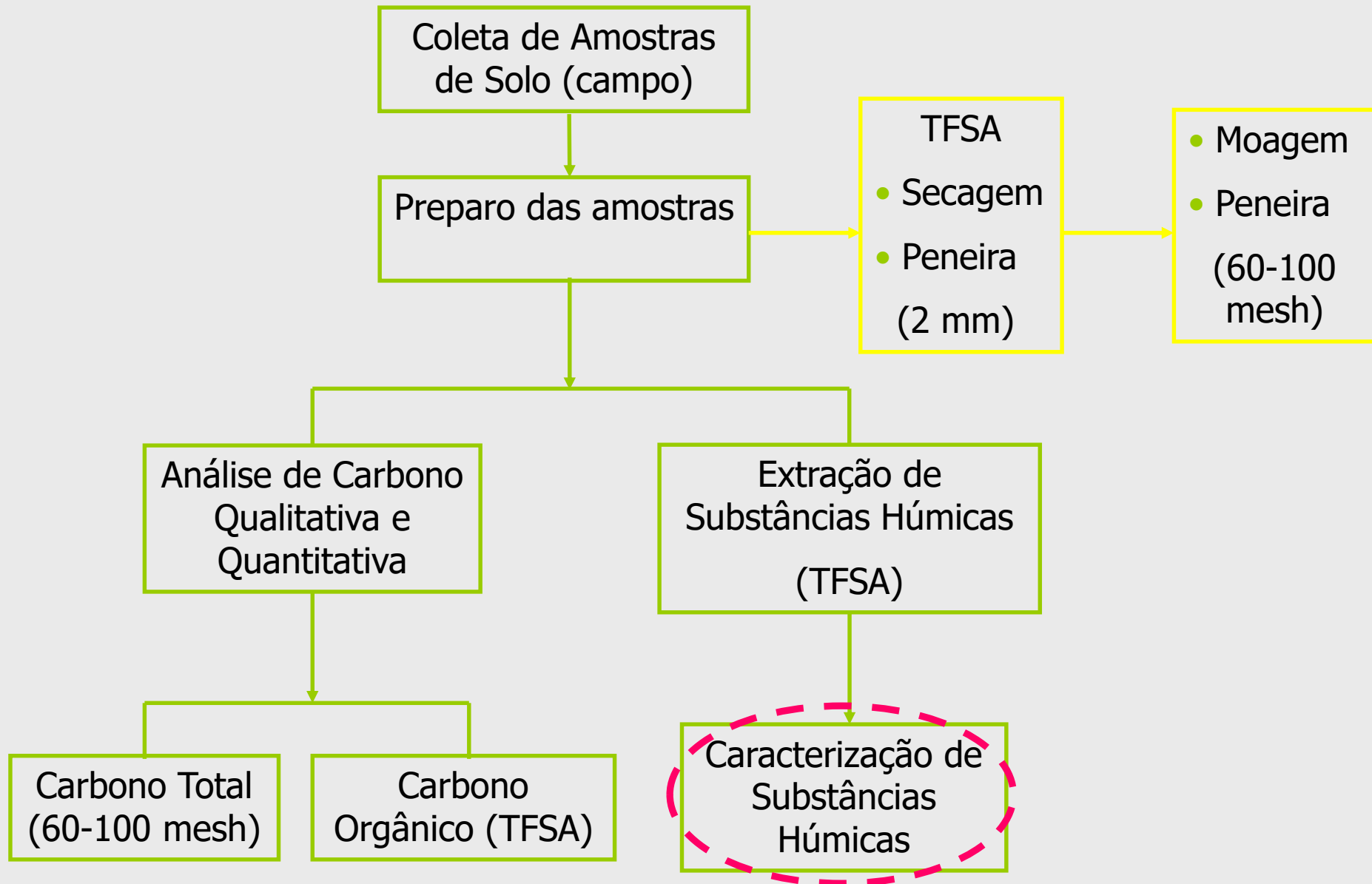
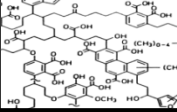
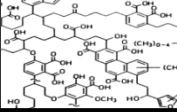


Fracionamento da MOS e caracterização de substâncias húmicas





Caracterização das substâncias húmicas

Técnicas espectroscópicas

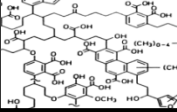
Conjunto de métodos baseados na produção e interpretação de espectros de emissão ou absorção de radiações eletromagnéticas

Técnicas cromatográficas

Processos que permitem que moléculas presentes em misturas complexas possam ser separadas, com base nas suas solubilidades e mobilidade

Outras técnicas para determinação de grupos funcionais

Técnicas termodegradativas, de eletroforese, visualização através de Microscopia de varredura, análise elementar das substâncias húmicas



Caracterização das substâncias húmicas

Técnicas espectroscópicas

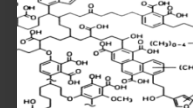
Conjunto de métodos baseados na produção e interpretação de espectros de emissão ou absorção de radiações eletromagnéticas

Absorção de Luz UV-VIS

Infravermelho

Ressonância Magnética Nuclear

Ressonância Paramagnética Eletrônica

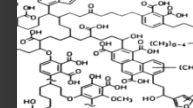


Técnicas espectroscópicas

Conjunto de métodos baseados na produção e interpretação de espectros de emissão ou absorção de radiações eletromagnéticas

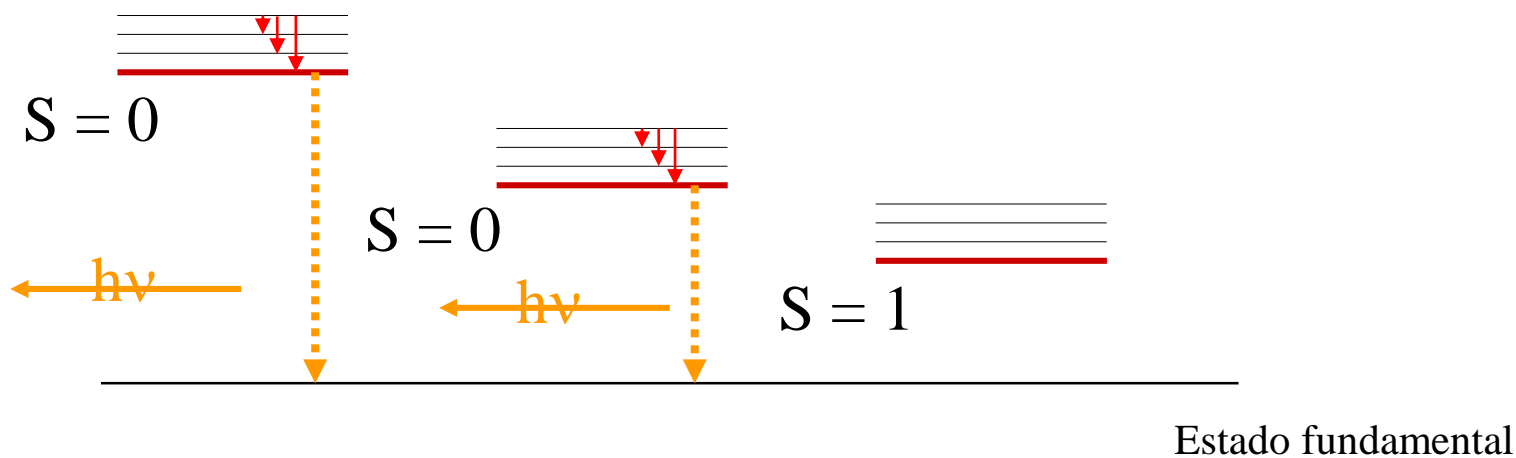
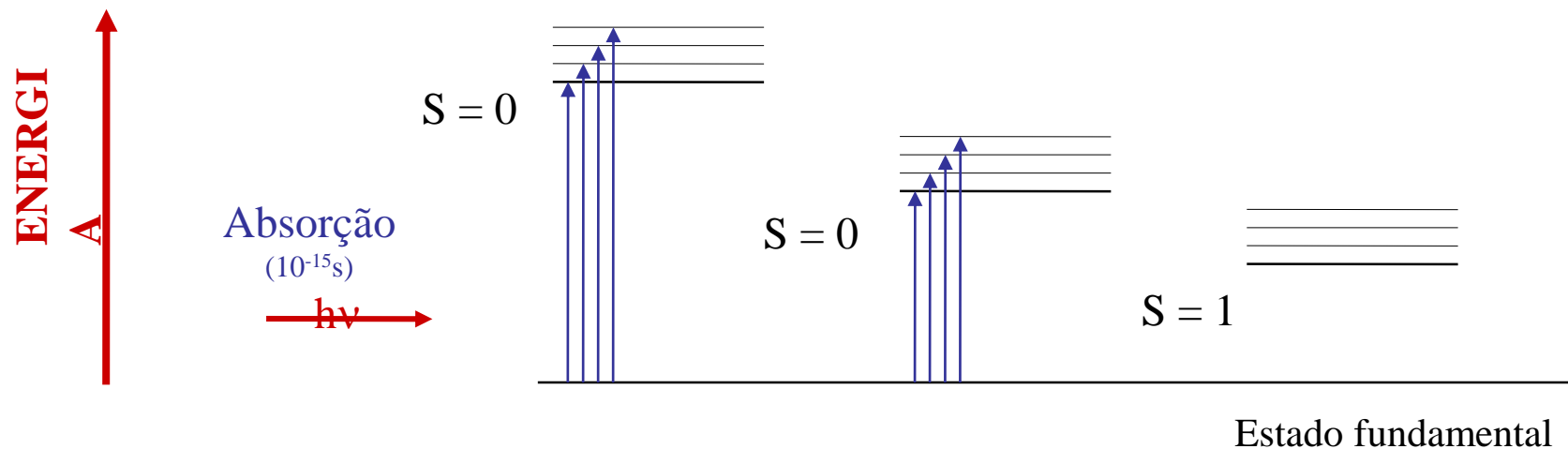
Aplicação em estudos relacionados a substâncias húmicas:

