

RECURSO SOLO

PROPRIEDADES E USOS

Ramom Rachide Nunes

Maria Olímpia de Oliveira Rezende

Universidade de São Paulo
Instituto de Química de São Carlos
Departamento de Química e Física Molecular

São Carlos, SP

© 2015

Qualquer parte desta publicação pode ser reproduzida, desde que citada a fonte.
Todos os direitos desta edição são reservados aos Autores.

Recurso solo : propriedades e usos / Ramom Rachide Nunes
e Maria Olímpia Oliveira Rezende (organizadores). - 1.
ed. . - São Carlos : Editora Cubo, 2015.

E-BOOK

EPUB

ISBN 978-85-60064-65-6

1. Solos. I. Nunes, Ramom Rachide, org. II. Rezende,
Maria Olímpia Oliveira, org.

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)¹ 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

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

diferentes 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); μ é o magneton de Bohr (μ_B) para o elétron ($9,2740154 \cdot 10^{-24} \text{ J T}^{-1}$) e magneton nuclear (μ_n) para os núcleons ($5,0507866 \cdot 10^{-27} \text{ J T}^{-1}$); B (em T) é a densidade de fluxo magnético que por simplicidade é denominada apenas de campo magnético. Devido à diferença de massa entre as partículas o magneton de Bohr é 1836 vezes maior que o magneton nuclear e assim o momento magnético do elétron é cerca de 2000 vezes maior que o dos núcleons. O diagrama energético para uma partícula com spin 1/2 submetido a um campo magnético é dado na (Figura 1).

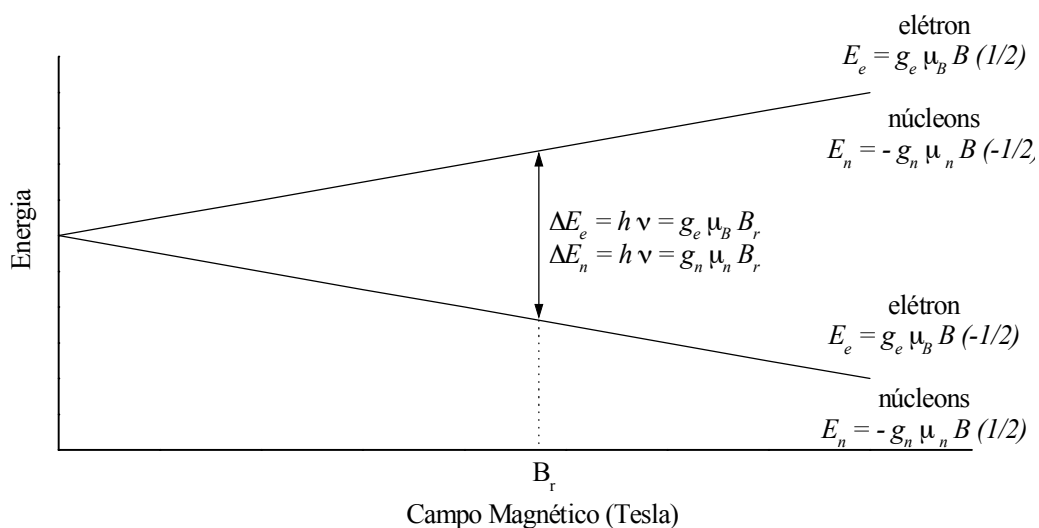


Figura 1. Remoção da degenerescência dos estados de spins por um campo magnético (efeito Zeeman). Os índices “e” e “n” referem-se ao elétron e aos núcleons, respectivamente.

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:

$$\Delta E = g \mu B \tag{Equação 2}$$

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 ΔE , onde h é a constante de Planck ($6,6260755 \cdot 10^{-34}$ J s) e ν é a frequência da radiação incidente, como mostrado a seguir:

$$h\nu = \Delta E = g \mu B_r \tag{Equação 3}$$

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:

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

onde n_+ e n_- são as populações dos níveis de maior e de menor energia respectivamente, k é a constante de Boltzmann ($1,380658 \cdot 10^{-27} \text{ J K}^{-1}$) 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 conseqüentemente 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 re-emitido. Existem, porém, acoplamentos entre os spins e o meio atômico circundante que possibilitam a transferência de energia sem a emissão de um fóton durante a transição do spin de volta para o nível inferior. Esse processo é denominado de relaxação spin-rede, e possui um tempo característico (T_1) dependente dos acoplamentos existentes (Coelho-Neto, 1992). A rede refere-se a outros átomos na molécula e outras moléculas, incluindo o solvente quando for o caso. A taxa de transição do nível de menor energia para o de maior energia não pode exceder a taxa de relaxação de volta para o estado fundamental, pois, 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 o tempo do processo é T_2 e a largura de uma linha espectral é inversamente relacionada a esse tempo (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 freqüentemente 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 N₂ 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 essas regras são chamadas de proibidas. É importante ressaltar que o termo proibido refere-se a regras estabelecidas para um modelo simples, de modo que transições proibidas podem se tornar permitidas por mecanismos não incluídos 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: Δm_s nuclear igual a 0 e Δm_s eletrônico igual a ± 1 , ou seja, as transições nucleares e de mais de um spin eletrônico são pouco prováveis. Já para RMN temos como transições proibidas as de spin eletrônico e as de mais de um spin nuclear.

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 anti-paralelos, 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 anti-paralelo 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).

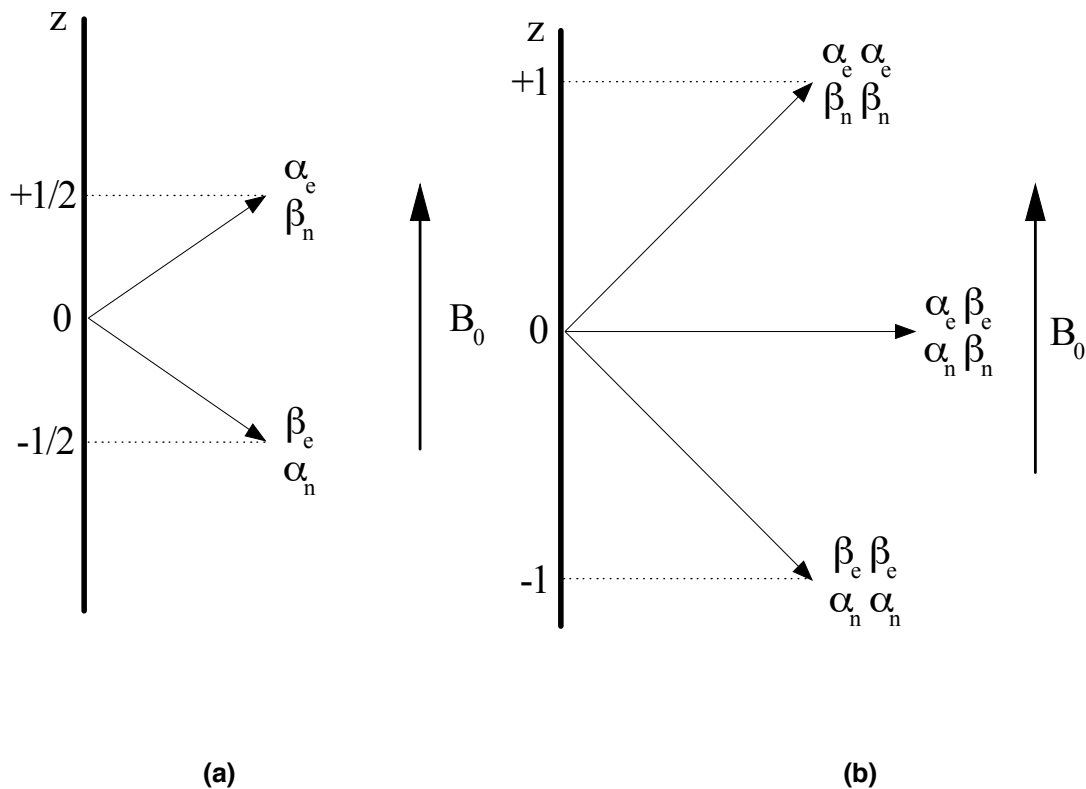


Figura 2. Orientação quantizada do spin; α e β são os estados de spin $+1/2$ e $1/2$ respectivamente, o eixo z tem como unidade \hbar . (a) $S = 1/2$ e (b) $S = 1$. Os sub índices “e” e “n” referem-se ao elétron e aos núcleons, respectivamente.

1.5. Interações magnéticas

A condição de ressonância dada pela Eq. (3) depende de constantes próprias da partícula em questão (g e μ) e do B , porém o campo magnético efetivo (B_{efet}) a que determinada partícula é submetida não é necessariamente apenas o B aplicado. Adicionalmente a 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).

