

ANÉIS AROMÁTICOS CONDENSADOS E RELAÇÃO E_4/E_6 : ESTUDO DE ÁCIDOS HÚMICOS DE GLEISSOLOS POR RMN DE ^{13}C NO ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO A TÉCNICA CP/MAS DESACOPLAMENTO DEFASADO

Sérgio da Costa Saab*

Departamento de Física, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Av. Carlos Cavalcanti, 4748, 84030-000 Ponta Grossa - PR, Brasil

Ladislau Martin-Neto

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, CP 741, 13569-970 São Carlos - SP, Brasil

Recebido em 6/6/05; aceito em 31/5/06; publicado na web em 26/9/06

CONDENSED AROMATIC RINGS AND E_4/E_6 RATIO: HUMIC ACIDS IN GLEYSOILS STUDIED BY NMR CP/MAS ^{13}C , AND DIPOLAR DEPHASING. In this work, seven samples of humic acids extracted from gleysoils were investigated. These studies, using NMR CP/MAS ^{13}C techniques, did not show significant correlation between the E_4/E_6 ratio and the degree of aromaticity. However, dipolar dephasing (DD) measurements of condensed aromatic or substituted carbons showed a negative correlation of 0.94. Also, there was a good correlation between the amount of semiquinone free radicals measured by the EPR technique and condensed aromatic rings measured by NMR CP/MAS ^{13}C with the DD technique. The content of semiquinone free radicals was quantified by EPR spectroscopy and was correlated with the humification (degree of aromaticity) of the humic substances. The results indicated that the E_4/E_6 ratio identifies the degree of aromatic rings condensation. It was also found that the degree of aromaticity, measured by NMR, as frequently presented in the literature (by conventional CP/MAS), underestimates aromatic rings in condensed structures.

Keywords: CP/MAS NMR ^{13}C ; humic acid; dipolar dephasing.

INTRODUÇÃO

A razão E_4/E_6 (razão entre as absorvâncias em 465 e 665 nm), medida por espectroscopia eletrônica, e a aromaticidade, determinada por ressonância magnética nuclear (RMN) de ^{13}C em estado sólido, são usadas para avaliar o grau de humificação da matéria orgânica do solo. O decréscimo da razão E_4/E_6 está diretamente relacionado com o aumento do peso molecular e a condensação dos carbonos aromáticos, e a aromaticidade é inversamente relacionada à quantidade de grupos alifáticos¹. Apesar destas relações serem amplamente usadas na caracterização de substâncias húmicas (grau de humificação), têm sido motivo de controvérsia na literatura. Chen *et al.*² afirmaram que a relação E_4/E_6 é principalmente controlada pelo tamanho das substâncias húmicas, porém, os estudos de Baes e Bloom³ demonstraram que as substâncias húmicas não apresentam propriedades de espalhamento da luz e, por isto, a relação E_4/E_6 não seria controlada pelo tamanho molecular. Outros autores^{1,4} afirmaram que ela se correlaciona negativamente com o grau de condensação ou conjugação dos anéis aromáticos das substâncias húmicas.

A técnica de RMN CP/MAS de ^{13}C (polarização cruzada com rotação em torno do ângulo mágico) de estado sólido apresenta problemas na análise quantitativa dos espectros, devido às variações na eficiência da polarização entre os diferentes tipos de carbono (C^3) e quanto maior o número de hidrogênios (H) diretamente ligados ao C mais eficiente será a polarização. Deste modo, espectros obtidos por esta técnica podem subestimar a concentração de C quaternários ou aqueles de estruturas aromáticas condensados. Opella e Frey⁶ propuseram uma seqüência de pulsos onde o desacoplador era desligado por um certo período de tempo, com a finalidade de suprimir os sinais de C que possuem forte interação dipolar com os prótons. A interação dipolar é mais fraca para C não protonados por causa da sua grande distância do núcleo de H e é, também, fraca para C semelhantes a metil, metoxílico que possu-

em movimento molecular no estado sólido, assim como para cadeias longas de $-\text{CH}_2$ ⁻⁵. Portanto, um espectro usando a técnica desacoplamento defasado (DD), com um tempo de defasagem, mostrará C não protonados e C que possuem mobilidade. Wilson⁷ mostrou que a medida direta de quantificação de C aromáticos nos espectros de RMN CP/MAS ^{13}C não corresponde ao teor real, devido à polarização cruzada usada para obter o experimento.

A espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (EPR) é usada nas substâncias húmicas (SH) para identificar radicais livres semiquinonas e metais de transição⁸⁻¹¹. A concentração de radicais livres semiquinonas é quantificada e relacionada com o grau de humificação das substâncias húmicas¹⁰⁻¹⁶. Seu valor pode mudar quando se varia o pH da amostra em solução, quando a SH é submetida ao processo de hidrólise ácida, quando se altera a temperatura, quando há processo redox ou quando a SH é irradiada por luz UV^{12,13}. O grau de humificação de substâncias húmicas e de agregados organo-minerais em áreas sob diferentes manejos de solo, incluindo plantio direto e manejo convencional¹⁴⁻¹⁶, tem sido avaliado por EPR.

Este trabalho teve como objetivo correlacionar os resultados de aromaticidade obtidos por RMN CP/MAS ^{13}C de ácidos húmicos AH(s) extraídos de gleissolos com e sem a técnica DD com resultados obtidos com EPR (concentração de radicais livres) e a razão E_4/E_6 .

PARTE EXPERIMENTAL

Foram coletadas sete amostras de solos, gleissolos, da região dos Grandes Lagos do estado do Rio de Janeiro, na profundidade de 0-0,20 m, como mostra a Tabela 1.

A extração e o fracionamento químico das SH por diferença de solubilidade foram realizados, utilizando a metodologia da Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas (IHSS)¹⁷, que faz uso do NaOH (0,1 mol L⁻¹) como extrator. As frações (AH(s)) obtidas foram liofilizadas em pH em torno de 4,0.

A análise química elementar foi feita utilizando-se o aparelho CHNS-O da marca CE-Instruments Eauger 200. Em todas as aná-

*e-mail: scsaab@uepg.br

Tabela 1. Teores de carbono, nitrogênio, hidrogênio, razão C/N e cinzas nas amostras de AH(s) dos gleissolos

Classificação dos gleissolos	HA(s)	C%	N%	H%	C/N	Cinza%
melânico alumínico hístico	1	46,5	3,5	4,5	13,2	5,9
sálico órtico típico	2	45,7	4,4	4,6	10,3	6,7
tiomórfico hístico típico s	3	46,2	3,5	4,5	13,2	7,5
melânico distrófico típico	4	50,8	4,7	6,9	10,8	5,4
háplico ta eutrófico solódico	5	49,0	3,7	5,4	13,2	6,2
háplicos tb distrófico argissólicos	6	46,6	4,1	5,2	11,4	6,0
háplico distrófico argilossólico	7	48,4	4,2	5,5	11,5	7,3

lises foram utilizadas três replicatas e foi apresentado o valor médio das análises.

As medidas de radicais livres semiquinonas foram realizadas utilizando o espectrômetro de EPR da Bruker-EMX cavidade retangular, banda X ($\approx 9,0$ GHz) em temperatura ambiente. A concentração de radicais livres semiquinonas foi obtida pela área dos sinais do radical livre através de dupla integração do espectro de EPR¹⁸, utilizando rubi sintético como padrão secundário¹¹. Aproximadamente 20 mg de amostra foram colocadas em tubos de quartzo. A concentração de radical livre foi quantificada normalizando-a pela massa das amostras de AH. As medidas foram feitas em duplicata para cada amostra. A potência de microondas utilizada para obter o sinal do radical livre semiquinona foi de 2 mW e a amplitude de modulação de 1 G_{pp} (Gauss pico a pico).

Os espectros de RMN de estado sólido foram obtidos no espectrômetro Varian Unity INOVA 400 MHz, utilizando-se uma seqüência CP/MAS com tempo de contato de 1 ms, tempo de repetição de 1 s e com desacoplamento defasado (DD) com tempo de defasagem de 70 μs ¹⁹ e rotores de zircônio com rotação do ângulo mágico de 7 kHz. A porcentagem de grupos aromáticos foi obtida dividindo-se a área do espectro (RMN CP/MAS de ^{13}C) na região dos aromáticos (110 – 160 ppm) pela área total do espectro (0 – 220 ppm)²⁰. Na técnica DD foi empregada a área do espectro correspondente à região dos aromáticos.