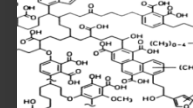
- Análise qualitativa de grupos reativos: COOH, OH-fenólico, OH-alcoólico, OH-enólico, C=O, -NH₂ etc
- Componentes estruturais aromáticos e alifáticos
- Estruturas de carboidratos e proteínas
- Determinação quantitativa de alguns grupos funcionais



Técnicas Espectroscópicas

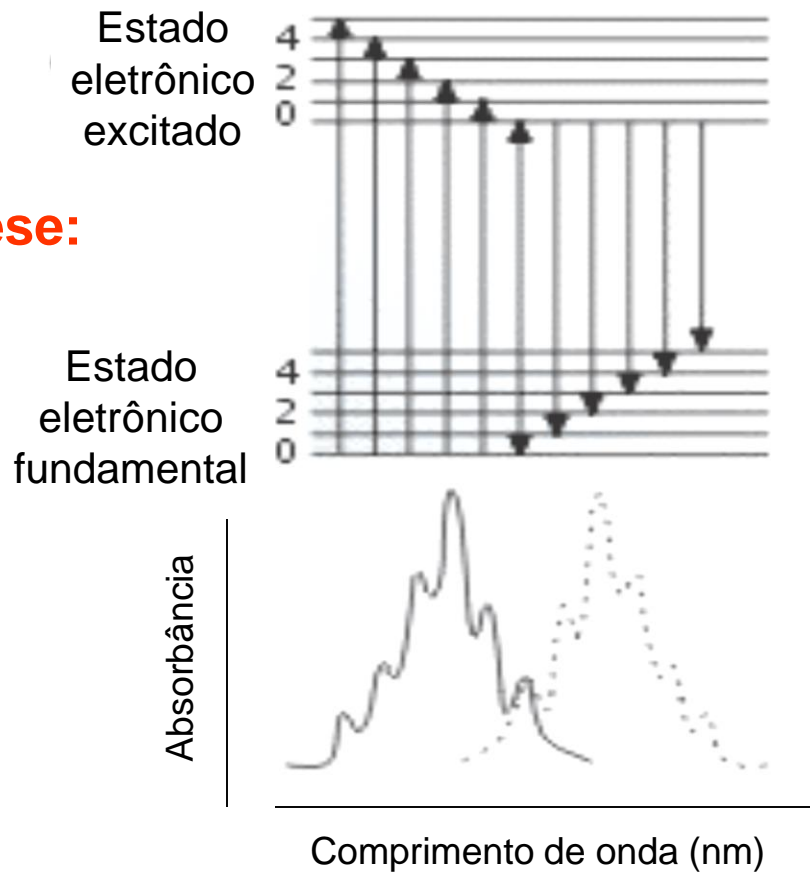
González Pérez, 2006

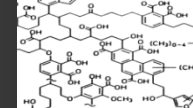




Técnicas Espectroscópicas

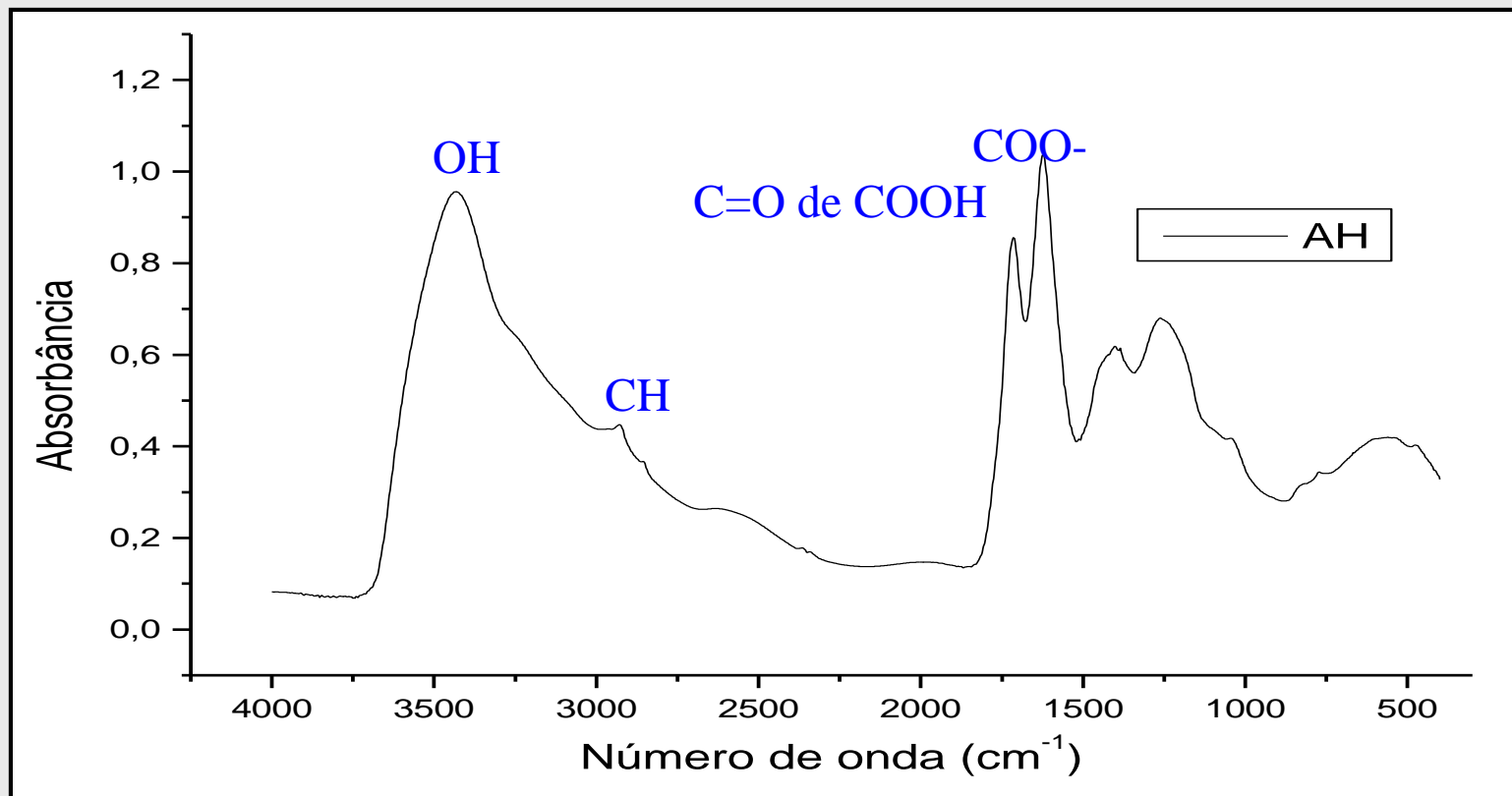
Em síntese:

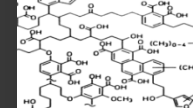




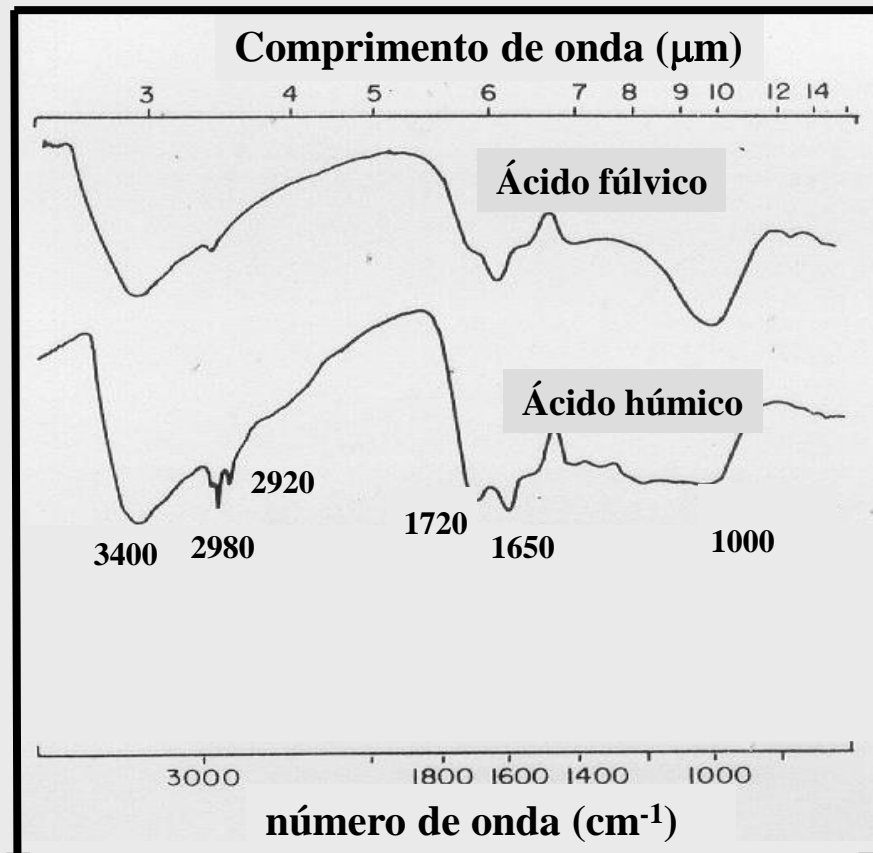
Técnicas Espectroscópicas

Relaciona a transmitância (ou a absorbância) em função do número de ondas (expresso em cm^{-1})





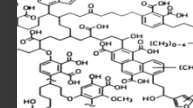
Técnicas Espectroscópicas



Bandas de absorção infra-vermelha de grupos funcionais em **compostos húmicos** e substâncias orgânicas