1.6. 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:

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

onde σ é chamada de constante de blindagem cujo valor é da ordem de 10^{-6} . O grau de blindagem depende da densidade de elétrons ao redor do núcleon em questão. Com 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 $h\nu = \Delta E = 2,0023193 \mu_B B_r$ do elétron livre. Em RMN é usual considerar-se que o g_n é uma propriedade inerente dos núcleons e qualquer correção na energia Zeeman são interpretadas como efeitos de blindagem Eq. (5). Já os espectroscopistas de RPE preferem descrever as mudanças na energia Zeeman como alterações do momento magnético efetivo do elétron, ou seja o valor- g não é uma constante e pode ser diferente em diferentes situações, com isso o valor- g medido experimentalmente pode diferir muito do g_e .

O momento angular intrínseco de spin do elétron desemparelhado é associado com um valor-g igual ao g_e , porém o movimento orbital 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 (λ^{-1}) de uma determinada banda de absorção em espectroscopia no infravermelho, ou o comprimento de onda do máximo de absorção (λ_m) em espectroscopia eletrônica (ultravioleta - visível).

1.7. 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 que a do elétron desemparelhado depende de qual orbital ele está e da orientação da molécula ou átomo em relação ao campo magnético aplicado.

Quando um elétron desemparelhado, que possa interagir com um núcleo com spin diferente de 0, for submetido a um campo magnético externo 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 13) 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 cm^{-1} ou MHz. A relação entre essas unidades é: $A (\text{mT}) / a (\text{cm}^{-1}) = 2141,9497 / g$; e $a (\text{cm}^{-1}) = 3,33546 \cdot 10^5 A (\text{MHz})$. O valor da constante de acoplamento hiper-fino ou super-hiperfino depende do grau de interação que ocorre entre o(s) elétron(s) desemparelhado(s) e o núcleo em questão.

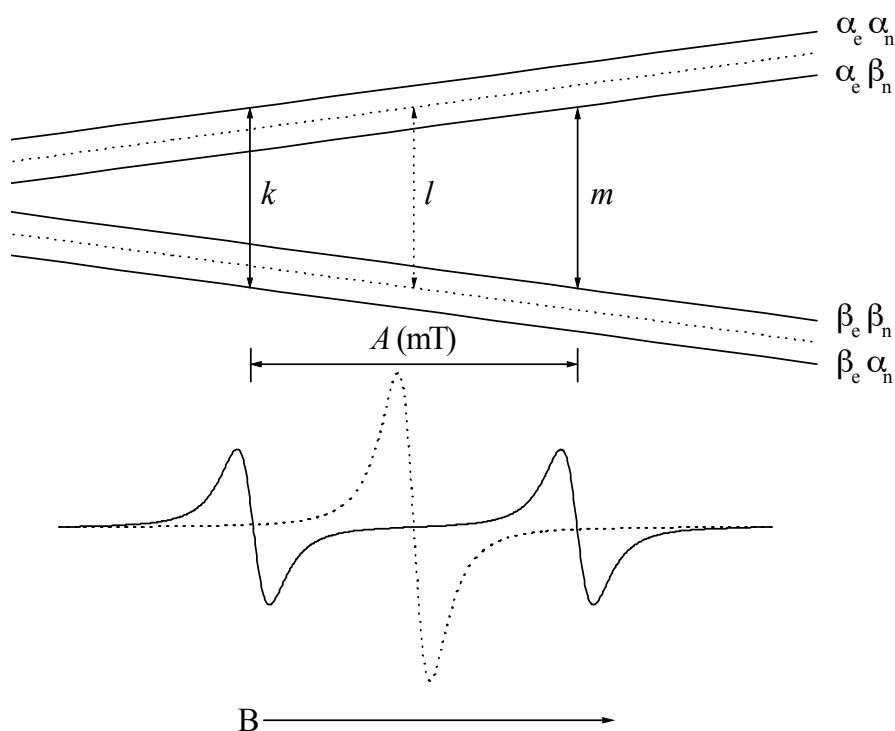


Figura 3. Níveis de energia e o respectivo espectro de RPE para um sistema com $S = 1/2$ e $I = 1/2$ (linhas cheias) e $S = 1/2$ e $I = 0$ (linhas pontilhadas). As setas denominadas k , l e m representam as transições permitidas.

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.

1.8. 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 freqüentemente é uma quantificação relativa dos diferentes grupos químicos (RMN), ou da espécie paramagnética em relação a um padrão (RPE). Esse assunto será tratado em detalhes no capítulo 6.

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 microondas, 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 microondas pela interação do solvente com a componente elétrica dessa, assim como aquecimento e outros problemas (Parisich, 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) (Parisich, 1990). Há, no entanto, experimentos executados em outras frequências de microondas tais como de 1 a 2 GHz (banda-L, $B_r = 35,7$ e $71,4$ mT), 3 a 4 GHz (banda-S, $B_r = 107$ e $142,7$ mT), 24 GHz (banda-K, $B_r = 856,4$ mT), 50 GHz (banda-V, $B_r = 1784,1$ mT) e 95 GHz (banda-W, $B_r = 3389,8$ mT). Normalmente os experimentos de RPE são efetuados à temperatura ambiente, porém, sobre certas circunstâncias, torna-se interessante efetuá-los a baixa temperatura utilizando N_2 ou mesmo He líquido (77 K e 4,2 K, respectivamente) para o resfriamento.

As espécies paramagnéticas freqüentemente 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 microondas 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 microondas com frequência fixa e conhecida e variar B (Parisich, 1990). Isso provoca a variação de ΔE até que a condição de ressonância, dada pela Eq. (3), seja atingida e ocorra a transição de spin com a absorção de energia que é detectada pelo equipamento.

Geralmente os espectros de RPE são adquiridos na forma de primeira derivada do espectro de absorção (Figura 13b). A resolução pode ser melhorada pela aquisição do espectro em segunda derivada (Parisich, 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 2.2.2.4). A seguir são dados alguns exemplos de configurações:

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

O acoplamento spin-órbita fornece um mecanismo com o qual o momento angular orbital pode ser adicionado, ou misturado, ao momento angular de spin (Goodman e Hall, 1994). Quando há significativa contribuição 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,¹ 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 Δg é inversamente

¹ Esses orbitais são designados d_{xy} , d_{xz} , d_{z^2} , d_{yz} , 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.

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:

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

onde n é o coeficiente de mistura entre os orbitais envolvidos, e é obtido do chamado “pentágono mágico” (Figura 14), λ é a constante de acoplamento spin-órbita para o átomo livre e que será positiva para átomos com menos de cinco elétrons d e negativa para mais de cinco elétrons d . O valor absoluto de λ depende do estado de oxidação do átomo mas aumenta rapidamente com o aumento do número atômico, e ΔE é a separação em energia desses orbitais que pode ser obtida de espectros eletrônicos (Parish, 1990).

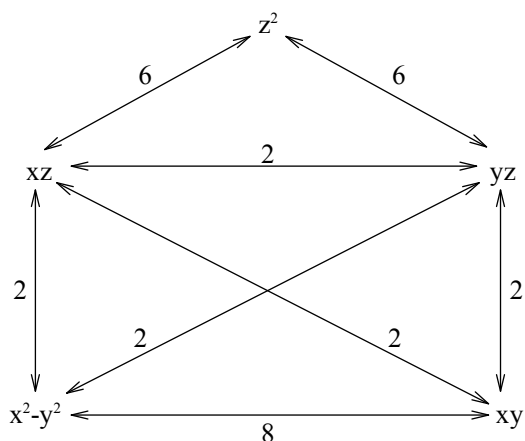


Figura 4. “Pentágono mágico” utilizado para a obtenção do coeficiente de mistura (número nas setas) dos pares de orbitais d.

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

Utilizando a constante de acoplamento spin-órbita e a ΔE obtida de espectros eletrônicos dificilmente se consegue reproduzir os valores de g experimentais obtidos dos espectros de RPE. Para ajustar esses valores experimentais modifica-se a Eq. (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 conseqüente redução de Δg .

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 mono-cristal, com anisotropia em g , o valor medido desse parâmetro será dependente da orientação dos eixos desse mono-cristal 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 g_{\parallel} (Goodman e Hall, 1994).

Por outro lado, quando o movimento de rotação aleatório dos átomos ou moléculas atinge taxas consideravelmente maiores do que a frequência de operação do espectrômetro, qualquer anisotropia se anula durante o tempo requerido para excitar-se o sistema. Sendo assim, em qualquer instante o conjunto de átomos ou moléculas terá todas as possíveis orientações em relação ao campo magnético externo e o espectro resultante será "aparentemente" isotrópico e terá apenas um fator-g. É interessante ressaltar que a frequência de operação dos espectrômetros de RPE é na faixa das microondas (GHz) de tal sorte que para a anisotropia ser nula a taxa 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 15a).

