy}	A_{zz}	a_0	$R_{\perp} (s^{-1})$	Pop. (%)
AF	1	6,5	5,2	33,6	15,1	$3,8 \times 10^6$	9,4
	2	6,6	5,6	30,5	14,2	$35,5 \times 10^6$	90,6
AH	principal	6,6	5,6	33,1	15,1	$4,4 \times 10^6$	99,0

(i) Os valores das componentes do tensor magnético g utilizados para simulação foram:

$g_{xx} = 2,0086$; $g_{yy} = 2,0063$; $g_{zz} = 2,0025$ (Ge *et al.*, 1990).

(ii) As componentes do tensor A estão em Gauss.

(iii) $a_0 = (A_{xx} + A_{yy} + A_{zz})/3$.

Na Tabela 5.5 observa-se que a componente 1 do marcador 5-SASL em presença do AF e a principal em presença do AH possuem valores de a_0 iguais e valores de $R_{\perp}$ próximos, podendo-se dizer que o marcador de spin localizado nos sítios hidrofóbicos referentes a cada componente apresenta mobilidade similar. Isto sugere o marcador de spin está em um mesmo tipo de sítio em cada SH. No entanto, a quantidade de moléculas do marcador 5-SASL em cada sítio é significativamente diferente, sendo aproximadamente 10 vezes maior para o AH. Lembrando que a componente 2 está, possivelmente, associada a ocorrência de interações dipolares ou de troca entre os próprios marcadores de spin, conforme discutido no capítulo 4, item 4.3.4. No capítulo 4, foi constatada a maior dificuldade de agregação dos AF, o que foi atribuída à maior quantidade de grupos polares. A agregação foi observada somente quando foram utilizadas concentrações extremamente altas ($>>5 \text{ g L}^{-1}$). Com isto, além de necessitar uma maior concentração para formação de sítios

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
BIBLIOTECA DE DOCUMENTAÇÃO

hidrofóbicos, o AF apresenta capacidade de imobilizar menor quantidade de moléculas de marcador de spin.

5.3.3 Interação do marcador 5-SASL com ácidos húmicos de diferentes origens

Os espectros de RPE do 5-SASL na presença de AH de origens diferentes (aquática e terrestre) mostraram evidências da imobilização do marcador de spin (Figura 5.8). Embora em ambas amostras tenha sido observada a componente imobilizada, indicando a imobilização do marcador de spin nos sítios hidrofóbicos, a mesma é mais evidente para o AH de origem terrestre.

Figura 5.8 – Espectros de RPE do marcador 5-SASL ($0,01 \text{ mmol L}^{-1}$) na presença de suspensões (pH 4,5) de ácido húmico (AH) (3 g L^{-1}) de diferentes origens. a) AH de origem aquática e b) AH de origem terrestre.

Dados obtidos por ^{13}C RMN (Tabela 5.6) mostraram que o AH de origem aquática possui maior quantidade de grupos polares (carboxílicos e carbonilas) (Rocha & Rosa, 2003). A maior quantidade de grupos polares foi a explicação também dada para a menor capacidade de agregação do AF (capítulo 4), hipótese que também pode ser aplicada para o AH de origem aquática.

Tabela 5.6 – Porcentagem da área de cada agrupamento químico em relação à área total nos espectros de ^{13}C CP-MAS e VACP-MAS RMN de ácidos húmicos (AH) de diferentes origens.

Origem do AH	<i>alquil C</i>	<i>O-alquil C</i>	<i>di-O-alquil C</i>	<i>Arom C + O-Arom C</i>	<i>COO</i>	<i>CO</i>
aquática ^a	21	7	9	37	19	8
terrestre	28,9	13,3	26,6	19,7	9,8	1,5

^a Dados fornecidos pela IHSS utilizando ^{13}C CP-MAS RMN.

5.3.4 Possibilidades de aplicação da metodologia de marcador de spin para estudos de problemas ambientais

Geralmente os solos muito intemperizados, como é o caso da maioria dos solos brasileiros, são ácidos (Franchini *et al.*, 2001). Nesta situação o cátion Al^{3+} está solúvel e disponível para as plantas, causando problemas de toxidez (Quaggio, 2000). Para contornar este problema é feita a calagem, ou seja, aplicação de carbonato de cálcio (CaCO_3) ou de magnésio (MgCO_3) para elevação do pH da solução do solo. O aumento do pH deve-se à dissociação dos sais e a reação do CO_3^{2-} com a água, produzindo íons OH^- , que passam a neutralizar o Al^{3+} , tornando-o indisponível para a planta. Então, com o aumento do pH, o alumínio e a sílica geralmente não permanecem em solução, mas precipitam na forma de alumino-silicatos (ex. caulinita) ou de óxidos de Al (ex. gibsitita). Nesta reação, há liberação de íons OH^- para a solução do solo, ocorrendo o aumento do pH da solução do solo, de 4,5 para valores próximos de 6,5.

Tentando simular esta situação, utilizou-se o solo Podzólico Vermelho Escuro tratado com HF, no qual MOS está em condições de laboratório mais próxima possível da condição ambiental, e realizou-se similar variação de pH causada pela

calagem. Nestas situações foi avaliada a mobilidade do marcador 5-SASL, por meio da observação dos espectros de RPE obtidos (Figura 5.9).

Figura 5.9 – Espectros de RPE do marcador 5-SASL ($0,01 \text{ mmol L}^{-1}$) na suspensão da amostra do solo Podzólico Vermelho Escuro tratada com solução de ácido fluorídrico (HF) (3 g L^{-1}). Análise realizada após 10 minutos de interação. a) pH $\sim 4,5$ e b) pH $\sim 6,5$.

Foi observado que quando a suspensão estava em pH 4,5 houve indícios da componente imobilizada, indicando que parte das moléculas do marcador de spin estava imobilizada na MOS. Contudo, aumentando o pH de 4,5 para 6,5 houve um significativo aumento da componente livre, sendo pouco evidenciada a componente imobilizada. Os parâmetros espectroscópicos das três linhas hiperfinas associadas à componente livre foram: a_0 (1,57 mT) e τ_c ($<10^{-9} \text{ s}$), são típicos de marcador de spin com alta mobilidade. Este comportamento é atribuído às alterações da conformação estrutural dos constituintes da MOS.

Desta forma, como muitos compostos orgânicos antropogênicos (pesticidas, por exemplo) possuem características apolares, podendo estabelecer interações hidrofóbicas com a MOS, uma corriqueira calagem pode permitir a lixiviação destes

compostos no ambiente, aumentando a probabilidade de contaminação do sub-solo e de águas naturais.

Mas como corrigir pH do solo sem alterar as propriedades da MOS? Aparentemente é um problema de difícil solução, porém, uma alternativa se dá por meio da implantação do plantio direto (PD), que é um sistema com base na sustentabilidade. O princípio básico deste sistema de manejo é a permanência dos resíduos vegetais sobre o solo, o que traz duas vantagens em relação ao sistema de plantio convencional: 1) minimização da erosão e 2) aumento do aporte de carbono orgânico (CO) no solo (Bayer *et al.*, 2002). A minimização da erosão diminui a lixiviação de bases evitando o decréscimo do pH, e com o maior aporte de CO, há o aumento do conteúdo de MOS, resultando em uma maior complexação do Al^{3+} (Stevenson, 1994), diminuindo a sua biodisponibilidade para as plantas. Por estes motivos, no PD há menor necessidade de calagem. Desta forma, a implementação deste sistema de manejo, além da possibilidade de seqüestro de CO no solo (Bayer *et al.*, 2002; Palumbo *et al.*, 2004), pode minimizar os impactos ambientais associados à maior ou menor mobilidade de compostos orgânicos apolares no ambiente, ocasionadas pelas variações do pH da solução do solo, com a calagem.

Tem-se tentado obter formas de recuperação de solos contaminados com compostos orgânicos antropogênicos e, entre elas, está a utilização de surfactantes sintéticos (Chu & Chan, 2003). Baseado no comportamento surfactante observado por Guetzloff & Rice (1994) que utilizaram análises de tensão da superficial da água, Conte *et al.* (2005), propuseram a utilização de SH como surfactantes naturais e sendo uma alternativa para recuperação de solos contaminados. Os resultados obtidos neste trabalho não podem afirmar que as SH são exatamente como surfactantes que possuem estruturas organizadas (Atkins, 1998). No entanto, pode ser entendido como

um comportamento similar aos surfactantes, pois foram capazes de formar sítios hidrofóbicos, nos quais o marcador de spin foi imobilizado. Neste sentido, há possibilidade de utilização da metodologia de marcador de spin para avaliar diferenças no comportamento surfactante de AH e avaliar a eficiência da descontaminação dos solos.