As medidas de absorvância (espectrofotômetro Hitachi U2000) foram realizadas na região de 200 a 800 nm. As soluções foram preparadas com 3 mg de AH dissolvidos²³ em 10 mL de $NaHCO_3$ (0,05 mol L^{-1}), com pH final da solução de 8,3.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta a porcentagem de C, H e N, os valores da razão C/N e os teores de cinzas das amostras de AH(s). Os teores de C nos ácidos húmicos variam de 45 a 51% e os de N, de 3,5 a 4,7%. Esses valores estão de acordo com os valores usualmente observados para AH's de solos¹.

Os dados de composição química dos AH's determinada por RMN CP/MAS de ^{13}C mostram os grupos alifáticos: O alquil C e alquil C, em comparação ao conteúdo de aromáticos, como apresentado na Tabela 2. Normalmente em AH(s) de solo¹ os valores de aromaticidade variam de 25 a 42%. Observando os resultados da Tabela 2 (mínimo de 15,6% e máximo 19,3%), os AH(s) dos gleissolos possuem

aromaticidade menor quando comparados a outros solos. Esta menor aromaticidade é consistente com a razão E_4/E_6 , que varia de 4,0 a 7,6, sendo que para AH(s) de solos os valores encontrados na literatura^{1,21} de E_4/E_6 variam de 3,0 a 5,0. E ainda, quanto maior a razão E_4/E_6 , menor é a quantidade de aromáticos condensados que podem ser associados à humificação da matéria orgânica do solo¹⁻³, em acordo com os dados de Ponnemperuma²² que mostrou que em solos hidromórficos (gleissolo estudado) há pouco resíduo humificado quando comparados a solos bem drenados.

Tabela 2. Teores dos principais grupos funcionais obtidos por RMN CP/MAS de ^{13}C e DD nos AH(s) e a razão E_4/E_6

HA (s)	Alquil – C % 0-50 ppm	O-Alquil- C % 50-110 ppm	C _{aromático} CP/MAS % 110-160 ppm	C _{aromático} DD (u.a) 110-160 ppm	E_4/E_6
1	36,8	31,8	15,6	0,24	6,4
2	35,0	28,4	17,6	0,28	4,7
3	31,7	30,2	18,7	0,30	4,0
4	31,0	30,7	19,3	0,24	5,5
5	40,1	25,3	17,6	0,28	4,6
6	37,9	33,9	16,7	0,27	5,1
7	36,8	30,4	15,9	0,20	7,6

Os espectros de RMN CP/MAS de ^{13}C das amostras de AH(s) dos gleissolos estão apresentados nas Figuras 1a e em 1b estão os espectros usando CP/MAS de ^{13}C mais DD.

Nas Figuras 2 e 3 são apresentados os gráficos entre a proporção de aromaticidade determinada por RMN CP/MAS de ^{13}C , com relação à concentração de radical livre semiquinona e à razão E_4/E_6 , respectivamente. Os coeficientes de determinação foram 0,36 para o conteúdo de radical livre e 0,45 para E_4/E_6 . Nas Figuras 4 e 5 estão mostradas as mesmas relações, porém a técnica de desacoplamento defasado (DD) foi usada para determinar a proporção de C aromáticos. Os valores dos coeficientes de determinação obtidos foram 0,62 e 0,94, respectivamente.

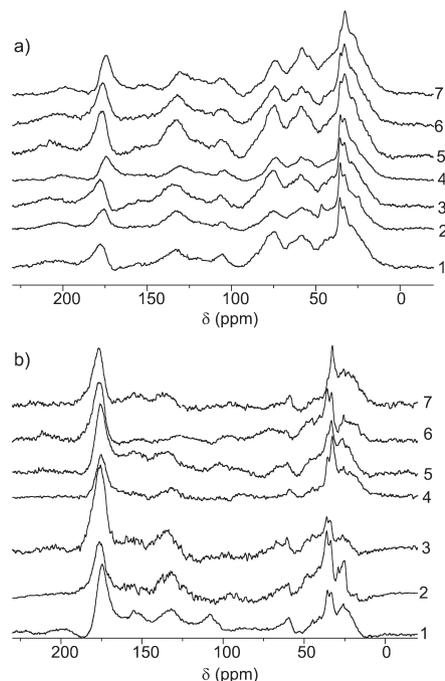


Figura 1. a) Espectros de CP/MAS ^{13}C das amostras de AH(s) dos gleissolos; b) espectros de CP/MAS ^{13}C com DD das amostras de AH(s) dos gleissolos

