

## Caracterização da matéria orgânica do solo

---

Etelvino Henrique Novotny

Luciano Pasqualoto Canellas

Luiz Alberto Colnago

A matéria orgânica ambiental é o elo entre a biosfera, geosfera, hidrosfera e atmosfera sendo, portanto, fundamental para a sustentabilidade do ecossistema. Estimativas da massa total de carbono orgânico do solo variam de  $1,22 \times 10^{18}$  g de carbono a  $2,46 \times 10^{18}$  g de carbono, esse reservatório, que excede a quantidade em todos os demais reservatórios superficiais, interage com a atmosfera e afeta seu conteúdo em  $\text{CO}_2$ .

O conteúdo de carbono estocado no solo corresponde a 3 ou 4 vezes a quantidade de carbono na biomassa assim sendo, ações que visem aumentar o estoque de carbono no solo são mais efetivas e factíveis que alterações no conteúdo de biomassa. Adicionalmente, como será visto a seguir, um aumento do conteúdo de carbono no solo aumenta sua fertilidade, especialmente em condições tropicais, e com isso o conteúdo de biomassa vegetal que esse solo é capaz de suportar em um ciclo virtuoso.

Tendo em vista a magnitude dos diferentes estoques e fluxos, fica claro a importância da matéria orgânica do solo no ciclo global do carbono e no planejamento de estratégias que visem mitigar as emissões antrópicas.

Dentre os diversos componentes do solo a matéria orgânica desempenha papel primordial na qualidade deste. Isso decorre da influência que a quantidade e qualidade da matéria orgânica exercem sobre as propriedades físicas, químicas e biológicas dos solos. Dentre essas propriedades destacam-se efeitos na melhoria e estabilidade de agregados, diminuição da plasticidade, aumento da capacidade de retenção de água, aumento da capacidade de troca de cátions (CTC) e participação essencial na respiração microbiana de determinadas espécies. Adicionalmente a matéria orgânica é, geralmente, o principal sítio de sorção para agrotóxicos e metais traços no solo, tanto micronutrientes como tóxicos. Esses efeitos são particularmente importantes nos solos tropicais, naturalmente ácidos e cuja fração mineral é composta principalmente de argilas de atividade baixa.

E para um melhor entendimento dessas importantes propriedades, quer seja sua estabilidade no ambiente, como sua reatividade e serviços ecossistêmicos que a matéria orgânica do solo presta, é necessário caracterizá-la e conhecer sua composição e funcionalidades.

Porém, é importante entender a dinâmica da matéria orgânica do solo como um equilíbrio dinâmico em um sistema aberto. Desta forma, a característica química da matéria orgânica do solo é apenas uma imagem momentânea de um estado estacionário para este sistema e um importante indicador das propriedades ambientais. Por se tratar de uma mistura complexa de todos os compostos encontrados nos organismos vivos (seus precursores) em diferentes estágios de transformação, obviamente não há uma estrutura química única da matéria orgânica do solo, nem das suas frações húmicas, como não há, por exemplo, uma estrutura, ou molécula de petróleo, isso pode ser um pouco frustrante para alguns dos nossos colegas Químicos, que se sentem mais confortáveis com um modelo molecular dos seus objetos de estudo, mas por outro lado é estimulante e desafiador entender e interpretar sua composição tendo sempre em mente todo o processo que a originou.

Assim, se um sistema apresenta uma entrada contínua de matéria orgânica fresca (biomassa), a microbiota do solo irá consumir preferencialmente as frações mais lábeis (por exemplo: carboidratos, proteínas etc.), e as frações "menos palatáveis" (os compostos recalcitrantes e aqueles hidrofóbicos, por exemplo: estruturas aromáticas policondensadas e ácidos graxos de cadeia longa) tendem a ser preservados. No entanto, se o equilíbrio do solo for perturbado, por exemplo, pelo corte

da floresta e mudança no uso da terra, e resultar em uma diminuição na entrada de matéria orgânica fresca, a comunidade microbiana primeiro esgotará a fração lábil e, então, será sucedida por uma comunidade adaptada para consumir materiais mais recalcitrantes. Da mesma forma, o tempo de residência de um material que antes era de longo, poderá ser reduzido. Por causa desse papel central da matéria orgânica do solo na qualidade do solo e de toda essa complexidade, essa necessidade de se compreender o processo e não apenas o objeto, que é tão apaixonante o estudo da matéria orgânica do solo e as ferramentas aqui apresentadas são algumas das mais poderosas neste intuito.

## A. TÉCNICAS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA APLICADAS NO ESTUDO DA MATÉRIA ORGÂNICA DO SOLO

Etelvino Henrique Novotny

Luiz Alberto Colnago

### 1. CONCEITOS BÁSICOS

#### 1.1. O momento magnético das partículas atômicas e o fenômeno de ressonância magnética

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

Esse momento magnético é quantizado, ou seja, só pode existir em certos valores discretos, definidos pelo número quântico de spin ( $m_s$ )<sup>5</sup> que indica a projeção (componente) desse momento magnético,  $S_z$ , em um eixo arbitrário. Na ausência de um campo magnético esses dipolos magnéticos estarão alinhados aleatoriamente e os diferentes estados de spin ( $m_s = \pm 1/2$ ) serão equivalentes em energia, ou seja, degenerados. Porém, na presença de um campo magnético externo, cuja direção é definida como sendo a direção do eixo z de coordenadas cartesianas, eles assumirão diferentes orientações distinguidas pelo número quântico  $m_s$ , sendo uma delas, de menor energia, paralela ao campo magnético e outra, de maior energia, antiparalela. Os estados de spin de menor energia são  $m_s = +1/2$  para os núcleons e  $m_s = -1/2$  para o elétron. A diferença dos sinais para os estados de menor energia é devida à carga negativa do elétron.

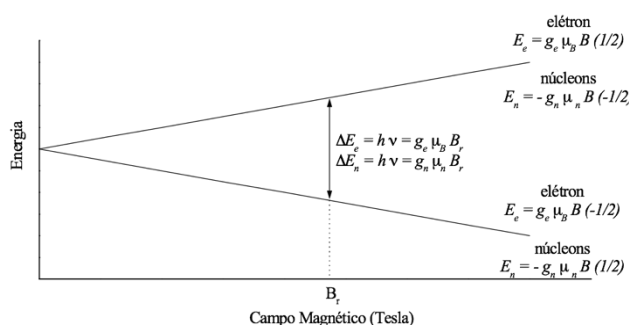
A interação do momento magnético da partícula com o campo magnético levará, segundo as regras da mecânica quântica, a um diagrama energético cuja energia da partícula será restrita a certos valores discretos definidos pelos seus respectivos números quânticos. Esses níveis energéticos são dados pela relação:

$$E = \pm g \mu B m_s \quad (\text{Equação 1})$$

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

---

<sup>5</sup> Optou-se por indicar o número quântico de spin como  $m_s$  tanto para o elétron como para os núcleons, porém é comum encontrar-se a notação  $m_e$  para o elétron e  $m_n$  para os núcleons.



**Figura 1.** Remoção da degenerescência dos estados de spins por um campo magnético (efeito Zeeman). Os índices “e” e “n” referem-se ao elétron e aos núcleons, respectivamente.

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

$$\Delta E = g \mu B \quad (\text{Equação 2})$$

Essa separação aumenta linearmente com o aumento de  $B$  (Figura 1). Transições de dipolo magnético entre os dois estados de spins ocorrem quando se faz incidir, perpendicularmente ao  $B$ , radiação eletromagnética cujos fótons possuem energia  $h\nu$  igual a  $\Delta E$ , onde  $h$  é a constante de Planck ( $6,6260755 \cdot 10^{-34}$  J s) e  $\nu$  é a frequência da radiação incidente, como mostrado a seguir:

$$h\nu = \Delta E = g \mu B_r \quad (\text{Equação 3})$$

Essa equação representa a condição de ressonância num experimento de ressonância magnética e  $B_r$  é o campo magnético em que ocorre esse fenômeno (Figura 1). Assim pode-se atingir a condição de ressonância variando-se a frequência da radiação incidente ou o campo magnético externo.

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

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

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

## 1.2. Tempos de relaxação

Se a partícula promovida ao nível de maior energia retornasse ao seu estado fundamental emitindo radiação não seria possível detectar a absorção líquida de energia, pois cada fóton absorvido seria reemitido. Existem, porém, acoplamentos entre os spins e o meio atômico circundante que possibilitam a transferência de energia sem a emissão de um fóton durante a transição do spin de volta para o nível inferior. Esse processo é denominado de relaxação spin-rede, e possui um decaimento exponencial com uma constante de tempo característico ( $T_1$ ) dependente dos acoplamentos existentes (Coelho-Neto, 1992). A rede refere-se a outros átomos na molécula e outras moléculas, incluindo o solvente quando for o caso. A taxa de transição do nível de menor energia para o de maior energia não pode exceder a taxa de relaxação de volta para o estado fundamental, pois, nesse caso, haverá a saturação do sistema (Senesi, 1990). Pode haver relaxação também pela transferência de energia de um spin para outro, que é conhecida como relaxação spin-spin. Nesse caso, a relaxação spin-spin também tem um decaimento exponencial com uma constante de tempo característico  $T_2$  e a largura de uma linha espectral é inversamente relacionada a  $T_2$ . Na ausência de saturação, quanto maior a taxa de relaxação ou seja menor  $T_2$ , mais larga será a linha espectral (Weil et al., 1994), perdendo-se resolução e até mesmo impossibilitando o registro do espectro pois pelo Princípio da Incerteza,  $\Delta E \Delta t = h/2\pi$ , se o tempo de relaxação for muito pequeno ( $\Delta t \rightarrow 0$ ), as linhas de ressonância ficarão muito largas ( $\Delta E \rightarrow \infty$ ), e não sairão da linha base (não serão percebidas). Isso frequentemente ocorre com os compostos de coordenação inorgânicos. Nesse caso também a diminuição da temperatura da amostra pode ser efetiva pois isso acarretaria um aumento dos tempos de relaxação. Em certos casos, com íons de metais de transição, opta-se por adquirir o espectro em temperaturas de N<sub>2</sub> ou mesmo He líquidos (77 K e 4,2 K, respectivamente).

### 1.3. Regras de seleção

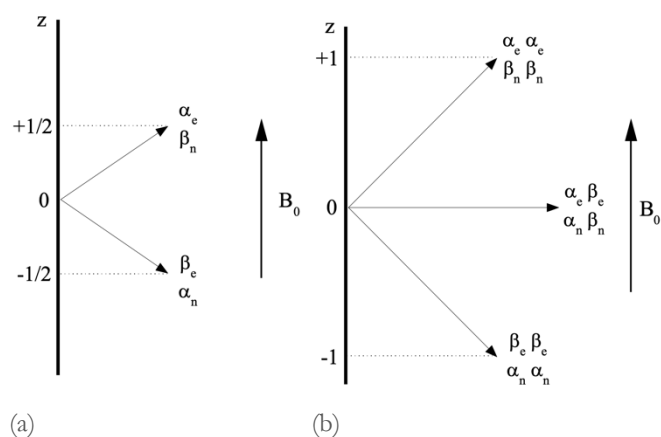
As condições para que a matéria absorva radiação eletromagnética estão sumariadas nas regras de seleção. As transições que são possíveis, de acordo com essas regras, são chamadas de permitidas, enquanto as transições que não obedecem a essas regras são chamadas de proibidas. É importante ressaltar que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

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

### 1.4. O spin total resultante

Em sistemas atômicos e moleculares não mais do que dois elétrons podem ocupar um dado orbital espacial e quando dois elétrons ocupam um mesmo orbital seus números quânticos de spin ( $m_s$ ) sempre terão sinais opostos, ou seja, esses elétrons estarão emparelhados tendo seus spins antiparalelos, o que é expresso pelo *Princípio de Exclusão de Pauli*. Nesse caso o momento magnético de cada elétron cancela o outro, resultando que orbitais completos não são efetivos quanto ao spin-magnetismo e logo apenas quando, no mínimo um orbital da espécie química possuir um elétron desemparelhado, essa espécie química poderá servir de sonda de RPE. Em se tratando de elétrons e núcleons, a soma dos spins desemparelhados de dada espécie é o spin total resultante sendo representado por  $S$  no caso de spin eletrônico e  $I$  no nuclear.

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



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

### 1.5. Interações magnéticas

A condição de ressonância dada pela Eq. (3) depende de constantes próprias da partícula em questão ( $g$  e  $\mu$ ) e do  $B$ , porém o campo magnético efetivo ( $B_{efet}$ ) a que determinada partícula é submetida não é necessariamente apenas o  $B$  aplicado. Adicionalmente a esse podem existir campos magnéticos locais ( $B_{local}$ ), decorrentes de outras interações magnéticas, que se somam vetorialmente ao  $B$  para produzir o  $B_{efet}$  que age sobre a partícula. Devido a isso, a condição de ressonância dada pela Eq. (3) ocorrerá em um valor de  $B$  diferente daquele para a partícula livre ou haverá o desdobramento da linha de ressonância em multipletos. Exemplos de  $B_{local}$  são os decorrentes do movimento orbital dos elétrons e do momento magnético das demais partículas. De fato, se não houvesse essas interações os espectros de RPE e RMN limitar-se-iam apenas a uma linha simples com  $g$  igual ao valor da partícula livre não fornecendo quaisquer informações a respeito do átomo ou molécula ao qual essa partícula dotada de momento magnético pertence. Na prática essas interações produzem uma multiplicidade de fascinantes e úteis fenômenos observáveis pela RMN e RPE (Weil et al., 1994).

### 1.5.1. A energia Zeeman

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

$$h\nu = \Delta E = g_n \mu_n (1-\sigma) B \quad (\text{Equação 4})$$

onde  $\sigma$  é chamada de constante de blindagem cujo valor é da ordem de  $10^{-6}$ . O grau de blindagem depende da densidade de elétrons ao redor do núcleon em questão. Com isso o núcleon serve como uma sonda para o ambiente químico (densidade eletrônica) em que está inserido. É importante ressaltar que mesmo elétrons emparelhados geram esse  $B_{local}$ , embora a magnitude desse seja muito menor do que daquele gerado por elétrons desemparelhados (Silverstein et al., 1991).

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

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

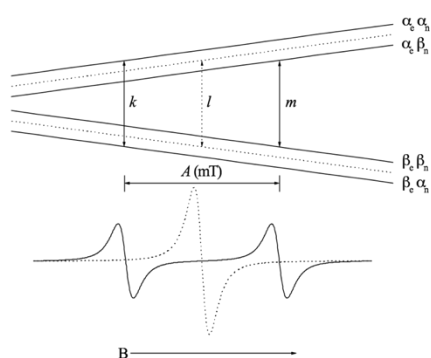
### 1.5.2. O acoplamento hiperfino e super-hiperfino

Os momentos magnéticos dos elétrons e dos núcleons podem ser acoplados via interação de contato (contato de Fermi) sendo a constante de acoplamento  $a$ , com dimensão de energia proporcional à densidade do elétron desemparelhado no núcleo. Assim sendo a interação de contato só pode ocorrer quando o elétron desemparelhado possuir uma probabilidade finita de densidade no núcleo. Logo, elétrons em orbitais  $p$ ,  $d$ ,  $f$  e superiores, que têm funções de onda com nós no núcleo (densidade eletrônica nula) precisam ter algum caráter de orbital  $s$  para que possa ocorrer a interação via interação de contato (Carrington e McLachlan, 1967).

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

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

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



**Figura 3.** Níveis de energia e o respectivo espectro de RPE para um sistema com  $S = 1/2$  e  $I = 1/2$  (linhas cheias) e  $S = 1/2$  e  $I = 0$  (linhas pontilhadas). As setas denominadas  $k$ ,  $l$  e  $m$  representam as transições permitidas.

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

### 1.6. Área sob a linha de ressonância

A área sob a linha de ressonância será proporcional à concentração da espécie responsável por essa linha desde que o espectro tenha sido adquirido em condições quantitativas, ou seja, quando não houver, por exemplo: saturação do sistema; supressão de sinais decorrentes de características da própria amostra; ajuste inadequado de parâmetros. Porém, a quantificação absoluta utilizando técnicas de ressonância magnética, em substâncias húmicas raramente é efetuada. O que se faz frequentemente é uma quantificação relativa dos diferentes grupos químicos (RMN), ou da espécie paramagnética em relação a um padrão (RPE).

## 2. A ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA (RPE)

### 2.1. Introdução

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

Com a RPE é possível analisar-se não destrutivamente amostras sólidas, líquidas e gasosas. É uma técnica extremamente sensível e sob condições favoráveis o limite de detecção para centros paramagnéticos encontra-se no intervalo de  $10^{11}$  a  $10^{12}$  spins  $g^{-1}$ , o que equivale à parte por bilhão. A resolução, porém, é perdida quando os centros paramagnéticos estão próximos o suficiente para que ocorra significativa interação dipolar entre eles. Portanto essa técnica aplica-se, primariamente, na caracterização de espécies magneticamente diluídas (Goodman e Hall, 1994) porém, diferentemente da espectroscopia no infravermelho, em RPE a diluição de amostras sólidas não é obtida pela simples mistura com um pó “silencioso” (diamagnético) mas sim há a necessidade da diluição dos centros paramagnéticos em nível molecular. No caso de soluções, solventes com alta constante dielétrica (por exemplo água) não são recomendados pois ocorrem perdas de potência da energia aplicada na forma de micro-ondas pela interação do solvente com a componente elétrica dessa, assim como aquecimento e outros problemas (Parisch, 1990). Porém é possível a aquisição de espectros nessas condições utilizando as celas planas (“flat cells”) ou tubos capilares especiais.

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

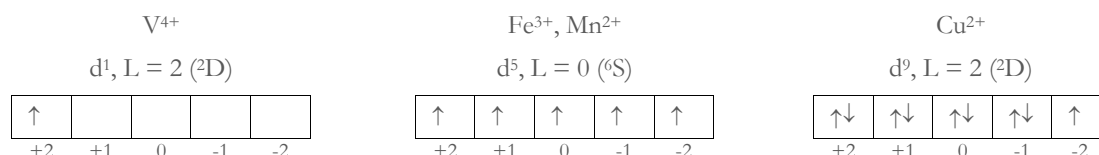
As espécies paramagnéticas frequentemente observadas incluem radicais livres orgânicos, complexos metálicos paramagnéticos e estados tripleto excitados de moléculas diamagnéticas (Bunce, 1987). Para a aquisição de um espectro de

RPE a amostra é colocada dentro de uma cavidade ressonante cujas dimensões são ajustadas à frequência de micro-ondas utilizada e, logo, é impossível variar essa frequência sem variar as dimensões da cavidade. Assim, por questões práticas, é mais conveniente submeter a amostra à radiação de micro-ondas com frequência fixa e conhecida e variar  $B$  (Parisch, 1990). Isso provoca a variação de  $\Delta E$  até que a condição de ressonância, dada pela Equação (3), seja atingida e ocorra a transição de spin com a absorção de energia que é detectada pelo equipamento.

Geralmente os espectros de RPE são adquiridos na forma de primeira derivada do espectro de absorção (Figura 3b). A resolução pode ser melhorada pela aquisição do espectro em segunda derivada (Parisch, 1990), entretanto a relação sinal-ruído em espectroscopia diminui geometricamente com sucessivas derivações (Starsinic et al., 1984).

## 2.2. O fator-g

O momento angular orbital do elétron é caracterizado pelo número quântico secundário (representado por  $l$ ), que especifica o seu módulo, e pelo número quântico magnético ( $m_l$ ), que especifica a sua orientação com respeito a um dado eixo  $z$ . Os valores de  $l$  variam de 0 a  $n-1$  ( $s, p, d, f, g, \dots$ ), sendo  $n$  o número quântico principal, e  $m_l$  varia de  $-l$  a  $+l$ . A soma dos  $m_l$  de todos os elétrons em orbitais incompletos fornece o momento angular orbital total que é representado por  $L$  ( $S, P, D, F, G, \dots$ ) e o estado desse átomo pode ser representado por  $(^{2S+1})L$ , onde o subscrito à esquerda é a multiplicidade de spin (seção 1.4). A seguir são dados alguns exemplos de configurações:



O acoplamento spin-órbita fornece um mecanismo com o qual o momento angular orbital pode ser adicionado, ou misturado, ao momento angular de spin (Goodman e Hall, 1994). Quando há significativa contribuição desse momento angular orbital ao momento magnético total do elétron desemparelhado o valor de  $g$  pode desviar significativamente do  $g_e$ .

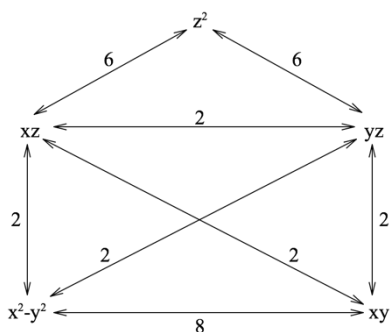
Desvios do valor- $g$  do  $g_e$  ( $g - g_e = \Delta g$ ) podem ser explicados com a seguinte analogia: campos cristalinos removem a degenerescência dos orbitais  $d$  dos metais de transição<sup>6</sup>, ou seja, quando esses átomos estão formando complexos os ligantes provocam distorções dos orbitais alterando a energia desses. Com essa remoção da degenerescência o elétron desemparelhado não terá acesso indiscriminado a esses orbitais, tendo uma maior densidade no orbital de menor energia. Entretanto, a mistura do estado fundamental com estados excitados é possível e essa transição pode ser pictoricamente compreendida como um movimento do elétron desemparelhado entre orbitais “vizinhos”. Por exemplo, transições  $d_{x^2-y^2} \leftrightarrow d_{xy}$  e  $d_{z^2} \leftrightarrow d_{yz}$  gerando um  $B_{local}$  paralelo e outro perpendicular ao  $B$ , respectivamente (regra da mão direita), o que alteraria o valor- $g$  desse elétron. A magnitude de  $\Delta g$  é inversamente proporcional à separação energética entre esses orbitais, pois grandes diferenças energéticas entre os orbitais dificultam o movimento eletrônico hipotético.

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

$$g = g_e - n \lambda \Delta E^{-1} \tag{Equação 6}$$

onde  $n$  é o coeficiente de mistura entre os orbitais envolvidos, e é obtido do chamado “pentágono mágico” (Figura 4),  $\lambda$  é a constante de acoplamento spin-órbita para o átomo livre e que será positiva para átomos com menos de cinco elétrons  $d$  e negativa para mais de cinco elétrons  $d$ . O valor absoluto de  $\lambda$  depende do estado de oxidação do átomo, mas aumenta rapidamente com o aumento do número atômico, e  $\Delta E$  é a separação em energia desses orbitais que pode ser obtida de espectros eletrônicos (Parisch, 1990).

<sup>6</sup> Esses orbitais são designados  $d_{xy}$ ,  $d_{xz}$ ,  $d_{yz}$ ,  $d_{z^2}$  e  $d_{x^2-y^2}$  sendo o orbital  $d_{z^2}$  coincidente com o eixo  $z$ ,  $d_{x^2-y^2}$  coincidente com os eixos  $x, y$  e  $d_{xy}$ ,  $d_{xz}$ ,  $d_{yz}$  coincidentes com a bissetriz dos eixos indicados pelos subscritos.



**Figura 4.** “Pentágono mágico” utilizado para a obtenção do coeficiente de mistura (número nas setas) dos pares de orbitais d.