Considerando apenas a hipótese de seqüestro de CO no solo pela proteção hidrofóbica (Piccolo *et al.*, 1999), a metodologia de marcador de spin mostrou que o solo com maior teor de matéria orgânica humificada (com maior teor de SH), tem maior potencial de seqüestro de CO no solo. Contudo, não são claros os mecanismos pelos quais o CO é estabilizado no solo, nem qual o grau de influência da proteção hidrofóbica, necessitando a correlação de resultados, como os obtidos por este trabalho, com dados de campo que avaliem a mineralização da MOS, como por exemplo, o fluxo de gases (CO₂) liberados pelo solo.

5.4 CONCLUSÕES

Pela supressão de fluorescência foi obtido o coeficiente de interação (K_{CO}) entre o PI e os AH extraídos de diferentes tipos de solos sob diferentes sistemas de manejo. A correlação entre K_{CO} com as características químicas das amostras forneceu bons valores para o coeficiente de correlação linear (R) com a aromaticidade, sugerindo a predominância de interações por meio de forças de van der Waals.

Da metodologia de marcador de spin não se obteve correlação entre o valor estimado para os sítios hidrofóbicos com as características químicas das amostras.

Assim, os resultados sugerem que os sítios hidrofóbicos podem estar mais associados à conformação estrutural do que à composição química dos AH.

A metodologia de marcador de spin permitiu avaliar a formação de sítios hidrofóbicos em outros componentes do solo. Para a fração argila (composta por caulinita) não foi observada a componente imobilizada, que indica a formação de sítios hidrofóbicos. A amostra de solo tratada com HF mostrou indícios da existência destes sítios. Comparando-se os resultados destas amostras com os resultados obtidos com o AH, observou-se que para este último houve significativa formação de sítios hidrofóbicos. Para as amostras com maior teor de carbono mais evidente foi a formação de sítios hidrofóbicos, confirmando a influência da MOS na interação com compostos orgânicos apolares.

Nos estudos utilizando o polissacarídeo “Blue Dextran” e a lignina sulfonada, não foi observado pelos espectros de RPE o marcador 5-SASL imobilizado nestes dois compostos. Isto sugere não ter havido afinidade hidrofóbica significativa entre o marcador 5-SASL e os compostos, o que foi atribuído ao carácter hidrofílico destes compostos. Estes dados corroboram com os resultados obtidos para o AF, onde a maior dificuldade na formação de sítios hidrofóbicos foi atribuída ao seu carácter hidrofílico.

Dados simulados mostraram que o marcador 5-SASL em presença do AF e do AH apresenta valores de a_0 iguais e valores de $R_{\perp}$ próximos, podendo-se dizer que o marcador de spin localizado nos sítios hidrofóbicos referentes a cada SH apresenta mobilidade similar. Isto sugere o marcador de spin está em um mesmo tipo de sítio em cada SH. No entanto, a quantidade de moléculas do marcador 5-SASL em cada SH é significativamente diferente, sendo aproximadamente 10 vezes maior para o AH. Com isto, além de necessitar uma maior concentração para formação de sítios

hidrofóbicos, o AF apresenta capacidade de imobilizar menor quantidade de moléculas de marcador de spin.

Foram apresentadas algumas possibilidades de aplicação da metodologia de marcador de spin em questões ambientais. Uma situação avaliada, foi a calagem, que tem como objetivo diminuir acidez do solo. Com a calagem, normalmente o pH da solução do solo é elevado de 4,5 para 6,5. Realizando esta mesma variação de pH em uma amostra cuja matéria orgânica está mais próxima da condição em que se encontra no solo (amostra de solo tratada com HF), foi observado o aumento da mobilidade do marcador de spin com o aumento do pH. O maior grau de mobilidade do marcador de spin foi atribuído a possíveis alterações nas características conformacionais da amostra. Desta forma, é possível que uma corriqueira calagem pode influir na dinâmica de pesticidas apolares, favorecendo a lixiviação e aumentando a probabilidade de contaminação do subsolo e águas naturais.

CONCLUSÕES GERAIS

Utilizando diferentes marcadores de spin (TEMPO, 5-SASL, 16-SASL e 5-MSSL), detectáveis por Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE), foi possível avaliar que as interações estabelecidas com o ácido húmico (AH) são predominantemente hidrofóbicas. Os resultados obtidos por simulação espectral mostraram quantitativamente a forte imobilização dos marcadores de spin nos sítios hidrofóbicos menos expostos ao meio aquoso (internos) do AH, com a taxa de difusão rotacional (R_L) decrescendo de 10^9 s^{-1} na água para 10^6 s^{-1} na presença do AH.

Com relação à conformação estrutural foi observado que esta, depende, além do pH, da concentração iônica do meio e da concentração de AH. Em $\text{pH} \leq 5$ a conformação menos expandida favorece a estruturação de sítios hidrofóbicos internos. Em $\text{pH} > 5$ a conformação mais expandida dificulta a estruturação destes sítios hidrofóbicos. A influência do pH na dinâmica de estruturação de sítios hidrofóbicos sugere que a conformação estrutural é influenciada predominantemente por ligações de hidrogênio entre grupos funcionais do AH. Além disto, a influência do pH se dá pela alteração na quantidade de íons carboxilatos (COO^-) oriundos da dissociação dos grupos carboxílicos (COOH), cujo pK_a está em torno de 5. A influência da concentração iônica deve-se à diminuição da repulsão eletrostática por meio da neutralização das cargas negativas oriundas dos COO^- . Os experimentos com variação da concentração de AH e do marcador de spin sugeriram que a formação de agregados húmicos ocorre principalmente devido à associação de várias estruturas húmicas menores.

Dos resultados obtidos por meio da supressão de fluorescência do pireno, observou-se que a interação do pireno dependeu das características químicas das amostras de AH. A boa correlação obtida entre a aromaticidade (fornecida pela análise elementar, espectroscopia de UV-visível, de RPE e de ^{13}C VACP-MAS RMN) e o coeficiente de interação (K_{CO}), sugeriu a predominância de interações por meio de forças de van der Waals. Por meio da metodologia de marcador de spin não se obteve correlação entre o valor estimado para os sítios hidrofóbicos com as características químicas das amostras de AH. Com isto, os resultados obtidos sugeriram que os sítios hidrofóbicos podem estar mais associados à conformação estrutural do que à composição química das amostras de AH.

A metodologia de marcador de spin permitiu avaliar a formação de sítios hidrofóbicos em alguns componentes do solo. Para a fração argila (composta por caulinita) não foi observada a componente imobilizada, que indica a formação de sítios hidrofóbicos, sugerindo não haver afinidade hidrofóbica significativa por esta fração mineral. A amostra de solo tratada com HF mostrou indícios da existência destes sítios. A utilização da amostra de solo tratada com HF é importante, pois indica a possibilidade de ocorrência de interações hidrofóbicas no ambiente. Isto porque, a matéria orgânica desta amostra está mais próxima de como ela se encontra no solo. As diferenças na imobilização do marcador foram atribuídas aos diferentes teores de carbono. Para o AF somente foi observada a imobilização do marcador de spin quando utilizadas concentrações extremamente altas ($>>5 \text{ g L}^{-1}$). Comparando-se os resultados destas amostras com os resultados obtidos com o AH, observa-se que para este último há maior facilidade de formação de sítios hidrofóbicos. As diferenças na imobilização do marcador foram atribuídas às diferenças no caráter hidrofílico. Isto sugere que solos com maior teor de matéria orgânica humificada

podem ter maior capacidade de estabelecer interações hidrofóbicas com outros compostos orgânicos.

Ambientalmente, a ocorrência de sítios hidrofóbicos menos expostos ao meio aquoso é de extrema importância, pois podem ser excelentes sítios de sorção para pesticidas apolares. Soma-se a isto, o fato de que os solos brasileiros, por serem bastante intemperizados, normalmente são ácidos, com o pH da solução do solo próximo de onde os sítios hidrofóbicos foram detectados.

