



Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

ISSN 1679-0154

Dezembro, 2004

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 01

Aplicação de Novas Técnicas de Ressonância Magnética Nuclear no Estado Sólido como Metodologia para o Estudo da Matéria Orgânica Ambiental - Quantificação de Estruturas Aromáticas Condensadas

*Etelvino Henrique Novotny
Evandro Chartuni Mantovani
Tito José Bonagamba
Eduardo Ribeiro de Azevedo
José Carlos Cruz
Vinícius de Melo Benites*

Sete Lagoas, MG
2004

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Milho e Sorgo

Endereço: Rod. MG 424 Km 65

Caixa Postal: 151

Fone:(31) 3779-1000

Fax: (31) 3779-1088

Home page: <http://www.cnpms.embrapa.br>

E-mail (sac): sac@cnpms.embrapa.br

Comitê de Publicações da Embrapa Milho e Sorgo

Presidente: Jamilton Pereira dos Santos

Secretário-Executivo: Frederico O.M. Durães

Membros: Antônio Carlos de Oliveira, Arnaldo Ferreira da Silva,

Carlos Roberto Casela, Fernando Tavares Fernandes e Paulo

Afonso Viana

Supervisor editorial: Antônio Carlos de Oliveira

Revisor de texto: Dilermando Lúcio de Oliveira

Normalização bibliográfica: Maria Tereza Rocha Ferreira

Tratamento de ilustrações: Tânia Mara Assunção Barbosa

Editoração eletrônica: Tânia Mara Assunção Barbosa

1ª edição

1ª impressão (2004): 200 exemplares

Todos os direitos reservados.

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

Novotny, Etelvino Henrique

Aplicação de novas técnicas de ressonância magnética nuclear no estado sólido como metodologia para o estudo da matéria orgânica ambiental - quantificação de estruturas aromáticas condensadas. / Etelvino Henrique Novotny...[et al.]. – Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2004.

22 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 1)

1. Matéria orgânica. 2. Sequestro de carbono. I. Novotny, Etelvino Henrique. II. Serie CDD 631.4

© Embrapa 2004



Sumário

Resumo	05
Introdução	07
Material e Métodos	09
Resultados e Discussão	10
Conclusões	19
Referências Bibliográficas	20



Aplicação de Novas Técnicas de Ressonância Magnética Nuclear no Estado Sólido como Metodologia para o Estudo da Matéria Orgânica Ambiental - Quantificação de Estruturas Aromáticas Condensadas

Etelvino Henrique Novotny^{1*}
Evandro Chartuni Mantovani¹
Tito José Bonagamba²
Eduardo Ribeiro de Azevedo²
José Carlos Cruz¹
Vinicius de Melo Benites³

Resumo

Um dos grandes desafios, no que concerne ao estudo sobre o seqüestro de carbono pelos solos, é a correta quantificação das estruturas aromáticas condensadas presentes nas estruturas das substâncias húmicas, principalmente daquelas oriundas de solos ricos em carbono pirogênico (*"black carbon"*), como por exemplo solos sob cerrado. Visando isso se efetuou a implementação e teste de metodologia recentemente propostos na literatura e além disso foi proposta uma modificação desta com significativo ganho no tempo de aquisição dos espectros.

Os resultados obtidos confirmam a eficiência da metodologia na quantificação de anéis aromáticos condensados assim como corroboram o uso do índice termogravimétrico como um bom índice relativo para inferir-se sobre a presença deste tipo de estrutura em ácidos húmicos.

¹ Pesquisador, Ph.D., Embrapa Milho e Sorgo, Caixa Postal 151, 35701-970 Sete Lagoas, MG ¹ Pesquisador, Dr., Embrapa Milho e Sorgo, Caixa Postal 151, 35701-970 Sete Lagoas, MG. *etelvino@cnpms.embrapa.br

² Professor, Dr., IFSC-USP, Cx. P. 369, 13566-590 São Carlos, SP.

³ Pesquisador, Dr., Embrapa Solos, Rua Jardim Botânico, 1024, Jardim Botânico, 22460-000 Rio de Janeiro, RJ

Introdução

Quando disponível, a técnica de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) tem substituído a espectroscopia no infravermelho e demais outras técnicas utilizadas para a caracterização da matéria orgânica do solo. 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 isto 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 estes resultados e podem se desinteressar pelo estudo desses materiais. Tendo em vista essas diferentes expectativas, um diálogo necessita ser estabelecido. Este diálogo é essencial, pois até os ajustes padrões para a aquisição de espectros de RMN da matéria orgânica ambiental são controversos (Dudley & Fyfe, 1982; Preston & Blackwell, 1985; Fründ & Lüdemann, 1989; Kinchesh et al., 1995; Conte et al., 1997; Hemminga & Buurman, 1997; Smernik & Oades, 2000; González-Pérez et al., 2004; Mao & Schmidt-Rohr, 2004a,b).