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

Utilizando a constante de acoplamento spin-órbita e a  $\Delta E$  obtida de espectros eletrônicos dificilmente se consegue reproduzir os valores de  $g$  experimentais obtidos dos espectros de RPE. Para ajustar esses valores experimentais modifica-se a Equações (6) para:

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

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

### 2.3. Anisotropia do fator- $g$ e sistemas rígidos não orientados

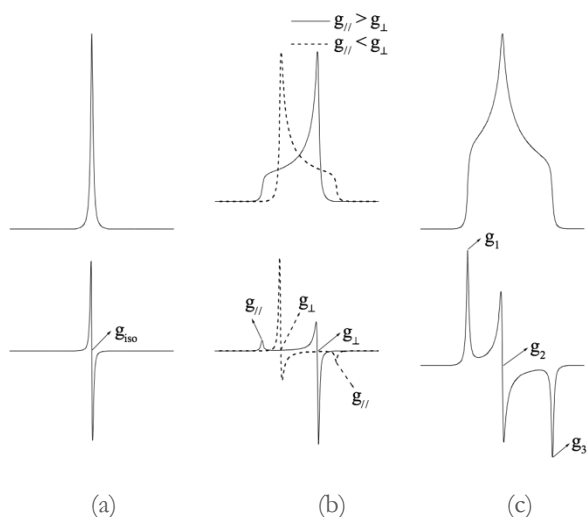
Em sistemas químicos o elétron desemparelhado ocupa um orbital que pode ser mais ou menos localizado em um átomo simples ou pode ser grandemente deslocalizado na molécula ou radical. O fator- $g$  reflete a natureza desse orbital inclusive sua simetria. Caso o radical em questão possua uma simetria esférica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

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

Por outro lado, quando o movimento de rotação aleatório dos átomos ou moléculas atinge taxas consideravelmente maiores do que a frequência de operação do espectrômetro, qualquer anisotropia se anula durante o tempo requerido para excitar-se o sistema. Sendo assim, em qualquer instante o conjunto de átomos ou moléculas terá todas as possíveis orientações em relação ao campo magnético externo e o espectro resultante será “aparentemente” isotrópico e terá apenas um fator- $g$ . É interessante ressaltar que a frequência de operação dos espectrômetros de RPE é na faixa das micro-ondas (GHz) de tal sorte que para a anisotropia ser nula a taxa desse movimento rotacional, dada pelo inverso do tempo de correlação, deve ser muito elevada. Com isso macromoléculas, ou mesmo íons em meios viscosos, podem apresentar espectros de RPE com anisotropia em sistemas líquidos. Essa característica pode ser utilizada em estudos dinâmicos nos quais se avalia o tempo de correlação da amostra ou de grupamentos químicos.

Em sistemas rígidos não orientados, tais como amostras sólidas na forma de pó e soluções congeladas, todas as possíveis orientações ocorrerão aleatoriamente, mantendo-se, contudo, as posições moleculares. Cada molécula com uma orientação particular tem seu próprio fator- $g$  e o espectro resultante é a soma dos espectros individuais de cada molécula. Para um sistema isotrópico apenas um valor de  $g$  será obtido (Figura 5a).





**Figura 5.** Espectros de RPE de amostras não orientadas (pó ou solução congelada); absorção (superior) e primeira derivada (inferior) sendo: (a) sistema isotrópico; (b) com simetria axial e (c) com simetria rômbrica.

Para o caso da simetria axial, em base puramente estatística, haverá poucas moléculas com o eixo principal de simetria paralelo ao campo magnético externo e muitas moléculas com o eixo principal de simetria perpendicular a ele de modo que a intensidade de absorção do sinal correspondente ao  $g_{\perp}$  será máxima (Parisch, 1990). Assim, em primeira derivada, mede-se o  $g_{\perp}$  na posição onde a linha de ressonância passa por zero e o  $g_{\parallel}$  em um máximo ou mínimo, dependendo se ele for maior ou menor que o  $g_{\perp}$ , respectivamente (Figura 5b). Já para um centro paramagnético com simetria rômbrica três valores de  $g$  serão observados no espectro (Figura 5c).

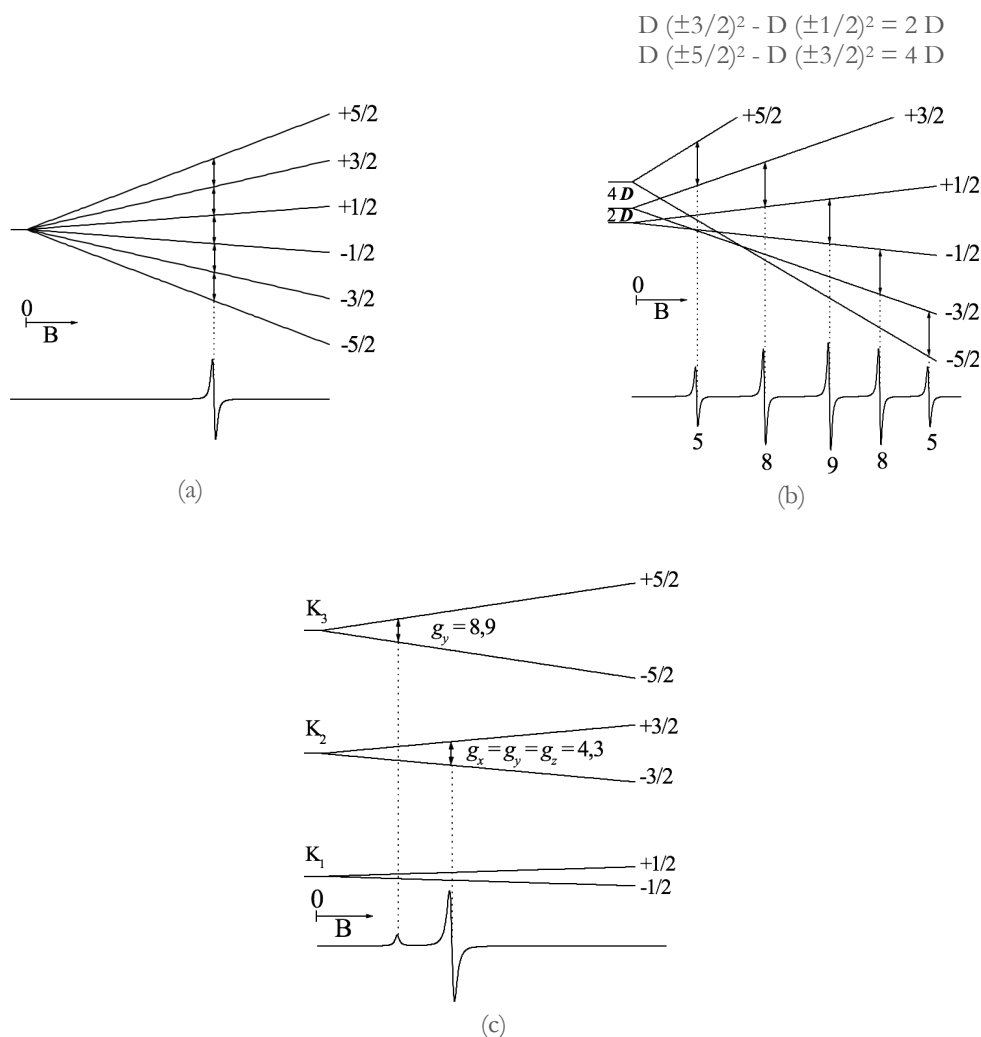
Frequentemente, a determinação dos valores- $g$  diretamente dos espectros é difícil e há a necessidade de simular esses espectros com o auxílio de métodos computacionais.

#### 2.4. A separação de campo zero (interação fina)

No caso em que íons ou moléculas possuam mais de um elétron desemparelhado próximos ( $S > 1/2$ ) haverá uma interação entre os momentos magnéticos desses elétrons. O campo magnético efetivo experimentado pelos elétrons desemparelhados será a soma do campo magnético aplicado com o campo magnético local gerado pelo(s) spin(s) eletrônico(s) do(s) outro(s) elétron(s) desemparelhado(s). Essa interação magnética, que ocorre via acoplamento spin-órbita, pode remover a degenerescência (provocar a separação de energia entre os estados de spin) mesmo na ausência de campo magnético externo e essa quebra de degenerescência é chamada de separação de campo zero ( $D$ ). A princípio ela é zero para simetria estritamente cúbica, porém a separação de campo zero ocorre na vasta maioria dos casos (Parish, 1990). Quando  $D$  for igual a zero as diferentes transições permitidas ocorrerão em um mesmo valor de campo magnético externo e apenas uma linha de ressonância será obtida (Figura 6a).

Porém, quando  $D$  for diferente de zero, os níveis energéticos não mais serão degenerados na ausência do campo magnético externo (Figura 6b) e essa separação em energia será dada por  $D.S^2$ . Devido a essa separação de campo zero as diversas transições de ressonância magnética não mais coincidirão e uma série de linhas será obtida (estrutura fina do espectro). A intensidade relativa dessas linhas será dada por  $(S + m_s + 1)(S - m_s)$  quando  $D$  for pequeno em relação à  $h\nu$  visto que todos os níveis serão populados. Por outro lado, quando  $D$  for grande em relação à  $h\nu$  (Figura 6c) as transições permitidas serão aquelas no mesmo dubleto de Kramer que, devido à mistura entre os diferentes estados de spins, possuem spin efetivo  $1/2$  (Wickman et al., 1965).

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



**Figura 6.** Diagramas de energia e respectivos espectros de RPE para sistemas  $S = 5/2$ . (a) Em simetria cúbica  $D = 0$ ; (b) em simetria menor que a cúbica com  $D \ll b$  e (c) com  $D \gg b$  e  $E/D = 1/3$ , p. ex.:  $\text{Fe}^{3+}$  em sítio rômboico.  $D$  é a separação de campo zero, os números sob as linhas de ressonância em (b) são as suas intensidades relativas. Cada par de níveis energéticos formado por  $\pm m$ , é chamado de dubleto de Kramer (spin efetivo de  $1/2$ ) sendo indicados em (c) por  $K_1$ ,  $K_2$  e  $K_3$ .

## 2.5. Espectros de RPE de materiais magneticamente ordenados

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

Em substâncias húmicas a interação dipolar entre íons  $\text{Fe}^{3+}$ , principalmente como contaminantes inorgânicos tais como na forma de óxidos ou hidróxidos, é a principal responsável pelas linhas largas centradas em  $g \cong 2$  frequentemente observadas em seus espectros, o que dificulta ou mesmo impossibilita a análise desse tipo de material por RPE.

## 2.6. Sondas de RPE frequentemente detectadas em substâncias húmicas

As espécies paramagnéticas frequentemente detectadas por RPE em substâncias húmicas são:  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{VO}^{2+}$  e radicais livres orgânicos. E ao comparar os parâmetros obtidos dos espectros de RPE com os da literatura é possível inferir sobre o estado de oxidação, a simetria e os ligantes desses íons paramagnéticos dentre outras informações. Essas informações podem ser relacionadas com a estabilidade desses complexos e sua conseqüente disponibilidade para as plantas e potencialidade de liberação no ambiente, assim como avaliar o potencial oxi-redutor das substâncias húmicas. Porém, é

também possível, em trabalhos mais elaborados, obter mais informações acerca das ligações entre os átomos, sobre a distribuição do elétron desemparelhado nas moléculas e a respeito do ordenamento dos níveis de energia nos compostos paramagnéticos (Mangrich e Vugman, 1988).

### 2.6.1. Fe<sup>3+</sup>

Na crosta terrestre o ferro é o quarto mais abundante de todos os elementos e o primeiro entre os metais de transição. Em consequência disso é encontrado em diversos constituintes do ambiente como argilas, matéria orgânica ambiental e em sedimentos orgânicos e inorgânicos em geral, além de seres vivos. O íon Fe<sup>3+</sup>, cujo isótopo mais abundante (<sup>56</sup>Fe, 91,72% de abundância natural) possui  $I = 0$ , tem uma configuração 3d<sup>5</sup> e dependendo do campo ligante ao qual está submetido, poderá ser  $S = 5/2$ ,  $S = 3/2$  e  $S = 1/2$ . O Fe<sup>2+</sup> (3d<sup>6</sup>,  $S = 2$ ), embora paramagnético, não é observado à temperatura ambiente devido ao  $T_2$  extremamente curto produzindo linhas muito largas. Mesmo na temperatura do He líquido (aproximadamente 4 K) a largura da linha de ressonância dessa espécie é usualmente de 50 mT (Drago, 1992).

O estado  $S = 5/2$  é o frequentemente detectado por RPE em substâncias húmicas e por se tratar de um estado  $J$  ( $L = 0$ ) não há contribuição orbital para o momento angular total dos elétrons no estado fundamental, e enquanto a simetria for alta não ocorrerá mistura desse com estados excitados resultando que o valor- $g$  esperado será aproximadamente o do elétron livre. Porém, devido a ser uma espécie com cinco elétrons desemparelhados a separação de campo zero pode tornar-se significativa, o que dependerá da simetria do complexo, e com isso temos que Fe<sup>3+</sup> em simetria cúbica, por exemplo íons hidratados em complexos de esfera externa, apresentará um sinal isotrópico com  $g \cong g_0$ .

Já em simetria axial a separação de campo zero ( $D$ ) pode ser muito maior do que a frequência de operação do espectrômetro ( $D \gg h \nu$ ) resultando em um espectro anisotrópico com  $g_{\parallel} \cong g_0$  e  $g_{\perp} \cong 6$ . Esse tipo de sinal, observado em alguns espectros de substâncias húmicas (Senesi, 1990), pode ser atribuído a íons de Fe<sup>3+</sup> ligado a quatro átomos de nitrogênio no plano equatorial, como no caso de complexos Fe<sup>3+</sup>-porfirinas. Essa estrutura pode ter sua origem na clorofila residual incorporada às substâncias húmicas, onde o Fe<sup>3+</sup> substituiu o íon central de Mg<sup>2+</sup> (Filip et al., 1985), ou sintetizada por microrganismos do próprio solo (Mangrich et al., 1998).

Finalmente, com máxima distorção rômbrica, o espectro resultante apresentará um sinal em  $g = 4,3$  e outro, de menor intensidade, em  $g = 8,9$  (Figura 16c). O sinal da transição do dubleto  $K_1$  normalmente não é observado à temperatura ambiente devido à baixa população de spins nesse dubleto. Linhas de ressonância com fator- $g$  próximo a 4,3 são comuns em espectros de RPE de minerais e de complexos orgânicos de Fe<sup>3+</sup>. Porém, é importante ressaltar que isso não é devido a uma preferência do Fe<sup>3+</sup> por ambientes com simetria rômbrica ou aproximadamente rômbrica ( $\lambda = 1/3$ ), mas sim devido à alta isotropia da transição  $m_s(-3/2) \rightarrow m_s(+3/2)$  nessa condição, visto que os três valores- $g$  ( $g_x$ ,  $g_y$  e  $g_z$ ) são coincidentes (Figura 16c). Muitas outras transições do Fe<sup>3+</sup> em sítios com separação de campo zero, porém de maior simetria, apresentam uma alta anisotropia dos seus valores- $g$  e em sistemas não orientados produzem linhas largas, e consequentemente de baixa amplitude (Goodman e Hall, 1994).

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

### 2.6.2. Mn<sup>2+</sup>

Assim como o Fe<sup>3+</sup>, o Mn<sup>2+</sup> também apresenta uma configuração 3d<sup>5</sup>, porém em substâncias húmicas seus complexos normalmente são de alta simetria e, consequentemente, a separação de campo zero é pequena, sendo de pouca importância. Devido a isso os valores- $g$  de seus complexos são próximos ao  $g_0$ . Outra importante diferença é que o isótopo <sup>55</sup>Mn, cuja abundância natural é de 100%, possui  $I = 5/2$  resultando em um sexteto cuja constante de interação hiperfina ( $\mathcal{A}$ ) varia de 5 a 10 mT (Parisich, 1990). Em complexos com mesmo número de coordenação o valor de  $\mathcal{A}$  aumenta quase que linearmente com o aumento do caráter iônico das ligações. Por outro lado, em complexos com ligações cujo caráter iônico é similar, os valores de  $\mathcal{A}$  são 5 a 10% menores nos complexos tetraédricos em relação aos octaédricos (Title, 1963).

Os valores de  $\mathcal{A}$ , normalmente obtidos para os complexos de Mn<sup>2+</sup> com substâncias húmicas, indicam coordenação a átomos de oxigênio em sítios octaédricos sendo que valores entre 9,3 e 9,6 mT ( $87 \cdot 10^{-4}$  e  $90 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ ) são consistentes com complexos de esfera externa (Lakatos et al., 1977) onde o Mn<sup>2+</sup> mantém sua esfera interna de hidratação, ou seja, o Mn<sup>2+</sup> solvatado -  $[\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$  - é adsorvido principalmente por atração eletrostática (Senesi, 1990). Já valores de  $\mathcal{A}$  entre 8,4 e 8,8 mT ( $78 \cdot 10^{-4}$  e  $82 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ ) indicam complexos em esfera interna sendo que os grupos funcionais possivelmente envolvidos seriam o carboxílico, as hidroxilas fenólica e alcoólica, a carbonila e a metoxila (Schnitzer e Khan, 1978). Caso o Mn<sup>2+</sup> estivesse coordenado a quatro átomos de nitrogênio (Mn-porfirinas) os valores de  $\mathcal{A}$  seriam menores (7,4 mT ou  $69 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ ) sendo que não se conhece relato desse tipo de complexo em substâncias húmicas.

Outro aspecto importante da interação hiperfina, pouco explorado na análise de substâncias húmicas por RPE, é a frequente ocorrência de algumas linhas adicionais entre as linhas do sexteto. Essas linhas adicionais são atribuídas às transições proibidas  $\Delta m$ , eletrônico e nuclear igual a  $\pm 1$ . A intensidade dessas linhas adicionais em relação à intensidade das linhas decorrentes das transições permitidas pode ser utilizada na estimativa da separação de campo zero ( $D$ ) quando  $D \ll b \nu$ , o mesmo podendo ser feito utilizando a eventual divisão das linhas do sexteto permitido, principalmente em campo alto (Abragam e Bleaney, 1986).

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

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

### 2.6.3. $VO^{2+}$

Os números de oxidação do vanádio são, +2, +3, +4 e +5 sendo que o último é diamagnético e o estado +3,  $3d^2$ , embora paramagnético, usualmente não é detectado em estruturas octaédricas devido aos curtos tempos de vida produzindo linhas muito largas na temperatura ambiente. Esse estado normalmente é detectado a aproximadamente 4 K (He líquido) ou em estruturas tetraédricas. Tanto o estado +2 quanto o +4 são facilmente detectáveis sendo que o estado +2 é instável e é facilmente oxidado ao estado +4. Normalmente o  $V^{4+}$  está sob a forma do seu oxidação mais comum, o íon vanadilo ( $VO^{2+}$ ), em complexos  $VO_4$  axiais (pirâmide de base quadrada, sendo o ligante axial o O do íon vanadilo).

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

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

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

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

Ambos os parâmetros  $g$  e  $A$  refletem a natureza dos ligantes do vanádio e há uma alta correlação negativa entre esses parâmetros. Com o aumento da covalência, a energia do estado excitado aumenta e esse aumento da separação entre os níveis energéticos dos orbitais  $d$  ( $\Delta E$ ) leva a um aumento do valor  $g$  aproximando-o do  $g$ , além disso, como visto no item 2.2, o aumento do caráter covalente também reduz  $\Delta g$ . Ao mesmo tempo, com a ligação mais covalente, a deslocalização do elétron desemparelhado reduz a constante de interação hiperfina. Os valores de  $g_{//}$  e  $A_{//}$ , são utilizados para diagnóstico pela maior amplitude de variação em relação aos parâmetros perpendiculares e em solução, onde apenas os valores isotrópicos são obtidos. Nesse caso, os valores de  $g_{iso}$  apresentam maiores variações do que  $A_{iso}$  (Parish, 1990). É possível a comparação de dados obtidos em sistemas rígidos não orientados com aqueles obtidos em solução, para isso basta calcular as médias aritméticas dos parâmetros anisotrópicos, por exemplo:  $g_{iso} = \langle g \rangle = 1/3 (2g_{\perp} + g_{//})$ , porém, na prática, pode haver discrepâncias de 10 a 20% entre esse valor médio e o verdadeiro valor isotrópico (Parisch, 1990).

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

#### 2.6.4. Cu<sup>2+</sup>

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

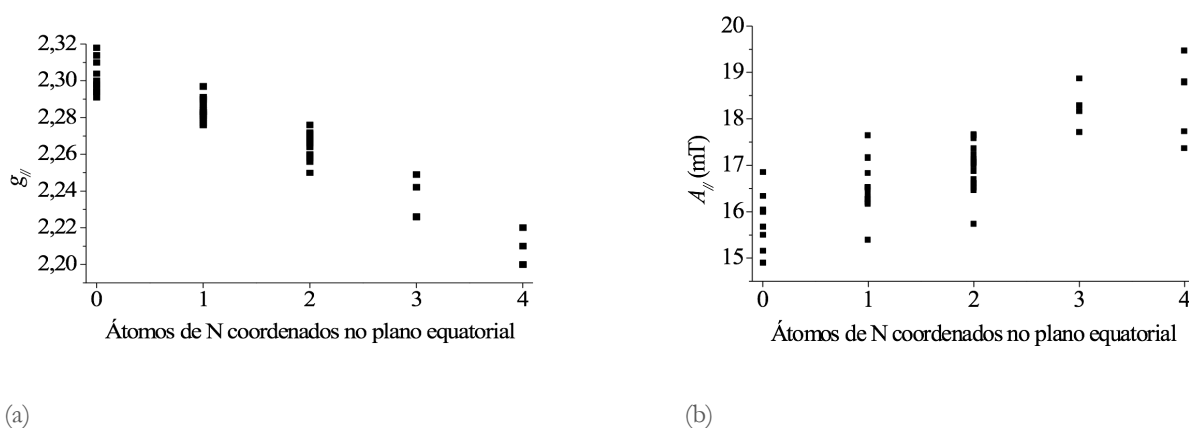
$$g_{//} = 2,0023 + 8 k 830 / \Delta E(d_{x^2-y^2} - d_{xy}); \quad g_{\perp} = 2,0023 + 2 k' 830 / \Delta E(d_{x^2-y^2} - d_{xz}, d_{yz}) \quad (\text{Equação 9})$$

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

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

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

O valor- $g_{//}$  diminui com o aumento da intensidade do campo ligante equatorial, assim esse parâmetro fornece informações a respeito da força de interação e do tipo de átomo coordenado ao Cu<sup>2+</sup> no plano equatorial. Em geral o valor- $g_{//}$  diminui na seguinte ordem: oxigênio > nitrogênio > enxofre. Assim, com o aumento do número de átomos de nitrogênio, ao invés de oxigênio, coordenados na posição equatorial, o valor- $g_{//}$  diminui e, embora menos regular, uma tendência oposta observa-se para o valor de  $A_{//}$  (Figura 17). Para o complexo de Cu<sup>2+</sup> hexahidratado obtêm-se  $g_{//} = 2,422$  e  $A_{//} = 11,9$  mT (Boyd et al., 1983).



**Figura 7.** Variações dos parâmetros espectroscópicos  $g_{//}$  (a) e  $A_{//}$  (b) em função do número de átomos de nitrogênio coordenados ao íon Cu<sup>2+</sup> no plano equatorial. Dados obtidos da literatura referentes a complexos com substâncias húmicas e compostos modelo: Boyd et al. (1983); Senesi et al. (1985); Senesi (1990).

Eventualmente em complexos de Cu<sup>2+</sup> coordenado com átomo(s) de nitrogênio pode-se observar, no sinal perpendicular do Cu<sup>2+</sup>, um conjunto de linhas separadas por 1 a 3 mT (Senesi et al., 1985; Martín-Neto et al., 1991). Esse conjunto de linhas é devido à interação super-hiperfina proveniente da interação do elétron desemparelhado do Cu<sup>2+</sup> com o núcleo do nitrogênio ligante. O número de linhas da interação super-hiperfina é dado por  $2nI + 1$  (seção 1.5.2), então, por exemplo, para o caso de cinco linhas equidistantes *n* equivale a dois átomos de nitrogênio equivalentes.