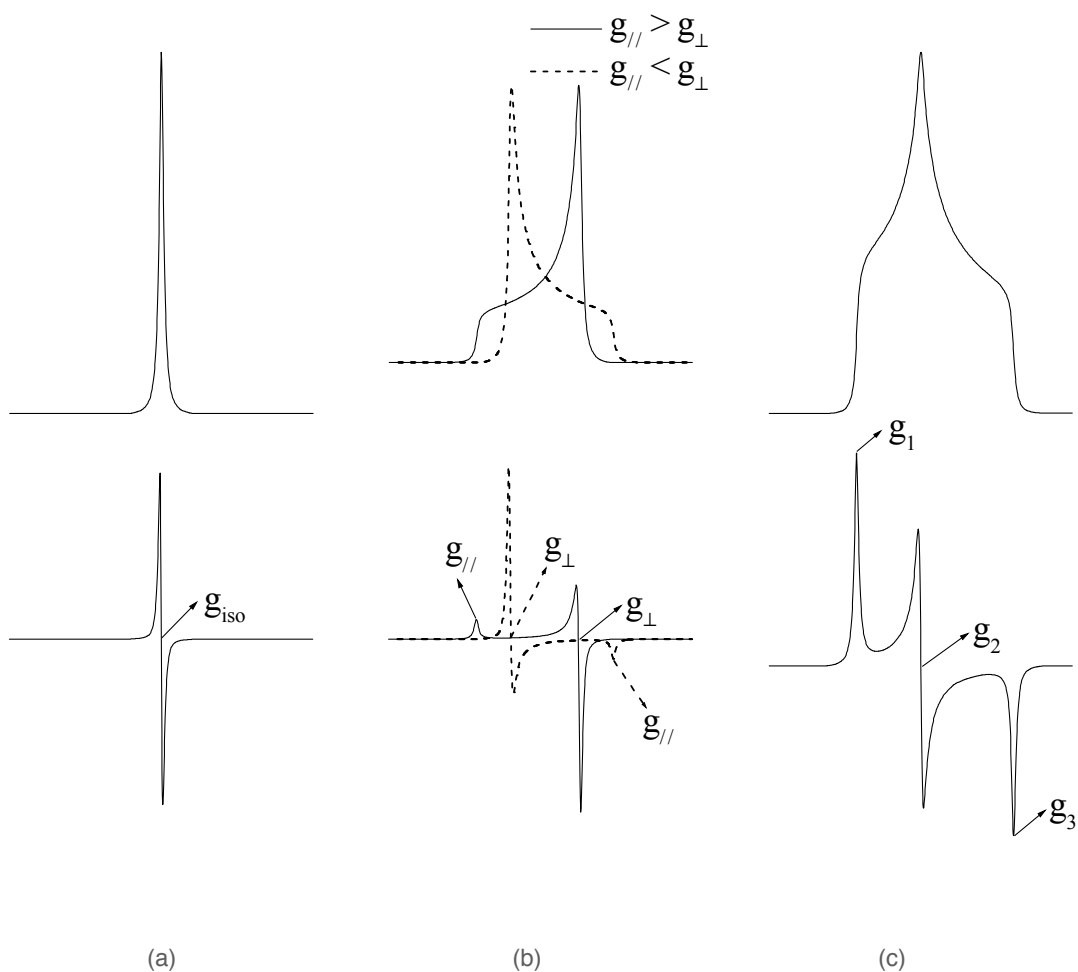


Figura 5. Espectros de RPE de amostras não orientadas (pó ou solução congelada); absorção (superior) e primeira derivada (inferior) sendo: (a) sistema isotrópico; (b) com simetria axial e (c) com simetria rômbrica.

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 (Parisich, 1990). Assim, em primeira derivada, mede-se o g_{\perp} na posição onde a linha de ressonância passa por zero e o g_{\parallel} em um máximo ou mínimo, dependendo se ele for maior ou menor que o g_{\perp} , respectivamente (Figura 15b). Já para um centro paramagnético com simetria rômica três valores de g serão observados no espectro (Figura 15c).

Freqüentemente, a determinação dos valores- g diretamente dos espectros é difícil e há a necessidade de simular 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 16a).

$$D (\pm 3/2)^2 - D (\pm 1/2)^2 = 2 D$$

$$D (\pm 5/2)^2 - D (\pm 3/2)^2 = 4 D$$

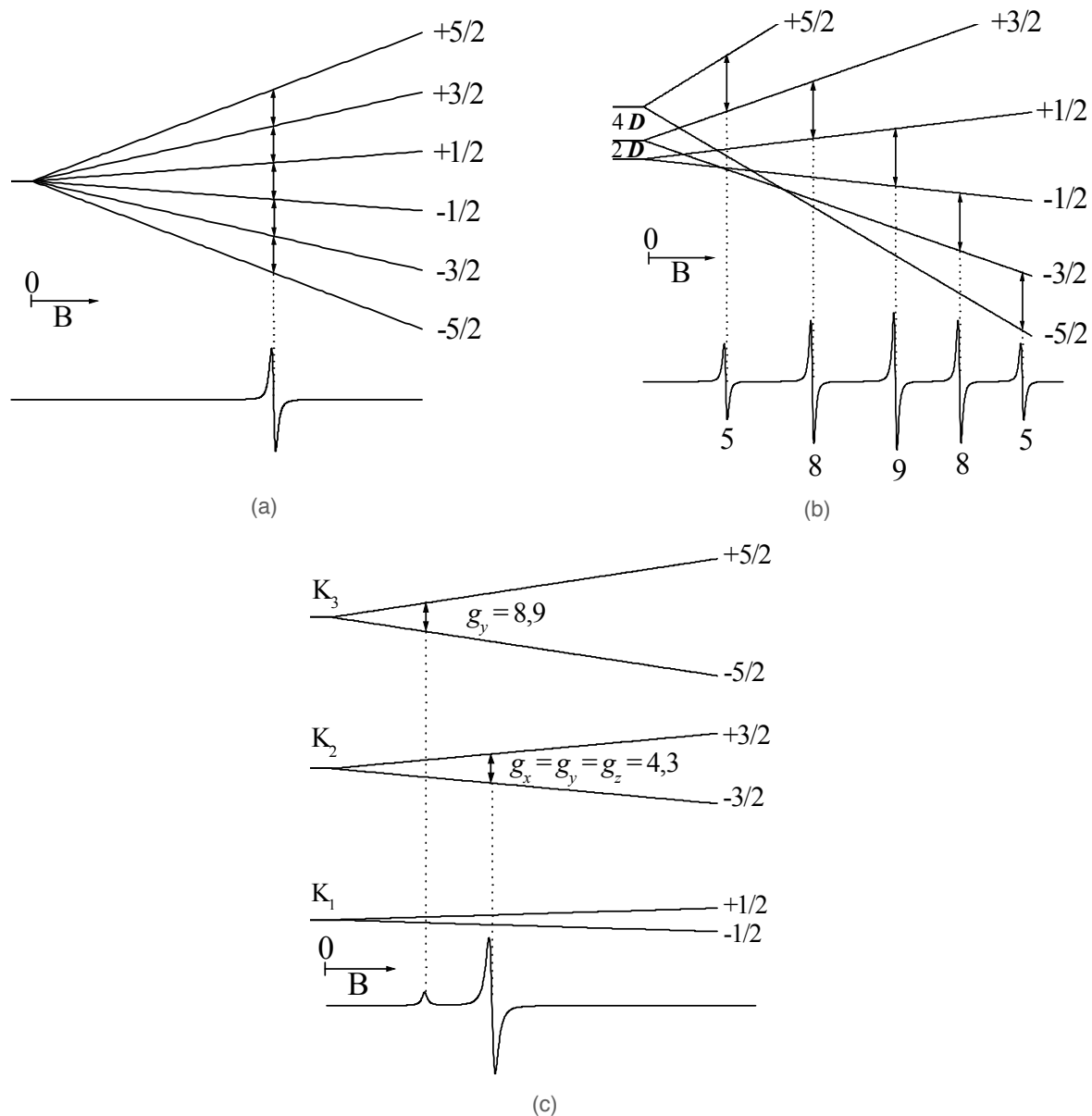


Figura 6. Diagramas de energia e respectivos espectros de RPE para sistemas $S = 5/2$. (a) Em simetria cúbica $D = 0$; (b) em simetria menor que a cúbica com $D \ll h \nu$ e (c) com $D \gg h \nu$ e $E/D = 1/3$, p. ex.: Fe^{3+} em sítio rômboico. D é a separação de campo zero, os números sob as linhas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

Porém, quando D for diferente de zero, os níveis energéticos não mais serão degenerados na ausência do campo magnético externo (Figura 16b) e 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 16c) as transições permitidas serão aquelas no mesmo dubleto de Kramer que, devido à mistura entre os diferentes estados de spins, possuem spin efetivo $1/2$ (Wickman et al., 1965).