A técnica de RMN de ^{13}C com polarização cruzada e rotação da amostra em torno do ângulo mágico (^{13}C -CP-MAS-NMR) só pode ser aplicada a amostras sólidas. Esta técnica apresenta a vantagem de poder ser utilizada para a análise da matéria orgânica sem a necessidade de extraí-la do solo, neste caso é assumido que o espectro obtido representa a totalidade da matéria orgânica como ela ocorre no solo, porém espectros deste 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 & Buurman, 1997), ou seja, ser exatamente a fração mais reativa desta matéria orgânica.

Outro problema semelhante seria que em complexos organominerais parte da matéria orgânica pode não ser detectada por RMN e esta fração “invisível” pode ser a matéria orgânica mais humificada ligada à fração argila do solo (Hemminga & Buurman, 1997). Novamente esta fração não detectável tem uma grande importância agrônômica e ambiental.

Muito se tem discutido a respeito da obtenção de espectros de RMN “quantitativos”, principalmente, no que concerne à eficiência da polarização cruzada, à existência de tempos de relaxação muito curtos quando da presença inequívoca de íons paramagnéticos nas amostras e especificamente quando se tenta a polarização direta, aos tempos de relaxação do ^{13}C serem muito elevados e portanto demandarem muito tempo de máquina para a aquisição de espectros razoáveis.

Já em relação a estruturas aromáticas condensadas, cuja metodologia para análise é ainda inexistente e é de suma importância no que concerne ao seqüestro de carbono pelos solos há uma grande dificuldade metodológica na sua determinação (González-Pérez et al., 2004).

Assim sendo, implementou-se um protocolo de análise por ^{13}C -CP-MAS-NMR sugerido recentemente por Mao & Schmidt-Rohr (2004a,b) assim como se testou modificações deste

visando reduzir o tempo de aquisição dos espectros, principalmente levando-se em consideração o elevado custo de utilização de espectrômetros de RMN.

Material e Métodos

As amostras de ácidos húmicos utilizadas neste trabalho foram obtidas de solos que apresentavam um gradiente no conteúdo de carbono pirogênico e já caracterizadas (Benites et al., 2005).

Implementou-se as seqüências de pulsos dadas nos artigos de Mao & Schmidt-Rohr (2004a,b), utilizando-se como padrões o hexametilbenzeno. Resumidamente estas seqüências visam:

- obter espectros quantitativos com o uso da polarização direta (DP)
- obter espectros com sinais apenas de C não protonado (anéis aromáticos condensados) e móveis (CH₃) utilizando-se o filtro de desacoplamento defasado (DD)
- obter espectros que separem os sinais sobrepostos de grupos aromáticos e *di-O-alquila* (C-anomérico) uso do filtro de deslocamento químico anisotrópico (CSA).

Adicionalmente testou-se o uso da polarização cruzada, ao invés da polarização direta, porém com o uso de uma rampa de potência no canal do ¹H (Peersen et al., 1993) - Variable Amplitude Cross Polarization (¹³C-VACP-MAS-NMR). Com isto se ganha intensidade do sinal do ¹³C (até 4 vezes) e redução do tempo de espera que passa a depender do tempo de relaxação spin-rede do ¹H ao invés daquele do ¹³C, que no caso do presente trabalho foi 60 vezes menor. Utilizando-se a rampa de potência elimina-se o efeito da rotação (MAS) que é seletivo para os grupos com menor interação dipolar tais como aqueles com maior mobilidade e/ou não protonados.

Resultados e Discussão

Uma das principais etapas da metodologia sugerida por Mao & Schmidt-Rohr (2004a,b) compreende o uso de um filtro de anisotropia do deslocamento químico (CSA), onde sinais com baixa simetria são suprimidos e os de maior simetria são mantidos. Dessa forma, grupos aromáticos que possuem ligações químicas em simetria planar (C hibridizado sp^2) são suprimidos enquanto C alquila com ligações em simetria próxima à tetragonal (C sp^3) são mantidos (figura 1). Com isto é possível separar-se e quantificar os grupos químicos cujos sinais de ressonância se sobrepõem na região de 90-110 ppm (C-aromático e *di-O-alquila*, tal como o C-anomérico das aldoses e cetoses).