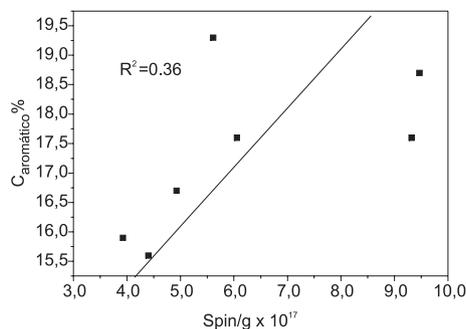


Figura 2. Correlação entre proporção de aromaticidade determinada por CP/MAS ^{13}C e conteúdo de radicais livres das amostras de AH(s)

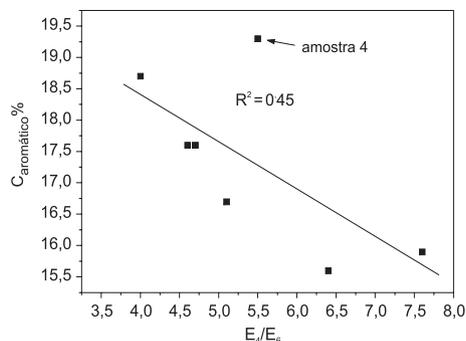


Figura 3. Correlação entre proporção de grupos aromáticos determinados por CP/MAS ^{13}C e relação E_4/E_6 nas amostras de AH(s)

O teor de hidrogênio nas amostras de AH é de 4,5 a 6,9% (Tabela 1), resultando na transferência de polarização do próton (^1H) para o ^{13}C (na polarização cruzada) mais eficiente, subestimando o conteúdo de aromáticos condensados ou substituídos. A polarização cruzada além de diminuir o tempo de relaxação do carbono e permitir, assim, um número muito maior de dados acumulados em um dado intervalo de tempo⁷ induz um aumento na intensidade do sinal de RMN do ^{13}C . Então, quanto mais hidrogênio contiver a amostra, maior será a transferência de polarização, fato evidenciado na Figura 3 com a amostra 4, possui maior conteúdo de hidrogênio (Tabela 1).

A técnica de desacoplamento defasado detecta os carbonos quaternários, isto é, os carbonos que não estão protonados, como também grupos CH_2 e CH_3 com muita mobilidade⁶. Por este motivo, a correlação é baixa entre a porcentagem de carbonos aromáticos medida diretamente por RMN CP/MAS de ^{13}C e a concentração de radicais livres (Figura 2) e E_4/E_6 (Figura 3). Quando é utilizada a técnica DD (Figuras 4 e 5), onde anéis aromáticos condensados ou

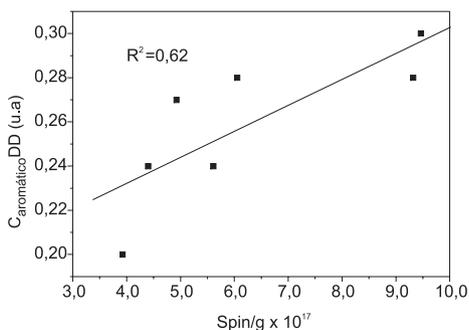


Figura 4. Correlação entre proporção de aromaticidade determinada por CP/MAS ^{13}C mais desacoplamento defasado (DD) e radicais livres das amostras de AH(s)

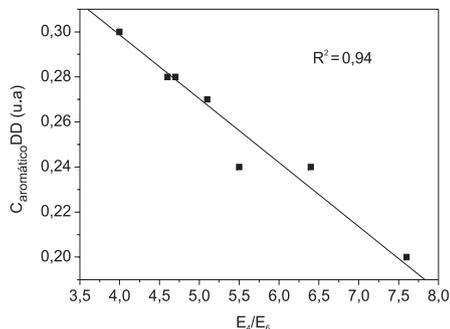


Figura 5. Correlação entre proporção de grupos aromáticos determinados por CP/MAS ^{13}C mais desacoplamento defasado (DD) e razão E_4/E_6 nas amostras de AH(s)

substituídos são detectados, a correlação melhora significativamente. Confirma-se assim que o conteúdo de radicais livres e a razão E_4/E_6 se correlacionam diretamente com anéis aromáticos medidos por RMN CP/MAS de ^{13}C , quando é utilizada a técnica DD.