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

2.5. 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 Fe^{3+} , principalmente como contaminantes inorgânicos tais como na forma de óxidos ou hidróxidos, é a principal responsável pelas linhas largas centradas em $g \approx 2$ freqüentemente observadas em seus espectros, o que dificulta ou mesmo impossibilita a análise desse tipo de material por RPE.

2.6. Sondas de RPE freqüentemente detectadas em substâncias húmicas

As espécies paramagnéticas freqüentemente detectadas por RPE em substâncias húmicas são: Fe^{3+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , VO^{2+} e radicais livres orgânicos. E ao comparar os parâmetros obtidos dos espectros de RPE com os da

literatura é possível inferir sobre o estado de oxidação, a simetria e os ligantes 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. Fe³⁺

Na crosta terrestre o ferro é o quarto mais abundante de todos os elementos e o primeiro entre os metais de transição. Em conseqüência 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 Fe³⁺, cujo isótopo mais abundante (⁵⁶Fe, 91,72% de abundância natural) possui $l = 0$, tem uma configuração 3d⁵ e dependendo do campo ligante ao qual está submetido, poderá ser $S = 5/2$, $S = 3/2$ e $S = 1/2$. O Fe²⁺ (3d⁶, $S = 2$), 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 freqüentemente detectado por RPE em substâncias húmicas e por se tratar de um estado S ($L = 0$) não há contribuição orbital para o momento angular total dos elétrons no estado fundamental, e enquanto a simetria for alta não ocorrerá mistura 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 Fe³⁺ em simetria cúbica, por exemplo íons hidratados em complexos de esfera externa, apresentará um sinal isotrópico com $g \cong g_e$.

Já em simetria axial a separação de campo zero (D) pode ser muito maior do que a freqüência de operação do espectrômetro ($D \gg h \nu$) resultando em um espectro anisotrópico com $g_{//} \cong g_e$ e $g_{\perp} \cong 6$. Esse tipo de sinal, observado em alguns espectros de substâncias húmicas (Senesi, 1990), pode ser atribuído a íons de Fe³⁺ ligado a quatro átomos de nitrogênio no plano equatorial, como no caso de complexos Fe³⁺-porfirinas. Essa estrutura pode ter

sua origem na clorofila residual incorporada às substâncias húmicas, onde o Fe^{3+} substituiu o íon central de Mg^{2+} (Filip et al., 1985), ou sintetizada por microrganismos do próprio solo (Mangrich et al., 1998).

Finalmente, com máxima distorção 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^{3+} . Porém, é importante ressaltar que isso não é devido a uma preferência do Fe^{3+} 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^{3+} em sítios com separação de campo zero, porém de maior simetria, apresentam uma alta anisotropia dos seus valores- g e em sistemas não orientados produzem linhas largas, e conseqüentemente de baixa amplitude (Goodman e Hall, 1994).

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

2.6.2. Mn^{2+}

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

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

Outro aspecto importante da interação hiperfina, pouco explorado na análise de substâncias húmicas por RPE, é a freqüente ocorrência de algumas linhas adicionais entre as linhas do sexteto. Essas linhas adicionais são atribuídas às transições proibidas Δm_s eletrônico e nuclear igual a ± 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 $D \ll h \nu$, o mesmo podendo ser feito utilizando a eventual divisão das linhas do sexteto permitido, principalmente em campo alto (Abragam e Bleaney, 1986).

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

Em relação a métodos de troca iônica a espectroscopia de RPE tem se mostrada mais sensível, conveniente e rápida para a determinação das constantes de equilíbrio dos complexos de Mn^{2+} com substâncias húmicas (Senesi, 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 cm^{-1}), resultando em fatores- g menores que o g_e :

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

Valores típicos são $1,97 > g_{\parallel} > 1,93$ 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_{\parallel} 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 (ΔE) leva a um aumento do valor g aproximando-o do g_e , além disso, como visto na seção 2.2.3.2, o aumento do caráter covalente também reduz Δg . Ao mesmo tempo, com a ligação mais covalente, a deslocalização do elétron desemparelhado reduz a constante de interação hiperfina. Os valores de g_{\parallel} e A_{\parallel} , 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: $g_{iso} = \langle g \rangle = 1/3 (2 g_{\perp} + g_{\parallel})$, 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^{2+}

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

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

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

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

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

O valor- g_{\parallel} 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^{2+} no plano equatorial. Em geral o valor- g_{\parallel} 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_{\parallel} diminui e, embora menos regular, uma tendência oposta observa-se para o valor de A_{\parallel} (Figura 17). Para o complexo de Cu^{2+} hexahidratado obtêm-se $g_{\parallel} = 2,422$ e $A_{\parallel} = 11,9$ mT (Boyd et al., 1983).

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

2.7. Os radicais livres orgânicos

Os processos de transformação da matéria orgânica no ambiente são conectadas 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 2,00352,004 (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.

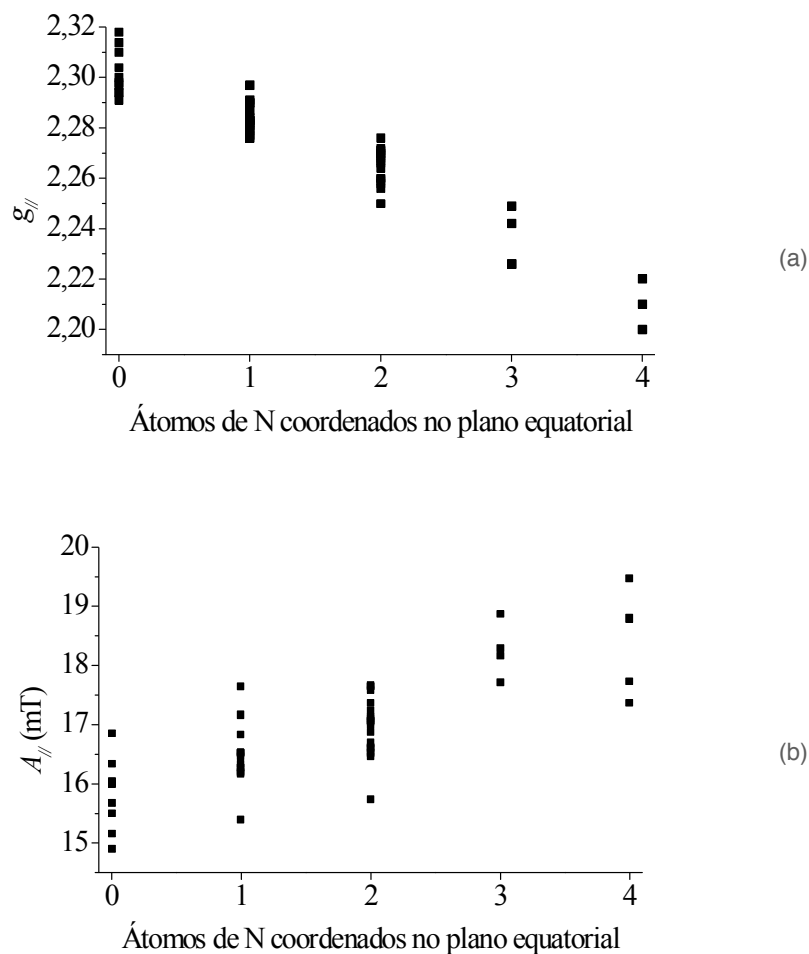


Figura 7. Variações dos parâmetros espectroscópicos g_{\parallel} (a) e A_{\parallel} (b) em função do número de átomos de nitrogênio coordenados ao íon Cu^{2+} no plano equatorial. Dados obtidos da literatura referentes a complexos com substâncias húmicas e compostos modelo: Boyd et al. (1983); Senesi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

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 transiente e envolvida em reações de óxido-redução (Steelink e Tollin, 1962; Alberts et al., 1974; Senesi e Schnitzer, 1977). Oniki e Takahama (1994) reportaram a presença de três tipos de radicais livres orgânicos em amostras de ácidos húmicos e Cheshire e McPhail (1996) observaram pelo menos duas espécies sendo que uma delas apresentava um sinal alargado e sem estrutura e outra com estrutura bem resolvida. A proporção entre 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; Jezierski et al., 1998; Jerzykiewicz et al., 1999; Olk et al., 1999); em estudos do impacto de diferentes sistemas de cultivo do solo (Martin-Neto et al., 1994b); para estimar a reatividade das substâncias húmicas no

ambiente (Senesi, 1990; Martin-Neto et al., 1994a; Sposito et al., 1996); assim como no monitoramento ambiental (Drozd e Jezierski, 1994; Jezierski 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 (Jezierski et al., 2000a,b; Novotny e Martin-Neto, 2000, 2002) e de fatores ambientais que atuam na sua produção e estabilização: material de origem; clima (Martin-Neto et al., 1998); poluição (óxidos de enxofre e nitrogênio, metais de transição) (Jezierski et al., 1998); pH; e condição redox (Senesi, 1990).