#### 2.6.5. Os radicais livres orgânicos

Os processos de transformação da matéria orgânica no ambiente são conectados com várias reações envolvendo radicais livres e esses podem ser estabilizados em estruturas “spins traps” tais como polifenóis, melaninas e melanoidinas

(Jeziarski et al., 1998). Esses radicais livres podem ser detectados em substâncias húmicas pela espectroscopia de RPE como um sinal estreito e intenso com  $g$  entre 2,0030 e 2,0043. Esse sinal é atribuído a semiquinonas possivelmente conjugadas a anéis aromáticos ( $g = 2,0041$  para radical 9,10-antraquinona), embora contribuições de radicais metoxibenzênicos, cujo valor  $g$  varia de 2,0035-2,004 (Blois et al., 1961) e radicais associados a nitrogênio não podem ser excluídas (Senesi e Steelink, 1989; Senesi, 1990). Estruturas aromáticas conjugadas às semiquinonas causam uma parcial deslocalização do elétron livre do oxigênio da semiquinona para os átomos de carbono reduzindo com isso o valor- $g$  (Schnitzer e Skinner, 1969; Riffaldi e Schnitzer, 1972). Entretanto, Cheshire e McPhail (1996) afirmaram que os sinais observados em substâncias húmicas não se parecem com aqueles de monômeros de semiquinonas. Como não há uma atribuição consensual para esses radicais preferiu-se referir a eles apenas como radicais livres orgânicos.

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

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

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

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

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

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

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

## 2.7. Outras técnicas experimentais

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

Outras técnicas experimentais utilizando RPE envolvem o uso de substâncias “spin-trap” e “spin-labels”. As primeiras “capturam” e estabilizam elétrons desemparelhados formados em reações onde os radicais livres formados são tão efêmeros que não seriam detectados convencionalmente. As segundas são sondas de RPE que são adicionadas a substâncias que não possuem elétrons desemparelhados ou cujo próprio sinal não fornece a informação desejada. Essas sondas de RPE

são radicais livres facilmente detectáveis normalmente com estrutura hiperfina ou super-hiperfina sensível ao ambiente em que estão expostas. Ferreira et al. (2001) utilizaram essa técnica para o estudo de possíveis sítios hidrofóbicos em ácidos húmicos.

### 3. A ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

#### 3.1. Introdução

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

O experimento básico de RMN consiste expor uma amostra com núcleos magnéticos ( $I \neq 0$ ) à um campo magnético estático ( $B$ ) e à um campo magnético oscilante ( $B_1$ ), com frequência de ressonância ( $\nu$ ) dada por:  $\nu_L = \gamma B (2\pi)^{-1}$  onde  $\gamma$  é a razão magnetogírica dada por  $\gamma = g_n \mu_n / 2\pi \hbar$ . Assim, em um equipamento com magneto de 9,4 T os  $^1\text{H}$  ( $\gamma = 2,675 \cdot 10^8 \text{ T}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) entrarão em ressonância a cerca de 400 MHz, que é a  $\nu$  nesse campo magnético e o modo usual de descrever-se o equipamento (Silverstein et al., 1991), enquanto os  $^{13}\text{C}$  entrarão em ressonância a cerca de 100 MHz pois seus  $g_n$  e  $\gamma$  são aproximadamente quatro vezes menores que os dos  $^1\text{H}$ .

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

Como o momento magnético do  $^{13}\text{C}$  é cerca de quatro vezes menor que o do  $^1\text{H}$  sua sensibilidade em experimentos de RMN é menor. Adicionalmente a isso a sua baixa abundância natural torna a detecção do  $^{13}\text{C}$  muito mais difícil, o que é expresso pela sua menor receptividade. Essas relações são dadas por:

$$\text{Sensitividade} = (I + 1) I^{-2} \mu_n^3 B^2 \quad (\text{Equação 10})$$

$$\text{Receptividade} = N \gamma^3 I (I + 1) \quad (\text{Equação 11})$$

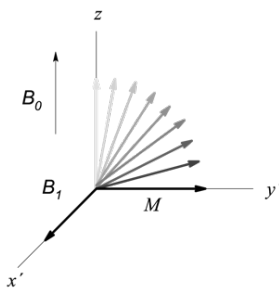
onde  $N$  é a abundância natural do nuclídeo em questão. Como os  $^1\text{H}$  apresentam a maior sensibilidade e conseqüentemente a maior receptividade em um mesmo  $B_0$ , ele é freqüentemente usado como referência para os demais nuclídeos. Os valores da receptividade e da sensibilidade relativas do  $^{13}\text{C}$  e de outros nuclídeos com  $I = 1/2$  de interesse para a análise da matéria orgânica do solo por RMN são dados na Tabela 1.

**Tabela 1.** Propriedades de alguns nuclídeos utilizados como sondas na análise da matéria orgânica do solo por RMN.

ISÓTOPO	ABUNDÂNCIA NATURAL (%)	SENSITIVIDADE RELATIVA (IGUAL NÚMERO DE NÚCLEOS)	RECEPTIVIDADE RELATIVA
$^1\text{H}$	99,9844	1	1
$^{13}\text{C}$	1,108	$1,5894 \cdot 10^{-2}$	$1,7613 \cdot 10^{-4}$
$^{15}\text{N}$	0,365	$1,0410 \cdot 10^{-3}$	$3,8004 \cdot 10^{-6}$
$^{31}\text{P}$	100	$6,6334 \cdot 10^{-2}$	$6,6345 \cdot 10^{-2}$

#### 3.2. Ângulo dos pulsos de rf e intervalos de relaxação

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



**Figura 8.** Deflexão do vetor magnetização líquida ( $M$ ) por um pulso de rf ( $B_1$ ) no sistema girante de coordenadas.

Para que não haja saturação do sistema de spins é necessário aguardar um certo período de tempo entre o término de um ciclo de uma sequência de pulsos e o início do próximo ciclo para que o  $M$  “retorne” ao eixo  $z$  (relaxação spin-rede –  $T_1$ ). Esse tempo de espera é chamado de intervalo de relaxação e para pulsos de  $90^\circ$  ele deve ser no mínimo  $5T_1$ .

### 3.3. O deslocamento químico

Como já visto na seção 1.5,  $B$  induz um movimento orbital eletrônico que por sua vez gera um  $B_{local}$  que é uma importante contribuição ao  $B_{efetivo}$  (ambos ao longo da direção  $z$ ) ao qual o núcleo magnético de interesse está submetido. A habilidade do campo magnético aplicado em gerar essa corrente eletrônica na molécula, e a intensidade do  $B_{local}$  resultante experimentado pelo núcleo, depende de detalhes da estrutura eletrônica próxima a esse núcleo. Com isso núcleos do mesmo elemento, porém em diferentes ambientes químicos, poderão apresentar diferentes frequências de Larmor (Atkins, 1998) e essas diferenças são decorrentes da blindagem do  $B$  pelas nuvens eletrônicas dos orbitais moleculares, assim a condição de ressonância é dada por:

$$h\nu = \Delta E = g_n \mu_n (1-\sigma) B = h\nu_L \quad (\text{Equação 12})$$

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

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

É comum as frequências de ressonância serem expressas em termos de uma quantidade empírica, adimensional, chamada de deslocamento químico ( $\delta$ ) que é obtida pela diferença entre as frequências de ressonância do núcleo em questão ( $\nu$ ) e de um padrão usado como referência ( $\nu_0$ ) e dividido pela frequência de referência ( $\nu_0$ ):

$$\delta = (\nu - \nu_0) \nu_0^{-1} 10^6 \quad (\text{Equação 13})$$

O uso do termo “ppm”, em referência à  $10^{-6}$ , após o valor de  $\delta$  é desnecessário, porém frequente.

Exemplos de padrões utilizados são para o  $^1\text{H}$  a frequência de ressonância do  $^1\text{H}$  do tetrametilsilano –  $\text{Si}(\text{CH}_3)_4$ , para o  $^{13}\text{C}$  é a frequência de ressonância do  $^{13}\text{C}$  do mesmo composto e do  $^{31}\text{P}$  a ressonância do  $^{31}\text{P}$  em solução 85% de  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , a vantagem do uso do  $\delta$  é que essa escala é independente do campo magnético aplicado (Atkins, 1998).

### 3.4. Desacoplamento

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

O acoplamento escalar spin-spin nuclear leva ao desdobramento das linhas espectrais em multipletos, sendo que o número de linhas é dado pelo número de núcleos magnéticos com os quais ocorre o acoplamento ( $2nI + 1$ ). A separação entre essas linhas é chamada de constante de acoplamento spin-spin ( $J$ ). Assim, por exemplo, o sinal de  $^{13}\text{C}$ -RMN de um grupo metila ( $\text{CH}_3$ ) será um quarteto.



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

O desacoplamento envolve a aplicação de um campo de rf adicional ( $B_2$ ) na frequência de ressonância do spin cuja influência deseja-se remover. Esse  $B_2$  faz com que a componente  $z$  desses spins oscile rapidamente comparado à interação spin-spin. Com isso, o tempo médio de permanência do núcleo que está sendo irradiado em cada estado de spin será tão curto que apenas o efeito médio dos estados de spin será efetivo e como resultado ocorrerá uma simplificação do espectro pela eliminação dos multipletos e estreitamento dos sinais (Gil e Gerald, 1987).

### 3.5. Anisotropia do deslocamento químico

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

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

Existem seqüências de pulsos que podem ser utilizadas para eliminar as bandas laterais tal como a TOSS (T<sub>O</sub>Tal S<sub>U</sub>ppression of S<sub>I</sub>de-bands).

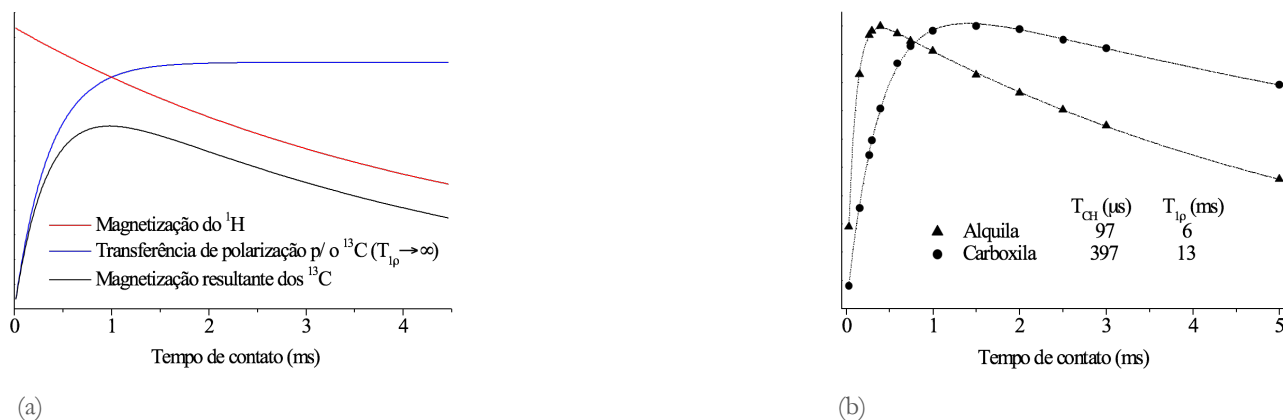
A rotação segundo o ângulo mágico também minimiza a interação dipolar, pois as interações dipolares também são proporcionais a  $(1-3 \cos^2\theta)$ , onde  $\theta$  é o ângulo formado entre o vetor internuclear dos núcleos em interação e a direção das linhas de força do  $B$ , e da mesma forma que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

### 3.6. A transferência de polarização

Como já visto no item 3.1, núcleos de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  submetidos ao mesmo campo magnético precessionam a diferentes frequências (frequências de Larmor), porém, utilizando diferentes campos de rf ( $B_1$ ) para cada núcleo, é possível atingir uma situação em que ambos precessionem à mesma frequência nos seus respectivos sistemas girantes de coordenadas. Essa situação é chamada de condição de Hartmann-Hahn onde os núcleos estarão em contato térmico podendo ocorrer transferência de energia entre eles, visto que eles se comportam como núcleos idênticos. Nos experimentos com polarização cruzada (CP-“cross polarization”) ajusta-se uma situação em que os núcleos abundantes (p. ex.:  $^1\text{H}$ ) estejam em uma situação de não equilíbrio com uma temperatura de spins da ordem de mK, necessitando transferir energia para os núcleos raros (p. ex.:  $^{13}\text{C}$ ) com os quais eles estão em contato. Com isso ganha-se intensidade do sinal do núcleo raro de até  $\gamma_a/\gamma_b$ , onde  $\gamma_a$  é a razão magnetogírica do núcleo abundante e  $\gamma_b$  a do raro. No caso do par  $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$  o ganho é de aproximadamente quatro. Adicionalmente, o tempo de repetição dos experimentos torna-se dependente do tempo de relaxação longitudinal ( $T_1$ ) do núcleo abundante, que no caso do  $^1\text{H}$  é frequentemente menor que do  $^{13}\text{C}$ , e logo o tempo total de experimento é drasticamente reduzido.

O processo de transferência de polarização leva um certo tempo característico que depende de diversos fatores, tais como movimentos moleculares e distância entre os núcleos de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  em interação, esse tempo é chamado de tempo de polarização cruzada ( $T_{CH}$ ), e por outro lado, a magnetização dos  $^1\text{H}$ , que será transferida para os  $^{13}\text{C}$ , não é constante durante o tempo de contato, mas sim diminui exponencialmente a uma taxa dada pelo tempo de relaxação spin-rede dos  $^1\text{H}$  no sistema de coordenadas girantes ( $T_{1\rho}$ ). Logo, a magnetização resultante dos  $^{13}\text{C}$  é resultado de uma combinação desses dois processos que ocorrem simultaneamente: a diminuição da magnetização dos  $^1\text{H}$  devida à relaxação ( $T_{1\rho}$ ) e a transferência de magnetização para os núcleos de  $^{13}\text{C}$  (Figura 9a).

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

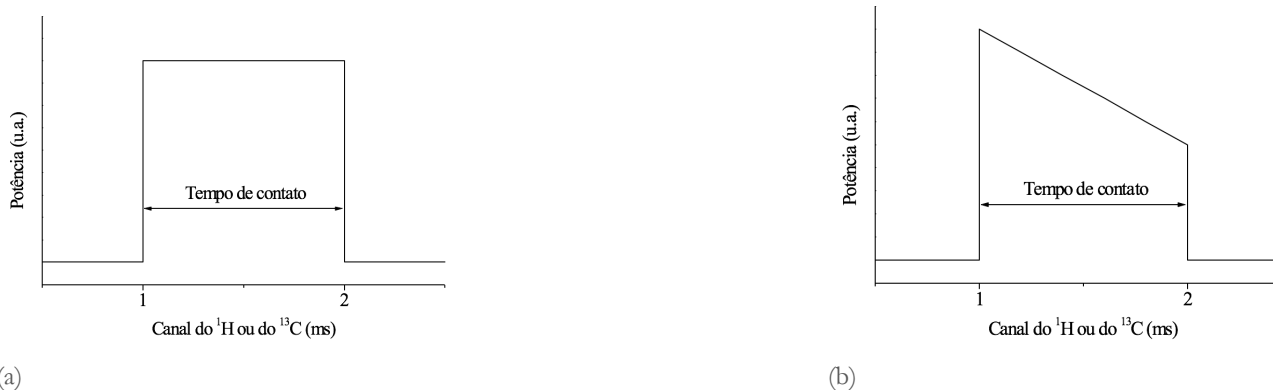


**Figura 9.** (a) Cinética da polarização cruzada. (b) Dados experimentais de uma amostra de ácidos húmicos. Alquila corresponde à região espectral de 0 - 45 ppm e carboxila de 158-186 ppm.

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

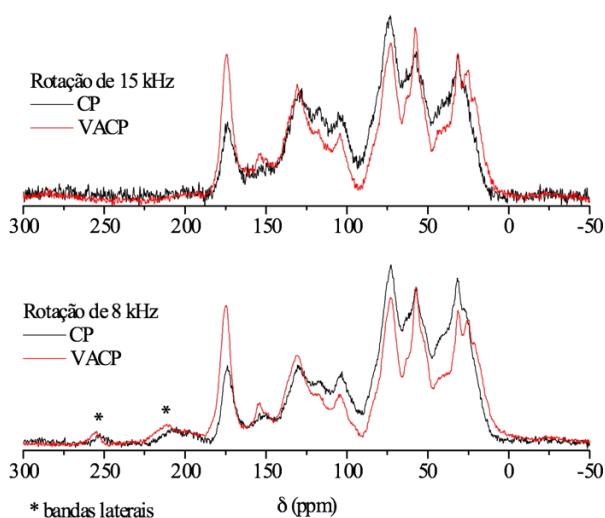
Visando o aumento da sensibilidade e resolução dos espectros, utilizam-se campos magnéticos cada vez mais intensos e isso leva à necessidade de girar a amostra as maiores velocidades, porém, quando a velocidade do rotor é comparável à interação dipolar o acoplamento de Hartmann-Hahn é dividido em uma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

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



**Figura 10.** Esquema comparativo do  $B_1$  para a seqüência de polarização cruzada (a) e da polarização cruzada com amplitude variável (b).

Na Figura 11 pode-se observar as diferenças entre os espectros obtidos com  $^{13}\text{C}$  CP-MAS NMR e  $^{13}\text{C}$  VACP-MAS NMR.



**Figura 11.** Espectros de  $^{13}\text{C}$ -RMN no estado sólido adquiridos com as seqüências de pulsos  $^{13}\text{C}$  CP-MAS NMR e  $^{13}\text{C}$  VACP-MAS NMR a diferentes taxas de rotação (MAS). Amostra de ácidos húmicos extraídos de solo.

### 3.7. Aplicação da RMN para a análise da matéria orgânica do solo

A primeira observação do fenômeno de RMN ocorreu em 1945 (Gunther, 1995), desde então essa técnica tem mostrado um tremendo desenvolvimento. Após o primeiro experimento em que RMN mostrou-se capaz de ser sensível as estruturas químicas, ela tornou-se uma das principais técnicas nas determinações de estrutura de moléculas orgânicas, biológicas e de materiais. A RMN ainda não tem sido amplamente utilizada na ciência do solo provavelmente devido à complexa e heterogênea estrutura física e química desse, apesar disso, em virtude da habilidade da RMN em resolver a estrutura microscópica e macroscópica da matéria orgânica, inorgânica e biológica, é muito provável que também na ciência do solo a RMN possa trazer, e já vem trazendo, valiosas informações que levem à melhor compreensão da estrutura química do solo e dos processos que nele ocorrem (Veeman, 1997).

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

Quando disponível, a técnica de RMN tem virtualmente substituído a espectroscopia no infravermelho. Porém, cientistas do solo e espectroscopistas têm diferentes expectativas em relação à RMN. Após anos de investigação química, tem-se aceitado que a matéria orgânica ambiental pode apresentar quase todo arranjo químico possível, por isso alguns cientistas

do solo já estão satisfeitos se um espectro de RMN fornecer-lhes informações semi-quantitativas de grupos aromáticos, alifáticos e carboxílicos. Por outro lado, poucos espectroscopistas sentem-se atraídos por esses resultados e podem se desinteressar pelo estudo desses materiais. Para a obtenção de resultados mais interessantes para ambas as partes, um diálogo necessita ser estabelecido. Esse diálogo é essencial, pois até os ajustes padrões para a aquisição de espectros de RMN da matéria orgânica ambiental são controversos (Dudley e Fyfe, 1982; Preston e Blackwell, 1985; Frund e Ludemann, 1989; Kinchesh et al., 1995; Conte et al., 1997; Hemminga e Buurman, 1997; Smernik e Oades, 2000).

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

Outro problema semelhante seria que em complexos organominerais parte da matéria orgânica pode não ser detectada por RMN e essa fração “invisível” pode ser a matéria orgânica mais humificada ligada à fração argila do solo (Hemminga e Buurman, 1997). Novamente essa fração não detectável tem uma grande importância agronômica e ambiental. Esses problemas podem ser minimizados pelo pré-tratamentos das amostras de solo com ditionito para remoção do  $\text{Fe}^{3+}$  por redução, o que nem sempre é eficiente (Preston et al., 1994). Mas uma combinação de redução por ditionito seguido por troca com  $\text{SnCl}_2$  pode ser suficiente (Arshad et al., 1988) e no caso de complexos organominerais uma possível solução seria a remoção dos silicatos por ácido fluorídrico, o que tem se mostrado eficiente também para a remoção dos óxidos de ferro (Dai e Johnson, 1999). Porém, esses tratamentos devem ser efetuados com cautela, pois pode haver importantes alterações químicas da matéria orgânica do solo.

### 3.8. Interpretação dos espectros de $^{13}\text{C}$ -RMN das substâncias húmicas

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

A caracterização das substâncias húmicas em termos da sua aromaticidade, definida como a porcentagem da área do espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN na região dos grupos aromáticos (110-145 ou 110-160 ppm) em relação à área total do espectro, excetuando-se as áreas do C carboxílico e carbonílico, (Hatcher et al., 1981) e relacionando esse valor com o grau de humificação das substâncias húmicas, como é comum na literatura (Inbar et al., 1989; Barančíková et al., 1997), pode não ser adequado visto que materiais não decompostos, tais como lignina e tanino, apresentam grupos aromáticos. Além disso, durante os processos de transformação da matéria orgânica do solo a razão entre as áreas atribuídas aos grupos aromáticos oxigenados em relação aos aromáticos diminui (Guggenberger et al., 1994), e grupos recalcitrantes ou de síntese microbiana, que se acumulam durante a decomposição da matéria orgânica do solo, tais como C alquila, contribuem para a região alifática do espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN. Logo, é possível ter um material pouco humificado, porém com alta aromaticidade.

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

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

Outra região do espectro de  $^{13}\text{C}$  CP-MAS NMR que apresenta diminuição de intensidade durante o processo de humificação é aquela atribuída a grupos alifáticos oxigenados (50-110 ppm) (Senesi et al., 1996; Kögel-Knabner et al., 1991; Guggenberger et al., 1994; Preston, 1996) visto que nessa região ocorrem os sinais atribuídos a compostos de fácil degradação

microbiana, tais como aminoácidos (53 ppm), metoxila da lignina (58 ppm) (Catroux e Schnitzer, 1987) e carboidratos da celulose e hemicelulose (picos a 64, 74, 85 e 105 ppm) (Guggenberger et al., 1994).

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

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

Logo, de maneira geral, a região alifática oxigenada (50-110 ppm) da matéria orgânica do solo é lábil pois nessa região do espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN há contribuições importantes de carboidratos da celulose (O-alquila e di-O-alquila – 62-112 ppm), material proteico e lignina (metoxila e/ou C proteico – 50-62 ppm). Na região dos aromáticos, por sua vez, os sinais na região de 145-160 ppm (fenólico) e 112-124 ppm (aromático) podem ser considerados como grupos lábeis ou pouco decompostos pois ambos podem ser atribuídos à lignina. Por outro lado, os sinais atribuídos a CH alifático (0-50 ppm) e a região alargada entre 124 e 145 ppm, atribuída a C aromático alterado, podem ser consideradas como estruturas recalcitrantes ou de materiais decompostos.

### 3.9. A técnica de $^{13}\text{C}$ CP-MAS com desacoplamento defasado

Técnicas que simplifiquem os espectros de RMN são importantes na análise de moléculas complexas. Na técnica de desacoplamento defasado (DD) acrescenta-se na sequência de pulsos de CP-MAS convencional um período em que o desacoplador fica desligado de forma a provocar um alargamento seletivo, por interação dipolar, dos sinais de C que possuem forte acoplamento dipolar com o  $^1\text{H}$ .

A interação dipolar é inversamente proporcional a  $r^3$ , onde  $r$  é a distância internuclear. Assim, C ligados diretamente a  $^1\text{H}$  ( $r \cong 0,11$  nm) apresentam acoplamento muito maior do que C com H somente na vizinhança ( $r > 0,2$  nm) e essa diferença pode ser utilizada para diferenciar esses C. Entretanto, movimentos moleculares podem reduzir a intensidade do acoplamento dipolar e grupos com rápida rotação intramolecular, tais como  $\text{CH}_3$ , podem não ter seus sinais alargados (Opella et al., 1979). Assim, a técnica de DD suprime seletivamente sinais de C protonados em estruturas com menor mobilidade. Esse tempo de espera com o desacoplador desligado pode ser variado, normalmente entre 20 e 120  $\mu\text{s}$ , visando otimizar os sinais de interesse.