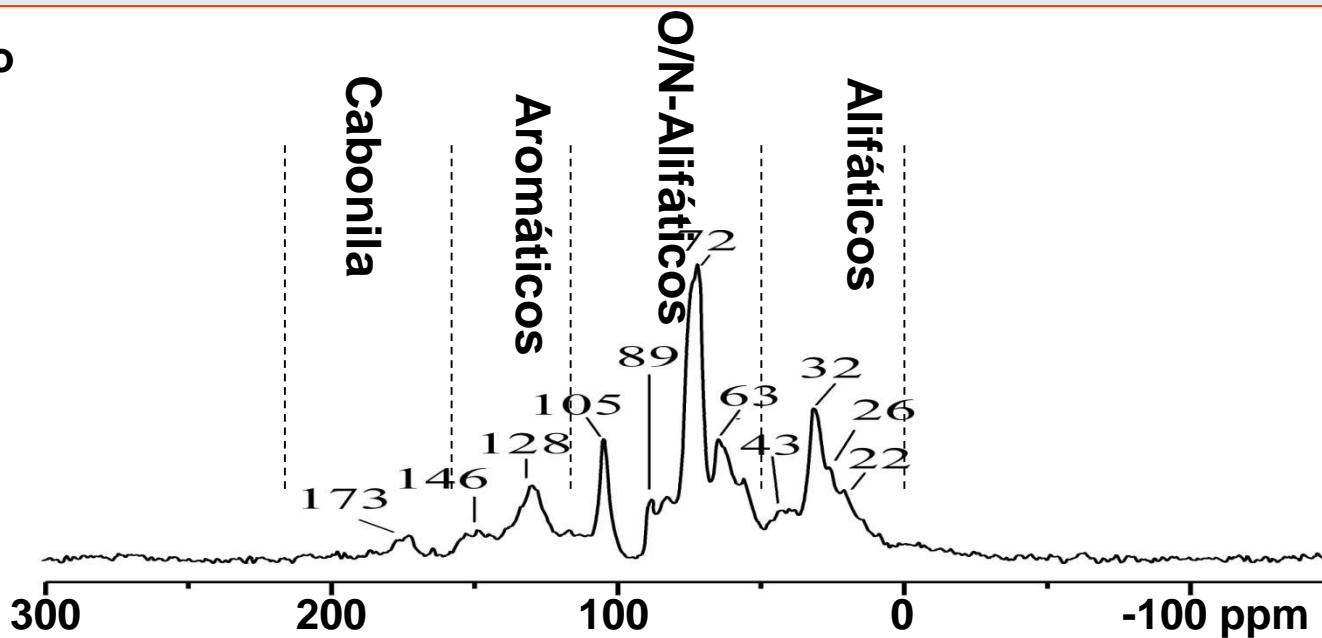
Nº onda cm^{-1}	Comprimento μm	Radicais
3400	2,94	Ligações O-H e N-H
3100	3,25	Ligação NH_3
1575	6,35	Sais de COOH
1267	7,89	C-O Aromático
840	11,90	C-H Aromático

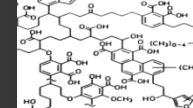
Tan (1992)



Técnicas Espectroscópicas

Exemplo



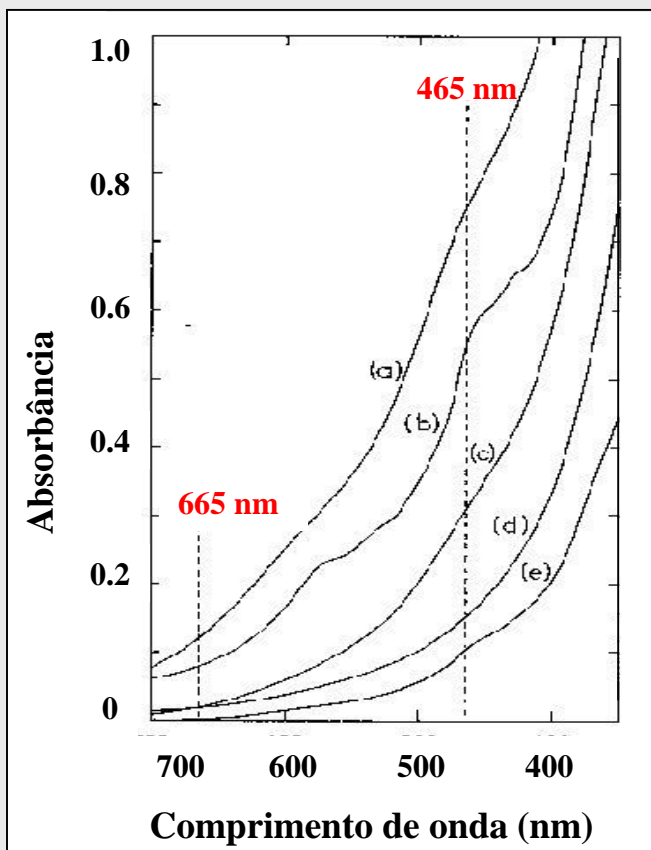


Técnicas Espectroscópicas

FAIXA DE ABSORÇÃO

ultra-violeta 200-400 nm

visível 400-800 nm



Principal parâmetro utilizado:

Relação E_4/E_6 → **Grau de humificação**

$$E_4/E_6 = \frac{\text{absorbância a 465 nm}}{\text{absorbância a 665 nm}}$$

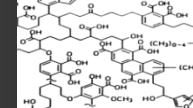
E_4/E_6

Baixo alto grau de condensação de constituintes aromáticos (“mais humificados”)

Alto maior presença de estruturas alifáticas (“menos humificadas”)