A presença de metais paramagnéticos adsorvidos nas substâncias húmicas pode levar à supressão dos sinais de RPE dos radicais livres orgânicos (Jezierski et al., 2000a,b; Novotny e Martin-Neto, 2000, 2002) e 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).

2.8. 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 freqüentemente 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 (ν_L) dada por: $\nu_L = \gamma B / (2\pi)$ onde γ é a razão magnetogírica dada por $\gamma = g_n \mu_n / \hbar$. Assim, em um equipamento com magneto de 9,4 T os ^1H ($\gamma = 2,675 \cdot 10^8 \text{ T}^{-1}\text{s}^{-1}$) entrarão em ressonância a cerca de 400 MHz, que é a ν nesse campo magnético e o modo usual de descrever-se o equipamento (Silverstein et al., 1991), enquanto que os ^{13}C entrarão em ressonância a cerca de 100 MHz pois seus g_n e γ são aproximadamente quatro vezes menores que os dos ^1H .

O carbono, que evidentemente é de grande importância para a química orgânica e conseqüentemente em estudos da matéria orgânica do solo, possui dois isótopos estáveis, o ^{12}C e o ^{13}C , cujas abundâncias naturais são 98,9 e 1,1%, respectivamente. Desses, somente o ^{13}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}C é nulo.

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

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

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

onde N é a abundância natural do nuclídeo em questão. Como os ^1H 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}C e de outros nuclídeos com $I = 1/2$ de interesse para a análise da matéria orgânica do solo por RMN são dados na Tabela 1.

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

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

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 (α) 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° 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° .

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 seqüência 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° ele deve ser no mínimo $5T_1$.

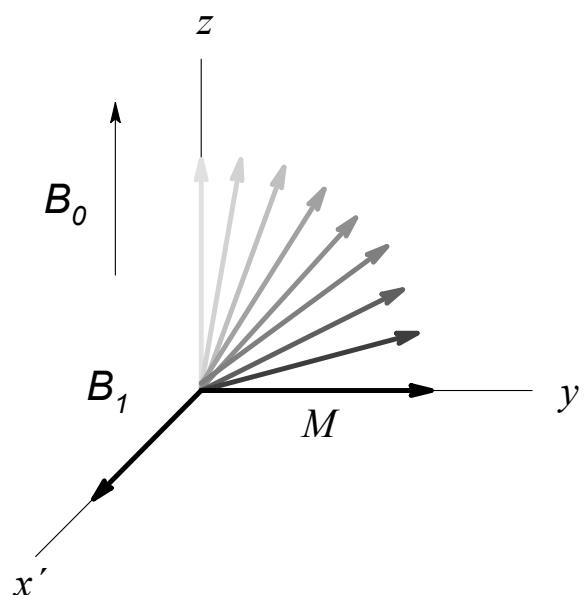


Figura 8. Deflexão do vetor magnetização líquida (M) por um pulso de rf (B_1) no sistema girante de coordenadas.

3.3. O deslocamento químico

Como já visto na seção 2.2.2.5, B induz um movimento orbital eletrônico que por sua vez gera um B_{local} que é uma importante contribuição ao $B_{efetivo}$ (ambos ao longo da direção z) ao qual o núcleo magnético de interesse está submetido. A habilidade do campo magnético aplicado em gerar 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 ν_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 ν_L assim núcleos desblindados precessionam a frequências maiores do que núcleos blindados.

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

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

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

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

Exemplos de padrões utilizados são para o ^1H a freqüência de ressonância do ^1H do tetrametilsilano – $\text{Si}(\text{CH}_3)_4$, para o ^{13}C é a freqüência de ressonância do ^{13}C do mesmo composto e do ^{31}P a ressonância do ^{31}P em solução 85% de H_3PO_4 , a vantagem do uso do δ é que 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}C RMN de um grupo metila (CH_3) será um quarteto.

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

O desacoplamento envolve a aplicação de um campo de rf adicional (B_2) na frequência de ressonância do spin cuja influência deseja-se remover. 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 Geraldes, 1987).

3.5. Anisotropia do deslocamento químico

Em solução um carbono (C) quimicamente distinto geralmente apresenta uma linha simples de ressonância quando os ^1H estão desacoplados. A frequência de ressonância, ou deslocamento químico, de uma linha simples é relacionada à distribuição eletrônica ao redor do núcleo responsável pelo sinal de RMN. Frequentemente 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 $(3/2 \text{sen}^2\theta)$ multiplica o tensor isotrópico enquanto $(3 \text{cos}^2\theta - 1)$ multiplica as demais componentes desse tensor, sendo θ o ângulo formado entre as linhas de força do B e o eixo principal do tensor. Se θ for igual a $54,7^\circ$ (ângulo mágico) $\text{cos}^2\theta = 1/3$ e $\text{sen}^2\theta = 2/3$ 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

Geraldes, 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}C) uma anisotropia do deslocamento químico de 170 ppm corresponde a um pouco mais do que 2500 Hz, assim uma taxa de rotação de 2,6 kHz seria suficiente para obter-se um espectro livre de bandas laterais; já em um magneto de 4,7 T (50,3 MHz para o ^{13}C) a taxa de rotação deveria ser de no mínimo 8,6 kHz.

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

A rotação segundo o ângulo mágico também minimiza a interação dipolar, pois as interações dipolares também são proporcionais a $(1-3\cos^2\theta)$, onde θ é o ângulo formado entre o vetor internuclear dos núcleos em interação e a direção das linhas de força do B , e da mesma forma que para a anisotropia do desvio químico, se $\cos^2\theta$ for igual a $1/3$ ($\theta = 54,7^\circ$), 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 ^1H .

3.6. A transferência de polarização

Como já visto em 2.2.4.1 núcleos de ^1H e ^{13}C submetidos ao mesmo campo magnético precessionam a diferentes frequências (frequências de Larmor), porém, utilizando diferentes campos de rf (B_1) para cada núcleo, é possível atingir uma situação em que ambos precessionem à mesma frequência nos seus respectivos sistemas girantes de coordenadas. 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.: ^1H) estejam em uma situação de não equilíbrio com uma temperatura de spins da ordem de mK, necessitando transferir energia para os núcleos raros (p. ex.: ^{13}C) com os quais eles estão em contato. Com isso ganha-se intensidade do sinal do núcleo raro de até γ_a/γ_b , onde γ_a é a razão magnetogírica do núcleo abundante e γ_b a do raro. No caso do par $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ o ganho é de aproximadamente quatro. Adicionalmente, o tempo de repetição dos

experimentos torna-se dependente do tempo de relaxação longitudinal (T_1) do núcleo abundante, que no caso do ^1H é freqüentemente menor que do ^{13}C , e logo o tempo total de experimento é drasticamente reduzido.

O processo de transferência de polarização leva um certo tempo característico que depende de diversos fatores, tais como movimentos moleculares e distância entre os núcleos de ^{13}C e ^1H em interação, esse tempo é chamado de tempo de polarização cruzada (T_{CH}), e por outro lado, a magnetização dos ^1H , que será transferida para os ^{13}C , não é constante durante o tempo de contato, mas sim diminui exponencialmente a uma taxa dada pelo tempo de relaxação spin-rede dos ^1H no sistema de coordenadas girantes ($T_{1\rho}$). Logo, a magnetização resultante dos ^{13}C é resultado de uma combinação desses dois processos que ocorrem simultaneamente: a diminuição da magnetização dos ^1H devida à relaxação ($T_{1\rho}$) e a transferência de magnetização para os núcleos de ^{13}C (Figura 19a).

Para que ocorra uma polarização cruzada eficiente, T_{CH} precisa ser muito menor do que $T_{1\rho}$ e, para que os espectros sejam quantitativos, os diferentes grupos químicos devem possuir valores de T_{CH} e $T_{1\rho}$ semelhantes. Normalmente o processo de difusão de spin que ocorre entre os núcleos de ^1H homogeneiza os valores de $T_{1\rho}$, porém 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; Fründ et al., 1994; Preston, 1996).