Simulando situações que podem ocorrer no ambiente, foi observado, por meio da metodologia de marcador de spin, que a ação do homem sobre o solo pode causar impactos ambientais que devem ser considerados. Pelos dados obtidos foi possível inferir que a calagem, que tem por objetivo alterar o pH da solução do solo, pode influenciar na mobilidade de compostos orgânicos antropogênicos, favorecendo a lixiviação e aumentando a probabilidade de contaminação do sub-solo e águas naturais.

TRABALHOS FUTUROS

- Utilizar diferentes marcadores de spin com o grupo nitróxido em diferentes posições na cadeia alifática para obter informações sobre a estrutura (forma e perfil de polaridade) dos sítios hidrofóbicos e, avançar nas análises por simulação;
- Realizar estudos para avaliação de saturação de sítios hidrofóbicos (processo competitivo) utilizando marcadores de spin e pesticidas com características apolares;
- Fazer medidas de tempo de relaxação (T_1 e T_2) por ^1H RMN no estado líquido para avaliação de interações do tipo doador-aceitador de elétrons;
- Utilizar RMN uni e bidimensional em estado líquido para caracterização das amostras de AH para posterior correlação com os dados obtidos pela metodologia de marcador de spin;
- Analisar sítios hidrofóbicos em amostras de AH com uma variabilidade maior com relação às características químicas (aromaticidade, polaridade e alifaticidade);
- Correlacionar a quantidade de sítios hidrofóbicos em AH com dados de campo (fluxo de CO_2) para avaliação da proteção hidrofóbica como um mecanismo de diminuição da mineralização da MOS.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMAD, R.; KOOKANA, R.S.; ALSTON, A.M.; SKJEMSTAD, J.O. The nature of soil organic matter affects the sorption of pesticides. *Environ. Sci. Technol.*, v.35, p.878-884, 2001.
- AIKEN, G.R.; McKNIGHT, M.D.; WERSHAW, R.L.; MacCARTHY, P. *Humic substances in soil, sediment and water – Geochemistry, isolation and characterization*. New York, Wiley, 1985. 680p.
- ALMENDROS, G.; GUADALIX, M.E.; GONZALEZ-VILA, F.J.; MARTIN, F. Preservation of aliphatic macromolecules in soil humins. *Org. Geochemistry*, v.24, n.6-7, p.651-659, 1996.
- ANDRIULLO, A.E.; GALANTINI, J.; PECORARI, C.; TORIONI, E. Organic soil material in the Pampas of Argentina. *Agrochimica*, v.34, n.5-6, p.475-489, 1990.
- ARAÚJO, A.B.; ROSA, A.H.; ROCHA, J.C.; ROMÃO, L.P.C. Distribuição de metais e caracterização das constantes de troca entre espécies metálicas e frações húmicas aquáticas de diferentes tamanhos moleculares. *Quím. Nova*, v.25, 2002.
- ASSUMPÇÃO, R.M.V.; MORITA T. *Manual de soluções, reagentes e solventes*. São Paulo : Edgard Blucher, 1968. 627p.
- ATKINS, P.W. 1998. *Physical chemistry*. 6.ed. Oxford , Oxford University Press.
- AVENA, M.J.; KOOPAL; L.K. Kinetics of humic acid adsorption at solid-water interfaces. *Environ. Sci. Technol.*, v.33, p.2739-2744, 1999.
- AVENA, M.L.; WILKINSON, K.J. Disaggregation kinetics of a peat humic acids: mechanism and pH effects. *Environ. Sci. Technol.*, v.36, p.5100-5105, 2002.
- BAFFA, O.; TABAK, M.; NASCIMENTO, O.R.; RUGGIERO, J. On the interaction of small molecules with hemoproteins – sperm whalw myoglobin. *Nuovo Cimento*. 5D, p.516-526, 1985.
- BAKER, A.; SPENCER, R.G.M. Characterization of dissolved organic matter from source to sea using fluorescence and absorbance spectroscopy. *Sci. Total Environ.*, v.333, n.1-3, p.217-232, 2004.
- BACKHUS, D.A.; GOLINI, C.; CASTELLANOS, E. Evaluation of fluorescence quenching for assessing the importance of interactions between nonpolar organic pollutants and dissolved organic matter. *Environ. Sci. Technol.*, v.37, n.20, p.4717-4723, 2003.
- BAYER, C.; MARTIN-NETO, L.; SAAB, S.C.; MIELNICZUK, J. Interferência da fração mineral na estimativa do grau de humificação da matéria orgânica em agregados organominerais por ressonância paramagnética eletrônica. *R. Bras. Ci. Solo*, v.24, p.11-17, 2000.
- BAYER C.; MARTIN-NETO, L.; MIELNICZUK, J.; CERETTA, C.A. Effect of no-till cropping systems on soil organic matter in a sandy clay loam Acrisol from Southern Brazil monitored by electron spin resonance and nuclear magnetic resonance. *Soil Till. Res.*, v.53, n.2, p.95-104, 2000a.
- BAYER, C.; MARTIN-NETO, L.; MIELNICZUK, J.; SAAB, S.daC.; MILORI, D.M.P.; BAGNATO, V.S. Tillage and cropping system effects on soil humic acid characteristics as determined by electron spin resonance and fluorescence spectroscopies. *Geoderma*, v.105, n.1-2, p.81-92, 2002.
- BAYER, C.; MIELNICZUK, J.; MARTIN-NETO, L.; ERNANI, P.R. Stocks and humification degree of organic matter fractions as affected by no-tillage on a subtropical soil. *Plant Soil*, v.238, n.1, p.133-140, 2002.

- BEARE, M. H.; HENDRIX, P. F.; COLEMAN, D. C. Water-stable aggregates and organic matter fractions in conventional- and no-tillage soils. *Soil Sci. Soc. A. J.*, v.58, p.777-786, 1994a.
- BEARE, M. H.; CABRERA, M. L.; HENDRIX, P. F.; COLEMAN, D. C. Aggregate-protected and unprotected organic matter pools in conventional- and no-tillage soils. *Soil Sci. Soc. A. J.*, v.58, p.787-795, 1994b.
- BRAVARD, S.; RIGHI, D. Characterization of fulvic and humic acids from an oxisol spodosol toposequence of Amazonia, Brazil. *Geoderma*, v.48, n.1-2, p.151-162, 1991.
- BROWN, G.K.; CABANISS, S.E.; MACCARTHY, P.; LEENHEER, J.A. Cu(II) binding by a pH-fractionated fulvic acid. *Analyt. Chim. Acta*, v.402, n.1-2, p.183-193, 1999.
- BUDIL, D.E.; LEE, S.; SAXENA, S.; FREED, J.H. Nonlinear-least-squares analysis of slow-motion EPR spectra in one and two dimensions using a modified levenberg-marquardt algorithm, *J. Magn. Reson.*, v.120, p.155-189, 1996.
- BUFFLE, J.A.E. In: Conference Proceeding de la Commission d' Hydrologie Applique de l' A.G.H.T.M., l' Universit d'Orsay, pp.3-10, 1977.
- BURDON, J. Are the traditional concepts of structures of humic substances realistic? *Soil Sci.*, v.66, n.11, p.752-769, 2001.
- BUURMAN, P.; van LAGEN, B.; PICCOLO, A. Increase in stability against thermal oxidation of soil humic substances as a result of self association. *Org. Geochem.*, v.33, p.367-381, 2002.
- CAMERON, R.S.; THORNTON, B. K.; SWIFT, R. S. e POSNER A.M. Molecular weight and shape of humic acid from sedimentation and diffusion measurements on fractionated extracts. *J. Soil Sci.*, v.23, p.395-408, 1972a.
- CAMPBELL, I.D.; DWEK, R.A. *Biological spectroscopy*. Menlo Park, Benjamin/Cumming, 1984. 404p.
- CANTOR, C.R.; SCHIMMEL, P.R. Techniques for the study of biological structure and function. In: CANTOR, C.R. (ed.). *Biophysical chemistry*. New York, Freeman, 1980. v.2, cap.7.
- CHEFETZ, B.; DESHMUKH, A.P.; HATCHER, P. Pyrene sorption by natural organic matter. *Environ. Sci. Technol.*, v.34, p.2925-2930, 2000.
- CHESHIRE, M.V.; McPAHIL., D.B. Hyperfine splitting in the electron spin resonance solution spectra of humic substances. *European. J. Soil Sci.*, v.47, p.205-213, 1996.
- CHEN Y.; SCHNITZER M. Scanning electron-microscopy of a humic-acid and of a fulvic-acid and its metal and clay complexes. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, v.40, p.682-686, 1976.
- CHEN, Y.; SENESI, N.; SCHNITZER, M. Information provide on humic substances by E₄/E₆ ratios. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, v.41, p.352-358, 1977.
- CHIEN, Y-Y.; KIM, E-G.; BLEAM W.F. Paramagnetic relaxation of atrazine solubilized by humic micelar solutions. *Environ. Sci. Technol.*, v.31, p.3204-3208, 1997.
- CHIN, Y.P.; AIKEN, G.R.; O'LOUGHLIN, E. Binding of pyrene to aquatic and commercial humic substances: the role of molecular weight and aromaticity. *Environ. Sci. Technol.*, v.31, p.1630-1635, 1997.
- CHIOU, C. T.; McGRODDY, S. E.; KILE, D. E. Partition characteristics of polycyclic aromatic hydrocarbons on soils and sediments. *Environ. Sci. Technol.*, v.32, n.2, p. 264-269, 1998.