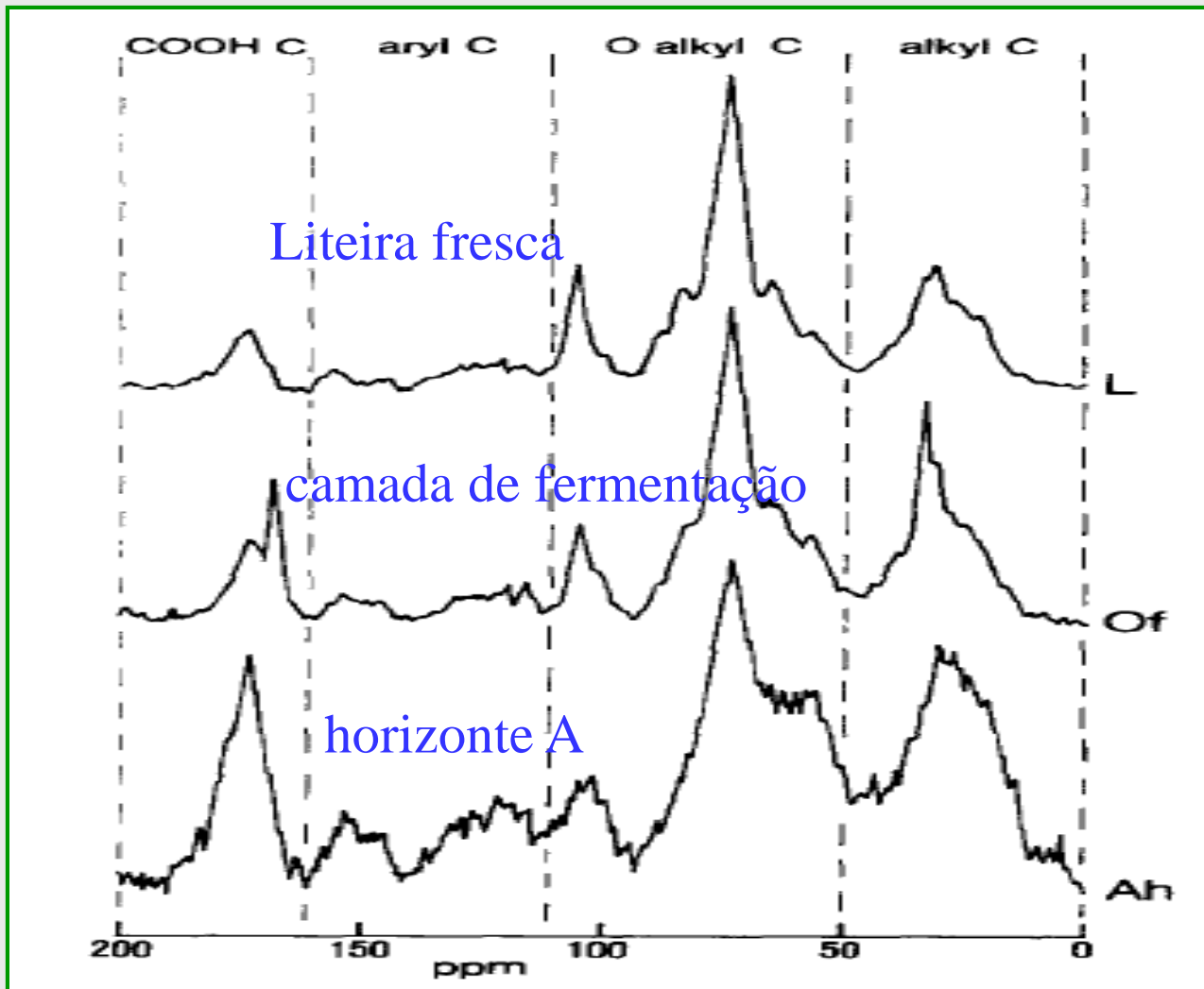
QUANTO **MENOR** E_4/E_6

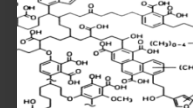
MAIOR GRAU DE CONDENSAÇÃO



Técnicas Espectroscópicas: aplicações

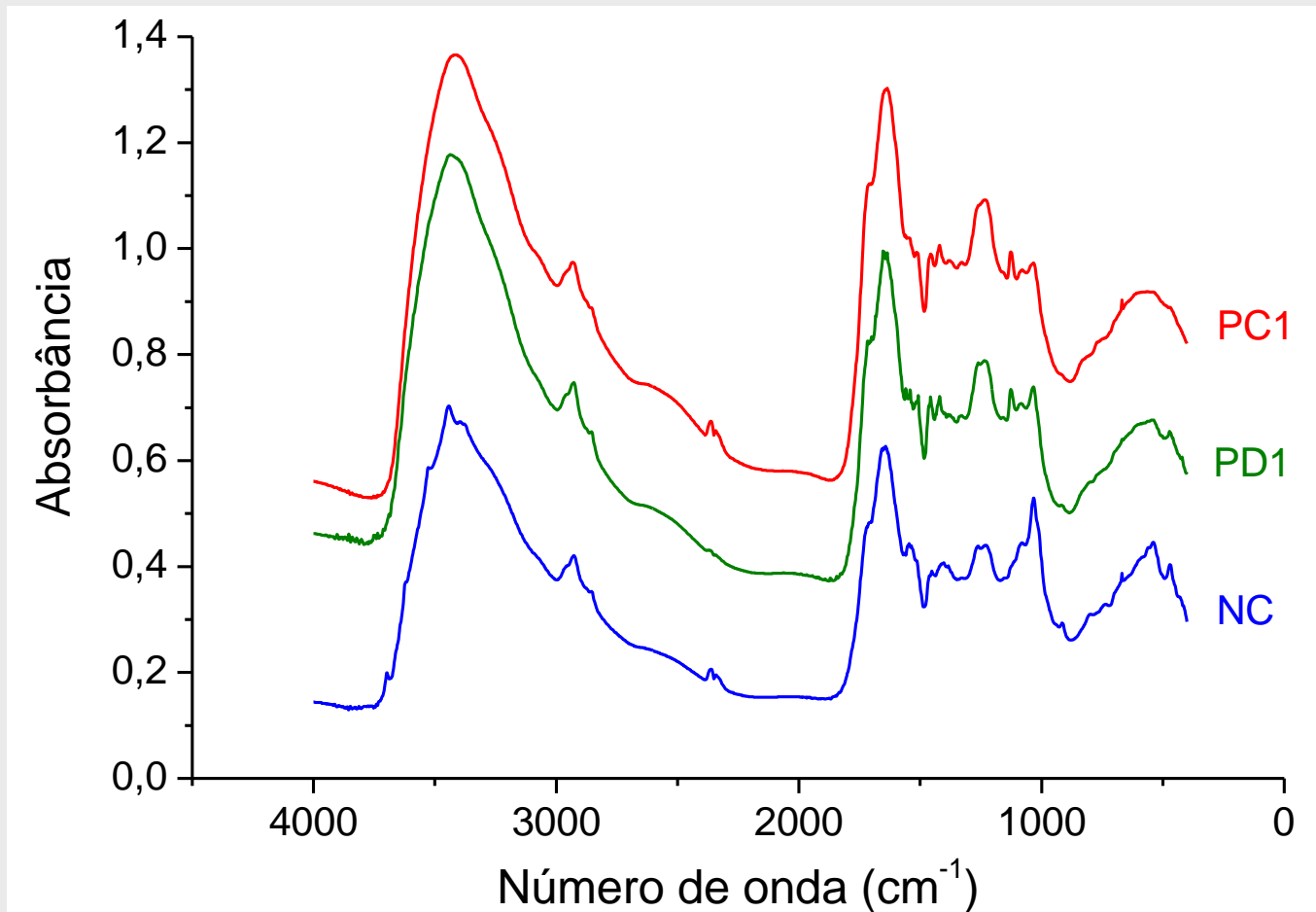
Espectros de RMN de ^{13}C mostrando o processo de humificação



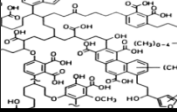


Técnicas Espectroscópicas: aplicações

Espectro de FTIR de AH extraídos de Latossolo, Brasil



diferentes
práticas
de manejo



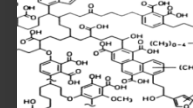
Técnicas Espectroscópicas

Vantagens:

- Estimativa do grau de humificação
- Utiliza pequena quantidade de amostra
- Identificação de metais complexados com as SH (ex.: Cu^{+2} , Fe^{+3})
- Estimar grau de humificação
- Conserva a amostra (não destrutiva)
- Análises relativamente rápidas

Desvantagem:

- Análises complexas
- Não se identificam todas as bandas
- Relativamente caras



Caracterização das substâncias húmicas

Técnicas espectroscópicas

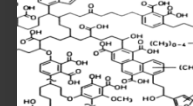
Conjunto de métodos baseados na produção e interpretação de espectros de emissão ou absorção de radiações eletromagnéticas

Técnicas cromatográficas

Processos que permitem que moléculas presentes em misturas complexas possam ser separadas, com base nas suas solubilidades e mobilidade

Outras técnicas para determinação de grupos funcionais

Técnicas termodegradativas, de eletroforese, visualização através de Microscopia de varredura, análise elementar das substâncias húmicas

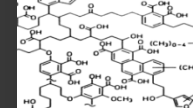


Caracterização das substâncias húmicas

Técnicas cromatográficas

Processos que permitem que moléculas presentes em misturas complexas possam ser separadas, com base nas suas solubilidades e mobilidade

CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO POR TAMANHO



CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO POR TAMANHO

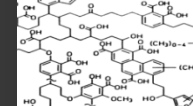


Princípio do método: separação por tamanho (volume hidrodinâmico)

Diversas propriedades das SHs dependem do seu **tamanho molecular**.

Portanto, o conhecimento da sua distribuição é importante

Piccolo & Conte (2000) mostraram que técnicas cromatográficas de exclusão por tamanho foram úteis para estudos das estruturas das SHs \Rightarrow conceito supramolecular



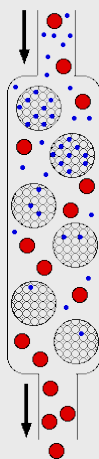
CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO POR TAMANHO



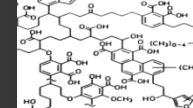
Princípio do método: separação por tamanho (volume hidrodinâmico)

Exemplos de técnicas cromatográficas de exclusão por tamanho são:

- Permeação em gel
- Permeação em vidro de porosidade controlada

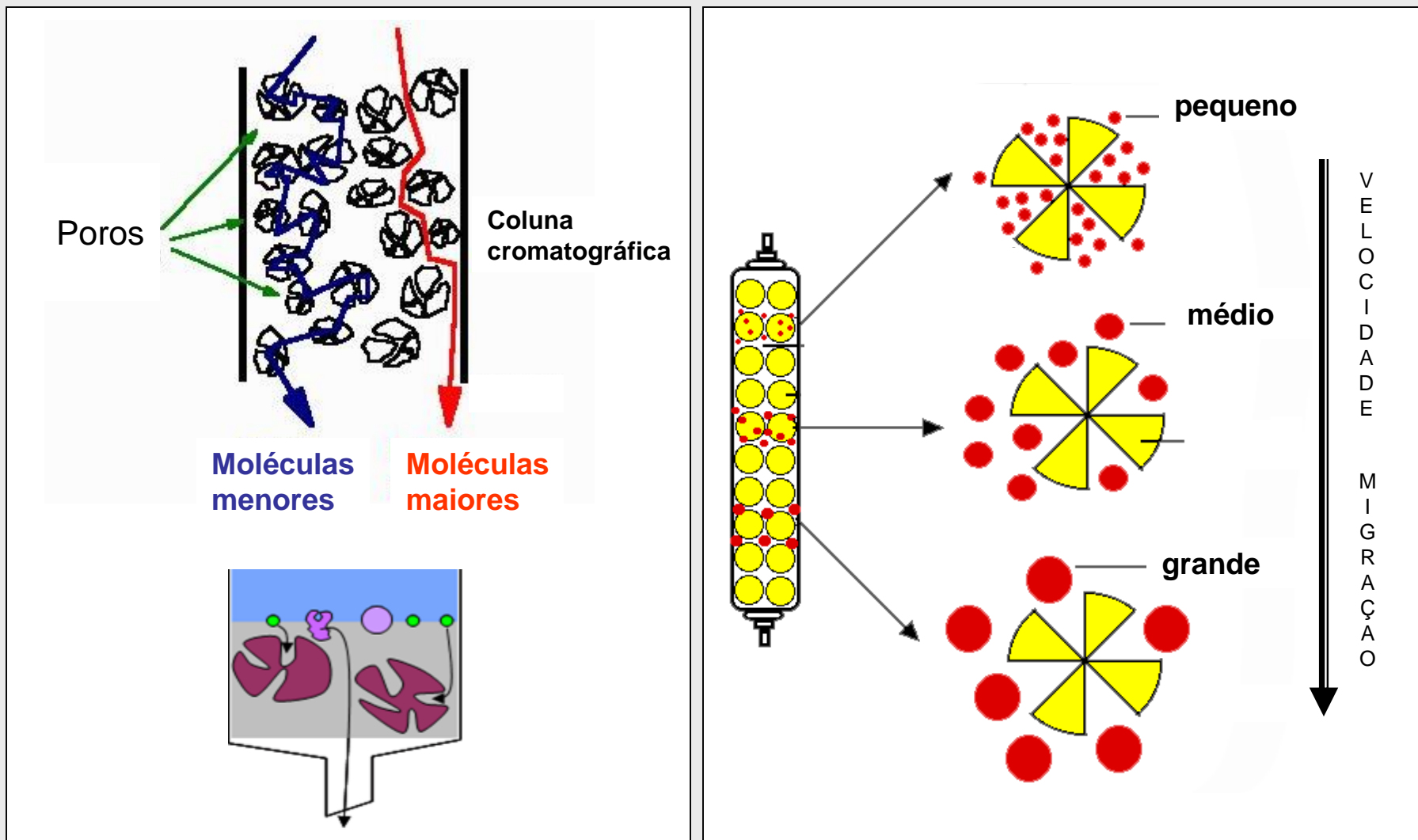


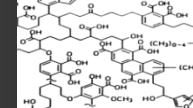
Baseadas no conceito de “peneiras moleculares”



CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO POR TAMANHO

Migração diferencial das substâncias húmicas na coluna cromatográfica





CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO POR TAMANHO

Cromatografia de permeação em gel

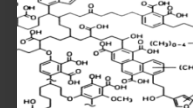
Dificuldades:

- Interação do gel com o material analisado
- Impossibilidade de aplicar altos fluxos durante cromatografia
↳ procedimento demorado