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

### 3.10. Ressonância Magnética Nuclear no Estado Líquido e Experimentos 2D

A dissolução da amostra no solvente tem como vantagem o menor alargamento de sinais devido ao movimento Browniano além do favorecimento dos processos de relaxação tornando possível a obtenção de sinais mais finos. Em misturas complexas, no entanto, a interação de sinais dificulta a obtenção de espectros de boa resolução e a integração das áreas. Para quantificação das espécies de C presentes na matéria orgânica as técnicas em estado sólido são, portanto, mais utilizadas com a vantagem da possibilidade de uso de amostras não alteradas de solo, isto é, sem necessidade de extração e, conseqüentemente, possíveis alterações químicas e análise de artefatos. Contudo, a RMN em solução pode ser útil no caso de estudos da interação da matéria orgânica com espécies químicas orgânicas e inorgânicas. Além disso, a partir da observação da relação direta entre a massa molecular e os coeficientes de difusão de distintas espécies orgânicas foi possível, com o experimento bidimensional DOSY (**D**iffusion **O**rdere**d S**pectroscop**Y** no qual observa-se num eixo os deslocamentos químicos e no outro os respectivos coeficientes de difusão), identificar a natureza complexa e supramolecular da matéria húmica em solução.

Após uma escolha prévia de moléculas orgânicas presentes na matéria orgânica natural e o estabelecimento de sua relação com características desejadas do ambiente é possível utilizar com sucesso a técnica em solução para monitorar esses indicadores. O aumento dos campos magnéticos e o desenvolvimento das técnicas bidimensionais abriram novas possibilidades de análise e ampliaram a perspectiva de uso. Especialmente considerando a possibilidade dos acoplamentos CLAE-RMN (cromatografia líquida de alta performance – ressonância magnética nuclear). São mostrados aqui exemplos de

usos das técnicas uni e bidimensionais de RMN em solução. Apesar de pouco explorada pela agronomia a RMN em solução tem um potencial enorme para o entendimento de processos importantes que ocorrem no solo.

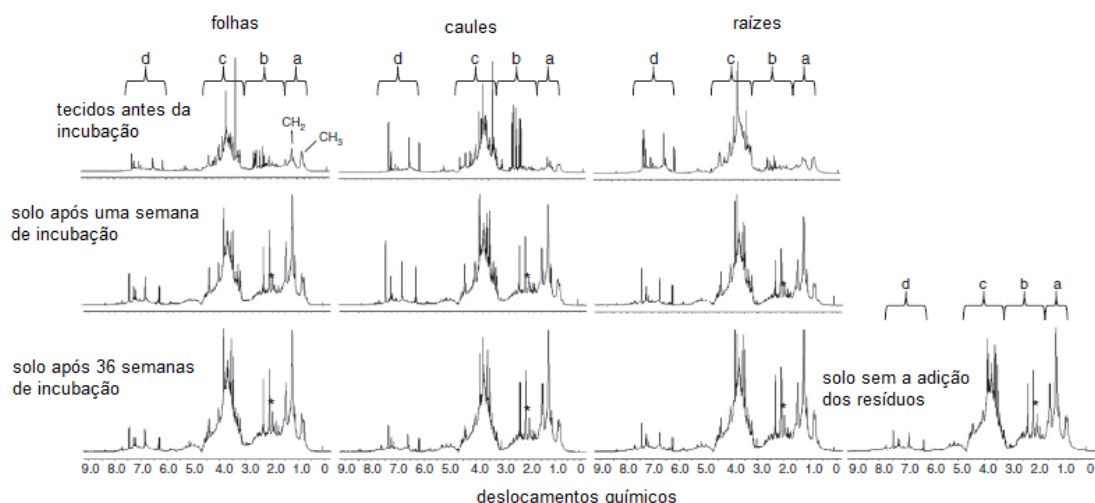
O passo mais crítico para análise de matéria orgânica natural do solo em RMN no estado líquido é, de acordo com Simpson (2001), o preparo da amostra. A presença de íons paramagnéticos induz perda de resolução e alargamento de sinais o que pode ser particularmente importante nas técnicas bidimensionais. A remoção desses íons é, portanto, fundamental. Algumas técnicas empregadas são o uso de agentes complexantes (4,5dihidróxi-1, 3-benzeno), tratamento com resina trocadora de cátions com Amberlite IR120, adição de KCl 0,03 mol L<sup>-1</sup> (Fan et al., 2000, Canellas et al. 2001, Simpson, 2001). Outro passo crítico é a escolha do solvente. Os mais usados são DMSO-d<sub>6</sub>(dimetilsulfóxido deuterado) e D<sub>2</sub>O/NaOD (água deuterada/hidróxido de sódio deuterado), sendo este último o mais usado, porém apresenta uma desvantagem pois é praticamente impossível preparar uma amostra de matéria orgânica humificada sem alguma contaminação de água e que produz o efeito conhecido como t1-noise (não relacionado a relaxação T<sub>1</sub>). Além disso, alguns compostos como amidas e hidroxilas podem não ser vistos na presença de solventes aquosos deuterados. Em alguns casos, portanto, pode ser mais apropriado usar DMSO-d<sub>6</sub>. Uma análise detalhada do modo de solubilização de substâncias húmicas por DMSO pode ser encontrada na revisão de Hayes (1985). Por fim, a concentração de amostras considerada ótima por Simpson (2001) para obtenção de experimentos homo e heteronucleares é de 100 mg de substâncias húmicas por mL.

### 3.11. Aplicações

Modificações nos ácidos húmicos isolados de solos provocados pela adição de resíduos de origem urbana (lodo da estação de tratamento de esgoto e composto de lixo urbano) foram estudadas por RMN <sup>13</sup>C em solução que permitiu verificar uma clara diminuição nas espécies alquílicas e aumento de carbono em polissacarídeos (Canellas et al., 2002a). Modificações nas substâncias húmicas decorrentes de mudanças de manejo ou de uso do solo também podem ser monitoradas relativamente por RMN <sup>13</sup>C em solução. Por exemplo, Canellas et al. (2002b) verificaram alterações na funcionalidade de ácidos húmicos isolados de solos altamente intemperizados (Argissolos e Latossolos) com a mudança de uso, i.e., de cana-de-açúcar para eucalipto; incluindo, principalmente, aumento de aromaticidade.

Um dos principais problemas agroambientais está relacionado à dinâmica do fósforo que em solos altamente intemperizados pode estar adsorvido especificamente os óxidos, hidróxidos e oxihidróxidos de ferro e alumínio e, portanto, apresentar concentrações limitantes na solução do solo e limitar a produção. Por outro lado, a eutrofização de solos especialmente em áreas de plantio direto e uso de resíduos animais pode aumentar muito a concentração desse elemento nos solos e mananciais. O estudo das espécies de fósforo associadas a matéria orgânica natural pode ser facilitado pelo uso da RMN <sup>31</sup>P em solução. Por exemplo, Busato et al. (2005) verificaram aumento significativo nas espécies mais lábeis de fósforo na matéria orgânica de um solo cultivado por longo tempo com cana-de-açúcar sem a queima dos resíduos durante a colheita em comparação com a área queimada. Anteriormente, Canellas et al. (2004) As espécies de fósforos encontradas na matéria orgânica em solos cultivados com leguminosas foram mais parecidas com as encontradas numa Mata adjacente do que com as espécies encontradas no solo cultivado com gramíneas. Esses estudos empregariam técnicas extremamente laboriosas e tediosas de fracionamento caso a RMN em solução não estivesse disponível.

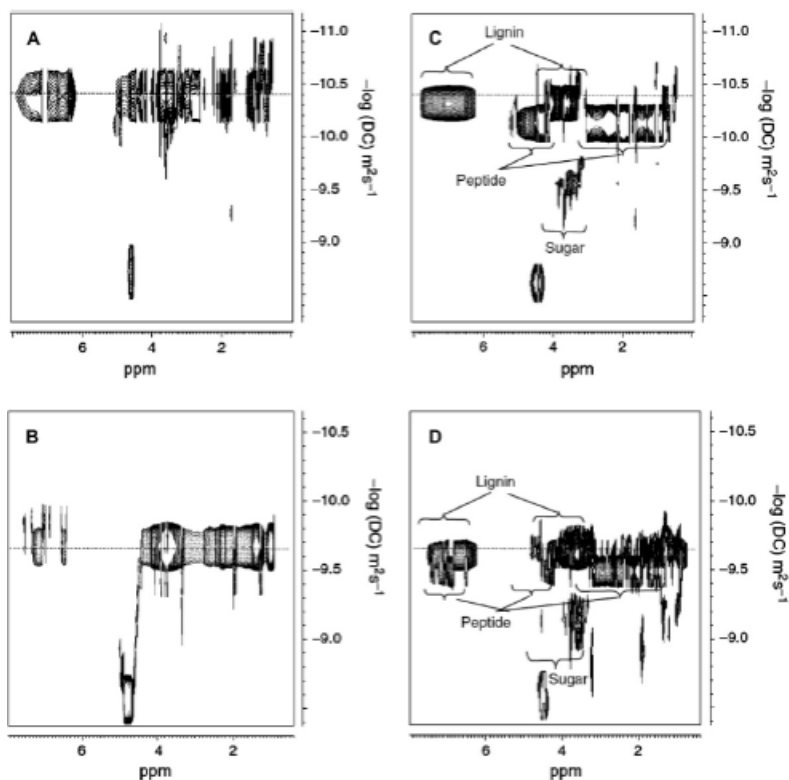
Apesar de menos explorada a <sup>1</sup>H RMN em solução pode ser também utilizada para monitorar as mudanças na matéria orgânica do solo. Por exemplo, Clemente et al (2013) monitoraram as mudanças decorrentes da adição de folhas, caules e raízes na matéria orgânica do solo e das substâncias húmicas por <sup>13</sup>C RMN no estado sólido e <sup>1</sup>H RMN em solução, respectivamente. As substâncias húmicas no solo incubado com folhas apresentaram maior quantidade de carbono alquílico enquanto no solo incubado com raízes a presença de compostos derivados da atividade microbiana foi maior. Claras implicações sobre as consequências de manejo do solo puderem ser obtidas incluindo aquelas relacionadas a de como aumentar a recalcitrância e a hidrofobicidade da matéria orgânica. Os espectros de <sup>1</sup>H RMN obtidos por Clemente et al. (2013) são mostrados na Figura 12.



**Figura 12.** Espectros  $^1\text{H}$  RMN em solução de diferentes tecidos de milho e das substâncias húmicas isoladas dos solos incubados por 1 e 36 semanas com os resíduos. Os espectros foram divididos nas seguintes regiões: (a) grupos metil e metilénos alifáticos de lipídios de alta e baixa massa molecular; (b) grupos metil e metilénicos alifáticos pertos de O e N, lipídios ou peptídeos; (c) O-álqulicos de açúcares ou ligninas; (d): sinais devidos a grupos aromáticos de ligninas ou proteínas. Os sinais de N-acetil que pode ser atribuído a peptideoxicanos ou quitinas também foram marcados (\*) bem como os derivados de peptídeos (P1 e P2).

FONTE: Adaptada de Clemente et al. (2013)

Simpson (2002) foi capaz de demonstrar que as substâncias húmicas em solução são, na realidade, associações ou agregados de moléculas de massa molecular relativamente pequena. Essas associações podem ser facilmente rompidas pela adição de ácidos orgânicos (Figura 13).



**Figura 13.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , DOSY, obtido a 500 MHz de uma amostra de ácido húmico (IHSS) preparada em  $\text{D}_2\text{O}$  a 133 mg/mL (A) e a 5 mg/mL (B) e após adição de 5 L de ácido acético (C e D). Antes da adição de ácido acético todos os componentes da MO difundem com aproximadamente o mesmo coeficiente de difusão indicando que as espécies estão agregadas. Depois da adição do ácido acético, os principais componentes da mistura (peptídeos, carboidratos e lignina) são separados de acordo com os seus coeficientes de difusão e estão na forma desagregada.

Para essa análise foi utilizado o experimento DOSY com duas concentrações diferentes de ácidos húmicos. Em ambas as concentrações, os coeficientes de difusão são semelhantes mostrando a associação de grupos funcionais tal qual como um polímero orgânico de uma macromolécula. Com a adição de ácido acético é promovido uma desagregação dos componentes da mistura resultando na formação de várias bandas discretas de difusão que estão correlacionadas com deslocamentos químicos consistentes as espécies mais abundantes nestas misturas tais como ligninas, ácidos graxos, carboidratos e peptídeos. Os tamanhos podem ser extrapolados a partir de comparações empíricas com coeficientes de difusão de compostos padrões e resultados estimaram massas moleculares na faixa de 200-600, 2000-2500 e 1000 Da para os diversos componentes das misturas. Muito abaixo dos milhões de Da das pseudo-macromoléculas húmicas estimadas por outras técnicas.

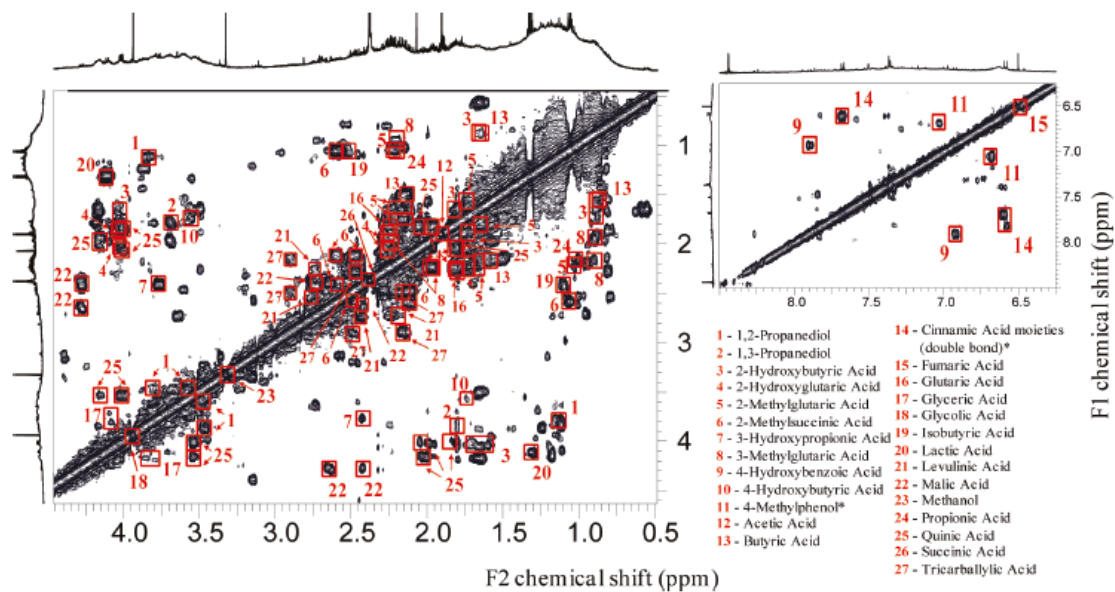
As técnicas bidimensionais permitiram (as mais usadas são apresentadas na Tabela a seguir) maior detalhamento sobre a estrutura da matéria orgânica em solução (Simpson, 2001) e tem sido utilizada também com sucesso para o monitoramento de ambientes pelo acompanhamento de moléculas traçadoras ou indicadoras (Simpson et al., 2011).

**Tabela 2.** Experimentos básicos em técnicas multidimensionais

EXPERIMENTOS HOMONUCLEARES: CORRELAÇÃO ENTRE ÁTOMOS IGUAIS ( $^1\text{H}/^1\text{H}$ )		
COSY	<b>C</b> orrelation <b>S</b> pectroscop <b>Y</b>	Acoplamento entre átomos de $^1\text{H}$ (até duas ou três ligações)
TOCSY	<b>T</b> otal <b>C</b> orrelation <b>S</b> pectroscop <b>Y</b>	Correlação entre todos os átomos de $^1\text{H}$ numa cadeia alquílica até que seja interrompida por um átomo de carbono quaternário
EXPERIMENTOS HETERONUCLEARES: CORRELAÇÃO ENTRE ÁTOMOS DIFERENTES ( $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ , $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ , $^1\text{H}/^{31}\text{P}$ )		
HSQC	<b>H</b> eteronuclear <b>S</b> ingle <b>Q</b> uantum <b>C</b> oherence	Observa a correlação de pares de átomos diferentes ligados entre si
HMQC	<b>H</b> eteronuclear <b>M</b> ultiple <b>Q</b> uantum <b>C</b> oherence	Observa a correlação de pares de átomos diferentes ligados entre si
HECTOR	<b>H</b> eteronuclear <b>C</b> orrelation	Observa a correlação de pares de átomos diferentes ligados entre si
HMBC	<b>H</b> eteronuclear <b>M</b> ultiple <b>B</b> ond <b>C</b> orrelation	Acoplamentos multinucleares até duas ou três ligações
<b>Experimentos de difusão:</b> DOSY ( <b>D</b> iffusion <b>O</b> rdered <b>S</b> pectroscop <b>Y</b> : observam-se deslocamentos químicos num eixo e os respectivos coeficientes de difusão no outro. Comparando com padrões é possível identificar diferentes compostos numa mistura		

Em nível molecular a RMN em solução é mais poderosa ferramenta de análise depois de escolhida a molécula alvo devido a sua versatilidade e possibilidade de acoplamento com técnicas de separação tais como os métodos cromatográficos (Simpson & Simpson, 2012). Por exemplo, Woods et al. (2011) aplicaram a cromatografia interação hidrofílica (HILIC) para separar a matéria orgânica dissolvida do rio Suwannee em 80 frações detectadas por RMN em solução. A técnica permitiu a identificação de componentes estruturais individualizados na matéria orgânica dissolvida (Figura 14). As técnicas convencionais de monitoramento de bioindicadores geralmente são muito trabalhosas e a simplificação decorrente de tratamento das amostras pode proporcionar perdas no entendimento das interações globais dessas moléculas indicadoras no ambiente estudado. A RMN permite uma visão holística do panorama físico-químico.





**Figura 14.** Espectros de RMN 2D COSY45 da fração simplificada HILIC (H09). Esquerda: Ampliação da região entre 0,5 até 4,5 ppm; direita: ampliação da região entre 6,3 até 8,5 ppm. Os assinalamentos foram a partir de base de dados.

A RMN em solução ainda tem muito a contribuir no entendimento dos principais processos que ocorrem no solo, pois ainda está no seu estágio inicial de desenvolvimento (Simpson et al., 2011). Porém será fundamental para o desenvolvimento das práticas que tornarão sustentáveis as atividades no solo.

#### LITERATURA RECOMENDADA

- Abragam, A., Bleaney, B. 1986. Electron paramagnetic resonance of transition ions. New York, Dover.
- Alberts, J.J., Schindler, J.E., Miller, R.W., Nutter, D.E. 1974. Elemental mercury evolution mediated by humic acid. *Science*. 184, 895-897.
- Arshad, M.A., Ripmeester, J.A., Schnitzer, M. 1988. Attempts to improve solid-state carbon-13 NMR spectra of whole mineral soils. *Can. J. Soil Sci.* 68, 593-602.
- Atkins, P.W. 1998. Physical chemistry. 6<sup>th</sup>. ed. Oxford, Oxford University Press.
- Baldock, J.A., Oades, J.M., Vassalo, A.M., Wilson, M.A. 1990. Solid-state CP/MAS <sup>13</sup>C NMR analysis of bacterial and fungal cultures isolated from a soil incubated with glucose. *Aust. J. Soil Res.* 28, 213-225.
- Baldock, J.A., Oades, J.M., Waters, A.G., Peng, X., Vassalo, A.M., Wilson, M.A. 1992. Aspect of the chemical structure of soil organic materials as revealed by solid-state <sup>13</sup>C NMR spectroscopy. *Biogeochemistry*. 16, 1-42
- Barančíková, G., Senesi, N., Brunetti, G. 1997. Chemical and spectroscopic characterization of humic acids isolated from different Slovak soil types. *Geoderma*. 78, 251-266.
- Barton, D.H.R., Schnitzer, M. 1963. A new experimental approach to the humic acid problem. *Nature*, 198, 217-218.
- Blois, M.S.Jr., Brown, H.W., Mailing, J.E. 1961. Precision g-value measurements of free radicals of biological interest. In: Blois, M.S.Jr., Brown, H.W., Lemmon, R.M., Lindlom, R.O., Weissbluth, M. (Eds.) *Free radicals in biological systems*. New York, Academic. p. 117-131.
- Boyd, S.A., Sommers, L.E., Nelson, D.W., West, D.X. 1983. Copper(II) binding by humic acid extracted from sewage sludge: an electron spin resonance study. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 47, 43-46.
- Bunce, N.J. 1987. Introduction to the interpretation of electron spin resonance spectra of organic radicals. *J. Chem. Educ.* 64, 907-914.
- Busato, JG, Velloso ACX, Canellas LP. Fósforo num Cambissolo cultivado com cana-de-açúcar por longo tempo: II – análise de ácidos húmicos por RMN <sup>31</sup>P. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 29: 945 - 953, 2005.
- Canellas LP, Espíndola JA, Guerra JGM, Teixeira MG, Velloso ACX, Rumjanek VM. Phosphorus analysis in soil under herbaceous perennial leguminous cover by nuclear magnetic spectroscopy. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*39: 589 - 596, 2004.
- Canellas LP, Santos GA, Guridi F, Rumjanek VM, Braz-Filho R. Aumento da resolução de espectros de RMN <sup>13</sup>C de ácidos húmicos com uso de KCl 0,03 mol L<sup>-1</sup>. *Química Nova*24: 131 - 132, 2001.
- Canellas LP, Santos GA, Rumjanek VM, Braz-Filho R, Guridi F. Structural features of humic acids from soils amended with urban organic residues: an elemental composition, NMR <sup>13</sup>C and Py-GC/MS study. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*. 26: 333 - 341, 2002.
- Canellas LP, Velloso ACX, Rumjanek V, Guridi F, Olivares FL, Santos GA, Braz-Filho, R. Distribution of the humified fractions and characteristics of humic acids of an ultissol under cultivation of eucalyptus and sugar-cane. *Terra*20: 371 - 381, 2002.
- Carrington, A., McLachlan, A.D. 1967. Introduction to magnetic resonance. New York, Harper & Row.