- CHRISTL, I.; KNICKER, H.; KÖGEL-KNABER, I.; KRETZSCHMAR, R. Chemical heterogeneity of humic substances: characterization of size fractions obtained by hollow-fibre ultrafiltration. *Eur. J. Soil Sci.*, v.51, p.617-625, 2000.
- CHUN, W.; KWAN, C.Y. Remediation of contaminated soil by a solvent/surfactant system. *Chemosphere*, v.53, p.9-15, 2003.
- CITADINI, A.P.S.; PINTO, A.P.A.; ARAÚJO, A.P.U.; NASCIMENTO, O.R.; COSTA-FILHO, A.J. EPR studies of clorocatechol 1,2-dioxygenases: evidence of ion reduction during catalysis and of the binding of amphipatic molecules. *Bio. J.*, v.88, p.3502-3508, 2005.
- CLAPP, C.E.; HAYES, M.H.B. Characterization of humic substances isolated from clay- and silt-sized fractions of a corn residue-amended agricultural soil. *Soil Sci.*, v.164, n.12, p.899-913, 1999.
- CLAPP, C.E.; HAYES, M.H.B. Sizes and shapes of humic substances. *Soil Sci.*, v.164, n.12, p.777-789, 1999.
- CONTE, P.; PICCOLO, A. Conformational arrangement of dissolved humic substances: influence of solution composition on association of humic molecules. *Environ. Sci. Technol.*, v.33, p.1682-1690, 1999.
- CONTE, P.; ZENA, A.; PILIDIS, G.; PICCOLO, A. Increased retention pf polycyclic aromatic hydrocarbons in soils induced by soil treatment with humic substances. *Environ. Poll.*, v.112, p.27-31, 2001.
- CONTE, P.; SPACCINI, R.; PICCOLO, A. Distribution of a C-13-labelled hydrophobic tracer over humic fractions of different size and composition. *Fresenius Environ. Bulletin*, v.13, n.3B, p.238-243, 2004.
- COSTA-FILHO, A. J.; SHIMOYAMA, Y.; FREED, J. H. A 2D-ELDOR study of the liquid ordered phase in multilamellar vesicle membranes. *Biophys. J.*, v.84, p.2619-2633, 2003.
- da SILVA, W.T.L.; da SILVA, S.C.; REZENDE, M.O.D. Influence of gamma-radiation on the behavior of humic acids from peat and tropical soil. *J. Radioanalytical Nuclear Chem.*, v.222, n.1-2, p.29-34, 1997.
- DAI, K.H.; JOHNSON C.E. Applicability of solid-state ¹³C CP/MAS NMR analysis in Spodosols: chemical removal of magnetic materials. *Geoderma*, v.93, p.289-310, 1999.
- DIALLO, M.S.; SIMPSON A.; GASSMAN, P.; FAULON, J.L.; JOHNSON, J.H.; GODDARD, W.A.; HATCHER, P.G. 3-D Structural modeling of humic acids through experimental characterization, computer assisted structure elucidation and atomistic simulations. *Environ. Sci. Technol.*, v.37, p.1783-1793, 2003.
- DICK, D.P.; GONÇALVES, C.N.; DALMOLIN, R.S.D.; KNICKER, H.; KLAMT, E.; KÖGEL-KNABNER, I.; SIMÕES, M.L.; MARTIN-NETO, L. Characteristics of soil organic matter of different Brazilian Ferralsols under native vegetation as a function of soil depth. *Geoderma*, v.124, p.319-333, 2005.
- DRAGUNOV C.C.; ZHELOKKOVTSEVA, H.H.; STRELKOVA, E.J. A comparative study of soil and peat humic acid. *Pochvovedenie*, v.7, p.409-420, 1948.
- DUARTE, B.B.O.; SANTOS, E.B.H., DUARTE, A.C. Spectroscopy characteristic of ultrafiltration fractions of fulvic and humic acids from an eucalyptus bleached Kraft pulp mill effluent. *Water Res.*, v.37, p.4073-4080, 2003.

- DUXBURY, J.M.; SMITH, M.S.; DORAN, J.M. Soil organic matter as a source and a sink of plant nutrients. In: COLEMAN, D.C.; OADES, J.M.; UEHARA, G. *Dynamics of soil organic matter in tropical ecosystems*. Honolulu, University of Hawaii, 1989, p.33-67.
- ENGEBRETSON, R. R.; von WANDRUSZKA, R. Kinetic aspects of cation-enhanced aggregation in aqueous humic acids. *Environ. Sci. Technol.*, v.32, n.4, p.488-493, 1998.
- FERREIRA, J.A.; NASCIMENTO, O.R.; MARTIN-NETO, L. Hydrophobic interactions between spin-label 5-SASL and humic acid as revealed by ESR spectroscopy. *Environ. Sci. Technol.*, v.35, p.761-765, 2001.
- FERREIRA, J.A. Caracterização de sítios hidrofóbicos em substâncias húmicas e interações com pesticidas determinados por espectroscopia, microscopia e polarografia. São Carlos, 2002. 200p. Tese (Doutorado) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo.
- FERREIRA, J.A.; MARTIN-NETO L.; VAZ, C.M.P.; REGITANO, J.B. Sorption interactions between imazaquin and a humic acid extracted from a typical Brazilian Oxisol. *J. Environ. Qual.*, v.31, n.5, p.1665-1670, 2002.
- FRANCHINI, J.C.; MEDA, A.R.; CASSIOLATO, M.E.; MIYAZAWA, M.; PAVAN, M.A. Potencial de extratos de resíduos vegetais na imobilização de calcário no solo por método biológico. *Scientia Agr.*, v.58, p.357-360, 2001.
- FISCHER, F.; SCHRADER, H. The origin and chemical structure of coal. *Brennstoff Chem.*, v.2, p.37-45, 1921.
- FLAIG, W. The chemistry of humic substances. In: *The use of isotopes in soil organic matter studies*. New York, Pergamon, 1966. p.103-127.
- FUCHS, W. *Die Chemie der Kohle*. Berlin, Springer. 1931.
- FRANK, H.S.; EVANS, M.W. Free volume and entropy in condensed systems. III. Entropy in binary liquid mixture, partial molar entropy in dilute solutions; structure and thermodynamics in aqueous electrolytes. *J. Chem. Phys.*, v.13, p.507-532, 1945.
- GANAYE, V. A.; KEIDING, K.; VOGEL, T. M.; VIRIOT, M.-L.; BLOCK, J.-C. Evaluation of soil organic matter polarity by pyrene fluorescence spectrum variations. *Environ. Sci. Technol.*, v.31, n.10; p.2701-2706, 1997.
- GAUTHIER, T.D.; SHANE, E.C.; GUERIN; W.F.; SEITZ, W. R.; GRANT, C.L. Fluorescence quenching method for determining equilibrium constants for polycyclic aromatic hydrocarbons binding to dissolved humic materials. *Environ. Sci. Technol.*, v.20, n.11, p.1162-1166, 1986.
- GAUTHIER, T.D.; GUERIN, W.F.; SEITZ, W.R.; GRANT, C.L. Effects of structural and compositional variations of dissolved humic materials on pyrene Koc values. *Environ. Sci. Technol.*, v.21, p.243-248, 1987.
- GE, M.; RANANAVARE, S.B.; FREED, J.H. ESR studies of acid stearic acid binding to bovine serum albumin. *Biochim. Biophys. Acta*, v.1036, p.238-236, 1990.
- GHOSH, K.; SCHNITZER, M. Macromolecular structures of humic substances. *Soil Sci.*, v.129, p.266-276, 1980.
- GONDAR, D.; LOPEZ, R.; FIOL, S.; ANTELO, J.M.; ARCE, F. Characterization and acid-base properties of fulvic and humic acids isolated from two horizons of an ombrotrophic peat bog. *Geoderma*, v.126, p.367-374, 2005.