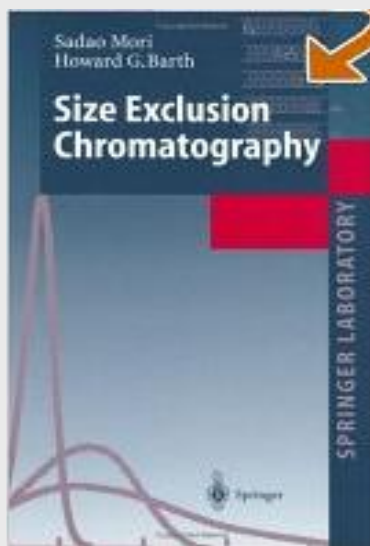
Cromatografia de permeação em vidro de porosidade controlada

Vantagens:

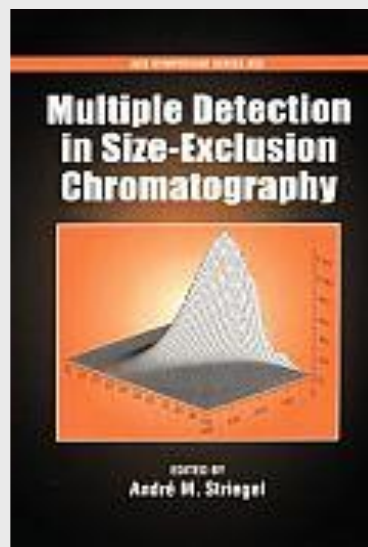
- Não interação (ou pequena) com o material analisado \Rightarrow inerte
- Permite aplicação de fluxos 5 a 10 vezes maiores



CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO POR TAMANHO



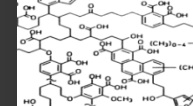
Mori & Barth (1999)



Striegel (2004)



Wu (2005)



Caracterização das substâncias húmicas

Técnicas espectroscópicas

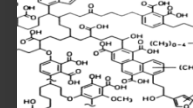
Conjunto de métodos baseados na produção e interpretação de espectros de emissão ou absorção de radiações eletromagnéticas

Técnicas cromatográficas

Processos que permitem que moléculas presentes em misturas complexas possam ser separadas, com base nas suas solubilidades e mobilidade

Outras técnicas para determinação de grupos funcionais

Técnicas termodegradativas, de eletroforese, visualização através de Microscopia de varredura, análise elementar das substâncias húmicas



Caracterização das substâncias húmicas

Outras técnicas para determinação de grupos funcionais

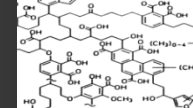
Técnicas termodegradativas, de eletroforese, visualização através de Microscopia de varredura, análise elementar das substâncias húmicas

Análise da composição elementar

Pirólise acoplada à cromatografia gasosa e espectrometria de massas

Eletroforese

Microscopia eletrônica de varredura (mev)



Caracterização das substâncias húmicas

Outras técnicas para determinação de grupos funcionais

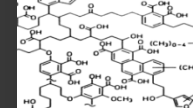
Técnicas termodegradativas, de eletroforese, visualização através de Microscopia de varredura, análise elementar das substâncias húmicas

Análise da composição elementar

Pirólise acoplada à cromatografia gasosa e espectrometria de massas

Eletroforese

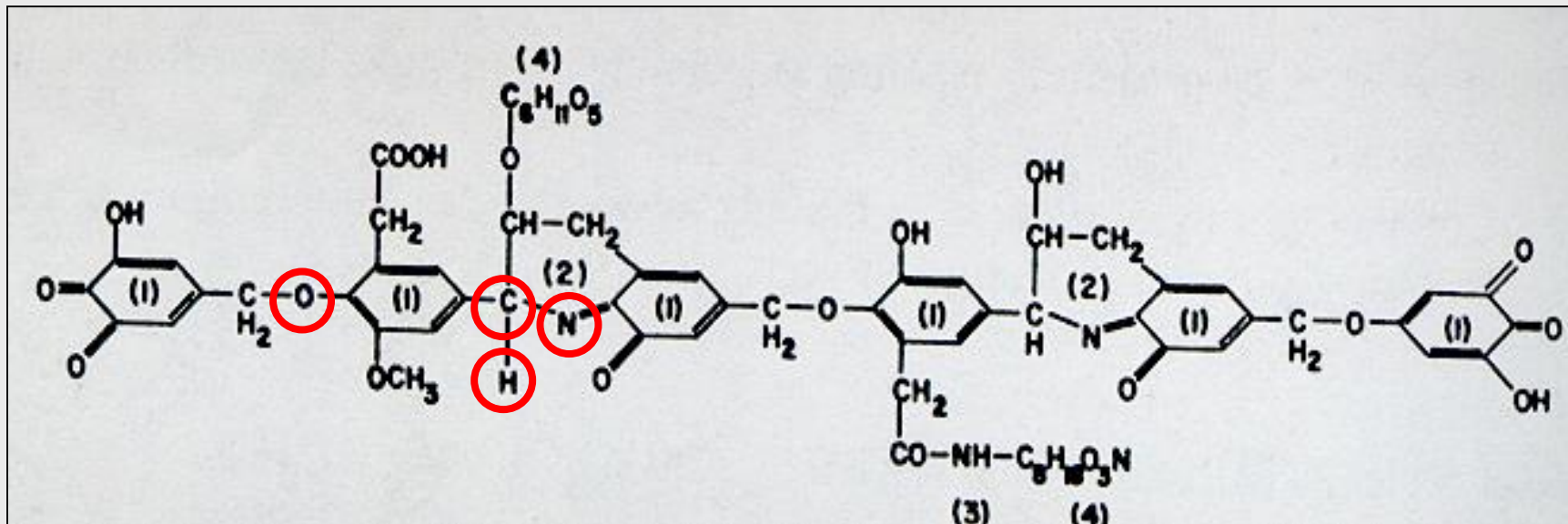
Microscopia eletrônica de varredura (mev)

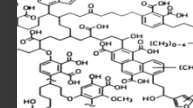


Análise da composição elementar das SHs

Composição Elementar

- Propriedade mais estável e fundamental das SHs
- Refere-se a distribuição percentual dos átomos que compõem a rede estrutural das substâncias húmicas





Análise da composição elementar das SHs

Sprengel & Berzelius (entre 1826 e 1845)

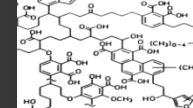
- 1^{os} experimentos determinação da composição elementar das SHs
- SHs constituídas essencialmente por C, H, N e O
- Elementos mais abundantes: C e O

Análise do conteúdo relativo de C, H, O, N e S das SHs

Indicam que SHs apresentam natureza química muito particular, distinta de qualquer substância de origem vegetal ou animal.

↑ *teor de C: devido a polimerização e condensação*

↓ *conteúdo de N: decorrente do processo de mineralização*



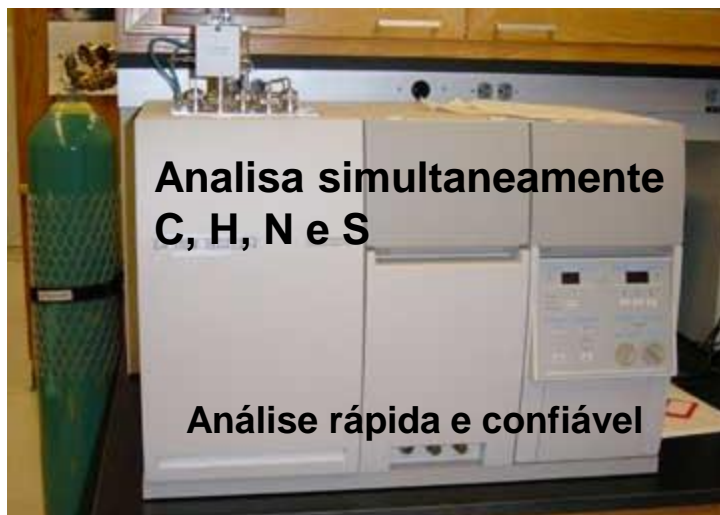
Análise do conteúdo relativo de C, H, O, N e S

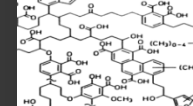
Os métodos para determinação desses elementos são muito variados

Exemplos:

*C e N por combustão via seco, N métodos de Dumas ou de Kjeldahl
S por combustão, O por pirólise redutiva etc*

Atualmente: utilização de analisadores elementares automáticos

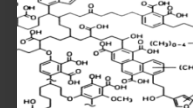




Composição elementar das SH

Elementos (%)	Ártico	Subtropical	Tropical
C	56,2	53,6-55,0	54,4-54,9
H	6,2	4,4-5,0	4,8-5,6
N	4,3	3,3-4,6	4,1-5,5
S	0,5	0,8-1,5	0,6-0,8
O	32,8	34,8-36,3	34,1-35,2

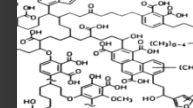
MOS com maior qtdde carbono e menor qtdde oxigênio ⇒ mais humificadas



Composição elementar das SH

Elementos (%)	HA	FA
C	56,2	45,7
H	4,7	5,4
N	3,2	2,1
S	0,8	1,9
O	35,5	44,8
	<u>100,4</u>	<u>99,7</u>

Em média os ácidos húmicos contêm 10% mais carbono e 10% menos oxigênio que os ácidos fúlvicos.