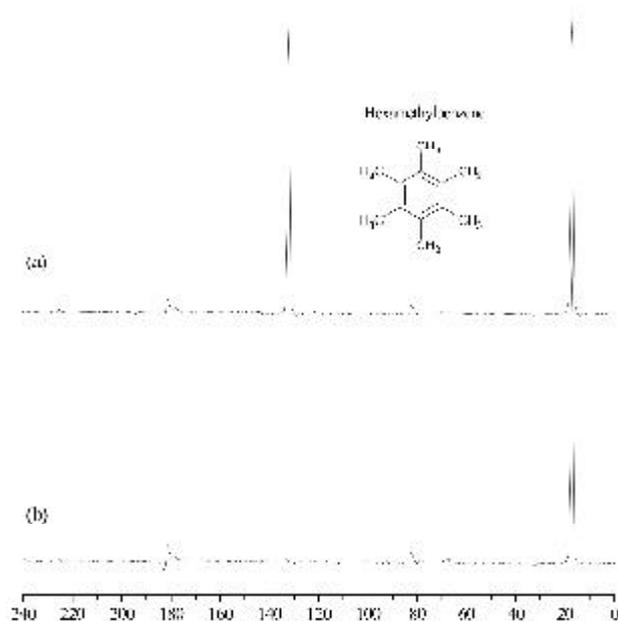


Figura 1. (a) Espectro ^{13}C -VACP-MAS-NMR do hexametilbenzeno com 12 kHz de MAS e Total Side-band Supression (TOSS) com quatro pulsos; (b) após 70 μs de CSA com “ γ -integral”.

Outra questão importante é a obtenção de espectros quantitativos, para isto os autores (Mao & Schmidt-Rohr, 2004a,b) sugerem o uso da polarização direta, porém esta técnica demanda muito tempo de máquina, tanto pela menor intensidade do sinal do ^{13}C obtida sem a polarização cruzada, como pelo maior tempo de espera entre um novo ciclo de pulsos pelo maior tempo de relaxação spin-rede do ^{13}C em relação ao ^1H . Para se contornar este problema testou-se o uso da polarização cruzada (CP), porém, visando o aumento da sensibilidade e resolução dos espectros, utilizam-se campos magnéticos cada vez mais intensos e isto leva à necessidade de girar a amostra a maiores velocidades sendo que, 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 destes 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}C - ^1H 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 isto é variar a amplitude do B_1 do ^1H ou do ^{13}C durante o tempo de contato da polarização cruzada. Desta forma o B_1 apresenta um gradiente capaz de abranger as diferentes condições de Hartmann-Hahn existentes na amostra. Esta técnica é chamada de polarização cruzada com amplitude variável ou "Variable Amplitude Cross-Polarization" (VACP) e foi empregada neste trabalho.

Ao se comparar os espectros obtidos por polarização direta e VACP com e sem filtro de desacoplamento defasado (Figura 2 e 3) da amostra com maior índice termogravimétrico (ITG), ou seja, aquela que teria o maior problema de quantificação visto que este índice correlaciona-se com o conteúdo de carbono pirogênico (anéis aromáticos condensados - não protonados), utilizando-se a polarização cruzada, observa-se que eles são muito semelhantes, sendo que com VACP em muito menos tempo de experimento (1 hora) obtêm-se espectros com uma relação sinal/ruído muito melhor que aqueles obtidos com polarização direta em 8,5 horas de aquisição.