- GONÇALVES, C.N.; DALMOLIN, R.S.D.; DICK, D.P.; KNICKER H.; KLAMT, E.; KOGL-KNABNER, I. The effect of 10% HF treatment on the resolution of CPMAS ^{13}C NMR spectra and on the quality of organic matter in Ferralsols. *Geoderma*, v.116, p.373-392, 2003.
- GUETZLOFF, T.F.; RICE, J.A. Does humic acid form a micelle? *J. A. Sci. Total Environ.* v.152, p.31-35, 2003.
- GUNASEKARA, A.; SIMPSON, M. J.; XING, B. Identification and characterization of sorption domains in soil organic matter using structurally modified humic acids. *Environ. Sci. Technol.*, v. 37, p.852-858, 2003.
- HAYES M.H.B.; CLAPP, C.E. Humic substances: considerations of compositions, aspects of structures, and environmental influences. *Soil Sci.*, v.166, p.723-737, 2001.
- HAITZER, M.; HOSS, S.; TRANSPURGER, W.; STEINBERG, C. Relationship between concentration of dissolved organic matter (DOM) and the effect of DOM on the bioconcentration of benzo[a]pyrene. *Environ. Toxicol.*, v.45, n.2-3, p.147-158, 1999.
- HEVIA, G.; BUSCHIAZZO, D.E.; HEPPER, E.N.; URIOSTE, A.M.; ANTON, E.L. Organic matter in size fractions of soils of the semiarid Argentina. Effects of climate, soil texture and management. *Geoderma*, v.116, n.3-4, p.265-277, 2003.
- HU, W.G.; MAO, J.; XING, B.; SCHMIDT-ROHR, K. Poly(methylene) crystallites in humic substances detected by nuclear magnetic resonance. *Environ. Sci. Technol.*, v.34, p.530-534, 2000.
- HUR, J.; SCHLAUTMAN, M.A. Using selected operational descriptors to examine the heterogeneity within a bulk humic substance. *Environ. Sci. Technol.*, v.37, p.880-887, 2003.
- HUR, J.; SCHLAUTMAN, M. A. Influence of humic substance adsorptive fractionation on pyrene partitioning to dissolved and mineral-associated humic substances. *Environ. Sci. Technol.*, v.38, n.22, p.5871-5877, 2004.
- IPCC, 2001: *Climate Change 2001: The Scientific Basis*. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA, 881pp.
- ISRAELACHVILI, J. Intermolecular and surface forces. 2ed. London : Academic, 1991. 450p.
- JACKSON, M.L. *Soil Chemistry Analysis Advanced Course*. 2.ed. Madison, WI, 1973.
- JONES, G.; INDIG, G.L. Spectroscopic and chemical binding properties of humic acids in water. *New J. Chem.*, v.20, n.2, p.221-232, 1996.
- KRASOVITSKII, B.M.; BOLOTIN, B.M. *Organic luminescent materials*. Weinheim:VCH, 1987. 340 p.
- KAISER, E.; SIMPSON, A.J.; DRIA, K.J.; SULZBERGER, B.; HATCHER, P.G. Solid-state and multidimensional solution-state NMR of soil phase extracted and ultrafiltered riverine dissolved organic matter. *Environ. Sci. Technol.*, v.37, p.2929-2935, 2003.
- KILE, D.E.; CHIOU, C.T. Water solubility enhancements of DDT and trichlorobenzene by some surfactants below and above the critical micelle concentration. *Environ. Sci. Technol.*, v.23(7), p.832-838, 1999.
- KNICKER, H.; ALMENDROS, G.; GONZALES-VILA, F.-J., MARTIN, F.; LUDEMANN, H.D. ^{13}C and ^{15}N -NMR spectroscopic examination of the transformation of organic nitrogen in plant biomass during thermal treatment. *Soil Bio. Biochem.*, v.28, p.1053-1060, 1996.

- KNOWLES, P.F.; MARSH, D.; RATTLE, H.W.E. *Magnetic resonance of biomolecules*. John Wiley & Sons, New York, 1976. 343p.
- KÖGEL-KNABNER, I.; ZECH, W.; HATCHER, P.G. Chemical structural studies of forest soil humic acids: aromatic carbon fraction. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, v.55, p.241-247, 1991.
- KONONOVA, M.M. Soil organic matter. Its nature, its role in soil formation and in soil fertility. New York, Pergamon Press, 1961.
- KOOPAL, L.K.; van RIEMSDIJK, W.H.; KINNIBURGH, D.G. Humic matter and contaminants. General aspects and modeling metal ion binding. *Pure Appl. Chem.*, v.73, n.12, p.2005-2016, 2001.
- KOPINKE, F.-D.; GEORGI, A.; MACKENZIE, K. Sorption of pyrene to dissolved humic substances and related model polymers. 1. structure-property correlation. *Environ. Sci. Technol.*, v.35, p.2536-2542, 2001.
- KRASOVITSKII, B. M.; BOLOTIN, B. M. *Organic luminescent materials*. Weinheim:VCH, 340 p., 1987.
- LAKOWICZ, J.R. *Principles of fluorescence spectroscopy*. New York : Kluwer Academic/Plenum 2nd ed. 698 p. 1999.
- LAL, R.; KIMBLE, J.M. Conservation tillage for carbon sequestration. *Nut. Cycl. Agroecosys.*, v.49, p.243-253, 1997.
- LAL, R. Soil carbon dynamics in cropland and rangeland. *Environ. Poll.*, v.116, p.353-362, 2002.
- LAL, R. Soil carbon sequestration impacts on global climate change and food security. *Science*, v.304, 2004.
- LEAD, J.R.; WILKINSON, K.J.; STARCHEV, K.; CANONICA, S.; BAFFLE, J. Determination of diffusion coefficients of humic substances by fluorescence correlation spectroscopy: Role of solution conditions. *Environ. Sci. Technol.*, v.34, p.1365-1369, 2000.
- LEINWEBER, P.; FRÜND, R.; REUTER, G. A ^{13}C -NMR study on the formation of soil organic matter from grass residues. *Z. Pflanzenernähr. Bodenk.*, v.156, p.415-420, 1993.
- LI, L.; ZHAO, Z.Y.; HUANG, W.L.; PENG, P.; SHENG, G.Y.; FU, J.M. Characterization of humic acids fractionated by ultrafiltration. *Org. Geochem.*, v.35, p.1025-1037, 2004.
- LICHTFOUSE, É.; DOU, S.; GIRARDIN, C.; GRABLY, M.; BALESSENT, J.; BEHAR, F.; VANDENBROUCKE, M. Unexpected ^{13}C -enrichment of organic components from wheat crop soils: evidence for the *in situ* origin of soil organic matter. *Org. Geochem.*, v.23, p.865-868, 1995.
- MACCARTHY, P. The Principles of humic substances. *Soil Sci.*, v.166, n.11, p.738-751, 2001.
- MAILLARD, L.C. Synthesis of humus-like substances by the interaction of amino acids and reducing sugars. *Ann. Chim. Phys.*, v.5, p.258-317, 1916.
- MANNING, T.J.; BENNETT, T.; MILTON, D. Aggregation studies of humic acid using multiangle laser light scattering. *Sci. Total Environ.*, v.257, n.2-3, p.171-176, 2000.
- MAO, J.-D.; XING, B.; SCHMIDT-ROHR, K. New structural information on a humic acid from two-dimensional ^1H - ^{13}C correlation solid-state nuclear magnetic resonance. *Environ. Sci. Technol.*, v.35, p.1928-1934, 2001.