CONCLUSÃO

A partir dos dados de RMN de ^{13}C obtidos pela técnica de polarização cruzada e ângulo mágico (CP/MAS) mostrou-se que os ácidos húmicos possuem baixo grau de aromaticidade, coerente com a expectativa para áreas de várzea com baixa aeração do solo e baixa atividade microbiana. Os valores da relação E_4/E_6 , obtidos de amostras em solução de ácidos húmicos, foram elevados e coerentes com baixos resíduos aromáticos. A razão E_4/E_6 correlacionou melhor com a quantidade de anéis aromáticos condensados, determinados por CP/MAS ^{13}C juntamente com a técnica de defasagem dipolar, que com o grau de aromaticidade obtido através do CP/MAS “convencional”. A explicação para a diferença está no fato que a razão E_4/E_6 está associada aos grupos aromáticos condensados e não com a aromaticidade total das amostras. Coerentemente a concentração de radicais livres semiquinonas, obtida por EPR, também se correlacionou melhor com o grau de anéis aromáticos obtido pela técnica de RMN usando DD.

AGRADECIMENTOS

Aos pesquisadores L. A. Colnago, N. C. Mello e E. H. Novotny pelas discussões do experimento e ao pesquisador M. Conceição pela amostra fornecida.

REFERÊNCIAS

1. Stevenson, F. J.; *Humus Chemistry*, 2nd ed., John Wiley & Sons: New York, 1994.
2. Chen, Y.; Senesi, N.; Schnitzer, M.; *Soil Sci. Soc. Am. J.* **1977**, *41*, 352.
3. Baes, A. V.; Bloom, P.R.; *Soil Sci. Soc. Am. J.* **1990**, *54*, 1248.
4. Kononova, M. M.; *Soil organic matter*, Pergamon Press: Oxford, 1966.
5. Preston, C. M.; *Soil Sci.* **1996**, *161*, 165.
6. Opella, S. J.; Frey, M. H.; *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 5854.
7. Wilson, M. A.; *NMR techniques and applications in geochemistry and soil chemistry*, Pergamon Press: Oxford, 1987.
8. Rex, R. W.; *Nature* **1960**, *188*, 1185.
9. Steelink, C.; Tollin, G.; *Biophys. Acta*, **1962**, *59*, 25.
10. Martin-Neto, L.; Rossel, R.; Sposito, G.; *Geoderma* **1998**, *81*, 305.
11. Saab, S. C.; Martin-Neto, L.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2004**, *15*, 34.
12. Senesi, N.; Griffith, S. M.; Schnitzer, M.; *Geochim. Cosmochim. Acta* **1977**, *41*, 969.
13. Senesi, N. Em *Humus, its structure and role in agriculture and environment*; Kubat, J., ed.; Elsevier Science Publishers: Amsterdam, 1992, p. 11.
14. Martin-Neto, L.; Andriullo, A. H.; Traghetta, D. G.; *Soil Sci.* **1994**, *157*, 365.
15. Bayer, C.; Martin-Neto, L.; Mielniczuk, J.; Saab, S. C.; Milori, D. M. P.; Bagnato, V. S.; *Geoderma* **2002**, *81*, 105.

16. Saab, S. C.; Martin-Neto, L.; *Quim. Nova* **2003**, 26, 497.
17. Swift, R. S. Em *Methods of soil analysis. Part3. Chemical Method*; Sparks, D. L., ed.; Soil Sci. Soc. Am. Book Series: 5: Madison, 1996, p. 1018.
18. Poole, C. P.; Farach, H. A.; *The Theory of Magnetic Resonance*, John Willey & Sons: Somerset, 1972.
19. Pérez, M. G.; Martin-Neto, L.; Saab, S. C.; Novotny, E. H.; Milore, D. M. B. P.; Bagnato, V. S.; Colnago, L. A.; Melo, W. J.; Knicker, H.; *Geoderma* **2004**, 118, 181.
20. Malcolm, R. L. Em *Humic substances in soil and crop sciences; selected readings*; MacCarthy, P.; Clapp, C. E.; Malcolm, R. L.; Bloom, P. R. C., eds.; 1990, p. 13.
21. Schnitzer, M. Em *Soil Biochemistry*; McLaren, D.; Skujins, J., eds; Marcel Dekker: New York, 1971, vol. 2, p. 60.
22. Ponnampuruma, F. M. Em *Advances in agronomy*; Brady, N. C., ed.; Academic Press: New York. 1972, p. 29.