- Catroux, G., Schnitzer, M. 1987. Chemical, spectroscopic, and biological characteristics of the organic matter in particle size fractions separated from an Aquoll. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 51, 1200-1207.
- Cheshire, M.V., Berrow, M.L., Goodman, B.A., Mundie, C.M. 1977. Metal distribution and nature of some Cu, Mn and V complexes in humic and fulvic acid fractions of soil organic matter. *Geochim. Cosmochim. Acta.* 41, 1131-1138.
- Cheshire, M.V., McPhail, D.B. 1996. Hyperfine splitting in the electron spin resonance solution spectra of humic substances. *European J. Soil Sci.* 47, 205-213.
- Clemente JS, Simpson MJ, Simpson AJ, Yanni SF, Whalen JK. Comparison of soil organic matter composition after incubation with maize leaves, roots, and stems *Geoderma* 192: 86–96, 2013.
- Coelho Neto, J.A. 1992. Processamento de sinais de ressonância paramagnética eletrônica. Projeto de um sistema de varredura rápida para R.P.E. Rio de Janeiro. Dissertação (Mestrado). Instituto de Física, Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- Colnago, L.A., Martin-Neto, L., Miyazawa, M., Vieira, E.M., Bonagamba, T.J., Panepucci, H. 1997. Estudo da razão E<sub>4</sub>/E<sub>6</sub> e aromaticidade por RMN de C<sup>13</sup> em estado sólido da AH de um Latossolo roxo. In: 2<sup>a</sup> Encontro Brasileiro sobre Substâncias Húmicas (1997 : São Carlos). Anais... São Carlos, EMBRAPA-CNPDIA. p. 167.
- Conte, P., Piccolo, A., van Lagen, B., Buurman, P., de Jager, P.A. 1997. Quantitative aspects of solid-state <sup>13</sup>C NMR spectra of humic substances from soils of volcanic systems. *Geoderma*. 80, 327-338.
- Dai, K.H., Johnson, C.E. 1999. Applicability of solid-state <sup>13</sup>C CP/MAS NMR analysis in Spodosols: chemical removal of magnetic materials. *Geoderma*. 93, 289-310.
- Drago, R.S. 1992. Physical methods for chemists. 2<sup>nd</sup> ed. Orlando, Saunders.
- Drozd, J., Jezierski, A. 1994. Electron spin resonance studies on humus compounds isolated from soils contaminated by copper smelters. In: Senesi, N., Miano, T. (Ed.) *Humic Substances in the Global Environment and Implications on Human Health*. Amsterdam, Elsevier. p. 1119-1124.
- Dudley, R.L., Fyfe, C.A. 1982. Evaluation of the quantitative reliability of the <sup>13</sup>C CP/MAS technique for the analysis of coals and related materials. *Fuel* 61, 651-657.
- Fan, T. W.-M., R. M. Higashi and A. N. Lanes. 2000. Chemical Characterization of a Chelator-Treated Soil Humate by Solution-State Multinuclear Two-Dimensional NMR with FTIR and Pyrolysis-GCMS, *Environ. Sci Technol.* 34, 1636-1646.
- Ferreira, J.A., Nascimento, O.R., Martin-Neto, L. 2001. Hydrophobic interactions between spin-label 5-SASL and humic acid as revealed by ESR spectroscopy. *Environ. Sci. Technol.* 35, 761-765.
- Filip, Z., Cheshire, M.V., Goodman, B.A., McPhail, D.B. 1985. The occurrence of copper, iron, zinc and others elements and the nature of some copper and iron complexes in humic substances from municipal refuse disposed in a landfill. *Sci. Total Environ.* 44, 1-16.
- Freitas, J.C.C., Bonagamba, T.J. 1999. Fundamentos e Aplicações da Ressonância Magnética Nuclear. Os Núcleo Atômicos e a RMN. Rio de Janeiro, AUREMN.
- Fründ, R., Haider, K., Lüdemann, H.-D. 1994. Impacts of soil management practices on the organic matter structure – investigation by CPMAS <sup>13</sup>CNMR-spectroscopy. *Z. Pflanzenernähr. Bodenk.* 157, 2935.
- Fründ, R., Haider, K., Lüdemann, H.-D. 1994. Impacts of soil management practices on the organic matter structure – investigation by CPMAS <sup>13</sup>CNMR-spectroscopy. *Z. Pflanzenernähr. Bodenk.* 157, 2935.
- Gil, V.M.S., Geraldes, C.F.G.C. 1987. Ressonância Magnética Nuclear. Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian.
- Gonzalez-Vila, F.J., Lentz, H., Lüdemann, H.-D. 1976. FT-<sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance spectra of natural humic substances. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 72, 1063-1070.
- Goodman, B.A., Cheshire, M.V. 1975. The bonding of vanadium in complexes with humic acids: an electron paramagnetic study. *Geochim. Cosmochim. Acta.* 39, 1711-1713.
- Goodman, B.A., Hall, P. L. 1994. Electron paramagnetic resonance spectroscopy. In: Wilson, M.J. (Ed.) *Clay Mineralogy: Spectroscopic and Chemical Determinative Methods*. London, Chapman e Hall. p. 173-225.
- Guggenberger, G., Christensen, B.T., Zech, W. 1994. Land-use effects on the composition of organic matter in particle-size separates of soil: I. lignin and carbohydrate signature. *Eur. J. Soil Sci.* 45, 449-458.
- Günther, H. 1995. NMR spectroscopy - Basic principles, concepts, and applications in chemistry. 2<sup>nd</sup> ed. New York, Wiley.
- Hagaman, E.W., Chambers, R.R., Woody, M.C. 1986. Determination of the fraction of organic carbon observable in coals and coal derivatives measured by high-resolution solid state carbon-13 nuclear magnetic resonance spectrometry. *Anal. Chem.* 58, 387-394.
- Hatcher, P.G., Schnitzer, M., Dennis, L.W., Maciel, G.E. 1981. Aromaticity of humic substances in soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 45, 1089-1094.
- Hemminga, M.A., Buurman, P. 1997. Editorial: NMR is soil science. *Geoderma*. 80, 221-224.
- Hu, W., Mao, J., Xing, B., Schmidt-Rohr, K. 2000. Poly(methylene) Crystallites in Humic Substances Detected by Nuclear Magnetic Resonance. *Environ. Sci. Technol.* 34, 530-534.
- Inbar, Y., Chen, Y., Hadar, Y. 1989. Solid-state carbon-13 nuclear magnetic resonance and infrared spectroscopy of composted organic matter. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 53, 1695-1701.
- Jezierski, A., Drozd, J., Jerzykiewicz, M., Chen, Y., Kaye, K.J. 1998. EPR in the environmental control: copper complexes and free radicals in soil and municipal solid waste compost. *Appl. Magn. Reson.* 14, 275-282.
- Jerzykiewicz, M., Drozd, J., Jezierski, A. 1999. Organic radicals and paramagnetic metal complexes in municipal solid waste composts. An EPR and chemical study. *Chemosphere* 39, 253-268.
- Jezierski, A., Czechowski, F., Jerzykiewicz, M., Chen, Y., Drozd, J. 2000a. Electron paramagnetic resonance (EPR) studies on stable and transient radicals in humic acids from compost, soil, peat and brown coal. *Spectrochim. Acta A* 56, 379-385.
- Jezierski, A., Czechowski, F., Jerzykiewicz, M., Drozd, J. 2000b. EPR investigation of structure of humic acids from compost, soil, peat and soft brown coal upon oxidation and metal uptake. *Appl. Magn. Reson.* 18, 127-136.
- Kinchesh, P., Powlson, D.S., Randall, E.W. 1995. <sup>13</sup>C NMR studies of organic matter in whole soils: I. Quantitation possibilities. *Eur. J. Soil Sci.* 46, 125-138.
- Kögel-Knabner, I., Zech, W., Hatcher, P.G. 1991. Chemical structural studies of forest soil humic acids: aromatic carbon fraction. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 55, 241-247.
- Lakatos, B., Tibai, T., Meisel, J. 1977. EPR spectra of humic acids and their metal complexes. *Geoderma*. 19, 319-338.

- Mangrich, A.S., Vugman, N.V. 1988. Bonding parameters of vanadyl ion in humic acid from the Jucu river estuarine region, Brazil. *Sci. Total Environ.* 75, 235-241.
- Mangrich, A.S., Lermen, A. W., Santos, E. J., Gomes, R. C., Coelho, R. R. R., Linhares, L. F., Senesi, N. 1998. Electron paramagnetic resonance and ultraviolet-visible spectroscopic evidence for copper porphyrin presence in actinomycete melanins from soils. *Biol. Fertil. Soils.* 26, 341-345.
- Martin-Neto, L., Nascimento, O.R., Talamoni, J., Poppi, N.R. 1991. EPR of micronutrients-humic substances complexes extracted from a Brazilian soil. *Soil Sci.* 51, 369-376.
- Martin-Neto, L., Andriulo, A. E., Tragheta, D. G. 1994b. Effects of cultivation on ESR spectrum of organic matter from soil size fractions of a mollisol. *Soil Sci.* 157, 365-372.
- Martin-Neto, L., Vieira, E.M., Sposito, G. 1994a. Mechanism of atrazine sorption by humic acid: A spectroscopic study. *Environ. Sci. Technol.* 28, 1867-1873.
- Martin-Neto, L., Rossel, R., Sposito, G. 1998. Correlation of spectroscopy indicators of humification with mean annual rainfall along a grassland climosequence. *Geoderma.* 81, 305-311.
- McBride, M.B. 1978. Transition metal bonding in humic acid: an ESR study. *Soil Sci.* 126, 200-209.
- Newman, R.H., Tate, K.R., Barron, P.F., Wilson, M.A. 1980. Towards a direct, non-destructive method of characterising soil humic substances using  $^{13}\text{C}$  NMR. *J. Soil Sci.* 31, 623-631.
- Newman, R.H., Tate, K.R. 1984. Use of alkaline soil extracts for  $^{13}\text{C}$  NMR characterization of humic substances. *J. Soil Sci.* 35, 47-54.
- Neyroud, J.A., Schnitzer, M. 1972. The chemistry of high molecular weight fulvic acid fractions. *Can. J. Chem.* 52, 4123-4132.
- Novotny, E.H., Martin-Neto, L. 2000. Factors affecting quantitative organic free radical analysis by EPR. In: 10<sup>th</sup> International Meeting of the International Humic Substances Society (2000 : Toulouse-França). *Anais... Toulouse, IHSS.* p. 85-90.
- Novotny, E.H., Martin-Neto, L. 2002. Effects from humidity and metal ions on the free radical analysis of peat humus. *Geoderma.* 106, 305-317.
- Olk, D.C., Cassman, K.G., Fan, T.W.M. 1995. Characterization of two humic acids fractions from a calcareous vermiculitic soil: implications for the humification process. *Geoderma.* 65, 195-208.
- Olk, D.C., Brunetti, G., Senesi, N. 1999. Organic matter in double-cropped lowland rice soils: Chemical and spectroscopic properties. *Soil Sci.* 164, 633-649.
- Oniki, T., Takahama, U. 1994. Effects of reaction time, chemical reduction, and oxidation, on ESR in aqueous solutions of humic acids. *Soil Sci.* 158, 204-210.
- Opella, S.J., Frey, M.H., Cross, T.A. 1979. Selection of nonprotonated carbon resonances in solid-state nuclear magnetic resonance. *J. Am. Chem. Soc.* 101, 5854-5856.
- Parish, R.V. 1990. NMR, NQR, EPR and Mössbauer spectroscopy in inorganic chemistry. London, Ellis Horwood.
- Peersen, O. B., Wu, X., Kustanovich, I., Smith, S.O. 1993. Variable-amplitude cross-polarization MAS NMR. *J. Magn. Reson. A.* 104, 334-339.
- Piccolo, A. 2000. From humic supra-molecular self-associations to stable polymeric structures via enzymatic and biomimetic catalyses. In: 10<sup>th</sup> International Meeting of the International Humic Substances Society (2000 : Toulouse-França). *Anais... Toulouse, IHSS.* p. 295.
- Piccolo, A. 2001. The supramolecular structure of humic substances. *Soil Sci.* 166, 810-832.
- Pfeffer, P.E., Gerasimowicz, W.V., Piotrowski, E.G. 1984. Effect of paramagnetic iron on quantitation in carbon-13 cross polarization magic angle spinning nuclear magnetic resonance spectrometry of heterogeneous environmental matrices. *Anal. Chem.* 56, 734-741.
- Poole, C.P. 1983. Electron spin resonance: A comprehensive treatise on experimental techniques. 2<sup>nd</sup> ed. New York, Wiley.
- Preston, C.M., Blackwell, B.A. 1985. Carbon-13 nuclear magnetic resonance for a humic and a fulvic acid: signal-to-noise optimization, quantitation, and spin echo techniques. *Soil Sci.* 139, 88-96.
- Preston, C.M., Dudley, R.L., Fyfe, C.A., Mathur, S.P. 1984. Effects of variations in contact times and copper contents in a  $^{13}\text{C}$  CPMAS study of samples of four organic soils. *Geoderma.* 33, 245-253.
- Preston, C.M., Newman, R.H., Rother, P. 1994. Using CP-MAS NMR to assess effects of cultivation on the organic matter of particle size fractions in a grassland soil. *Soil Sci.* 157, 26-35.
- Preston, C.M. 1996. Applications of NMR to soil organic matter analysis: history and prospects. *Soil Sci.* 161, 144-166.
- Riffaldi, R., Schnitzer, M. 1972. Electron spin resonance spectrometry of humic substances. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 36, 301-305.
- Saab, S.C., Mello, N.C., Colnago, L.A., Conceição, M., Novotny, E.H., Martin-Neto, L. 1999. Anéis Aromáticos Condensados e Relação  $E_4/E_6$ : Estudo de Ácidos Húmicos por  $^{13}\text{C}$  NMR CPMAS Usando Desacoplamento Defasado. In: XXVII Congresso Brasileiro de Ciência do Solo (1999 : Brasília). *Anais... Brasília, EMBRAPA-Cerrados.* CD-ROM. Número: T044-7.
- Schmidt, M.W.I., Knicker, H., Hatcher, P.G., Kögel-Knabner, I. 1997. Improvement of  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  CPMAS NMR spectra of bulk soils, particle size fractions and organic material by treatment with hydrofluoric acid (10 %). *Eur. J. Soil Sci.* 48, 319-328.
- Schnitzer, M., Skinner, S.L.M. 1969. Free radicals in soil humic compounds. *Soil Sci.* 108, 383-390.
- Schnitzer, M., Khan, S.U. 1978. *Soil Organic Matter.* Amsterdam, Elsevier.
- Schnitzer, M., Lévesque, M. 1979. Electron spin resonance as a guide to the degree of humification of peats. *Soil Sci.* 127, 140-145.
- Simpson, A.J. 2001. Multidimensional solution state NMR of humic substances: a practical guide and review. *Soil Sci.*, 166, 795-809.
- Simpson AJ, McNally DJ, Simpson MJ. NMR spectroscopy in environmental research: From molecular interactions to global processes. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* 58 97-175, 2011.
- Simpson MJ, Simpson AJ. The Chemical Ecology of Soil Organic Matter: molecular constituents *J Chem Ecol* 38:768-784, 2012.
- Senesi, N. 1990. Application of Electron Spin Resonance (ESR) Spectroscopy in Soil Chemistry. *Advances in soil science*, V.14. New York, Springer.
- Senesi, N., Bocian, D.F., Sposito, G. 1985. Electron spin resonance investigation of copper(II) complexation by soil fulvic acid. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 49, 114-119.
- Senesi, N., Miano, T.M., Brunetti, G. 1996. Humic-like substances in organic amendments and effects on native soil humic substances. In: Piccolo, A. (Ed.) *Humic substances in terrestrial ecosystems.* Amsterdam, Elsevier. p. 531-593.
- Senesi, N., Steelink, C. 1989. Application of ESR spectroscopy to the study of humic substances. In: Hayes, M.H.B., MacCarthy, P., Malcolm, R.L., Swift, R.S. (Eds.) *Humic substances II. In search of structure.* Chichester, Wiley. p. 373-407.

- Silverstein, R.M., Bassler, G.C., Morrill, T.C. 1991. Spectrometric identification of organic compounds. 5<sup>th</sup> ed. New York, Wiley.
- Smernik, R.J., Oades, J.M. 2000. The use of spin counting for determining quantitation in solid state <sup>13</sup>C NMR spectra of natural organic matter. 1. Model systems and the effects of paramagnetic impurities. *Geoderma*. 96, 101-129.
- Sposito, G., Martin-Neto, L., Yang, A. 1996. Atrazine complexation by soil humic acids. *J. Environ. Qual.* 25, 1203-1209.
- Starsinic, M., Otake, Y., Walker Jr., P.L., Painter, P.C. 1984. Application of FTIR spectroscopy to the determination of COOH groups in coal. *Fuel*. 63, 1002-1007.
- Steelink, C., Tollin, 1962. Stable free radicals in soil humic acid. *Biochimica Biophysica Acta*, 59, 25-34.
- Title, R.S. 1963. Electron paramagnetic resonance spectra of Cr<sup>+</sup>, Mn<sup>2+</sup> and Fe<sup>3+</sup> in cubic ZnS. *Phys. Rev.* 131, 623-627.
- Veeman, W.S. 1997. Nuclear magnetic resonance, a simple introduction to the principles and applications. *Geoderma*. 80, 225-242.
- Weil, J.A., Bolton, J.R., Wertz, J.E. 1994. Electron paramagnetic resonance: Elementary theory and practical applications. New York, Wiley.
- Wickman, H.H., Klein, M.P., Shirley, D.A. 1965. Paramagnetic resonance of Fe<sup>3+</sup> in polycrystalline ferrichrome A. *J. Chem. Phys.* 42, 2113-2116.
- Wilson, M.A. 1987. NMR techniques and applications in geochemistry and soil chemistry. Oxford, Pergamon Press.
- Wilson, M.A. 1990. Application of nuclear magnetic resonance spectroscopy to organic matter whole soils. In: MacCarthy, P., Clapp, C.E., Malcolm, R.L., Bloom, P.R. (Ed.) *Humic substances in soil and Crop Sciences; Selected Readings*. Madison, American Society of Agronomy and Soil Science Society of America. p. 221-260.
- Woods GC, Simpson MJ, Koerner PJ, Napoli A, Simpson AJ. HILIC-NMR: Toward the Identification of Individual Molecular Components in Dissolved Organic Matter. *Environ. Sci. Technol.* 45: 3880–3886, 2011.

## B. PIRÓLISE E REAÇÕES DE HIDRÓLISE E METILAÇÃO TERMICAMENTE ASSISTIDAS (TERMOQUEMÓLISE) PARA IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS NAS SUBSTÂNCIAS HÚMICAS

Luciano Pasqualoto Canellas

### 1. INTRODUÇÃO

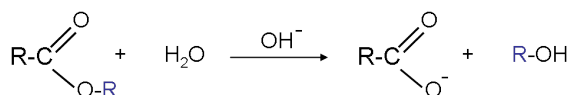
A pirólise consiste na degradação térmica da matéria em atmosfera inerte. É um método analítico termodegradativo muito útil na caracterização química de compostos e misturas complexas (Silvério et al., 2008). Com a transferência muito rápida de energia térmica para a amostra ocorre a perda de elétrons e a formação de radicais livres. A fragmentação do composto ocorre para estabilização do restante da estrutura e os fragmentos gerados podem ser úteis na identificação de estruturas químicas especialmente quando separadas por cromatografia gasosa e identificadas por espectrometria de massas (CG-MS). A técnica tem sido amplamente usada para a caracterização da matéria orgânica do solo (Sainz-Jimenez, 1996). O principal avanço no método na aplicação em matéria orgânica foi o uso de reações de hidrólise e metilação antes do aquecimento da amostra (Challinor, 1989, 1991). As reações de hidrólise e metilação termicamente assistidas (THM) ou termoquemólise (do inglês thermochemolysis) evitam as perdas de grupos COOH e OH durante a fase de transferência de energia térmica e diminuindo a produção de artefatos. Vários agentes alquilantes tem sido proposto para a termoquemólise das amostras. O mais usado continua sendo o hidróxido de tetrametil amônio (TMHA). Outro passo significativo na área foi desenvolvimento da termoquemólise off-line permitindo o uso de grande quantidade de amostras (gramas em vez de pouco miligramas) e aumentando a consistência da análise comparativa por métodos estatísticos. Por fim, apesar de rápido e capaz de identificar componentes moleculares presentes na matéria orgânica a tanto a pirólise como as reações de hidrólise e metilação termicamente assistidas necessitam da extração prévia da matéria orgânica e suas frações para obtenção de resultados confiáveis uma vez que a interação com a matriz mineral em amostras intactas de solo produz uma quantidade de artefatos indesejáveis especialmente reações de ciclização e formação de compostos aromáticos. Spaccini et al. (2013) propuseram o tratamento prévio de amostras com ácido fluorídrico antes das reações de hidrólise e metilação. A técnica é capaz de reduzir os problemas da interação com silicatos candidatando o método a avaliação direta da qualidade da matéria orgânica do solo.

### 2. FUNDAMENTOS

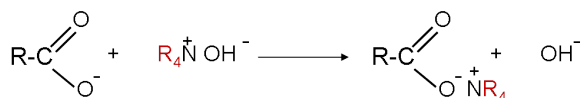
A pirólise é um método analítico térmico muito útil para estudo de amostras e misturas complexas tais como as que ocorrem na matéria orgânica no solo. A transferência de grande quantidade de energia térmica em frações de milissegundos sob atmosfera inerte retira elétrons da amostra produzindo radicais orgânicos. É gerada uma instabilidade pela perda de elétrons. As vibrações das ligações entre os átomos são afetadas e para estabilizar a estrutura ocorre a fragmentação e o rearranjo. Os fragmentos voláteis podem ser diretamente identificados por espectrometria de massas (Py-MS) ou ainda serem capturados e separados por cromatografia gasosa e, em seguida, identificados por espectrometria de massas (Py/GC-MS). A pirólise pode ser realizada em fornos ou em pirolizadores que transferem energia térmica por filamento aquecido por resistência ou por indução. Este processo é chamado de *flash* pirólise por indução térmica ou pirólise por *Curie-Point* na qual poucos microgramas (5 a 10 µg) de amostra são colocados no porta-amostra, a energia térmica (700°C) é rapidamente transferida sob alto vácuo e, dessa forma, os produtos analisados por espectrometria. É a chamada *flash* pirólise *on line*. O fundamento da técnica é, portanto, a produção de radicais livres e identificação dos produtos de reação térmica. Uma descrição detalhada do método e dos equipamentos pode ser encontrada em Bracewell et al. (1989).

A transferência rápida de grande quantidade de energia produz uma série de reações na amostra, especialmente a de descarboxilação e desidroxilação. Como os ácidos carboxílicos e as hidroxilas fenólicas e enólicas são os principais grupamentos funcionais responsáveis pela acidez da matéria orgânica, trata-se de uma questão pertinente. Challinor (2001) introduziu o pré-tratamento da amostra com um reagente capaz de hidrolisar ligações ésteres e éteres e, em seguida, metilar as posições geradas. A reação de hidrólise e metilação termicamente assistida (HMTA) ficou mais conhecida como *termoquemólise*. A amostra é, portanto, previamente tratada com o agente alquilante sendo o TMHA o mais utilizado (Figura 1) e, depois, submetida ao aquecimento.

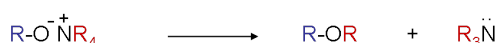
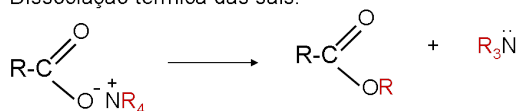
Hidrólise Alcalina:



Formação de sais de amônio:



Dissociação térmica dos sais:



**Figura 1.** Mecanismo da hidrólise e metilação assistida termicamente com sais quaternários de amônio.

FONTE: Adaptado de Challinor (2001)

Além disso, foi desenvolvido o método *off-line*, no qual a reação entre a amostra e o agente alquilante ocorre em ampolas fechadas sob vácuo. Após o aquecimento a ampola é aberta e os produtos são capturados com solvente apropriado e analisados por métodos cromatográficos e espectrométricos (Hatcher et al., 1995). Quantidades maiores de amostras (20-30 mg) podem ser analisadas pois não são inseridas diretamente no probe pirolisador. Uma variação desse método de hidrólise e metilação termicamente assistida *off-line* foi popularizada por Grasset e Ambles (1998), que consiste na termoquemólise preparativa. Assim, grandes quantidades de amostras (1 a 2 g) são colocadas em barcos de quartzo e banhadas com 1 a 2 mL de TMAH 25% em metanol. Após a secagem, as amostras são transferidas para um reator tubular de vidro Pyrex que, por sua vez, é introduzido num forno com temperatura programada (Figura 2).

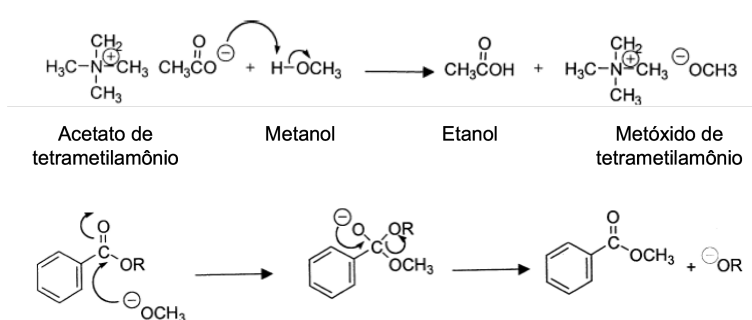


**Figura 2.** visão geral do dispositivo utilizado para reação preparativa de hidrólise e metilação termicamente assistida (termoquemólise preparativa *off-line*). As amostras são colocadas nos barcos de quartzo e inseridas no reator tubular. A temperatura do forno é controlada e o gás inerte de arraste conduz os compostos voláteis para os traps vidro contendo solvente orgânico e imersos em banho de gelo. Após a remoção do solvente os compostos são analisados.