Composição elementar das SH

Carbono (%)

ácidos húmicos > ácidos fúlvicos

ácidos húmicos : >clima temperado em relação a clima tropical

Nitrogênio (%)

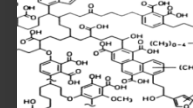
Ácidos húmicos 2,0 - 5,0

Ácidos fúlvicos 0,7 - 2,6

Determinação da relação C/N

Inferência sobre:

- grau de humificação
- disponibilidade de N para as plantas e microrganismos

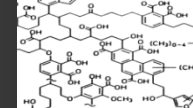


Composição elementar das SH

	C	H	O	N	S
<u>Ácidos húmicos</u>					
Alfisols	56,8	5,3	33,3	4,6	nd
Alfisols	52,3	5,2	37,2	3,6	nd
Inceptisol	51,4	5,8	38,7	4,1	nd
Oxisols	44,3	7,7	38,0	2,1	nd
Spodosols	56,7	5,2	35,4	2,4	0,4
Spodosols	49,0	4,6	45,7	0,7	nd
Ultisols	48,7	4,8	42,7	3,8	nd
Ultisols	44,8	6,3	36,7	2,8	nd
<u>Ácidos fúlvicos</u>					
Inceptisol	47,9	5,2	44,3	2,6	nd
Spodosols	50,9	3,3	44,7	0,7	0,3
Spodosols	50,2	4,6	43,4	1,8	nd
Ultisols	40,6	4,1	53,9	1,4	nd

*valores em preto representam clima temperado e verde clima tropical

Tan (1992)



Composição elementar das SH

	C	H	O	N	S
<u>Ácidos húmicos</u>					
Alfisols	56,8	5,3	33,3	4,6	nd
Alfisols	52,3	5,2	37,2	3,6	nd

Exemplo de análise derivada da composição elementar:

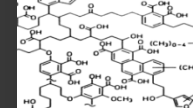
$$\text{Grau de oxidação} = 2Q \text{ Oxigênio} - Q \text{ Hidrogênio} / Q \text{ Carbono}$$

(Orlov, 1974)

Q = quantidade de átomos grama dos elementos

Interpretação

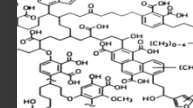
Valores menores indicam substâncias humificadas quimicamente mais evoluídas



Composição elementar das SH

	C	H	O	N	S
<u>Ácidos húmicos</u>					
Alfisols	56,8	5,3	33,3	4,6	nd
Alfisols	52,3	5,2	37,2		nd
Inceptisol	51,4	5,8			
Oxisols	44,3	7,1			
Spodosols	56,7	5,1			
Spodosols	49,0				
Ultisols	48,7				
Ultisols	44,8				
<u>Ácidos fúlvicos</u>					
Inceptisol	47,9	5,2			nd
Spodosols	50,9	3,3	44,7	0,7	0,3
Spodosols	50,2	4,6	43,4	1,8	nd
Ultisols	40,6	4,1	53,9	1,4	nd

*valores em preto representam clima temperado e verde clima tropical



Caracterização das substâncias húmicas

Outras técnicas para determinação de grupos funcionais

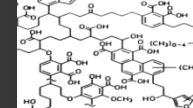
Técnicas termodegradativas, de eletroforese, visualização através de Microscopia de varredura, análise elementar das substâncias húmicas

Análise da composição elementar

Pirólise acoplada à cromatografia gasosa e espectrometria de massas

Eletroforese

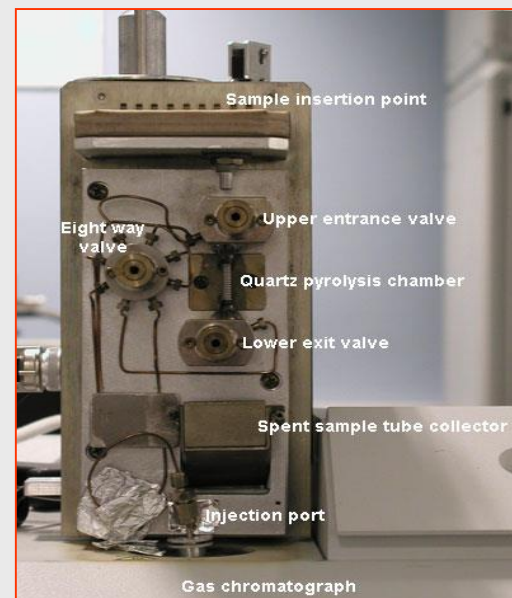
Microscopia eletrônica de varredura (mev)

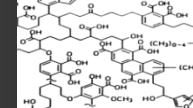


Pirólise acoplada à cromatografia gasosa e espectrometria de massas (Py-GC/MS)

Pirólise

- Consiste na degradação de uma substância pela ação de calor
- Absorção de energia térmica causa excitação das ligações vibracionais resultando no rompimento de ligações mais fracas



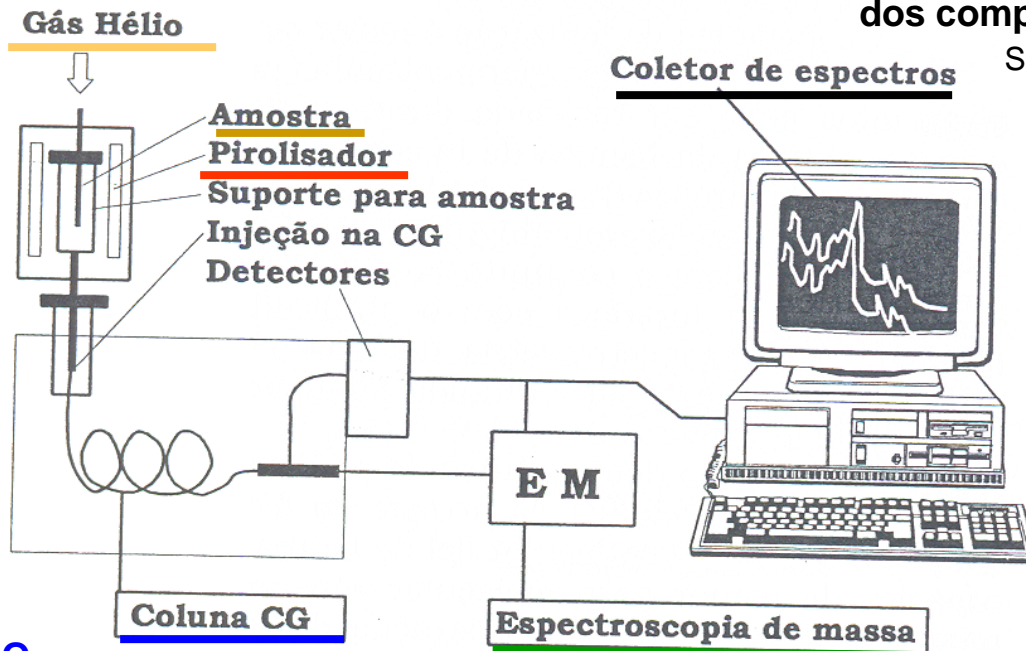


Pirólise acoplada à cromatografia gasosa e espectrometria de massas

SHs extraídas
(amostra de solo,
Hemphfling & Schulten, 1991)

vácuo ou gás inerte:
para restringir formação
de produtos secundários

VOLATILIZAÇÃO
dos componentes
da amostra (temp.
500 a 700 °c)



Espectro da abundância relativa dos compostos

Selecionando massas específicas é possível selecionar um composto específico ou um grupo de compostos

TRATAMENTO DADOS

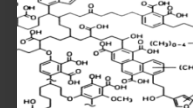
Grande quantidade de dados obtidos: análise multivariada

SEPARAÇÃO

Baseada no fato de que a velocidade de arraste do fragmento pelo gás é uma função do seu peso molecular.

IDENTIFICAÇÃO DOS PRODUTOS

Gráfico contendo as massas dos fragmentos carregados positivamente nas suas concentrações relativas



Pirólise acoplada à cromatografia gasosa e espectrometria de massas

Aplicações MOS

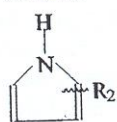
Simmonds et al. (1969) primeira utilização em amostras de solo

- Deserto da Califórnia, solo com 0,34% C
- Teste para utilização da técnica em um ensaio biológico exploratório em Marte

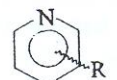
Atualmente: principais unidades estruturais observadas por Py-GC/MS