- MAO, J.-D.; HUNDAL, L.S.; THOMPSON, M.L.; SCHMIDT-ROHR, K. Correlation of poly(methylene)-rich amorphous aliphatic domains in humic substances with sorption of a nonpolar organic contaminant, phenanthrene. *Environ. Sci. Technol.*, v.36, p.929-936, 2002.
- MARTIN-NETO, L.; NASCIMENTO, O.R.; TALAMONI, J.; POPPI, N.R. EPR of micronutrients-humic substance complexes extracted from brazilian soil. *Soil Sci.*, v.151, p.369-376, 1991.
- MARTIN-NETO, L.; SPOSITO, G.; VIEIRA, E.M. Mechanism of atrazine sorption by humic acids: a spectroscopy study. *Environ. Sci. Technol.*, v.28, n.11, p.1867-1873, 1994a.
- MARTIN-NETO, L.; ANDRIULLO, A. E.; TRAGHETTA, D. G. Effects of cultivation on ESR spectra of organic matter from soil size fractions of a mollisol. *Soil Sci.*, v.157, p.365-372, 1994b.
- MARTIN-NETO, L.; ROSELL, R.; SPOSITO, G. Correlation of spectroscopic indicators of humification with mean annual rainfall along a temperate grassland climosequence. *Geoderma*, v.81, n.3-4, p.305-311, 1998.
- MARTIN-NETO, L.; TRAGHETTA, D.G.; VAZ, C.M.P.; CRESTANA, S. On the interaction mechanisms of atrazine and hydroxyatrazine with humic substances. *J. Environ. Qual.*, v.30, n.2, p.520-525, 2001.
- McPHIE, P. Enzyme purification and related techniques: dialysis. In: JACOBY, W.B., (ed.). *Methods in enzymology*. New York, Academic Press, 1971. v.22, cap.14.
- MEHRING, M. Principles of high resolution NMR in solids. 2nd. Springer:New York, 1983. 342p.
- NAMJESNIK-DEJANOVIC, K.; MAURICE, P.A.; AIKEN, G.R.; CABANISS, S.; CHIN, Y.P.; PULLIN, M.J. Adsorption and fractionation of a muck fulvic acid on kaolinite and goethite at pH 3.7, 6, and 8. *Soil Sci.*, v.165, n.7, p.545-559, 2000.
- NASCIMENTO, O.R. DMPG gel-fluid thermal transition monitored by a phospholipid spin labeled at the acyl chain end. *Chem. Phys. Lip.*, v.124, p.69-80, 2003.
- NOVOTNY, E.H. Estudos espectroscópicos e cromatográficos de substâncias húmicas de solos sob diferentes sistemas de preparo. São Carlos, 2002. 215p. Tese (Doutorado) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo.
- NOVOTNY, E. H.; MARTIN-NETO, L. Effects of humidity and metal ions on the free radicals analysis of peat humus. *Geoderma*, v.106, p.305-317, 2002.
- OADES, J.M.; GILLMAN, G.P.; UEHARA, G. Interaction of soil organic matter and variable charge clays. In: COLEMAN, D.C.; OADES, J.M.; UEHARA, G. *Dynamics of soil organic matter in tropical ecosystems*. Honolulu, University of Hawaii, 1989. cap.3, p.69-95.
- OHNISHI, S.; McCONNELL, H.M. Interaction of the radical ion of chlorpromazine with deoxyribonucleic acid. *J. Am. Chem. Soc.*, v.87, p.2293, 1965.
- OLK, D.C.; BRUNETTI, G.; SENESI, N. Decrease in humification of organic matter with intensified lowland rice cropping: a wet chemical and spectroscopic investigation. *Soil Science Society of America Journal*, v.64, p.1337-1347, 2000.
- PERMINOVA, I.V.; GRECHISHCHEVA, N.Y.; KOVALEVSKII, D.V.; KUDRYAVTSEV, A.V.; PETROSYAN, V.S.; MATORIN, D.N. Quantification and prediction of the detoxifying properties of humic substances related to their chemical binding to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environ. Sci. Technol.*, v.35, n.19, p.3841-3848, 2001.

- PAJACZKOWSKA, J.; SULKOWSKA, A.; SULKOWSKI, W.W.; JEDRZEJCZYK, M. Spectroscopy study of the humification process during sewage sludge treatment. *Journal of Molecular Structure*, v.651-653, p.141-149, 2003.
- PALUMBO, A.V.; MCCARTHY J.F.; AMONETTE, J.E.; FISHER, L.S.; WULLSCHLEGER, S.D.; DANIELS, W.L. Prospects for enhancing carbon sequestration and reclamation of degraded lands with fossil-fuel combustion by-products. *Adv. Environ. Res.*, v.8, p.425-438, 2004.
- PEERSEN, O. B.; WU, X.; KUSTANOVICH, I.; SMITH, S.O. Variable-amplitude cross-polarization MAS NMR. *J. Magn. Reson. A.*, v.104, p.334-339, 1993.
- PEREZ, M.G.; MARTIN-NETO, L.; SAAB, S.C.; NOVOTNY, E.H.; MILORI, D.M.B.P.; BAGNATO, V.S.; COLNAGO, L.A.; MELO, W.J.; KNICKER, H. Characterization of humic acids from a Brazilian Oxisol under different tillage systems by EPR, C-13 NMR, FTIR and fluorescence spectroscopy. *Geoderma*, v.118, n.3-4, p.181-190, 2004.
- PERMINOVA, I.V.; GRECHISHCHEVA, N.Y.; PETROSYAN, V.S. Relationship between structure and binding affinity of humic substances for polycyclic aromatic hydrocarbons: relevance of molecular descriptors. *Environ. Sci. Technol.*, v.33, p.3781-3787, 1999.
- PICCOLO A.; ZACCHEO, P.; GENEVINI, P.G. Chemical characterization of humic substances extracted from organic-waste-amended. *Soils Bioresour. Technol.*, v.40, n.3, p.275-282, 1992.
- PICCOLLO, A.; CELANO, G.; DE SIMONE, C. Interactions of atrazine with humic substances of different origins and their hydrolyzed products. *Sci. Total Environ.*, v.117/118, p.403-412, 1992.
- PICCOLO, A. Humus and soil conservation, In: Piccolo, A. (ed.). *Humic Substances in terrestrial ecosystems*. Elsevier, Amsterdam, 1996, p.225-264.
- PICCOLO, A.; NARDI, S.; CONCHERI, G. Macromolecular changes of humic substances induced by interaction with organic acids. *Eur. J. Soil Sci.*, v.47, p.319-328, 1996a.
- PICCOLO, A.; NARDI, S.; CONCHERI, G. Micelle-like conformation of humic substances as revealed by size exclusion chromatography. *Chemosphere*, v.33, p.595-602, 1996b.
- PICCOLO, A.; CONTE, P.; SCHEUNERT, I.; PACI, M. Atrazine interactions with soil humic substances of different molecular structure. *J. Environ. Qual.*, v.27, p.1324-1333, 1998.
- PICCOLO, A.; MBAGWU, J.S.C. Role of hydrophobic components of soil organic matter in soil aggregate stability. *Soil. Sci. Soc. Am. J.*, v.63, p.1801-1810, 1999.
- PICCOLO, A.; SPACCINI, R.; HABERHAUER, G.; GERZABECK, M. H. Increased sequestration of organic carbon in soil by hydrophobic protection. *Naturwissenschaften*, v.86, p.496-499, 1999.
- PICCOLO, A. The supramolecular structures of humic substances. *Soil Sci.*, v.166, p.810-832, 2001.
- PICCOLO, A. The supramolecular structure of humic substances: A novel understanding of humus chemistry and implications in soil science. *Adv. Agron.*, v.75, p.57-134, 2002.
- PICCOLO, A.; CONTE, P.; SPACCINI, R.; MBAGWU, J. S. C. Influence of land use on the characteristics of humic substances in some tropical soils of Nigeria. *Euro. J. Soil Sci.*, v.56, p.343-353, 2005.