A amostra é aquecida em atmosfera inerte proporcionada por um fluxo constante de gás inerte (normalmente hélio) que arrasta os produtos voláteis para fora do forno. Os produtos da termoquemólise são capturados em frascos contendo solventes (normalmente clorofórmio devido a facilidade de remoção) imersos em banho de gelo. O solvente é retirado sob baixa temperatura e os produtos então analisados com métodos apropriados.

Hatcher e Clifford (1994) verificaram que o TMAH é tão efetivo a 300°C tanto quanto a 700°C para a produção de produtos voláteis em amostras de ácidos húmicos (ésteres e diésteres metílicos de ácidos graxos, ésteres metílicos de ácidos carboxílicos aromáticos e metoxibenzenos), sugerindo que uma quantidade significativa de quebra de ligações acontece a temperaturas sub-pirolíticas. É mais apropriado denominar o processo como termoquemólise já que se usa temperaturas abaixo da pirólise convencional. Resultados de termoquemólise em baixas temperaturas (250, 300 e 400°C) são facilmente encontrados e de acordo com Spaccini et al (2009). Estas “baixas temperaturas” são suficientes para reduzir os rearranjos pirolíticos.

Embora o TMAH seja o agente derivatizante mais utilizados, outros reagentes têm sido estudados. Hidróxidos de tetraetil-, tetrapropil- ou tetrabutilamônio possibilitam a discriminação entre ácidos alquilados ou fenóis e grupamentos metílicos pré-existentes (Challinor, 1996; Guignard et al., 2000). Os acetatos de tetraalquilamônio (menos básicos que os hidróxidos) alquilam somente ácidos livres sem promover a hidrólise (Hardell & Nilvebrant, 1999; Grasset et al., 2002). O acetato de tetrametilamônio (TMAAc) pode substituir o TMAH devido a sua seletividade e condições mais suave de reação. O TMAAc foi usado pela primeira vez na termoquimólise por Hardell e Nilvebrant (1999). É seletivo para a metilação de ácidos livres sem alterar qualquer éster presente, uma vez que não reagem em condições de alcalinidade média diferente do TMAH, uma base muito forte, que hidrolisa os ésteres e metila os ácidos resultantes, bem como metila qualquer ácido livre presente. O estudo comparativo do tratamento da matéria orgânica natural aquática com sais de tetrametilamônio de diferente forças de basicidade foi realizado por Joll et al. (2004). Foram empregados além do TMAH e TMAAc, o carbonato de tetrametilamônio (TMACO<sub>3</sub>) e brometo de tetrametilamônio (TMABr). Este último não foi efetivo como reagente termoquimolítico. O TMAAc em metanol produziu uma gama diferente de compostos em relação ao TMAH em metanol e TMACO<sub>3</sub> em água. Somente neste tratamento foi detectado a presença de compostos sulfurados e ésteres metílicos. Os autores propuseram um mecanismo para a formação destes metil-ésteres envolvendo a transesterificação com íon metóxido derivado do solvente (Figura 3) e concluíram que o uso do TMAAc em metanol na termoquimólise “*off-line*” preserva mais a informação estrutural da matéria orgânica que o uso do TMAH/MeOH ou TMACO<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O.



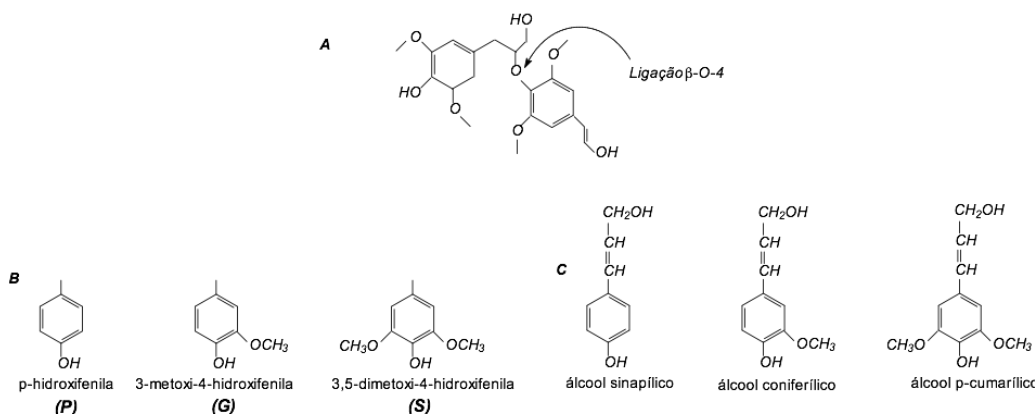
**Figura 3.** Mecanismos propostos por Joll et al., 2004 para a formação *in situ* de metóxido de tetrametilamônio e da transesterificação de ligações ésteres com o íon metóxido para produzir metil ésteres.

O isolamento de substâncias húmicas e a remoção de minerais são processos tediosos e muitas vezes alteram a natureza química dos compostos presentes. O uso de amostras intactas de solo sem a passagem por procedimentos de extração e a obtenção de resultados de forma rápida pela *flash* pirólise é tentador e vem sendo usado especialmente de forma relativa, comparando-se efeitos de uso e manejo na qualidade da matéria orgânica do solo (Hempling & Schulten, 1990). Uma limitação encontrada para determinação da natureza química das amostras intactas de solo por pirólise são as reações de ciclização e aromatização de compostos da matéria orgânica do solo induzidas pela presença das argilas. Faure et al. (2006) usaram compostos modelos e substâncias húmicas naturais e observaram a descarboxilação de ácidos alcanóicos durante a pirólise e produção de alcenos de cadeia mais curtas. Na presença de esmectita, foi observada uma intensa aromatização das amostras com geração de alquilbenzenos e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos durante a pirólise de alcanóis e, especialmente, de ácidos alcanóicos. A desidratação de álcoois catalisada por argilas do tipo 2:1 é uma reação já bem conhecida. O "embaralhamento" das estruturas dos alcenos produzidos e a ciclização e aromatização ocorrem na presença de esmectita. Os produtos são detectados, mas a descrição de como isso ocorre ainda não é muito claro. Foi demonstrado por Faure e colaboradores que a reação de hidrólise e metilação termicamente assistida reduz esse problema. Spaccini et al. (2013) demonstraram a eficiência do pré-tratamento de desmineralização de amostras solo com ácido fluorídrico para evitar a formação de artefatos antes das reações de hidrólise a metilação termicamente assistidas aumentando a capacidade de análise do método. Eles usaram solos de diferentes regiões da Itália (Turim ao norte, Piacenza na região Central e Nápoles no Sul da Itália) com composição mineralógica dominada por argilas do tipo 2:1 (clorita, vermiculita, esmectitas e minerais interstratificados) e 1:1 (caulinita). O ácido fluorídrico é eficiente para quebrar ligações Si-O e desmineralizar as amostras. Resta saber se em solos oxidicos a influência na pirólise é também acentuada.

A identificação dos produtos da pirólise em amostras complexas depende da eficiência da separação e da habilidade de interpretação dos espectros de massas. O mais comum, devido ao grande número produtos obtidos com as reações de hidrólise e metilação termicamente assistidas, é a comparação por semelhança com bibliotecas de espectros. Para tanto existe uma vasta literatura dos produtos de pirólise e termoquemólise dos principais biopolímeros presentes na matéria orgânica do solo e nas substâncias húmicas. A identificação de subprodutos de ligninas, ácidos graxos, carboidratos, derivados de proteínas e aminoácidos é a base para a interpretação e uso do método.

A lignina representa cerca de 20-35% da biomassa vegetal e são classificadas de acordo com a quantidade relativa dos monômeros guaiacila (G), siringila (S) e *p*-hidroxifenila (P), derivados dos álcoois coniferílico, sinapílico e *p*-cumarílico, respectivamente (Figura 4). As ligninas de gimnospermas são formadas quase exclusivamente de unidades de G, enquanto das angiospermas perenes estão constituídas por unidades de S e G e os três monômeros formam as ligninas das Poaceas, sendo o P o maior constituinte.

No procedimento termoquimiolítico de ligninas com TMAH, pela degradação química principalmente de ligações  $\beta$ -O-4 alquil-aril éter (Hatcher et al., 1995; Martin et al., 1995), são produzidos os monômeros metilados de unidades de *p*-hidroxifenol, guaiacila e siringila.

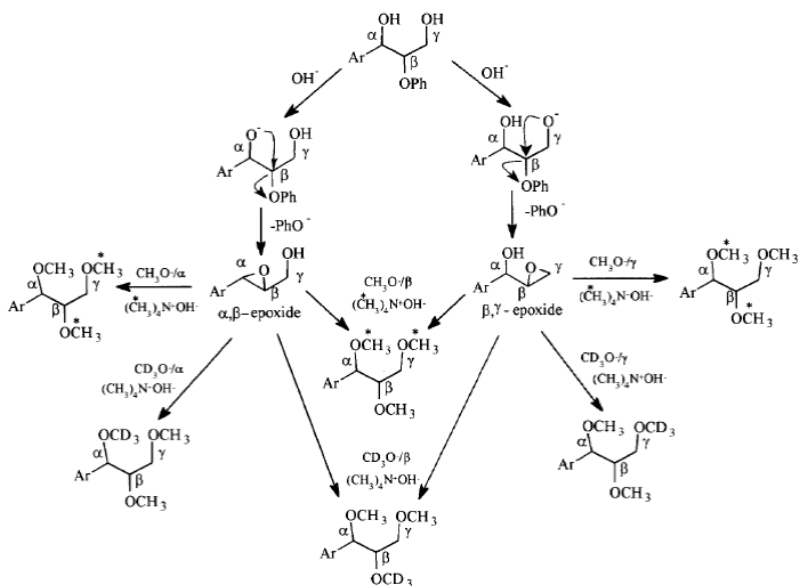


**Figura 4.** Ligação  $\beta$ -O-4 alquil-aril éter nas ligninas (A), monômeros de ligninas (B) e seus álcoois precursores (C).

FONTE: Adaptado de Abreu et al. (2009) e Canellas e Araújo (2005)

Baseando-se nos resultados obtidos com lignina natural e num dímero usado como modelo de lignina aliado a uma combinação de reagentes marcados com  $^{13}\text{C}$  e deutério, para diferenciar as reações promovidas pelo TMAH e o solvente MeOH, Filley et al (1999) propôs um mecanismo de reação do TMAH apresentado na Figura 5. Os autores propõem um deslocamento intramolecular do grupamento  $\beta$ -fenóxi e a formação de dois intermediários epóxi-propano de guaiacila: o  $\gamma$ -hidroxi- $\alpha,\beta$ -epóxido e o  $\alpha$ -hidroxi- $\beta,\gamma$ -epóxido. O metóxido funciona com um nucleófilo para abrir o anel epóxido.

A termoquemólise “*off-line*” com TMAH de compostos usados como modelo de lignina que não contém grupamentos carboxilas, produzem quantidades significativas de produtos oxidados incluindo ácidos 4-metoxi e 3,4 dimetoxi benzóicos com seus ésteres metílicos. As reações de compostos aromáticos sem grupamentos carboxilas com TMAH podem produzir ácidos benzoicos (Hatcher & Minard, 1995).



**Figura 5.** Mecanismo de reação de TMAH com dímero modelo de lignina.

FONTE: Filley et al. (1999)



Os lipídeos se encontram em todos os organismos vivos e são difíceis de definir estruturalmente. Eles são definidos operacionalmente como substâncias que, sendo insolúveis em água, podem ser extraídas com solventes orgânicos de baixa polaridade, como por exemplo: clorofórmio, éter, benzeno etc. Este fato faz com que dentro dos lipídeos se agrupem diferentes tipos de substâncias: graxas, esteróides, terpenos, ceras, entre outros. Os lipídeos podem ser compostos hidrofóbicos (não polares) ou anfipáticos (com substituintes não polares e apolares). Embora eles constituam uma classe bem definida de biomoléculas, em alguns casos podem ser encontrados em forma combinada com outras substâncias como os carboidratos e proteínas.

Os ácidos graxos se encontram em grandes quantidades nas células e tecidos de plantas e microrganismos. Eles são classificados de acordo com o número de átomos de carbono, o número e a posição das duplas ligações na cadeia de carbono e a presença de grupos funcionais. Os ácidos graxos podem ainda ser divididos em dois grupos: lineares ou ramificados. No estado livre só aparecem em traços, encontrando-se esterificados em estruturas lipídicas complexas. Na Tabela 1 são apresentados alguns dos ácidos graxos mais comuns no vegetal.

Nos ácidos graxos hidroxilados, as posições possíveis do grupamento hidroxila são  $\alpha$  ou  $C_2$ ,  $\beta$  ou  $C_3$ ,  $\omega$  ou carbono terminal da cadeia hidrocarbônica (oposto ao grupamento carboxila) e  $(\omega-1)$  (Brondz, 2002). Goosens et al. (1986) atribuem os ácidos  $\beta$ -hidroxilados, que se encontram ligados por meio de ligações químicas lábeis por ataque ácido, às bactérias.

Segundo Brondz (2002), muitos dos ácidos graxos saturados de cadeia normal são amplamente distribuídos na natureza e com frequência encontrados nas bactérias. Existem três tipos de ácidos graxos saturados mono-ramificados, sendo eles: a série iso, com fórmula  $(CH_3)_2CH(CH_2)_nCOOH$ ; a série anteiso, com fórmula  $CH_3CH_2CHCH_3-(CH_2)_nCOOH$  e, a série anteiso que apresenta ramificação no meio da cadeia, com fórmula  $CH_3(CH_2)_nCHCH_3(CH_2)_mCOOH$ . Existe também os ácidos graxos mono-insaturados, sendo os de isomeria trans, preferencialmente de bactérias (Volkman et al., 1980). Os vários tipos de ácidos graxos encontrados em bactérias estão mostrados na Tabela 4 (Suzuki et al., 1993).

**Tabela 1.** Alguns dos ácidos graxos comuns (nas formas aniônicas) nos lipídeos.

Nº de C	LIGAÇÃO DUPLA	NOME IUPAC (COMUM)	FÓRMULA MOLECULAR
12	0	Dodecanoato (Laurato)	$CH_3-(CH_2)_{10}-COO^-$
14	0	Tetradecanoato (Miristato)	$CH_3-(CH_2)_{12}-COO^-$
16	0	Hexadecanoato (Palmitato)	$CH_3-(CH_2)_{14}-COO^-$
18	0	Octadecanoato (Estearato)	$CH_3-(CH_2)_{16}-COO^-$
20	0	Eicosanoato (Araquidato)	$CH_3-(CH_2)_{18}-COO^-$
22	0	Docosanoato (Behenato)	$CH_3-(CH_2)_{20}-COO^-$
24	0	Tetracosanoato (Lignocerato)	$CH_3-(CH_2)_{22}-COO^-$
16	1	<i>cis</i> - $\Delta^9$ -Hexadecenoato (Palmitoleato)	$CH_3-(CH_2)_5-\begin{matrix} \diagup & \diagdown \\ C & = & C \\ \diagdown & \diagup \\ H & & H \end{matrix}-(CH_2)_7-COO^-$
18	1	<i>cis</i> - $\Delta^9$ -Octadecenoato (Oleato)	$CH_3-(CH_2)_7-\begin{matrix} \diagup & \diagdown \\ C & = & C \\ \diagdown & \diagup \\ H & & H \end{matrix}-(CH_2)_7-COO^-$
18	3	<i>cis</i> - $\Delta^{9,12,15}$ -Octadecatrienoato (Linolenato)	$CH_3CH_2(CH=CHCH_2)_3(CH)_6COO^-$
20	4	<i>cis</i> - $\Delta^{5,8,11,14}$ -Eicosatetraenoato (Araquidonato)	$CH_3(CH_2)_4(CH=CHCH_2)_4(CH)_2COO^-$

**Tabela 2.** Alguns dos diferentes ácidos graxos encontrados nas bactérias.

ÁCIDOS SATURADOS	
Cadeia linear	Ácido n-octadecanóico (n-18:0)
Iso-ramificado	Ácido 14-metil pentadecanóico (i-16:0)
Anteiso-ramificado	Ácido 14-metil hexadecanóico
Ácido $\omega$ -cíclico	Ácido $\omega$ -ciclohexilundecanóico
ÁCIDOS INSATURADOS E SEUS DERIVADOS	
Ácido monoenoico	ácido 11-octadecenóico (18:1)
Ácido polienoico	ácido 5,8,11,14,17-eicosapentaenoico
Ácido ciclopropano	ácido 11,12-metileno octadecanóico (ciclo-19:0)
Ácido 10-metil	ácido 10-metil octadecanóico (t-19:0)
HIDRÓXIÁCIDOS	
Ácido 3-hidróxi	ácido 3-hidróxidecanóico (3OH-10:0)
Ácido 2-hidróxi	ácido 2-hidróxihexadecanóico(2OH-16:0)

Lores et al. (2006) empregam o perfil de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMES, em inglês) na caracterização de diferentes esterco e, também, seus vermicompostos produzidos por diferentes espécies de minhocas (*Eisenia andrei*, *Eudrilus eugeniae* e *Lumbricus rubellus*). Os autores encontraram que os ácidos graxos 18:2 $\omega$ 6 e 20:4 $\omega$ 6 aumentam significativamente nos vermicompostos bovinos com as três espécies de minhocas. Os autores justificaram este fato pela ativação e proliferação de protozoários e de fungos, considerando que os ácidos graxos 18:2 $\omega$ 6 e 20:4 $\omega$ 6 são biomarcadores característicos de fungos e protozoários, respectivamente.

Ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMES) são liberados na termoquímica com TMAH da matéria orgânica e substâncias húmicas. Vecken et al. (1999) reportaram a contribuição significativa dos ácidos graxos C16, C18:1 e C18 em ácidos húmicos isolados de compostos de resíduos biológicos. Reveillé et al. (2003) mostraram que os ácidos graxos constituíam uma fração importante no cromatograma de íons totais de ácidos húmicos de lodos de esgoto apesar da extração exaustiva destes compostos nas amostras.

Os terpenos são hidrocarbonetos constituídos por unidades de isopreno (2-metil-1,3-butadieno) e divididos em cinco grupos de acordo com o número de unidades de isopreno (C<sub>5</sub>) em sua molécula. Assim, os monoterpênicos (C-10) com duas unidades; sesquiterpenos (C-15) com três; diterpenos (C-20) com quatro, triterpenos (C-30) com cinco, tetraterpenos com oito (C-40) e politerpenos (C-n) com n unidades de isopreno, respectivamente. As unidades de isopreno se unem formando estruturas lineares ou cíclicas. Na Figura 6 é mostrado a estrutura do isopreno e de alguns terpenoides. Nos vegetais são encontrados um grupo grande de terpenos, componentes de óleos essenciais das plantas, por exemplo, os monoterpênicos, geraniol, limoneno, mentol, principais componentes principais dos óleos do gerânio, limão e menta, respectivamente. O squaleno, precursor na biossíntese do colesterol, é um exemplo de triterpeno. Os carotenoides são estruturalmente hidrocarbonetos tetraterpênicos, e dos quais o mais importante é o  $\beta$ -caroteno, precursor da vitamina A.

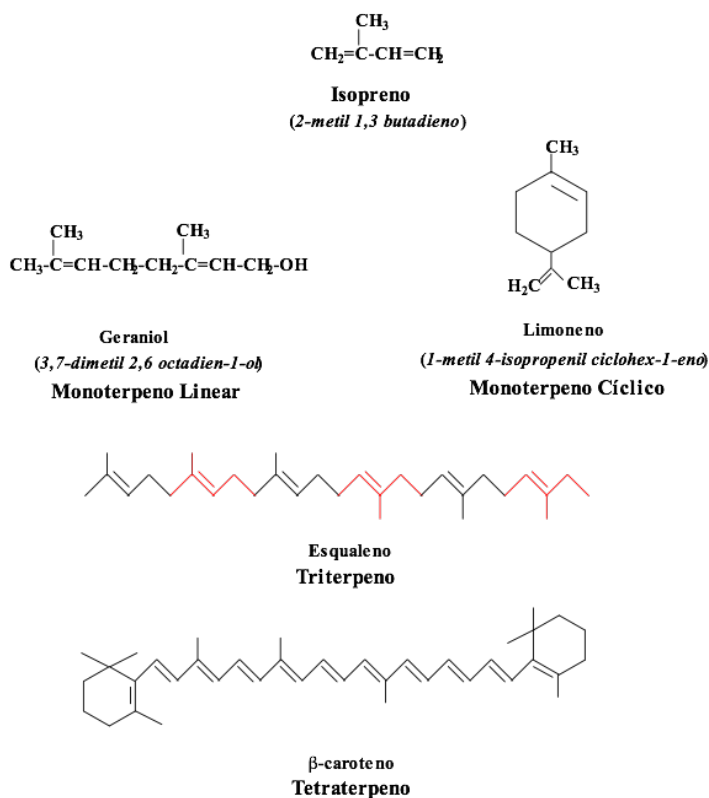


Figura 6. Estrutura da unidade de isopreno e alguns terpenoides.

Os esteroides são sintetizados a partir do isopreno; por isso podem ser incluídos dentro dos compostos terpenoides e são derivados do hidrocarboneto perhidrociclopentanofenantreno (Figura 7).

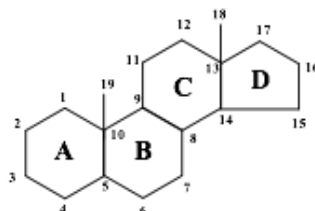


Figura 7. Estrutura do perhidrociclopentanofenantreno.

O colesterol é o esteroide mais abundante, sendo o maior componente nas membranas biológicas das células animais. O colesterol é membro de um subgrupo de esteroides que contém um grupamento hidroxila no C3 do anel A e uma cadeia ramificada de oito ou mais átomos de C no C17 (Figura 8). Nas plantas superiores, o colesterol aparece em raras ocasiões. Elas contêm outros tipos de esteróis chamados de fitoesteróis, entre os quais, o estigmasterol e o β-sitosterol (Figura 8).

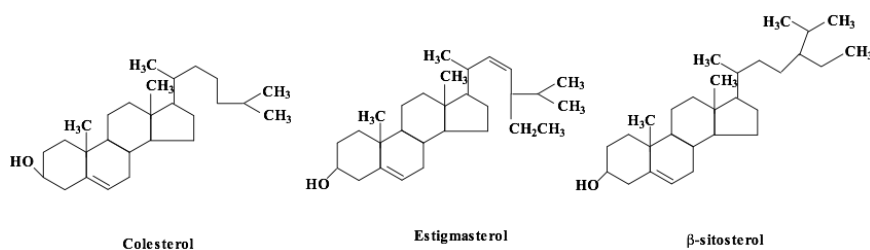


Figura 8. Estrutura química do esteroide: colesterol. (5-colesten-3β-ol) e os fitoesteroides: estigmasterol e β-sitosterol.

Os esteróis e triterpenos são os lipídeos mais abundantes nos tecidos das plantas (Bull et al., 2000; Nierop et al., 2003). Triterpenos tetracíclicos e pentacíclicos também são lipídios típicos nos tecidos de plantas (Otto & Simoneit, 2001). Os diterpenos tricíclicos, especialmente aqueles com esqueletos abietano, primarano e labdano, são os mais representativos dos diterpenoides naturais frequentemente encontrados nas resinas de várias plantas superiores das famílias *Coniferae* e *Leguminosae* (Pastorova et al., 1997; Cox et al., 2007).