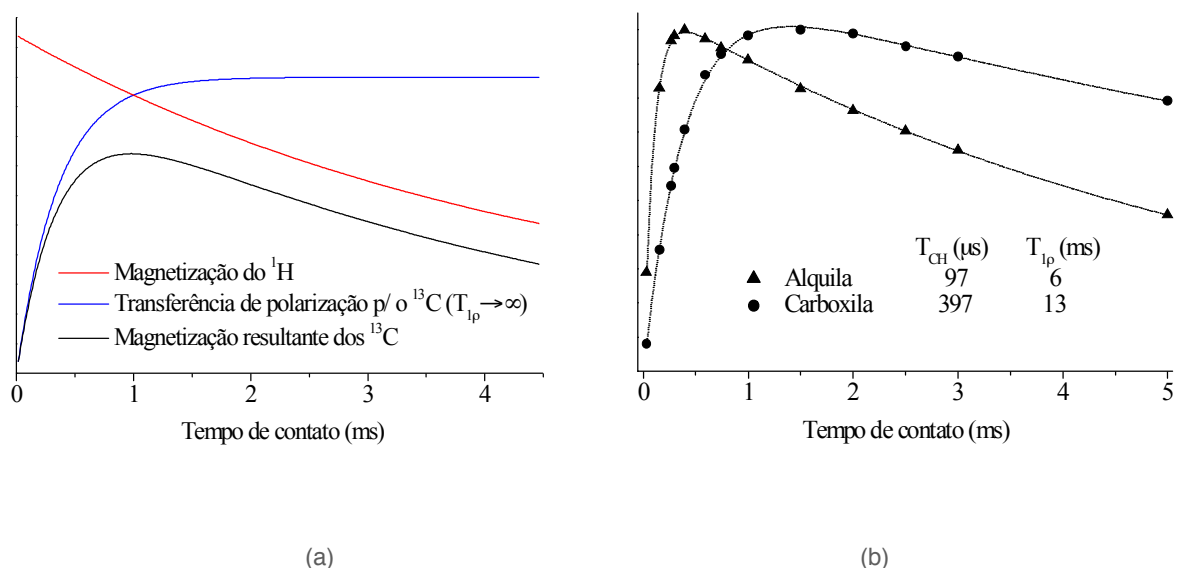


Figura 9. (a) Cinética da polarização cruzada. (b) Dados experimentais de uma amostra de ácidos húmicos. Alquila corresponde à região espectral de 0 - 45 ppm e carboxila de 158186 ppm.

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 a maiores velocidades porém, quando a velocidade do rotor é comparável à interação dipolar o acoplamento de Hartmann-Hahn é dividido em uma série de picos separados pela frequência de rotação. A intensidade do sinal obtida com a polarização cruzada no máximo 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 ^1H ou do ^{13}C durante o tempo de contato da polarização cruzada (Figura 10). 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).

Na Figura 11 pode-se observar as diferenças entre os espectros obtidos com ^{13}C CPMAS NMR e ^{13}C VACPMAS NMR.

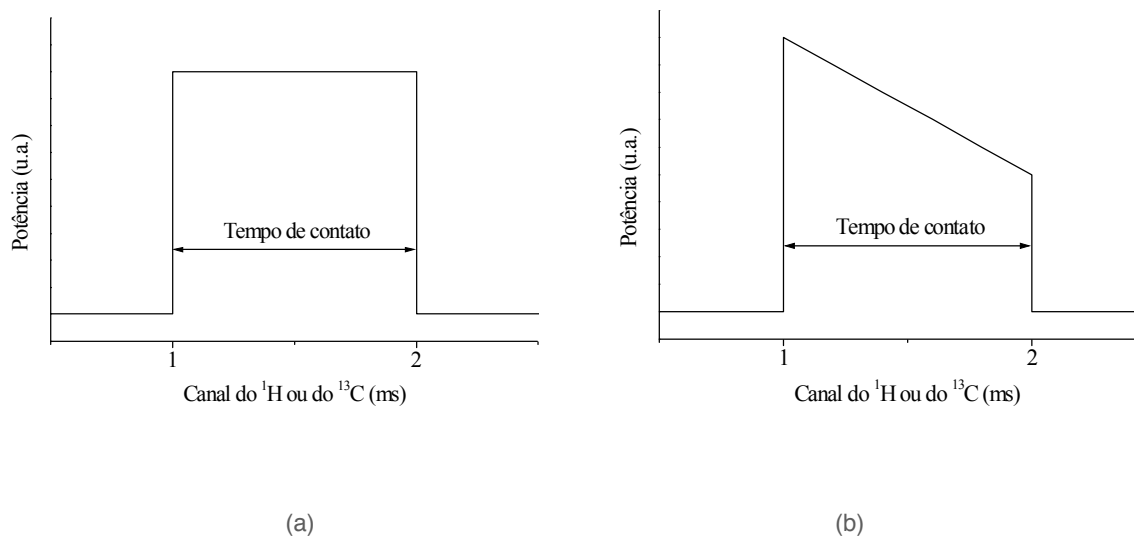


Figura 10. Esquema comparativo do B_1 para a seqüência de polarização cruzada (a) e da polarização cruzada com amplitude variável (b).

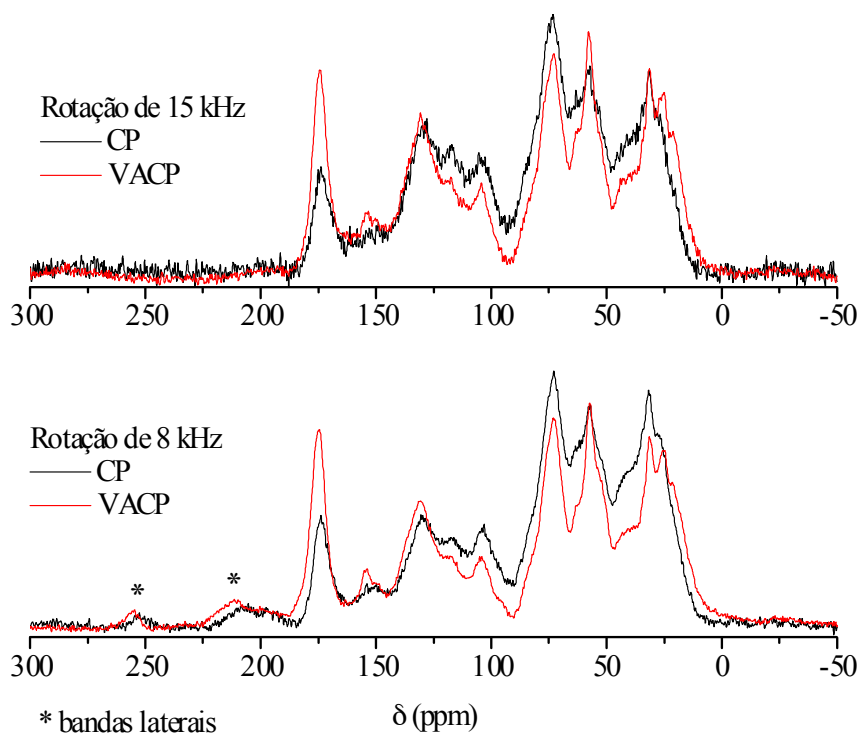


Figura 11. Espectros de ^{13}C -RMN no estado sólido adquiridos com as seqüências de pulsos ^{13}C CPMAS NMR e ^{13}C VACPMAS NMR a diferentes taxas de rotação (MAS). Amostra de ácidos húmicos extraídos de solo.

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

A primeira observação do fenômeno de RMN ocorreu em 1945 (Günther, 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 na 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). GonzalezVila et al. (1976) usaram a espectroscopia de ^{13}C RMN para estudar as características estruturais de ácidos húmicos extraídos de solos. Espectros de ^{13}C CPMAS 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 aceito 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; Fründ e Lüdemann, 1989; Kinchesh et al., 1995; Conte et al., 1997; Hemminga e Buurman, 1997; Smernik e Oades, 2000).

A técnica de ^{13}C CPMAS NMR 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 Fe^{3+} e Mn^{2+}) nas amostras intactas. Conseqüentemente, uma grande parte da matéria orgânica do solo pode ser “obscurecida” por íons paramagnéticos, e a fração obscurecida pode ser exatamente a matéria orgânica ligada aos íons paramagnéticos (Hemminga e Buurman, 1997), ou seja ser exatamente a fração mais reativa 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 agrônômica e ambiental. Esses problemas podem ser minimizados pelo pré-tratamentos das amostras de solo com ditionito para remoção do Fe^{3+} por redução, o que nem sempre é eficiente (Preston et al., 1994). Mas uma combinação de redução por ditionito seguido por troca com SnCl_2 pode ser suficiente (Arshad et al., 1988) e no caso de complexos organominerais uma possível solução seria a remoção dos silicatos por ácido fluorídrico, o que tem se mostrado eficiente também para a remoção dos óxidos de ferro (Dai e Johnson, 1999). Porém, 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}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}C RMN pode ser utilizada para caracterizar a matéria orgânica do solo e acompanhar a sua decomposição visto que os diversos compostos que dela fazem parte possuem diferentes taxas de mineralização e alguns compostos sintetizados pelos microorganismos do solo também podem ser detectados por ^{13}C RMN.