- POOLE Jr., C. P. *Electron spin resonance: a comprehensive treatise on experimental techniques*. New York, Wiley-Interscience, 1967. 921p.
- POOLE, C. P. & FARACH, H.A. *Theory of magnetic resonance*. New York, Wiley-Interscience, 1987. 359p.
- PRESTON, C.M. Applications of NMR to soil organic matter analysis: history and prospects. *Soil Sci.*, v.161, p.144-166, 1996.
- QUAGGIO, J.A. *Acidez e calagem em solos tropicais*. Campinas – Instituto Agrônomo de Campinas/IAC, 2000. 111p.
- PRUSKI, M.; Dela ROSA, L.; GERSTEIN, B.C. Effect of sample spinning on detection of ^{13}C NMR in coals. *Energy and Fuels*, v.4, p.160-165, 1990.
- RAGLE, C.S.; ENGBRETSON, R.R.; von WANDRUSZKA, R. The sequestration of hydrophobic micropollutants by dissolved humic acids. *Soil Sci.*, v.162, n.2, p.106-114, 1997.
- RAN, Y.; XING, B.; RAO, P. S. C.; FU, J. Importance of adsorption (hole-filling) mechanism for hydrophobic organic contaminants on an aquifer kerogen isolate. *Environ. Sci. Technol.*, v.38, p.4340-4348, 2004.
- REBHUN, M.; MEIR, S.; LAOR, Y. Using dissolved humic acid to remove hydrophobic contaminants from water by complexation-flocculation process. *Environ. Sci. Technol.*, v.32, n.7, p.981-986, 1998.
- RICE, J.A.; MacCARTHY, R. Statistical evaluation of the elemental composition of humic substances. *Org. Geochem.*, v.17, p.635.
- RIFFALDI, R.; SCHNITZER, M. Electron spin resonance spectrometry of humic substances. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, v.36, p.301-305, 1972.
- ROCHA, J.C.; ZARA L.F.; ROSA, A.H.; SARGENTINI, E.; BURBA, P. Humic substances: A sequential device for fractionation by ultrafiltration with molecular size basis. *Quím. Nova*, v.23, n.3, p.410-412, 2000.
- ROCHA, J.C.; ROSA, A.H. Substâncias húmicas aquáticas: interações com espécies metálicas. Editora UNESP, 120p, 2003.
- ROSA, A.H.; ROCHA, J.C.; SARGENTINI JR., É. A flow procedure for extraction and fractionation of humic substances from soils. In: SWIFT, R.S., SPARK, K.M. (Ed.) *Understanding and managing organic matter in soils, sediments, and waters*. New York: International Humic Substances Society, 2001, p.41-46.
- ROSA, A.H.; SIMÕES, M.L.; de OLIVEIRA, L.C.; ROCHA, J.C.; MARTINETO, L.; MILORI, D.M.B.P. Multimethod study of degree humification of humic substances extracted from different tropic soils profiles in Brazil's Amazonian region. *Geoderma*, 2005, no prelo.
- RUTHERFORD, D.W.; CHIOU, C.T.; KILE, D.E. Influence of soil organic matter composition on the partition of organic compounds. *Environ. Sci. Technol.*, v.26, n.2, p.336-340, 1992.
- SACHLEBEN, J.R.; CHEFETZ, B.; DESHMUKH, A.; HATCHER, P.G. Solid-state NMR characterization of pyrene-cuticular matter interactions. *Environ. Sci. Technol.*, v.38, p.4369-4376, 2004.
- SAGFORS, P.-E.; STARCK, B. High molar mass lignin in bleached kraft pulp mill effluents. *Wat. Sci. Technol.*, v.20, p.49-58, 1988.
- SALLOUM, M. J.; CHEFETZ, B.; HATCHER, P. G. Phenanthrene sorption by aliphatic-rich natural organic matter. *Environ. Sci. Technol.*, v.36, p.1953-1958, 2002.

- SARGENTINI Jr., E.; ROCHA, J.C.; ROSA, A.H.; ZARA, L.F.; SANTOS, A. Substâncias húmicas aquáticas: fracionamento molecular e caracterização de rearranjos internos após complexação com íons metálicos. *Quim. Nova*, v.24, n.3, p.339-344, 2001.
- SCHLAUTMAN, M.; MORGAN, J.J. Effects of aqueous chemistry on the binding of polycyclic aromatic hydrocarbons by dissolved humic materials. *Environ. Sci. Technol.*, v.27, p.961-969, 1993.
- SCHLESINGER, W.H. Biogeochemistry. An analysis of global change. 2. ed. San Diego, Academic. 1997.
- SCHNITZER, M.; KHAN, S.U. Humic substances in the environment. New York, Marcel Dekker. 1972.
- SCHNITZER, M. Humic Substances: Chemistry and Reactions. In: SCHNITZER, M.; KHAN, S.U. (Ed.). *Soil Organic Matter*. Elsevier. 1978.
- SCHNITZER, M.; LEVESQUE, M. Electron spin resonance as a guide to the degree of humification of peats. *Soil Sci.*, v.127, n.3, p.140-145, 1979.
- SCHNITZER, M. Soil organic matter – the next 75 years. *Soil Sci.*, v.151, n.1, 1991.
- SCHULTEN, h.-r.; SCHNITZER, M. A state of the art structural concept for humic substances. *Naturwissenschaften*, v.80, p.29-30, 1993.
- SCHULTEN, H.R.; SCHNITZER, M. Three-dimensional models for humic acids and soil organic matter. *Naturwissenschaften*, v.82, p.487-498, 1995.
- SCHULTEN H.-R.; SCHNITZER, M. Chemical model structures for soil organic matter and soils. *Soil Sci.*, v.162, n.2, p.115-130, 1997.
- SCHWARZENBACH, R.P.; GSCHWEND, P.M. IMBODEN, D.M. *Environmental Organic Chemistry*, J. Willey, 1992. 681p.
- SENESE, N.; TESTINI, C.; MIANO, T.M. Interaction mechanisms between humic acids of different origin and nature and electron donor herbicides: a comparative IR and ESR study. *Org. Geochem.*, v.11, n.1, p.25-30, 1987.
- SENESE, N. Application of electron spin resonance (ESR) spectroscopy in soil chemistry. *Adv. Soil. Sci.*, v.14, p.77-130, 1990.
- SENESE, N. Binding mechanisms of pesticides to soil humic substances. *Sci. Total Environ.*, v.123/124, p.63-76, 1992.
- SENESE, N.; D'ORAZIO, V.; MIANO, T.M. Adsorption mechanisms of s-triazine and bipyridylum herbicides on humic acids from hop field soils. *Geoderma*, v.66, p.273-283, 1995.
- SENESE, N.; RIZZI, F.R.; DELLINO, P. E.; ACQUAFREDDA, P. Fractal dimension of humic acids in aqueous suspension as a function of pH and time. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, v.60, p.1773-1780, 1996b.
- SENESE, N.; RIZZI, F.R.; DELLINO, P.; ACQUAFREDDA, P. Fractal humic acids in aqueous suspensions at various concentrations, ionic strengths, and pH values. *Colloids Surfaces A-Physicochemical Engineering Aspects*, v.127, n.1-3, p.57-68, 1997.
- SIMPSON, A. J.; KINGERY, W.L.; SHAW, D.R.; SPRAUL, M.; HUMPFER, E.; DVORTSAK, P. The application of ¹H HR-MAS NMR spectroscopy for the study of structures and associations of organic components at the solid-aqueous interface of a whole soil. *Environ. Sci. Technol.*, v.35, p.3321-3325, 2001.
- SIMPSON, A.J.; KINGERY, W.L.; SWAW, D.R.; SPRAUL, M.; HUMPFER, E.; DVORTSAK, P. Molecular structures and associations of humic substances in the terrestrial environment. *Naturwissenschaften*, v.89, p.84–88, 2002.