Na termoquímica com TMAH de solos (Spaccini et al., 2009), compostos orgânicos (Spaccini et al., 2007) e ácidos húmicos (Spaccini & Piccolo, 2009) foram liberados os derivados éter ou éster metílicos dos diferentes compostos terpênicos, entre os quais os triterpenos tetracíclicos principalmente metil éter e éster de derivados metílico/etilico de colesteno-3-ol, os triterpenos pentacíclicos com estruturas básicas de ursano, lupeano e oleano e os diterpenos tricíclicos com esqueletos abietano e pimarano.

A cutina é um dos principais componentes da cutícula das plantas. São formadas basicamente por  $\omega$ -hidroxiácidos e seus derivados interligados por meio de ligações éster, formando um poliéster polimérico de tamanho indeterminado. As duas famílias dos monômeros de cutina são compostas por C16 e C18. A família C16 consiste principalmente de ácido 16-hidroxi palmítico e os ácidos 9,16 ou 10,16 dihidroxipalmíticos. A família C18 consiste principalmente do ácido 18-hidroxioléico, ácido 9,10-epoxi-18-hidroxiesteárico e 9,10,18 trihidroxisteárico. (Holloway, 1982).

A suberina apresenta dois domínios, um poliaromático e um polialifático. Os domínios poliaromáticos estão localizados predominantemente na parede celular primária e os polialifáticos estão localizados entre a parede celular primária e na plasmalema. Presume-se que os dois domínios sejam interligados. A composição qualitativa e quantitativa exata de monômeros de suberina varia em diferentes espécies. Alguns monômeros alifáticos comuns incluem  $\alpha$ -hidroxiácidos (principalmente o ácido 18-hidroxi-octadec-9-enóico) e  $\alpha,\omega$ -diácidos (principalmente o ácido octadec-9-ene-1,18-dióico). Os monômeros dos poliaromáticos são ácidos hidroxicinâmicos e derivados, como feruloiltiramina. Em adição aos componentes alifáticos e aromáticos, o glicerol tem sido relatado como um componente principal da suberina em algumas espécies. Propõe-se que a função do glicerol seja interligar monômeros alifáticos e, possivelmente, também ligar monômeros polialifáticos a poliaromáticos.

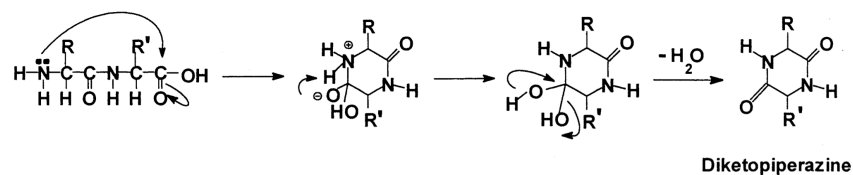
Del Rio & Hatcher (1998) empregaram a termoquímica com TMAH na análise de biopolíesteres alifáticos (cutinas, cutículas e suberina) isolados de diferentes plantas. Os principais compostos produzidos corresponderam a derivados metílicos de ácidos graxos de cadeia longa, ácidos graxos hidroxilados e ácidos  $\alpha$ ,  $\omega$  alcenodíicos. Foi observado a isomerização de alguns ácidos graxos, evento que aumenta a complexidade de interpretação da mistura dos produtos obtidos (Hardell & Nilvebrant, 1999).

Polissacarídeos como celulose, hemicelulose e pectinas são constituintes da parede celular das células vegetais. A celulose é composta de unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4 e as hemiceluloses referem-se a uma mistura de polímeros de hexoses, pentoses e ácidos urônicos. Já a pectina é um polímero do ácido galacturônico parcialmente esterificado com grupos metoxila. O amido é o polissacarídeo de reserva das plantas, e tal como a celulose, é constituída por unidades de glicose embora as ligações glicosídicas sejam do tipo  $\alpha$ -1,4 e  $\alpha$ -1,6.

Alguns autores têm reportado a ausência de picos derivados de carboidratos nos cromatogramas de íons totais de substâncias húmicas obtidos com TMAH, justificando este fato pela pouca sensibilidade desta técnica para estes compostos (Clifford et al., 1995; Chefetz et al., 2000). Não obstante, Fabbri e Helleur (1999) reportaram que a termoquímica com TMAH da celulose e amido produziu 1, 2, 4-trimetoxibenzeno enquanto Schwarzinger et al (2002) mostram que os parâmetros, como conteúdo de TMAH, temperatura e tempo de pirólise, devem ser otimizados a fim de revelar derivados de carboidratos nos cromatogramas de íons totais. Spaccini e Piccolo, (2007) avaliaram o conteúdo de C orgânico nas amostras de composto orgânico antes e depois da pirólise e verificaram que quase 50% do C orgânico permanece no resíduo sólido. Segundo eles a configuração atual dos parâmetros da termoquímica ( $T= 400^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos) é altamente seletiva para ligninas e compostos alquilícos e reduz a identificação simultânea das unidades de carboidratos a partir de celulose.

As proteínas são polipeptídeos formados pela união sucessiva e covalente de aminoácidos através de ligações peptídicas. Tem sido isolado mais de duzentos aminoácidos de todas as fontes naturais, dos quais somente vinte são constituintes naturais das proteínas. Os vinte aminoácidos constituintes das proteínas têm o grupamento amino ( $\text{NH}_2$ ) no  $\text{C}\alpha$ , ou seja, a unidade monomérica das proteínas são os ácidos  $\alpha$ -amino carboxílicos.

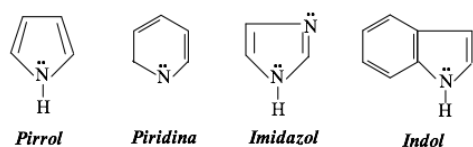
Chiavari e Galletti (1992) sugeriram que os pirolisados de aminoácidos são resultados de reações de condensação intramolecular, homólises, formação de ligação peptídica e perda de dióxido de carbono. Hendricker e Voorhees (1998) realizaram a pirólise com TMAH de aminoácidos, peptídeos e oligopeptídeos e amostraram que a metilação ocorre nos grupamentos com unidades de hidrogênio acidícos (grupamentos  $-\text{OH}$  e  $-\text{NH}_2$ ). Os autores sugerem que, nessas condições, oligopeptídeos e aminoácidos formam dipeptídeos cíclicos com perda de água. A seguinte equação mostra o mecanismo de desidratação, o qual pode acontecer durante a pirólise de um dipeptídeo.



**Figura 9.** Mecanismo de desidratação do peptídeo durante a pirólise.

O primeiro passo envolve o ataque nucleofílico do grupamento amino terminal ao grupamento carbonila do seguinte resíduo. O intermediário formado perde água para formar dicetopiperazina. A sequência de aminoácidos no dipeptídeo determina a funcionalidade dos grupamentos R.

Na termoquimólise com TMAH de material húmico não se encontram resíduos de unidades de proteínas, peptídeos ou aminoácidos. Nos pirolisados, os compostos nitrogenados são encontrados em pequenas quantidades como compostos heterocíclicos e, geralmente, são reportados como miscelâneas (Peuravuori e Pihlaja, 2007). As principais estruturas heterocíclicas nitrogenadas apresentadas na termoquimólise de materiais húmicos reportadas na literatura são derivadas de pirrol, indol, imidazol e pirimidina (Figura 10).



**Figura 10.** Compostos heterocíclicos de nitrogênio.

Numerosos trabalhos têm empregado esta técnica para melhorar o entendimento do processo de humificação, no solo ou na compostagem, perseguindo a biotransformação de entidades aromáticas a partir de derivados da lignina (Del Río et al., 1994; Chefetz et al., 2000; Spaccini e Piccolo, 2007; Spaccini et al., 2009), assim como também na caracterização do material húmico isolado de compostos com diferentes graus de maturação (Mikki et al., 1999; Amir et al., 2006; Spaccini e Piccolo, 2009).

Hatcher & Clifford, 1994 e Del Río et al. (1994) mostraram que a termoquimólise com TMAH de AH isolados do solo produz ésteres metílicos de ácidos metóxi, dimetóxi e trimetóxi benzeno carboxílicos e ésteres metílicos de ácidos graxos. Del Río et al. (1994) sugeriram a formação de unidades de ácido benzeno carboxílico durante o processo de coalificação. Mikki et al. (1999) observaram, com aumento do tempo de maturação no curso do compostagem, aumento na quantidade relativa de alquilbenzenos e diminuição na de alquilfenóis. Vecken et al. (1999) observaram que durante a compostagem aumenta, principalmente, a quantidade de compostos do tipo metoxifenóis com respeito aos outros compostos aromáticos sugerindo o aumento na solubilidade da lignina. Os autores também reportam a contribuição significativa dos ácidos graxos C16, C18:1 e C18 dos AH de composto de resíduos biológicos.

Amir et al (2006) sugerem mudanças estruturais nos AH nos diferentes estágios de compostagem, em comparação com a abundância relativa dos pirolisados obtidos em cada estágio. A abundância relativa ( $P_i$ ), de cada um dos produtos da pirólise, pode ser calculada por meio da razão entre a área do pico correspondente e a somatória das áreas de todos os picos considerados no pirograma (Ayuso et al., 1996):

$$P_i = a_i \div S_a \quad (\text{Equação 1})$$

onde,  $a_i$  é a área de cada pico no cromatograma.

Estes autores empregam também o índice de similitude ( $S_{ij}$ ) para comparar os pirogramas de AH extraídos do lodo de esgoto em cada uma das etapas sucessivas de compostagem. O índice é calculado pela seguinte expressão:

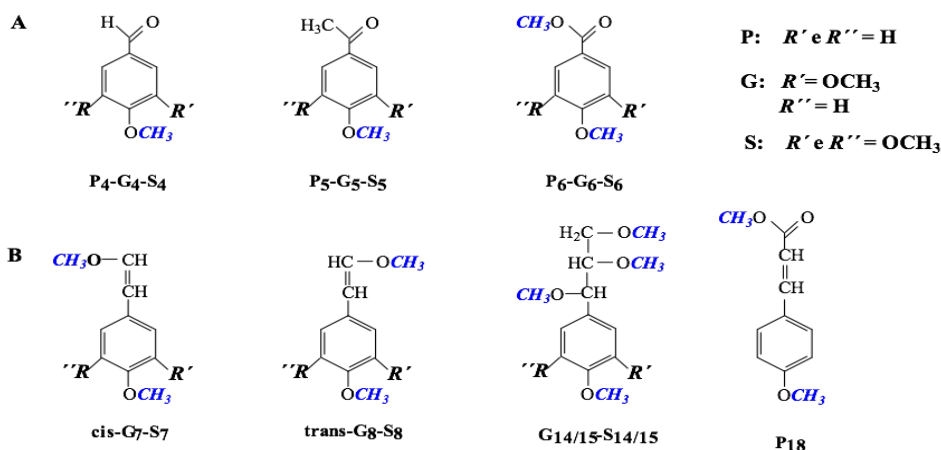
$$S_{ij} = [ \sum ( P_i^k \div P_j^k ) ] \div n \quad P_i^k < P_j^k \quad (\text{Equação 2})$$

onde:  $P^k$  é a abundância relativa de cada uma das unidades liberadas nos pirogramas  $i$  e  $j$ ; e  $n$  é o número de picos.

O índice de similitude ( $S_{ij}$ ) compara dois pirogramas e fornece o grau de semelhança entre suas composições estruturais químicas (Ceccanti et al., 1986; Ayuso et al., 1996).

Dentro dos produtos mais abundantes liberados na termoquimiólise de material húmico (solo, composto ou vermicomposto e/ou AH isolados destas fontes) são encontrados os compostos aromáticos derivados de ligninas e compostos alquílicos derivados principalmente de lípideos: ácidos graxos,  $\omega$ -hidroxi ácidos, hidroxiácidos de cadeia média, ácidos alcanodióicos, n-alcanos, diterpenóides e triterpenóides.

Os produtos clássicos liberados na termoquemólise de material húmico derivados de ligninas são geralmente os produtos oxidados das moléculas de di e tri metoxifenilpropano (Figura 11A) tais como: benzaldeído (P4, G4, S4); acetofenona (P5, G5, S5) e ácido benzóico (P6, G6, S6). Também são freqüentes os isômeros cis/trans de 1-(3,4-dimetoxifenila)-2-metoxietileno (G7, G8) e 1-(3,4,5-trimetoxifenila)-2-metoxietileno (S7, S8) apresentados na Figura 13 B, os enantiômeros de 1-(3,4-dimetoxifenila)-1,2,3-trimetoxipropano (G14, G15) e 1-(3,4,5-trimetoxifenila)-1,2,3 trimetoxipropano (S14, S15). O derivado P mais habitual e abundante é o 3-(4-metoxifenila) ácido 2-propenóico, que segundo Spaccini et al. (2009) pode resultar também da oxidação das unidades aromáticas de biopolímeros de suberina nos tecidos de plantas lenhosas.



**Figura 11.** Produtos clássicos derivados de ligninas liberados na termoquemólise de material húmico, os grupamentos metila (em azul) derivam do TMAH.

FONTE: Adaptado de Spaccini et al. (2009)

Enquanto as formas ácidas e aldeídicas de G e S são o resultado da oxidação progressiva da lignina, os homólogos correspondentes com uma cadeia lateral metoxilada são indicativos de componentes de lignina não modificada, os quais mantêm a ligação intermolecular propiléter (Spaccini et al., 2009). A extensão da degradação da lignina pode ser estimada através de índices estruturais baseados nas quantidades relativas de produtos específicos derivados de G e S liberados na termoquimiólise (Hatcher et al., 1995). Chefetz et al. (2000) mostram que a razão dos compostos siringila/guaiacila (S/G) diminui sugerindo uma degradação preferencial das unidades S pelos microrganismos. Outros autores (Chefetz et al., 2002; Amir et al., 2006), não encontram mudanças significativas com este índice e utilizam outro índice para acessar ao estágio de degradação das ligninas: a razão ácido/aldeído (Ad/Al). Segundo Chefetz et al. (2002) um decréscimo no conteúdo de compostos de lignina e um aumento da razão Ad/Al decorrem do processo de humificação no solo. O índice Ad/Al é a razão da área do pico da estrutura ácida sobre a estrutura aldeídica correspondente, por exemplo:  $G6/G4$  e  $S6/S4$ . Outro índice usado é  $\Gamma$  que corresponde à razão da área do pico da estrutura ácida sobre a soma das áreas dos picos dos isômeros treó/eritro ( $\Gamma G = G6 \div [G14 + G15]$  e  $\Gamma S = S6/[S14+S15]$ , respectivamente. Ambos os índices são considerados como bons indicadores da transformação biooxidativa da lignina (Vane et al 2001b). A caracterização molecular durante diferentes estádios da compostagem foi realizada por Spaccini e Piccolo (2007) que aplicaram estes índices (Tabela 3) sugerindo, a partir dos dados da literatura (Vane et al., 2001b, Vane et al, 2003) para tecidos frescos e decompostos da madeira, uma decomposição avançada da lignina durante o primeiro período de compostagem. Neste trabalho o parâmetro  $\Gamma S$  não foi estimado pela coeluição cromatográfica de S15 com o pico intenso do hexadecanoato de metila. O conteúdo invariável de S e G e a presença de moléculas menos modificadas (G14/15 e S14/15) no composto final confirmam a estabilidade da lignina durante a compostagem. Spaccini et al (2009) também empregaram estes índices no seguimento de alterações moleculares da matéria orgânica de solos cultivados durante um ano com e sem adubação. Os autores sugeriram uma efetiva incorporação de moléculas de ligninas, sem degradar ou parcialmente modificada, na MOS a partir da diminuição observada nos índices estruturais do solo adubado.

Os principais e mais abundantes compostos alquílicos liberados na termoquemólise correspondem aos ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMEs) lineares ou ramificados, saturados ou não. Durante o processo de humificação o conteúdo destes compostos diminui embora persista uma vez estabilizado. A preservação seletiva destas moléculas hidrofóbicas tem

sido reconhecida entre os fatores principais que permitem a acumulação de compostos orgânicos recalcitrante no solo (Almendros & Sanz, 1991; Grasset e Amblés, 1998).

**Tabela 3.** Índices estruturais durante os estádios de compostagem (60, 90 e 150 dias)

ÍNDICES	60	90	150
Ad/Al G	3,8	4,1	4,3
Ad/Al S	5,0	4,9	5,1
$\Gamma_G$	2,9	2,8	3,0

FONTE: Adaptado de Spaccini e Piccolo (2007)

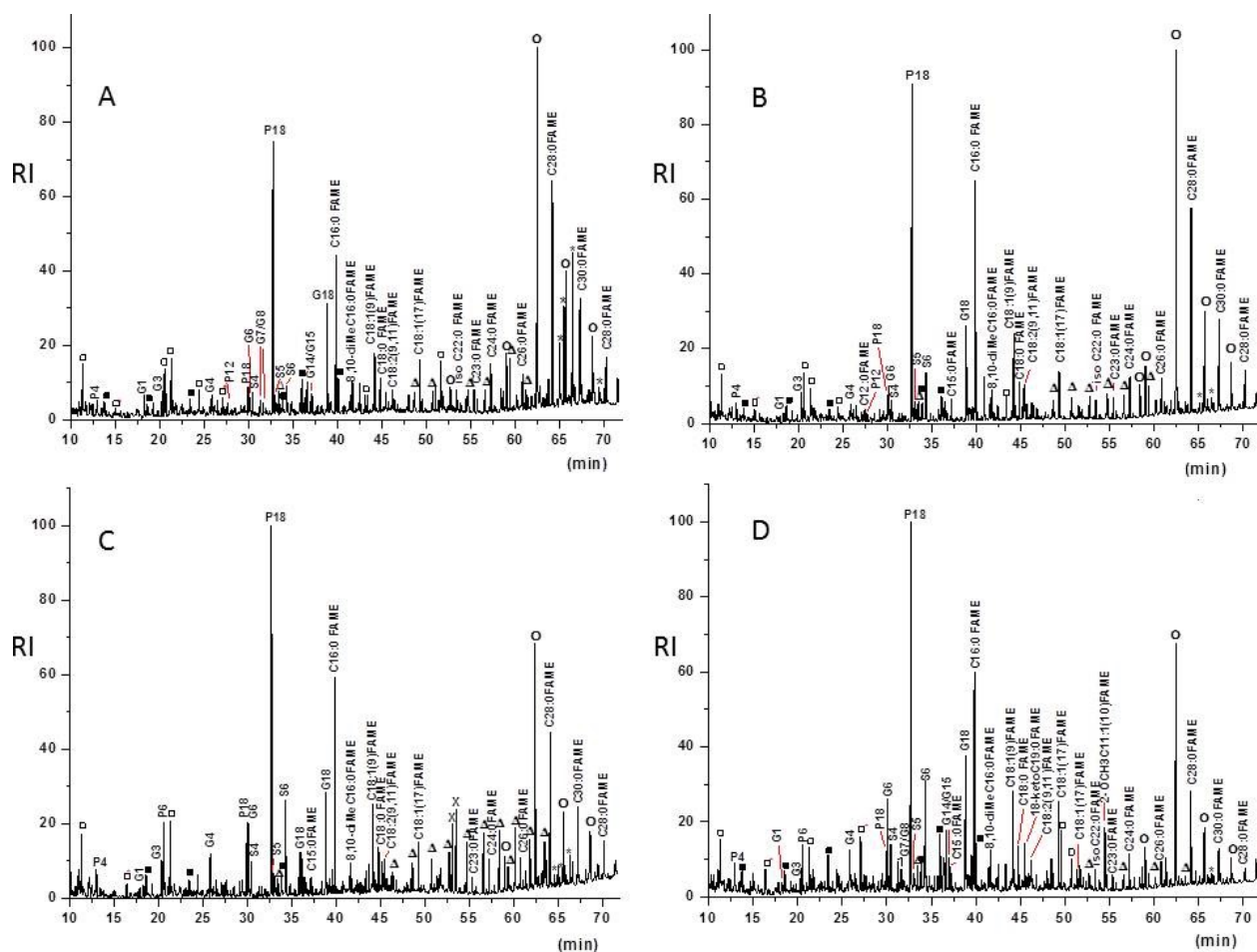
A natureza do ácido graxo permite conhecer a contribuição e origens deles na matéria orgânica. Desta forma, ácidos graxos de cadeias longas e de número par de átomos de C são a contribuição de biopoliésteres alifáticos e plantas superiores, respectivamente (Naafs et al., 2004). Autores como Amblés et al. (1994) e Naafs et al. (2004) sugerem que a presença marcada de FAME de número par sobre número ímpar de átomos de C indica a contribuição das plantas superiores nos compostos. No material humificado originado de composto é habitual a liberação de derivados dos ácidos palmíticos (C16), esteárico (C18) e oléico (C18:1), os quais são oriundos de organismos vivos ou deteriorados e de hidroxiácidos provenientes de cutina e/ou suberina e, também, de microrganismos. A participação direta da atividade microbiológica na incorporação de produtos ao material humificado é revelada pela detecção de FAMES de cadeia ramificada, destacando-se os ácidos iso-C15 e anteiso-C17. Outros compostos alquílicos que permanecem na matéria orgânica humificada e utilizados, às vezes, como biomarcadores do processo de humificação são os terpenos e esteróis.

Spaccini e Piccolo (2007) na caracterização de alterações moleculares de um composto a estágios crescentes de maturação (60, 90 e 150 dias) não encontraram mudanças significativas na quantidade e composição de diterpenos tricíclicos e triterpenos tetra e pentacíclicos. Nos pirolisados foram encontrados principalmente ácidos diterpênicos abiético, pimárico e isopimárico e seus produtos diagenéticos, tais como, derivados dos ácidos dehidroabiético e dehidroabietano e ácido labdano. Além disso, foram encontrados triterpenos tetracíclicos representados pelos éteres e ésteres de derivados metil/etil colesteno-3-ol e triterpenos pentacíclicos com estruturas ursano, lupeano e oleanano. No seguimento das alterações moleculares da matéria orgânica de solos cultivados durante um ano com e sem adubação, por meio da pirólise “*off-line*” com TMAH, Spaccini et al (2009) encontraram variações qualitativas e quantitativas significativas entre o solo adubado e o solo controle. Somente na matéria orgânica do solo adubado, eles encontraram pequenas, mas significativas quantidades de derivados di e triterpenóides cíclicos, sugerindo que a termoquimólise de amostras do solo pode ser útil na avaliação de mudanças na matéria orgânica. Derivados di e triterpenos são considerados como indicadores da entrada de plantas coníferas e angiospermas em ambientes marinhos e terrestres; portanto, começam a ser biomarcadores para traçar as fontes biológicas na matéria orgânica natural (Otto & Simoneit, 2002; Naafs et al., 2004).

Spaccini e Piccolo (2009) fizeram a caracterização dos ácidos húmicos isolados de composto de estádios crescentes de maturação (AH-60, AH-90 e AH-150 dias). Uma quantidade significativa de diterpenos tricíclicos e triterpenos tetra e pentacíclicos foram identificados entre os produtos da termoquimólise do AH-60. Nenhuma mudança quantitativa ou qualitativa foi encontrada na distribuição de lipídeos diterpenóides e triterpenóides liberados na termoquimólise do AH-90 e AH-150. Derivados de esteróis e triterpenóis tem elevada labilidade bioquímica e quando expostos à atividade microbiana são rapidamente degradados. A sua persistência no composto mais maduro sugere a incorporação estável dentro dos domínios hidrofóbicos protetores formados durante o processo de compostagem (Spaccini e Piccolo, 2009). Peuravuori e Pihlaja (2007) aplicam a termoquimólise com dois reagentes alquilantes, TMAH e TMAAc, no estudo das semelhanças e diferenças estruturais da matéria orgânica dissolvida e oito frações obtidas por HPSEC (cromatografia líquida de alta eficiência por exclusão de tamanho). Os autores por meio da análise multivariada dos componentes principais (PCA) verificaram que todas as subfrações húmicas contém unidades estruturais similar sendo a quantidade relativa delas o fator de discriminação mais efetivo. Além de confirmar que as degradações pirolíticas dos materiais húmicos tratados com ambos os agentes derivatizantes são governadas, praticamente, pelo mesmo mecanismo.