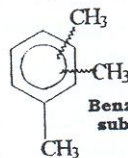
Olefinas



Piróis metil substituídos



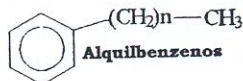
Piridinas metil substituídas



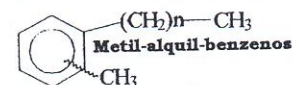
Benzenos metil substituídos



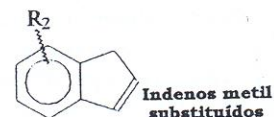
Alcanos



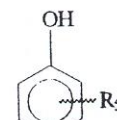
Alquilbenzenos



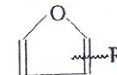
Metil-alkuil-benzenos



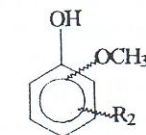
Indenos metil substituídos



Fenóis metil substituído

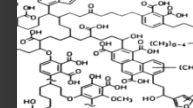


Furanos metil substituído

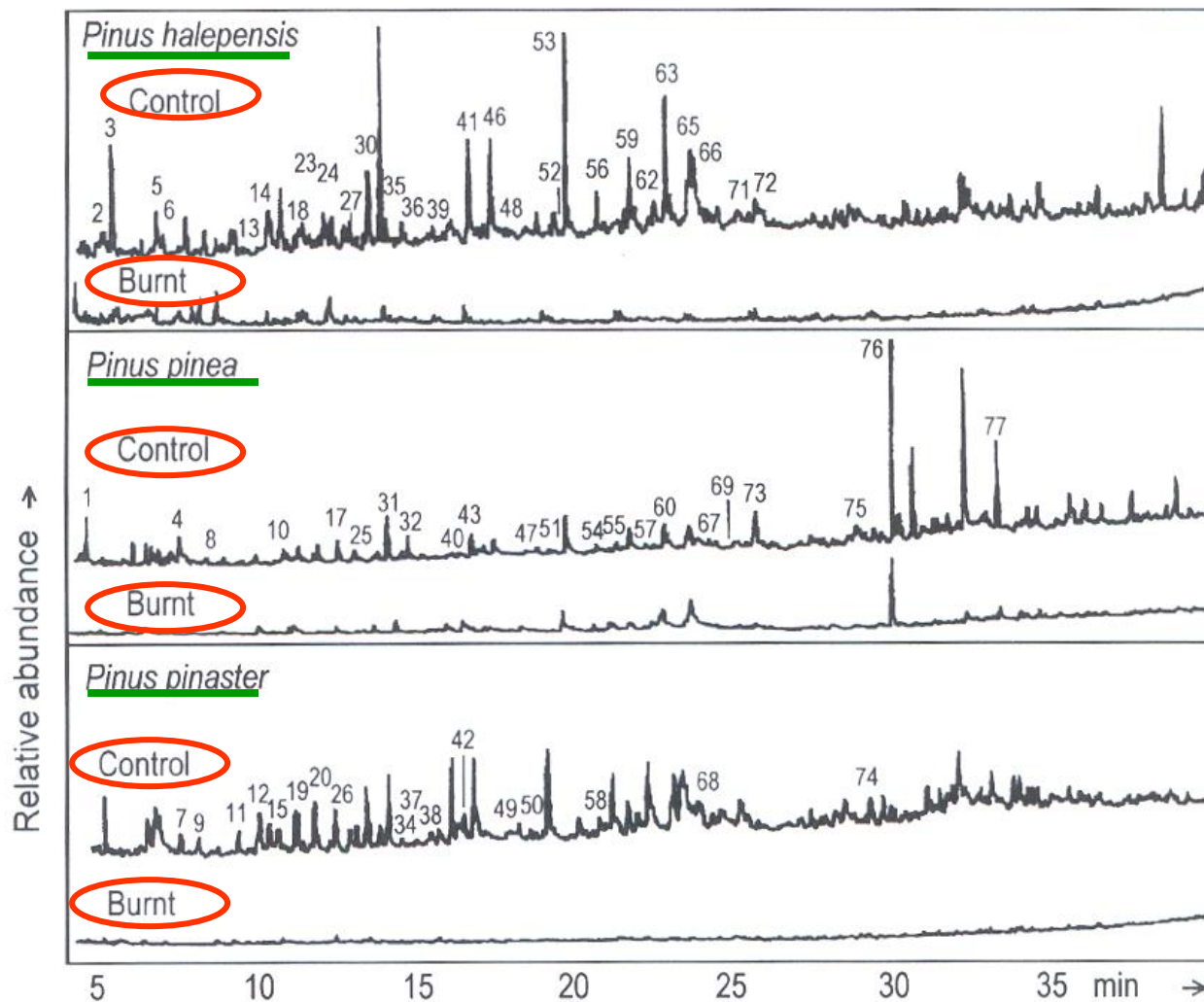


Metóxi fenóis metil substituídos

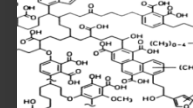
Técnicas analíticas de caracterização de substâncias húmicas



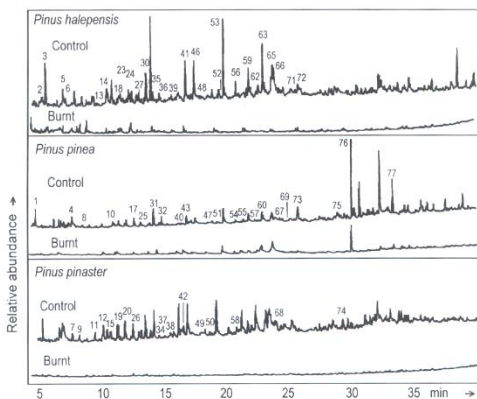
Exemplo: Pirogramas (Py-GC/MS) de amostras de solo



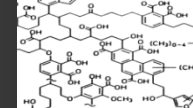
Técnicas analíticas de caracterização de substâncias húmicas



Compostos identificados por Py-GC/MS



1. Benzene
2. 2-Methyl-2-cyclopentene-1-one
3. Toluene
4. Furfural
5. 1*H*-pyrrole, 3-methyl
6. 2-Hydroxymethylfuran
7. Styrene
8. Cyclopente-1-ene-3,4-dione
9. 2-Methyl-2-cyclopente-1-one
10. 2-Acetylfuran
11. 2,3-Dihydro-5-methylfuran-2-one
12. 5-Methyl-2-furfuraldehyde
13. Benzylalcohol
14. Benzaldehyde
15. Phenol
16. 5-Methyl-2-furfuraldehyde
17. 4-Hydroxy-5,6-dihydro-(2*H*)-pyran-2-one
18. 5,6-Dihydropyran-2,5-dione
19. 3-Hydroxy-2-methyl-2-cyclopenten-1-one
20. 2,4-Dihydropyran-3-one
21. 2-Methoxytoluene
22. 2-Hydroxy-3-methyl-2-cyclopenten-1-one
23. 4-Isopropyltoluene
24. 2,3-Dimethylcyclopenten-1-one
25. Hydroxymethyldihydropyranone
26. 5-Ethyl-2-furfural
27. *o*-Cresol
28. 2-Furoic acid methyl ester
29. *p*-cresol
30. 2,6-Dimethylphenol
31. Guaiacol
32. Levoglucosenone
33. 3-Hydroxy-2-methyl-(4*H*)-pyran-4-one
34. Dimethyldihydropyranone
35. Phenylacetone nitrile
36. 3-Hydroxy-2-methyl-(4*H*)-pyran-4-one
37. 2,4-Dimethylphenol
38. Benzoic acid
39. 4-Ethylphenol
40. Catechol
41. 2-Acetoxy-5-ethylfuran
42. 3,5-Dihydroxy-2-methyl-(4*H*)-pyran-4-one
43. Methylguaiacol
44. 5-Hydroxy-2-furfuraldehyde
45. Methoxymethylbenzene
46. 4-Vinylphenol
47. 4-Methylcatechol
48. 4-Ethyl-2-methylphenol
49. 4-Ethylguaiacol
50. 4-Hydroxybenzyl alcohol
51. Indole
52. 1,4-Dideoxy-*D*-glycerohex-1-enopyranos-3-ulose
53. Vinylguaiacol
54. *trans*-Propenylphenol
55. 2,6-Dimethoxyphenol
56. Eugenol
57. 4-Propylguaiacol
58. 3-Methylindole
59. Vanillin
60. *cis*-Isoeugenol
61. 4-Hydroxyacetophenone
62. Homovanillin
63. *trans*-Isoeugenol
64. 1-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl) propyne
65. Acetovanillone
66. Vanillic acid methyl ester
67. 4-Ethyl-2,6-dimethoxyphenol
68. Guaiacylacetone
69. 2,6-Dimethoxy-4-vinylphenol
70. 1,6-Anhydro-*b*-glucofuranose
71. Guaiacylpropan-2-one
72. Propiovanillone
73. Guaiacyl vinyl-2-one
74. *trans*-Coniferaldehyde
75. Retene
76. Myristic acid
77. Palmitic acid



Pirólise acoplada à cromatografia gasosa e Espectrometria de massas

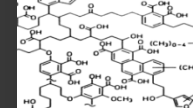
Em síntese, produtos da Py-GC/MS são:

- Fragmentos de polímeros orgânicos
- Produtos da oxidação da MOS (CO_2 , ácido acético, acetona etc)
- Produtos totalmente volatilizados (ácidos graxos)
- Artefatos produzidos durante volatilização e na coluna do cromatógrafo

Interferências

Amostras com elevados teores de:

- Metais
 - Sílica
- ⇒ eficiência reduzida



Caracterização das substâncias húmicas

Outras técnicas para determinação de grupos funcionais

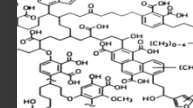
Técnicas termodegradativas, de eletroforese, visualização através de Microscopia de varredura, análise elementar das substâncias húmicas

Análise da composição elementar

Pirólise acoplada à cromatografia gasosa e espectrometria de massas

Eletroforese

Microscopia eletrônica de varredura (mev)



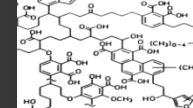
Eletofórese

Desenvolvida para separar componentes carregados eletricamente em uma mistura, com base na diferença de mobilidade das substâncias na presença de um campo elétrico

Focalização isoelétrica em gel de poliacrilamida com gradiente de pH

Na focalização isoelétrica, as moléculas de natureza anfótera (cargas + e -) migram para uma posição onde o pH é igual ao seu ponto isoelétrico, i.e., no valor de pH onde as moléculas não apresentam carga líquida.

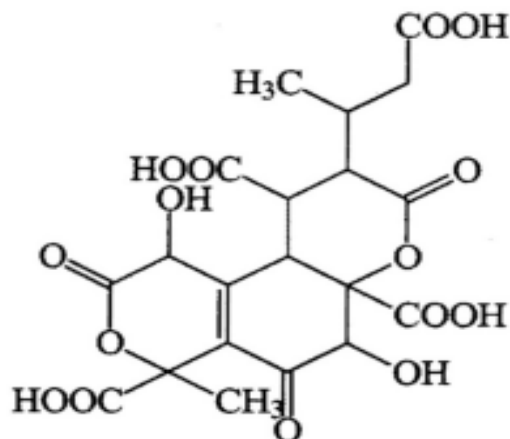




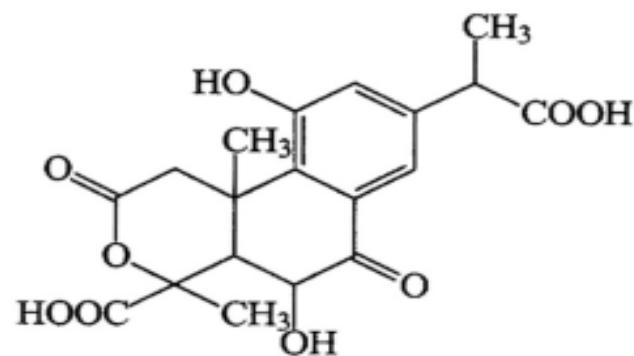
Eletofórese

Focalização isoelétrica em gel de poliacrilamida com gradiente de pH

- Técnica usada pela 1ª vez, em SHs, por Gjessing & Gjerdahl (1970)
Objetivo: fracionamento de SHs presentes em meio aquático