- SIMPSON, A.J. Determining the molecular weight, aggregation, structures and interactions of natural organic matter using diffusion ordered spectroscopy. *Magn. Reson. Chem.*, v.40, p.S72-S80, 2002.
- SIMPSON, M.J.; CHEFETZ, B.; HATCHER, P.G. Phenanthrene sorption to structurally modified humic acids. *J. Environ. Qual.*, v.32, n.5, 2003.
- SIMPSON, M.J.; SIMPSON, A.J.; HATCHER, P.G. Noncovalent interactions between aromatic compounds and dissolved humic acid examined by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Environ. Toxicol. Chem.*, v.23, n.2, p.355-362, 2004.
- SIMPSON, A.J.; TSENG, L.H.; SIMPSON, M.J.; SPRAUL, M.; BRAUMANN, U.; KINGERY, W.L.; KELLEBER, B.P.; HAYES, M.H.B. The application of LC-NMR and LC-SPE-NMR to compositional studies of natural organic matter. *Analyst*, v.129, p.1216-1222, 2004.
- SINGER, L. S. Synthetic ruby as a secondary standard for the measurement of intensities in electron paramagnetic resonance. *J. Appl. Phys.*, v.30, p.1463-1464, 1959.
- SOLLINS, P.; HOMANN, P.; CALDWELL, B.A. Stabilization and destabilization of soil organic matter: mechanisms and controls. *Geoderma*, v.74, p.65-105, 1996.
- SOLOMONS, T.W.G. *Fundamentals of organic chemistry*. 3.ed. New York, Wiley, 1990. 968p.
- SPACCINI, R.; PICCOLO, A.; CONTE, P.; HABERHAUER, G.; GERZABEK, M.H. Increased soil organic carbon sequestration through hydrophobic protection by humic substances. *Soil Biol. Biochem.*, v.34, n.12, p.1839-1851, 2002.
- SPOSITO, G.; MARTIN NETO, L.; YANG, A. Atrazine complexation by soil humic acids. *J. Environ. Qual.*, v.25, p.1203-1209, 1996.
- STEELINK, C. Elemental characteristics of humic substances. In: AIKEN, G.R.; McKNIGHT, D.M.; WERSHAW, R.L.; MacCARTHY, P., Eds., *Humic Substances in soil, sediment and water*, John Wiley, New York, pp.457-476, 1985.
- STEVENSON, F. J. *Humus chemistry: genesis, composition, reactions*. 2. ed. New York: J. Wiley, 1994. 496p.
- STONE, T.J.; BUCKMAN, T.; NORDIO, P.L.; McCONNELL, H.M. Spin labeled biomolecules. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, v.54, p.1010-1017, 1965.
- STOUT, J.D.; GOH, K.M.; RAFTER, T.A. 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. 1985. v.5, p.1-73.
- SWIFT, R.S. Fractionation of soil humic substances. In: AIKEN, G.R.; McKNIGHT, D.M.; WERSHAW, R.L.; MacCARTHY, P. (eds.). *Humic substances in soil, sediment and water: Geochemistry, isolation and characterization*. New York, Wiley & Sons, p.387-408, 1985.
- SWIFT, R.S. Molecular weight, size, shape, and charge characteristics of humic substances: Some basic considerations, In: HAYES, M.H.B.; MacCARTHY, P.; MALCOM, R.L.; SWIFT, R.S. (eds.). *Humic Substances*. Chichester, Wiley, 1989, p.449-466.
- SWIFT, R.S. Macromolecular properties of soil humic substances: Fact, fiction, and opinion. *Soil Sci.*, v.164, n.11, p.790-802, 1999.
- TANFORD, C. *The hydrophobic effect: formation of micelles and biological membranes*. New York, John Wiley & Sons. 1973. 200p.

- TATE, K.R.; THENG, B.K.G. Organic matter and its interactions with inorganic soil constituents. In: THENG, B.K.G. (ed). *Soils with variable charge*. Palmerston North, New Zealand Society of soil Science, 1980. p.225-249.
- THENG, B.K.G.; TATE, K.R.; SOLLINS, P. Constituents of organic matter in temperate and tropical soils. In: COLEMAN, D.C.; OADES, J.M.; UEHARA, G. *Dynamics of soil organic matter in tropical ecosystems*. Honolulu, University of Hawaii, 1989. cap.1, p.5-32.
- TRAGHETTA, D.G. *Estudos de mecanismos de reação da atrazina e hidroxia-trazina com substâncias húmicas por técnicas espectroscópicas e polarografia*. São Carlos, 1997. 188p. Tese (Doutorado) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo.
- TRAINA, S.J.; NOVAK, J.; SMECK, N.E. An ultraviolet absorbance method of estimating the percent aromatic carbon content of humic acids. *J. Environ. Qual.*, v.19, n.1, p.151-153, 1990.
- THURMAN, E.M.; MALCOLM, R.L. Preparative isolation of aquatic substances. *Environ. Sci. Technol.*, v.15, p.463-466, 1981.
- TOMBÁČZ, E. Colloidal properties of humic acids and spontaneous changes of their colloidal state under variable solution conditions. *Soil Sci.*, v.64, n.11, p.814-824, 1999.
- UHLE, M.E.; CHIN, Y.P.; AIKEN, G.R.; DIANE, M.M. Binding of polychlorinated biphenyls to aquatic humic substances: the role of substrate and sorbate properties on portioning. *Environ. Sci. Technol.*, v.33, p.2715-2718, 1999.
- VARGA, B.; KISS, G.; GALAMBOS, I.; GELENCSE, A.; HLAVAY, J.; KRIVACSY, Z. Secondary structure of humic acids. Can micelle-like conformation be proved by aqueous size exclusion chromatography?. *Environ. Sci. Technol.*, v.34, p.3303-3306, 2000.
- VIEIRA, E.M.; PRADO, D.O.; LANDGRAF, A.G.S.; REZENDE, M.O.D. Study of adsorption desorption of herbicide 2,4D in soil. *Quim. Nova*, v.22, n.3, p.305-308, 1999.
- VISSER, S.A. A physico-chemical study of the properties of humic acids and their changes during humification. *J. Soil Sci.*, v.15, p.202-219, 1964.
- WANDRUSZKA, von R. The micellar model of humic acid: evidence from pyrene fluorescence measurements. *Soil Sc.*, v.163, p.921-930, 1998.
- WEBER, J.B.; WEED, S.B.; WARD, T.M. Adsorption of s-triazines by soil organic matter. *Weed Sci.*, v.17, p.417-421, 1969.
- WEIL, J. A.; BOLTON, J. R.; WERTZ, J.E. *Electron paramagnetic resonance: elementary theory and practical applications*. New York: Willey, 1994. 568 p.
- WERSHAW, R. L.; AIKEN, G. R. Molecular size and weight measurements of humic substances. In AIKEN, G.R.; McKNIGHT, D.M.; WERSHAW, R.L.; MacCARTHY, P. (eds.). *Humic substances in soil, sediment and water: Geochemistry, isolation and characterization*. New York, John Wiley & Sons, p. 477-492, 1985.
- WERSHAW, R.L. A new model for humic materials and their interactions with hydrophobic organic chemicals in soil-water or sediment-water systems. *J. Contam. Hydrol.*, v.1, 29-45, 1986.
- WERSHAW, R.L. Model for humus in soils and sediments. *Environ. Sci. Technol.*, v.27, p.814-816, 1993.
- WERSHAW, R.L. Molecular aggregation of humic substances. *Soil Sci.*, v.164, n.11, p.803-813, 1999.

- WIDOM, B.; BHIMALAPURAM P.; KOGA, K. The hydrophobic effect. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, v.5, p.3085-3093, 2003.
- WILSON, M.A. *NMR techniques and applications in geochemistry and soil chemistry*. Oxford, Pergamon Press.1987.
- WILSON, M.A. Application of nuclear magnetic resonance spectroscopy to organic matter whole soils. In: MacCARTHY, P.; CLAP, C.E.; MALCOLM, R.L.; BLOOM, P.R., (Eds). *Humic substances in soil and crop sciences*; Selected Readings. Madison, American Society of Agronomy and Soil Science Society of America.1990. p.221-260.
- WONG, S.; HANNA, J.V.; KING, S.; CARROLL, T.J.; ELDRIDGE, R.J.; DIXON, D.R.; BOLTO, B.A.; HESSE, S.; ABBT-BRAUN, G.; FRIMMEL, F.H. Fractionation of natural organic matter in drinking water and characterization by ^{13}C cross polarization magic-angle spinning NMR spectroscopy and size exclusion chromatography. *Environ. Sci. Technol.*, v.36, n.16, p.3497-3503, 2002.
- WRIGGLESWORTH, J.M. Biochemical research techniques. A practical introduction. New York, J. Wiley, 1983. 79-117pp.
- XING, B.; MCGILL, W.B.; DUDAS, M.J. Cross-correlation of polarity curves to predict partition coefficient of nonionic organic contaminants. *Environ. Sci. Technol.*, v.28, p.1929-1933, 1994.
- ZHU, D.; HYUN, S.; PIGNATELLO, J.J.; LEE, L.S. Evidence for π - π electron donor-acceptor interactions between π -donor aromatic compounds and π -acceptor sites in soil organic matter through pH effects on sorption. *Environ. Sci. Technol.*, v.38, p.4361-4368, 2004.
- ZECH, W.; SENESI, N.; GUGGENBERG, G.; KAISER, K.; LEHMANN, J.; MIANO, T. M.; MILTNER, A. & SCHROTH, G. Factors controlling humification and mineralization of soil organic matter in the tropics. *Geoderma*, 79:117-161, 1997.