A caracterização das substâncias húmicas em termos da sua aromaticidade, definida como a porcentagem da área do espectro de ^{13}C RMN na região dos grupos aromáticos (110-145 ou 110-160 ppm) em relação à área total do espectro, excetuando-se as áreas do C carboxílico e carbonílico, (Hatcher et al., 1981) e relacionando 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}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}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 Csubstituídos (Preston, 1996). KögelKnabner 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 Csubstituídos encontrados em estruturas aromáticas recalcitrantes devem ter uma origem diferente da lignina (Guggenberger et al., 1994).

Outra região do espectro de ^{13}C CPMAS 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; KögelKnabner 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}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}C RMN há contribuições importantes de carboidratos da celulose (Oalquila e diOalquila – 62-112 ppm), material protéico e lignina (metoxila e/ou C protéico – 50-62 ppm). Na região dos aromáticos, por sua vez, os sinais na região de 145-160 ppm (fenólico) e 112-124 ppm (aromático) podem ser considerados como grupos lábeis ou pouco decompostos pois ambos podem ser atribuídos à lignina. Por outro lado, os sinais atribuídos a CH alifático (0-50 ppm) e a região alargada entre 124 e 145 ppm, atribuída a C aromático alterado, podem ser consideradas como estruturas recalcitrantes ou de materiais decompostos.

3.9. A técnica de ^{13}C CPMAS NMR com desacoplamento defasado

Técnicas que simplifiquem os espectros de RMN são importantes na análise de moléculas complexas. Na técnica de desacoplamento defasado (DD) acrescenta-se na seqüência de pulsos de CPMAS 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 ^1H .

A interação dipolar é inversamente proporcional a r^3 , onde r é a distância internuclear. Assim, C ligados diretamente a ^1H ($r \cong 0,11$ 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 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 μ s, visando otimizar os sinais de interesse.

Adicionalmente, a técnica de ^{13}C CPMAS NMR apresenta limitações na análise quantitativa dos espectros devido às variações na eficiência de polarização entre os C em diferentes ambientes químicos (Preston, 1996). Logo, o grau de aromaticidade medido por ^{13}C RMN, da forma freqüentemente utilizada na literatura, pode estar sendo subestimada por não detectar corretamente os C aromáticos em estruturas condensadas. A técnica de DD, por sua vez, privilegia C não protonados e móveis (Opella et al., 1979), assim os C com acoplamento dipolar fraco, tais como aqueles não protonados de estruturas aromáticas condensadas, são facilmente detectados por 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**rdered **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⁻¹ (Fan et al., 2000, Canellas et al. 2001, Simpson, 2001). Outro passo crítico é a escolha do solvente. Os mais usados são DMSO-d₆(dimetilsulfóxido deuterado) e D₂O/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 T1). 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-d₆. 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 ¹³C 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 ¹³C 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 ^{31}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 ^1H 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 ^{13}C RMN no estado sólido e ^1H RMN em solução, respectivamente. As substâncias húmicas no solo incubado com folhas apresentaram maior quantidade de carbono alquílico enquanto que 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 ^1H RMN obtidos por Clemente et al. (2013) são mostrados na Figura 12.

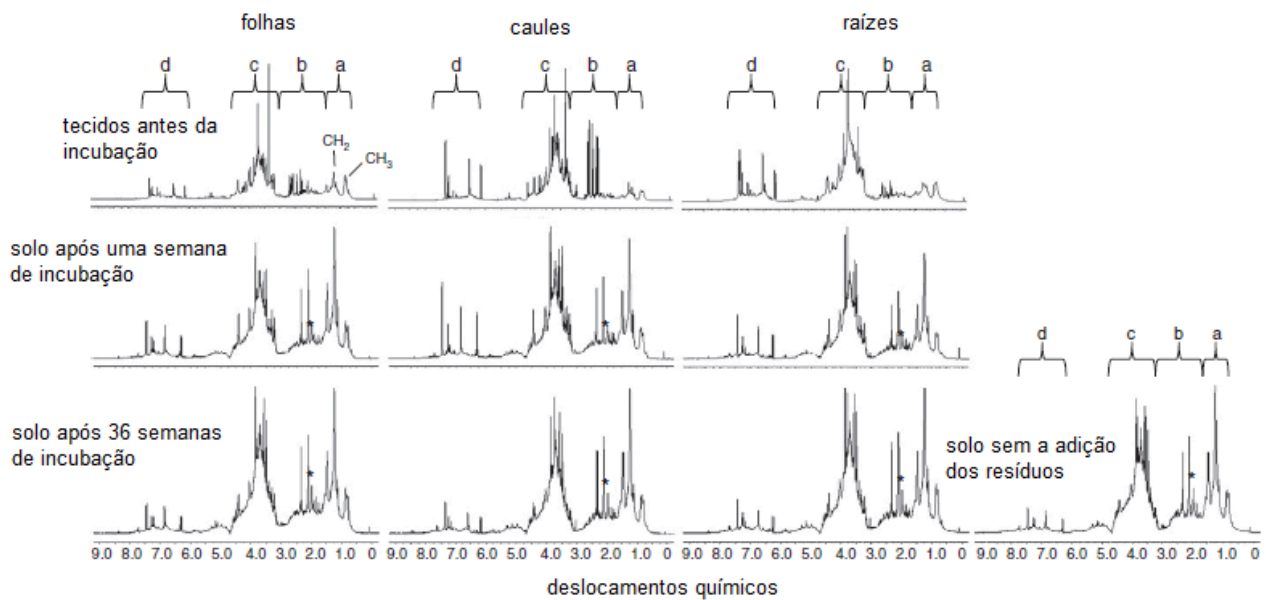


Figura 12. Espectros ^1H RMN em solução de diferentes tecidos de milho e das substâncias húmicas isoladas dos solos incubados por 1 e 36 semanas com os resíduos. Os espectros foram divididos nas seguintes regiões: (a) grupos metil e metilenos alifáticos de lipídios de alta e baixa massa molecular; (b) grupos metil e metilênicos alifáticos pertos de O e N, lipídios ou peptídeos; (c) O-alquílicos de açúcares ou ligninas; (d): sinais devidos a grupos aromáticos de ligninas ou proteínas. Os sinais de N-acetil que pode ser atribuído a peptideoglicanos 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).

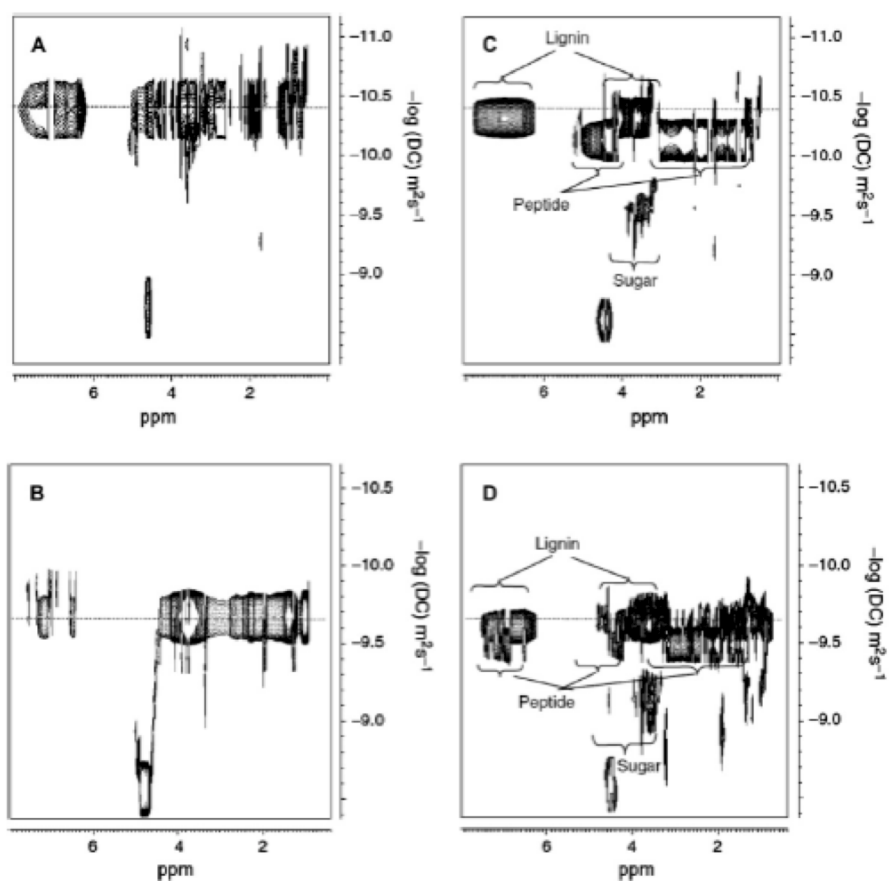


Figura 13. Espectro de RMN de ^1H , DOSY, obtido a amostras ácido húmico (IHSS) preparada em D_2O a 133 mg/ml (A) e a 5 mg/ml (B) e após adição de 5 L de ácido acético (C e D). Antes da adição de ácido acético todos os componentes da MO difundem com aproximadamente o mesmo coeficiente de difusão indicando 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 coeficiente de difusão e estão na forma desagregada.