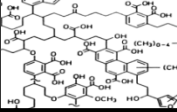
Subfraction 2/1, MW = 500



Subfraction 2/4, MW = 392

Diagrama de modelo estrutural de AF do Rio Suwannee, Georgia, EUA

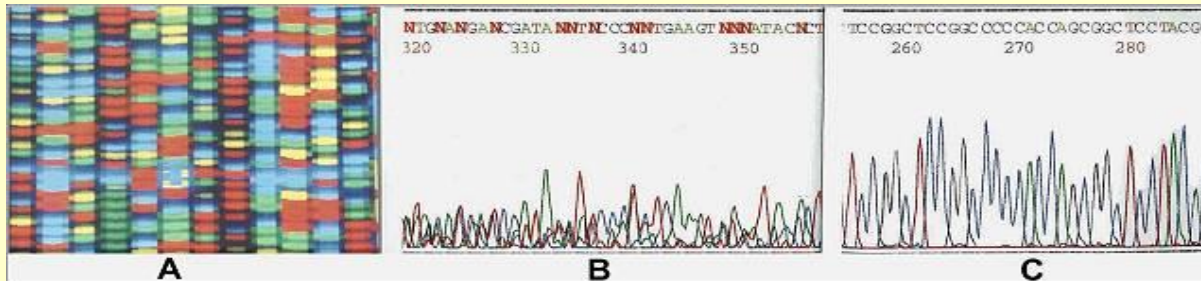
(MW = peso molecular em Daltons)

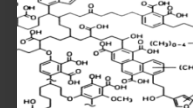


Eletrforese

Focalização isoelétrica em gel de poliacrilamida com gradiente de pH

- Técnica usada pela 1ª vez, em SHs, por Gjessing & Gjerdahl (1970)
Objetivo: fracionamento de SHs presentes em meio aquático
- **Solo**: método útil para obtenção de informações sobre as características de cargas das substâncias húmicas

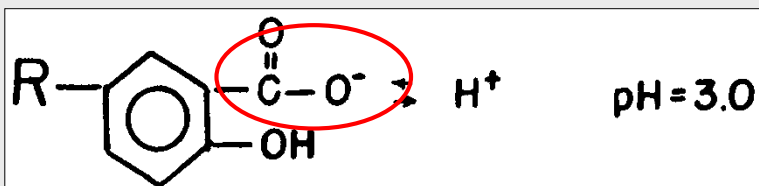




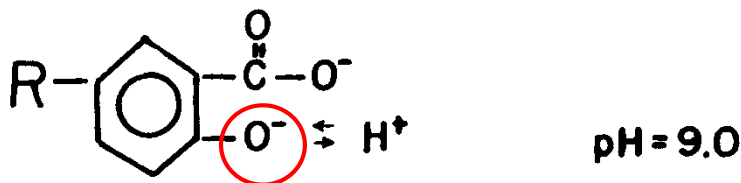
Cargas elétricas

As cargas negativas das substâncias húmicas surgem da dissociação de prótons dos grupos funcionais:

Carboxílicos



Fenólicos - OH



O desenvolvimento de cargas negativas das substâncias húmicas é dependente do pH do meio → cargas variáveis ou dependentes do pH

pH do meio

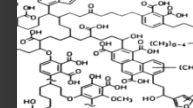
Cargas (-) das substâncias húmicas

Baixo

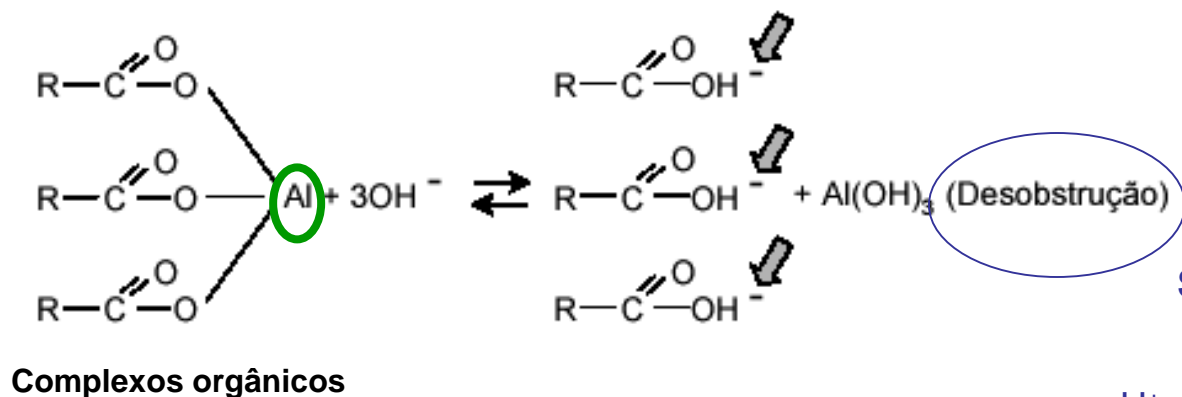
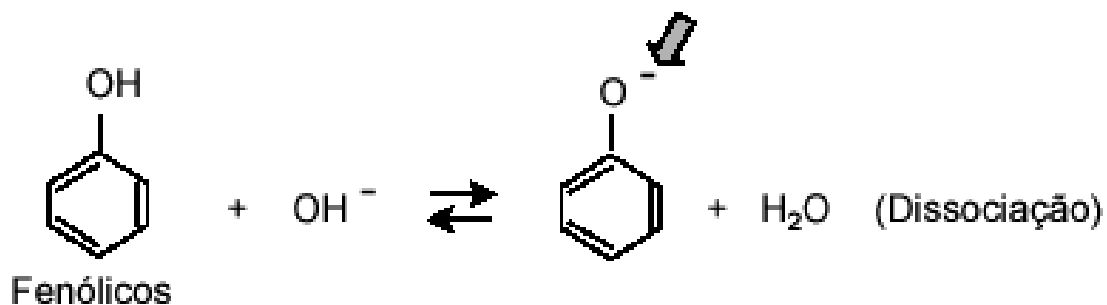
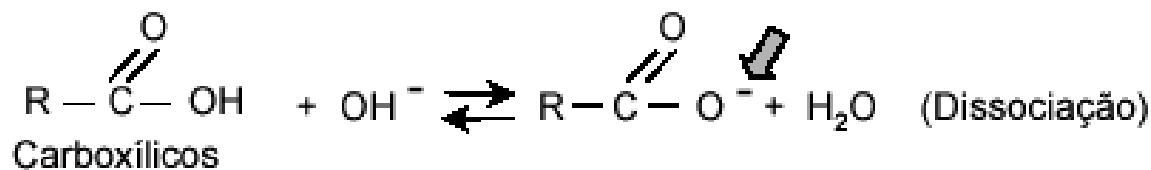
Baixas

Alto

Altas



Elevação do pH e formação de cargas negativas

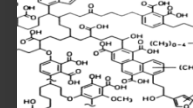


Série preferencial de troca
(valência e grau de hidratação)



Elevação do pH

Técnicas analíticas de caracterização de substâncias húmicas



Eletroforese : focalização isoelétrica em gel de poliacrilamida com gradiente de pH

- **Solo**: separação de AH marrom vs cinza

Ácido Fúlvico		Ácido Húmico		Humina
Amarelo claro	Amarelo escuro	Marrom escuro	Cinza a preto	preto

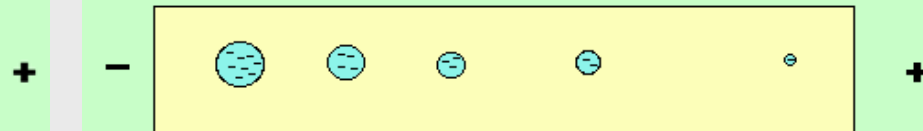
	—————	Aumenta grau de polimerização	—————>	
2000	—————	Aumenta peso molecular	—————>	300 000 ?
45%	—————	Aumenta conteúdo de carbono	—————>	62%
48%	—————	Diminui conteúdo de oxigênio	—————>	30%
	—————	Diminui grau de solubilidade	—————>	

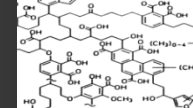
Eletroforese – princípios gerais

Tamanhos iguais e cargas diferentes



Tamanhos diferentes e cargas iguais





Caracterização das substâncias húmicas

Outras técnicas para determinação de grupos funcionais

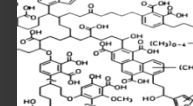
Técnicas termodegradativas, de eletroforese, visualização através de Microscopia de varredura, análise elementar das substâncias húmicas

Análise da composição elementar

Pirólise acoplada à cromatografia gasosa e espectrometria de massas

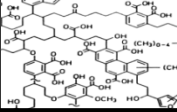
Eletroforese

Microscopia eletrônica de varredura (mev)



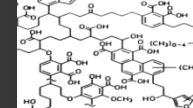
O que cada método mede?

Método	Informação obtida
NMR	Grupos funcionais C-C, C=O, C-OH, etc
FTIR	Grupos funcionais
EPR	Radicais, humificação (de aromáticos)
UV-VIS	Humificação (de aromáticos)
Py-GC/MS	Fragmentos moleculares, fonte/entrada



Qual a exatidão da informação?

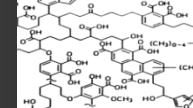
Método	Exatidão
NMR	moderada-alta
FT-NIR	alta
EPR	alta
UV-VIS	alta
Py-GC/MS	alta



Interferências nos métodos

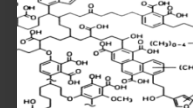
Método	Interferência
NMR	Paramagnéticos, humus inclusive
FTIR	Minerais, compostos de Fe
EPR	radicais (Fe, Mn, Cu...)
Py-GC/MS	Metais e silício

Técnicas analíticas de caracterização de substâncias húmicas



Método	Quantidade de amostra
NMR	100-300 mg
FTIR	1 mg
EPR	20 mg
UV-VIS	2-500 mg
Py-GC/MS	1 mg

Técnicas analíticas de caracterização de substâncias húmicas



Método	Custo
NMR	Caro
FTIR	Barato
EPR	Moderado
UV-VIS	Barato
Py-GC/MS	Moderado