As alterações na matéria orgânica durante o processo da vermicompostagem de dois resíduos (esterco de curral e torta de filtro) foi monitorada por Martinez-Balmori et al. (2013). Os autores verificaram a presença de derivados de ligninas especialmente os derivados do ácido fenilpropanóico, ácidos graxos de cadeia curta (identificados como ésteres metílicos) e alcanos, alcenos, terpenos e esteróides em menor quantidade (Figura 12). Foi identificado a presença de alcoóis de cadeia longa no vermicomposto de torta de filtro durante todo o processo, resultando em matéria orgânica de caráter mais hidrofóbico no final da vermicompostagem em relação ao vermicomposto de esterco de curral. No final da vermicompostagem de ambos os resíduos foi inoculado um microrganismo promotor do crescimento vegetal e após um ano

de armazenamento o vermicomposto da torta de filtro apresentou maior número de células viáveis desse microrganismo. O resultado foi atribuído a proteção de caráter hidrofóbico da matéria orgânica (Spaccini et al. 2000).



**Figura 12.** Cromatogramas de íons totais de vermicomposto da torta de filtro da indústria da cana aos 0 (A), 30 (B), 60 (C) e 90 (D) dias de maturação.

Uma série de trabalhos recentes apresentam dados da caracterização da matéria orgânica por pirólise em diferentes ambientes no Brasil (Buurman et al., 2013 e 2012; Buurman & Roscoe, 2011; Perobelli Ferreira et al., 2009 Ferreira et al., 2013). Um importante banco de dados sobre a natureza química da matéria orgânica de solos tropicais pode ser gerado com a aplicação da técnica.

#### LITERATURA RECOMENDADA

- Almendros G & Sanz J. Structural study on the soil humin fraction – boron trifluoride-methanol transesterification of soil humin preparations. *Soil Biology and Biochemistry* 23:1147-1154, 1991.
- Ambles A, Jambu P, Parlant E, Joffre J, Riffe C. Incorporation of natural monoacids from plant residues into a hydromorphic forest podzol. *European Journal Soil Science* 45: 175-182, 1994.
- Amir S, Hafidi M, Lemece L, Merlina G, Guisresse M, Pinelli E, Revel JC, Bailly JR, Ambles A Structural characterization of humic acids, extracted from sewage sludge during composting, by thermochemolysis–gas chromatography–mass spectrometry. *Process Biochemistry* 41: 410–422, 2006
- Ayuso M, Hernandez T, Garcia C, Pascual JA. Biochemical and chemical structural characterization of different organic materials used as manures. *Bioresource Technology* 57: 201–207, 1996.



- Brondz I. Development of Fatty Acid Analysis by High-Performance Liquid Chromatography, Gas Chromatography, and Related Techniques – Review. *Analytica Chimica Acta* 465: 1-37, 2002.
- Bull ID, Nott CJ, van Bergen PF, Poulton PR, Evershed RP. Organic geochemical studies of soils from the Rothamsted classical experiments V. The fate of lipids in different long-term experiments. *Organic Geochemistry*, 31: 389-408, 2000.
- Buurman P, Vidal-Torrado P, Millani Lopes J. The podzol hydrosquence of Itaguare (São Paulo, Brazil). 2. Soil organic matter chemistry by Pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry. *Soil Science Society America Journal* 77:1307-1318, 2013.
- Buurman P, Vidal-Torrado P, Martin-Neto L. Pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry characterization of humic acids in coastal spodosols from Southeast Brazil. *Soil Science Society America Journal* 76:961-971, 2012.
- Buurman P & Roscoe R. Different chemical composition of free light, occluded light and extractable SOM fractions in soils of Cerrado and tilled and untilled fields, Minas Gerais, Brazil A Pyrolysis GC/MS study. *European journal of Soil Science* 62:253-266, 2011.
- Canellas LP, Santos AG, Guridi F, Rumjanek V, Bastos R. Compostos heterocíclicos nitrogenados em ácidos húmicos extraído de composto de resíduo sólido urbano. *Floresta e Ambiente* 6 :1-7, 1999.
- Canellas LP, Moraes AA, Rumjanek VM, Garcia MR, Guridi F, Santos, G de A, Braz-Filho, R. Structural features of humic acids isolated from soils amended with urban organic residues: elemental composition, <sup>13</sup>C NMR and Py-GC/MS analysis. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 26:333-341, 2002.
- Canellas LP & Santos G de A. Humosfera: Tratado preliminar sobre a química das substâncias húmicas. Campos dos Goytacazes-RJ. (2005).
- Canellas LP, Santos GA, Rumjanek VM, Braz-Filho R, Guridi F. Structural features of humic acids from soils amended with urban organic residues: an elemental composition, NMR <sup>13</sup>C and Py-GC/MS study. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 26: 333-341, 2002.
- Canellas LP, Santos GA, Moraes AA, Rumjanek VM. Avaliação de características de ácidos húmicos de resíduos sólidos urbanos II. métodos termodegradativos (pirólise acoplada à cromatografia gasosa -espectrometria de massas). *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 24: 751-757, 2000.
- Canellas LP, Olivares FL, Rumjanek VM, Santos GA. Métodos Complementares. In: *Fundamentos da Matéria orgânica do Solo: Ecossistemas tropicais e subtropicais*, 2008, p. 277-289.
- Challinor JM. Review: the development and application of thermally assisted hydrolysis and methylation reactions. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 61: 3-34, 2001.
- Chefetz B, Chen Y, Clapp CE, Hatcher PG. Characterization of organic matter in soils by thermochemolysis using tetramethylammonium hydroxide (TMAH) *Soil Science Society America Journal* 64:583-589, 2000.
- Clifford DJ, Carson DM, McKinney DE, Bortiatynsky JM, Hatcher PG. A new rapid technique for the characterization of lignin in vascular plant: thermochemolysis with tetramethylammonium hydroxide (TMAH), *Organic Geochemistry* 23:169-175, 1995.
- Challinor JM. A pyrolysis-derivatization-gas chromatography technique for the structural elucidation of some synthetic polymers. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 16:323-333, 1989.
- Challinor JM. Structure determination of alkyd resins by simultaneous pyrolysis methylation. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 18:233-244, 1991.
- Ceccanti B, Alcaniz-Baldellou JM, Gispert-Negrell M, Gassiot-Matas M. Characterization of organic matter from two different soils by pyrolysis-gas chromatography and isoelectric focusing. *Soil Science* 142:83-90, 1986.
- Challinor JM. A pyrolysis/derivatization-gas chromatograph technique for the elucidation of some synthetic polymers. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 16:323-333, 1989.
- Challinor JM. A rapid simple pyrolysis-derivatization-gas chromatography-mass spectrometry method for profiling of fatty acids in trace quantities of lipids. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 37:185-197, 1996.
- Challinor JM. Review: the development and applications of thermally assisted hydrolysis and methylation reactions. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 61: 3-34, 2001.
- Chefetz B, Chen Y, Clapp E, Hatcher PG. Characterization of organic matter in soils by thermochemolysis using tetramethylammonium hydroxide (TMAH). *Soil Science Society America Journal* 64: 583-589, 2000.
- Chefetz B, Tarchitzky J, Deshmukh AP, Hatcher PG, Chen Y. Structural characterization of soil organic matter and humic acids in particle-size fractions of in agricultural soil. *Soil Science Society America Journal*, 66:129-141, 2002.
- Clifford DJ, Carson DM, McKinney DE, Bortiatynski JM, Hatcher PG. A new rapid technique for the characterization of lignin in vascular plants: thermochemolysis with tetramethylammonium hydroxide (TMAH). *Organic Geochemistry* 23:169-175, 1995.
- Chiavari G & Galletti GC. Pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry of amino acids. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 24:123-137, 1992.
- Cox RE, Yamamoto S, Otto A, Simoneit, BRT. Oxygenated di- and tricyclic diterpenoid of southern hemisphere conifers. *Biochemical Systematics and Ecology*, 35:342-362, 2007.
- Bracewell JM, Haider K, Larter SR, Shulten H-R. Thermal degradation relevant to structural studies of humic substances. In Hayes MHB, MacCarthy P, Malcolm RL, Swift RS (Eds). *Humic Substances II in search of structure*. John Wiley and Sons, 181-253, 1989.
- De Leeuw JW e Baas WJ. The behaviour of esters in the presence of tetramethylammonium salts at elevated temperatures; flash pyrolysis or flash chemolysis? *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 26, 175-184, 1993.
- Del Rio JC, Gonzalez-Vila FJ, Martin F, Verdejo T. Characterization of humic acids from low-rank coals by <sup>13</sup>C NMR and pyrolysis-methylation. Formation of benzenecarboxylic acid moieties during the coalification process. *Organic Geochemistry* 22:885-891, 1994.
- Del Rio JC & Hatcher PG. Analysis of aliphatic biopolymers using thermochemolysis with tetramethylammonium hydroxide (TMAH) and gas chromatography-mass spectrometry. *Organic Geochemistry*, 29:1441-1451, 1998.
- Fabbri, D & Helleur R. Characterization of the tetramethylammonium hydroxide thermochemolysis products of carbohydrates. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 49: 277-293, 1999.
- Faure P, Schlepp L, Mansuy-Huault, Elie M, Jardé E, Pletier M. Aromatization of organic matter induced by the presence of clays during flash pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry (PyGC-MS) A major analytical artifact. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 75:1-10, 2006
- Ferreira F, Vidal-Torrado P, Oter XL, Buurman P. Chemical and spectroscopic characteristics of humic acids. *Journal of Soils and Sediments* 13:253-264, 2013.
- Filley TR, Minard, RD, Hatcher, PG. Tetramethylammonium hydroxide (TMAH) thermochemolysis: proposed mechanisms based upon the application of <sup>13</sup>C-labeled TMAH to synthetic model lignin dimer. *Organic Geochemistry* 30:607-621, 1999.

- Gonzalez-Vila FJ, Almendros G, Madrid F. Molecular alterations of organic fractions from urban waste in the course of composting and their further transformation in amended soil. *Science Total Environment*, 236:215–29, 1999.
- Grasset L, Guignard C, Amblès A. Free and esterified aliphatic carboxylic acids in humin and humic acids from a peat sample as revealed by pyrolysis with tetramethylammonium hydroxide or tetramethylammonium acetate. *Organic Geochemistry* 33:181–188, 2002.
- Grasset L & Amblès A. Structural study of soil humic acids and humin using a new preparative thermochemolysis technique. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 47:1–12, 1998.
- Guignard C, Lemee L, Amblès A. Structural characterization of humic substances from an acidic peat using thermochemolysis techniques. *Agronomie* 20: 465–475, 2000.
- Hardell HL, Nilvebrant NO. A rapid method to discriminate between free and esterified fatty acids by pyrolytic methylation using tetramethylammonium acetate and hydroxide. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 52:1–14, 1999.
- Hempling R, Schulten H-R. Chemical characterization of the organic matter in forest soils by Curie Point pyrolysis-CG/MS and pyrolysis-field ionization mass spectrometry. *Organic Geochemistry* 15:131-145, 1990.
- Hatcher PG & Clifford DJ. Flash pyrolysis and in situ methylation of humic acids from soil. *Organic Geochemistry* 21:1081–1092, 1994.
- Hatcher PG & Minard RD. Comment on the origin of benzenecarboxylic acids in pyrolysis methylation studies. *Organic Geochemistry*, 23:991–994, 1995.
- Hatcher PG, Nanny MA, Minard RD, Dible, SD, Carson DM. Comparison of two thermochemolytic methods for the analysis of lignin in decomposing gymnosperm wood: the CuO oxidation method and the method of thermochemolysis with tetramethylammonium hydroxide (TMAH). *Organic Geochemistry* 23:881–888, 1995.
- Hendricker AD, Voorhees KJ. Amino acid and oligopeptides analysis using curie-point pyrolysis mass spectrometry with in situ thermal hydrolysis and methylation: mechanistic considerations. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 48:17–33, 1998.
- Joll CA, Huynh T, Heitz A. Off-line tetramethylammonium hydroxide thermochemolysis of model compound aliphatic and aromatic carboxylic acids: Decarboxylation of some ortho- and/or parasubstituted aromatic carboxylic acids. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 70:151-167, 2003.
- Joll CA, Couton D, Kagi RI. Comparison of reagents for off-line thermochemolysis of natural organic matter. *Organic Geochemistry* 35:47–59, 2004.
- Lores M, Gómez-Brandón, Pérez-Díaz D, Domínguez, J. Using FAME profiles for the characterization of animal wastes and vermicomposts *Soil Biology and Biochemistry* 38 2993–2996, 2006.
- Martín F, González-Vila FJ, del Río JC, Verdejo T. Pyrolysis derivatization of humic substances, 1. Pyrolysis of fulvic acids in the presence of tetramethylammonium hydroxide. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 28:71-80, 1994.
- McKinney DE, Carson DM, Clifford DJ, Minard RD, Hatcher PG. Off-line thermochemolysis versus flash pyrolysis for the in situ methylation of lignin: is pyrolysis necessary? *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 34:41-46, 1995.
- Miikki V, Hänninen K, Knuutinen J, Hyötyläinen J. Pyrolysis of humic acids from digested and composted sewage sludge. *Chemosphere* 38:247–253, 1999.
- Naafs DFW, van Bergen PF, de Jong MA, Ooninx A, de Leeuw JW. Total lipid extracts from characteristic soil horizons in a podzol profile. *European Journal of Soil Science* 55: 657–669, 2004.
- Nierop KGJ, Naafs DFW, Verstraten JM. Occurrence and distribution of ester-bound lipids in Dutch coastal dune soils along a pH gradient. *Organic Geochemistry* 34: 719-729, 2003.
- Otto A & Simoneit BRT. Chemosystematics and diagenesis of terpenoids in fossil conifer species and sediment from the Eocene Zeitz formation, Saxony, Germany. *Geochimica and Cosmochimica Acta* 65:3505–3527, 2001.
- Pastorova I, van der Berg KJ, Boon JJ, Verhoeven JW. Analysis of oxidized diterpenoid acids using thermally assisted methylation with TMAH. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 43: 51–57, 1997.
- Perobelli Ferreira F, Buurman P, Macias F, Otero XL, Boluda R. Pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry of soil organic matter extracted from a Brazilian mangrove and Spanish salt marshes. *Soil Science Society America Journal* 73:841-851, 2009.
- Peuravuori J & Pihlaja K. Advanced TMAH and TMAAc thermochemolysis–pyrolysis techniques for molecular characterization of size-separated fractions from aquatic dissolved organic matter. *Analytical Bioanalytical Chemistry*, 389:475–491, 2007.
- Réveillé V, Mancuy L, Jardé E, Garnier-Sillan E. Characterization of sewage sludge derived organic matter: lipids and humic acids. *Organic Geochemistry*, 34:615–627, 2003.
- Sainz-Jimenez C. Application of pyrolysis-Gas chromatography/mass spectrometry to soil chemistry. p.65-84. 15th world Congress of Soil Science Acapulco, Mexico, July 10-16, 1994. Volume 3a: Commission II: Symposia.
- Spaccini R, Piccolo A, Haberhauer G, Gerzabek MH. Transformation of organic matter from maize residues into labile and humic fractions of three European soils as revealed by <sup>13</sup>C distribution and CPMAS-NMR spectra. *European Journal of Soil Science* 51: 583–594, 2000.
- Schwarzinger C, Tanczos I, Schmidt H. Levoglucosan, cellobiose and their acetates as model compounds for the thermally assisted hydrolysis and methylation of cellulose and cellulose acetate. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 62: 179–196, 2002.
- Silvério F, Barbosa LC, Pilo-Veloso D. A pirólise como técnica analítica. *Química Nova*, Vol. 31:1543-1552, 2008.
- Spaccini R & Piccolo A. Molecular characterization of compost at increasing stages of maturity. 2. Thermochemolysis-GC-MS and <sup>13</sup>C-CPMAS-NMR spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55:2303–2311, 2007.
- Spaccini R, Song XS, Cozzolino V, Piccolo A. Molecular evaluation of soil organic matter characteristics in three agricultural soils by improved off-line thermochemolysis: The effect of hydrofluoric acid demineralisation treatment. *Analytica Chimica Acta* 802:46-55, 2013.
- Spaccini R, Sannino D, Piccolo A, Fagnano M. Molecular changes in organic matter of a compost-amended soil. *European Journal of Soil Science*, 60: 287-296, 2009.
- Suzuki K, Goodfellow M, O'Donnell AG. Cell envelopes and classification. In *Handbook of new bacterial systematics*, Goodfellow M & O'Donnell AG (Eds). Academic Press, London:195-250, 1993.
- Vane CH, Drage TC, Snape CL. Biodegradation of oak (*Quercus alba*) wood during growth of the shiitake mushroom (*Lentinula edodes*): a molecular approach. *Journal Agriculture Food Chemistry* 51:947-956, 2003.
- Vane CH, Martin SC, Snape CE, Abbott GD. Degradation of lignin in wheat straw during growth of the oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) using off-line thermochemolysis with tetramethylammonium hydroxyde and solid state <sup>13</sup>C NMR. *Journal Agriculture Food Chemistry*, 49: 2709-2716, 2001.
- Volkman JK, Johns RB, Gillan FT, Perry GJ, Bavor Jr HI. Microbial Lipids of an Intertidal Sediment – I. Fatty Acids and Hydrocarbons. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 44:1133-1143, 1980.

Substância Húmicas...

Estimado leitor, após a apresentação dessas poderosas, e complexas, ferramentas para o estudo da matéria orgânica do solo, penso ser apropriado, seguindo o preceito de Voltaire ("defina seus termos"), iniciar com um pouco de etimologia como epílogo e prelúdio dos próximos capítulos dessa empolgante história:

Homem – Humanos – Humanidade

Do latim *homo* (*Homo sapiens*, humanidade), cuja etimologia é **húmus**, solo, terra fértil!

Segundo alguns autores, derivou do hebraico: Adão, Adam, em hebraico, "criatura humana feita de terra", que provém de *adamá*, que quer dizer terra, Mãe-Terra, e que em latim, por sua vez, seria *homo* (solo, solo fértil). De acordo à Wikipedia: 'A palavra "humano" em si vem do latim *humanus*, um cognato adjetivo para *homo*, que se acredita ter sido derivada de uma palavra proto-indo-européia para "terra".

E vamos adiante: em latim *humilis* era o homem que se inclinava para a terra (*quasi acclinans humo*), daí humilde...

E assim húmus, húmicos etc. que remetem à terra fértil e à própria humanidade. Matéria orgânica do solo como indicadora de fertilidade. Terra fértil, rica em matéria orgânica; sendo a fração mais abundante desta as substâncias húmicas, por isso os termos húmus, húmicos, todos com a mesma origem de *Homo*, humanidade, humilde, terra fértil... Lindo não?

Mas vamos adiante, segundo me ensinou o Professor Mangrich, o próprio termo "Química" também se relaciona à matéria orgânica do solo e substâncias húmicas. Desde a Antiguidade o homem reconhecia a importância da matéria orgânica do solo e curiosamente, o próprio termo *química* pode ter surgido relacionado a ela. Nas margens do rio Nilo, depois das enchentes, as terras ribeirinhas ficavam cobertas por uma camada de material orgânico escuro trazido das florestas da África por onde o rio passava, material orgânico esse que garantia a fertilidade do solo. Os egípcios chamavam aquela terra preta de *Khem*, e segundo alguns autores, foi de onde se originou a palavra árabe *alquimia*, que depois transformou-se na palavra *química*.

E toda essa riqueza, esta beleza foi posta em xeque por polemistas profissionais em revistas conceituadas, isso sem qualquer evidência experimental, apenas questionando a nomenclatura e discorrendo obviedades como algo revolucionário. Com um discurso competente, figuras e boxes bem elaborados e com um inegável encanto (o que me remete ao mito das sereias), pois sendo humanos, somos tentados ao fantástico, presas fáceis para os mercadores de uma pretensa "abordagem holística", à uma pretensa visão integrada dos processos e principalmente, adoramos os gênios que revolucionam nossa *Weltanschauung*, mas quantas vezes isso de fato ocorreu? E quantos fracassaram neste intuito? Mesmo sabendo disso, temos o pendor para o diferente, o revolucionário.

Pois bem, estes polemistas, cientes disso, atacaram com platitudes a "existência" das substâncias húmicas, questionando a "terminologia", alegando que por não existir uma molécula bem definida de substâncias húmicas, elas não existiriam... Imbuído de achar graça nessa futilidade fico imaginando como estes polemistas pedem uma "cerveja", visto não ter uma estrutura química definida, não ser isolável dos precursores, ser uma denominação baseada no processo de preparo, enfim, todos os critérios empregados para negar sua existência. Eles chegariam num bar e pediriam: "por favor, me sirva um fermentado de mosto de cereais, malteados ou não, pré-germinados ou não, adicionados de lúpulo e outros ingredientes..." e daí ao infinito considerando os diferentes tipos de cervejas (não há nem mesmo um processo único para sua preparação). O mesmo vale para vinho, pães etc... Mas para qualquer um com o mínimo de bom senso, quando se menciona "cerveja" ou "substâncias húmicas" automaticamente vem em mente do que se trata. Mas o incauto pode alegar "sim, no cotidiano, no balcão de um bar tudo bem não ser tão rigoroso...", pertinente, porém, o que dizer do átomo? Gostaria de sugerir a estes polemistas que questionassem a Física Atômica e toda a Ciência, inclusive a Química, a própria existência do átomo alegando que todos os estudos e conhecimento que temos relacionado está "errado" pois o termo é inapropriado, visto que hoje sabemos que o átomo, do grego: *a*=não + *tomo*=divisão, portanto indivisível, é sim divisível! O mesmo vale para, por exemplo, vitamina (*vita* + *amine*, amina vital) pois se acreditava que seriam formadas por aminoácidos e tantos outros exemplos em que se mantém uma terminologia clássica por conveniência ou tradição.

Como alternativa (nada) revolucionária eles propõem um *Soil Continuum Model*, sendo que qualquer um com o mínimo conhecimento sobre a matéria orgânica do solo sabe que é um contínuo, que são produtos da decomposição parcial de todos os compostos existentes nos seres vivos, não há uma "molécula isolável de árvore", quem dirá dos seus produtos de decaimento. Todos sabemos que o fracionamento em ácidos fúlvicos, húmicos e humina é meramente operacional, que se faz necessário no método científico de extremo sucesso: análise para posterior síntese. Estudar as partes em detalhes para depois construirmos o modelo completo, fazermos a síntese das partes, por exemplo, para entendermos de fisiologia (estudo do

funcionamento), precisamos começar pelas partes, pela anatomia (*ana*=em partes + *tome*=corte). A propósito, gostaria que os polemistas trouxessem para o laboratório uma, conforme termo empregado por eles, "entidade física" analisável, ou que obtivessem espectros de ressonância magnética nuclear de qualidade de amostras intactas. Infelizmente muitas vezes precisamos fazer a abertura de amostras, purificá-las para podermos estudá-las em detalhes.

Enfim, em geral, as técnicas aqui apresentadas, para fornecer resultados de qualidade, prescindem da extração e purificação do material orgânico do solo, e como até os polemistas reconhecem, a extração clássica com solução alcalina é a mais eficiente.

Provavelmente na próxima edição desta obra esta polêmica já estará esquecida e a "boa Ciência" irá prevalecer, como dizia Mário Quintana "eles passarão...", mas achei pertinente comentá-la, até como ilustrativo de como a Ciência "funciona" e progride. Óbvio que devemos estar cientes que eventualmente o que sabemos hoje não está correto, isso já aconteceu inúmeras vezes nos próprios estudos das substâncias húmicas e assim que surgir modelos e propostas mais adequadas, abandona-se a vigente no belo e eficiente processo de "seleção natural" da Ciência, onde a teoria/modelo mais apto sobrevive. Afinal trabalhamos com verdades provisórias e quando ocorrer: *Le Roi est mort. Vive le Roi!*