Para essa análise foi utilizado o experimento DOSY com duas concentrações diferentes de ácidos húmicos. Em ambas concentrações, o coeficiente 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 utilizadas 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	C orrelation S pectroscop Y	Acoplamento entre átomos de ^1H (até duas ou três ligações)
TOCSY	T otal C orrelation S pectroscop Y	Correlação entre todos os átomos de ^1H numa cadeia alquílica até que seja interrompida por um átomo de carbono quaternário
Experimentos heteronucleares: correlação entre átomos de diferentes ($^1\text{H}/^{13}\text{C}$, $^1\text{H}/^{15}\text{N}$, $^1\text{H}/^{31}\text{P}$)		
HSQC	H eteronuclear S ingle Q uantum C oherence	Observa a correlação de pares de átomos diferentes ligados entre si
HMQC	H eteronuclear M ultiple Q uantum C oherence	Observa a correlação de pares de átomos diferentes ligados entre si
HECTOR	H eteronuclear C orrelation	Observa a correlação de pares de átomos diferentes ligados entre si
HMBC	H eteronuclear M ultiple B ond C orrelation	Acoplamentos multinucleares até duas ou três ligações
Experimentos de difusão: DOSY (D iffusion O rdered S pectroscop Y : 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.

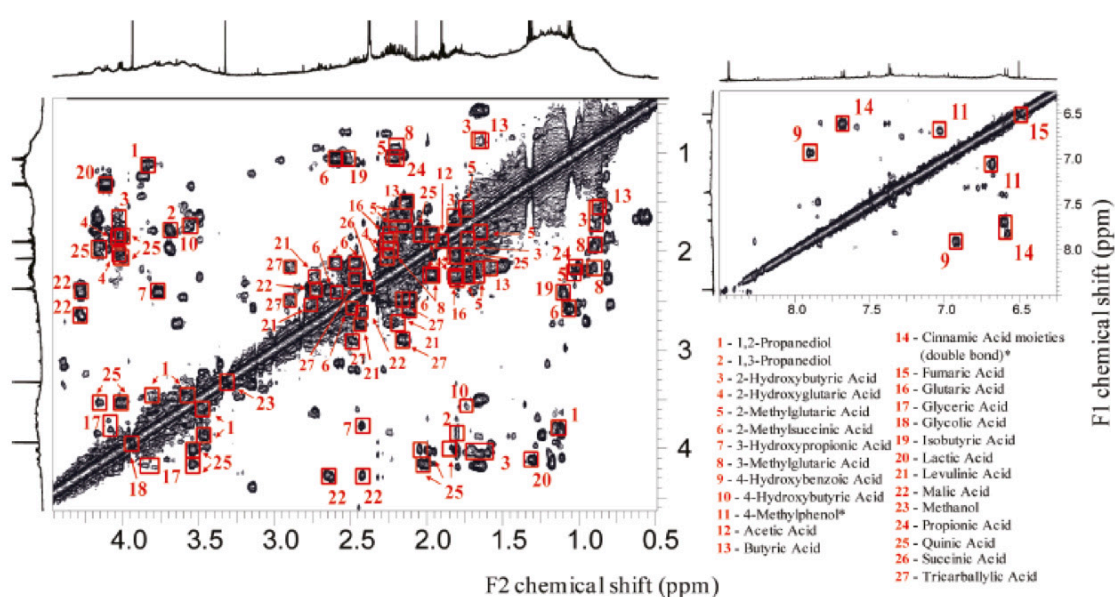


Figura 14. Espectros de RMN 2D COSY45 da fração simplificada HILIC (H09). Esquerda: Ampliação da região entre 0,5 até 4,5 ppm; direita: ampliação da região entre 6,3 até 8,5 ppm. Os assinalamentos foram a partir de base de dados.

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. 6th. ed. Oxford, Oxford University Press.

Baldock, J.A., Oades, J.M., Vassalo, A.M., Wilson, M.A. 1990. Solid-state CP/MAS ¹³C NMR analysis of bacterial and fungal cultures isolated from a soil incubated with glucose. *Aust. J. Soil Res.* 28, 213-225.

Baldock, J.A., Oades, J.M., Waters, A.G., Peng, X., Vassalo, A.M., Wilson, M.A. 1992. Aspect of the chemical structure of soil organic materials as revealed by solid-state ¹³C NMR spectroscopy. *Biogeochemistry*. 16, 1-42

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 ³¹P. 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 ¹³C de ácidos húmicos com uso de KCl 0,03 mol L⁻¹. 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 ¹³C 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_4/E_6 e aromaticidade por RMN de C^{13} em estado sólido da AH de um Latossolo roxo. In: 2º 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 ^{13}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 ^{13}C CP/MAS NMR analysis in Spodosols: chemical removal of magnetic materials. *Geoderma*. 93, 289-310.

Drago, R.S. 1992. Physical methods for chemists. 2nd ed. Orlando, Saunders.

Drozd, J., Jezierski, A. 1994. Electron spin resonance studies on humus compounds isolated from soils contaminated by copper smelters. In: Senesi, N., Miano, T. (Ed.) *Humic Substances in the Global Environment and Implications on Human Health*. Amsterdam, Elsevier. p. 1119-1124.

Dudley, R.L., Fyfe, C.A. 1982. Evaluation of the quantitative reliability of the ^{13}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 Núcleos 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 ¹³CNMR-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 ¹³CNMR-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-¹³C nuclear magnetic resonance spectra of natural humic substances. Biochem. Biophys. Res. Comm. 72, 1063-1070.
- Goodman, B.A, Cheshire, M.V. 1975. The bonding of vanadium in complexes with humic acids: an electron paramagnetic study. Geochim. Cosmochim. Acta. 39, 1711-1713.
- Goodman, B.A., Hall, P. L. 1994. Electron paramagnetic resonance spectroscopy. In: Wilson, M.J. (Ed.) Clay Mineralogy: Spectroscopic and Chemical Determinative Methods. London, Chapman e Hall. p. 173-225.
- Guggenberger, G., Christensen, B.T., Zech, W. 1994. Land-use effects on the composition of organic matter in particle-size separates of soil: I. lignin and carbohydrate signature. Eur. J. Soil Sci. 45, 449-458.
- Günther, H. 1995. NMR spectroscopy - Basic principles, concepts, and applications in chemistry. 2nd ed. New York, Wiley.
- Hagaman, E.W., Chambers, R.R., Woody, M.C. 1986. Determination of the fraction of organic carbon observable in coals and coal derivatives measured by high-resolution solid state carbon-13 nuclear magnetic resonance spectrometry. Anal. Chem. 58, 387-394.
- 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 in 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.
- Jeziński, 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., Jeziński, A. 1999. Organic radicals and paramagnetic metal complexes in municipal solid waste composts. An EPR and chemical study. *Chemosphere* 39, 253-268.
- Jeziński, 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.
- Jeziński, 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. ¹³C 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}C NMR. *J. Soil Sci*. 31, 623-631.

Newman, R.H., Tate, K.R. 1984. Use of alkaline soil extracts for ^{13}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: 10th International Meeting of the International Humic Substances Society (2000 : Toulouse-França). *Anais... Toulouse, IHSS*. p. 85-90.

Novotny, E.H., Martin-Neto, L. 2002. Effects from humidity and metal ions on the free radical analysis of peat humus. *Geoderma*. 106, 305-317.

- 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: 10th 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.* 2nd 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}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}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}C and ^{15}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.I.M. 1969. Free radicals in soil humic compounds. *Soil Sci.* 108, 383-390.
- Schnitzer, M., Khan, S.U. 1978. *Soil Organic Matter*. Amsterdam, Elsevier.
- Schnitzer, M., Lévesque, M. 1979. Electron spin resonance as a guide to the degree of humification of peats. *Soil Sci.* 127, 140-145.
- 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*. 5th ed. New York, Wiley.
- Smernik, R.J., Oades, J.M. 2000. The use of spin counting for determining quantitation in solid state ¹³C NMR spectra of natural organic matter. 1. Model systems and the effects of paramagnetic impurities. *Geoderma*. 96, 101-129.
- 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⁺, Mn²⁺ and Fe³⁺ 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 Fe³⁺ 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.