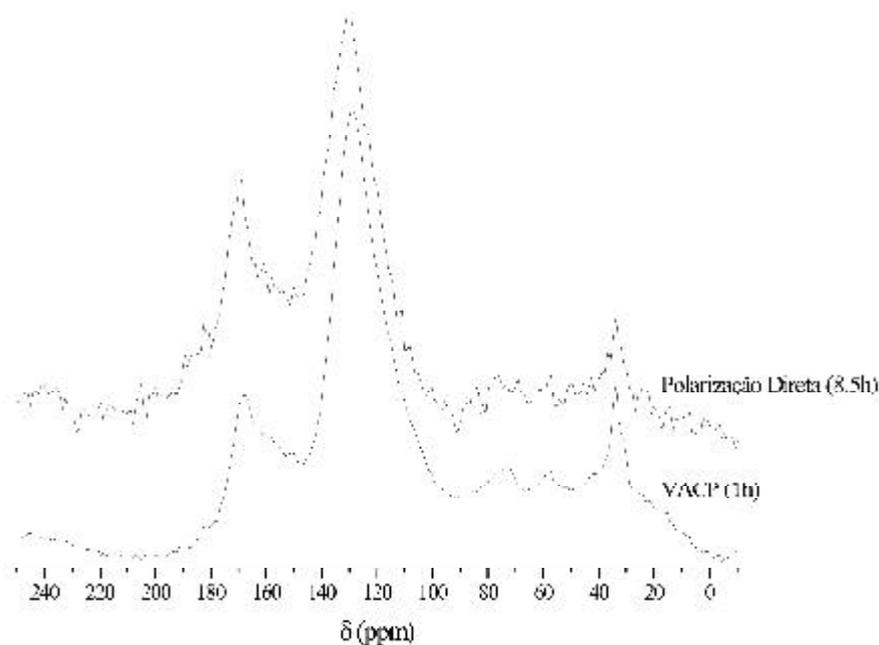


Figura 2. Espectro de Polarização Direta, 12 kHz MAS, (tempo de espera igual a cinco vezes o maior T₁ C determinado) e espectro VACP, 12 kHz MAS, de uma amostra de ácidos húmicos extraídos de uma área rica em carbono pirogênico.

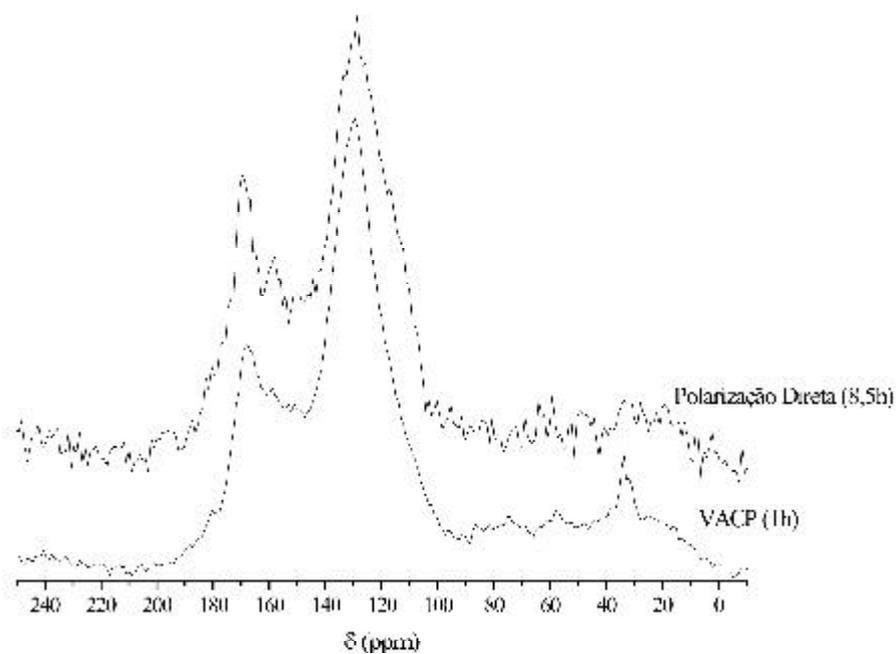


Figura 3. Espectros correspondentes ao da Figura 1 após desacoplamento defasado ($70 \mu\text{s}$). Polarização Direta (12 kHz MAS) e VACP (12 kHz MAS) de uma amostra de ácidos húmicos extraídos de uma área rica em carbono pirogênico.

As áreas obtidas para cada região espectral pelos dois métodos de aquisição com e sem filtro de desacoplamento defasado foram praticamente idênticas (Tabela 1).

Tanto a eliminação das bandas laterais pelo uso da TOSS como os filtros de DD e CSA funcionaram adequadamente (Figura 4).

Tabela 1. Contribuição relativa (% da área total) das regiões de deslocamento químico (ppm). Comparação entre polarização cruzada com amplitude variável (VACP) e polarização direta (DP), com e sem filtro de desacoplamento defasado (DD).

Região (ppm)	¹³ C RMN	VACP	DP	VACP-DD	DP-DD
	Atribuição	%			
0-51	alquila	14	13	8	7
51-63	metoxila, N- alquila	5	4	3	2
63-95	O- alquila	9	9	5	3
95-110	ci-C- alquila	6	7	4	4
110-142	aromático	43	41	34	35
142-180	C- aromático	8	8	9	9
180-190	carboxila	12	14	12	14

Pela boa relação sinal/ruído obtida utilizou-se ~ 3500 transientes (30 minutos de tempo de aquisição). Para o cálculo das áreas de cada região espectral dos espectros de RMN estes foram deconvoluídos em 20 picos individuais (função voigt) (Figuras 5 e 6). A posição dos picos ajustados foi determinada pelo método da segunda derivada sendo que, caso um pico simples não ajustasse bem os dados experimentais, um novo pico era adicionado para melhorar o ajuste (Mao et al., 2000). As áreas dos picos ajustados foram agrupadas de acordo com as regiões de deslocamento químico dados na Tabela 1. As bandas laterais foram corrigidas utilizando-se o método sugerido por Mao & Schmidt-Rohr (2004b).

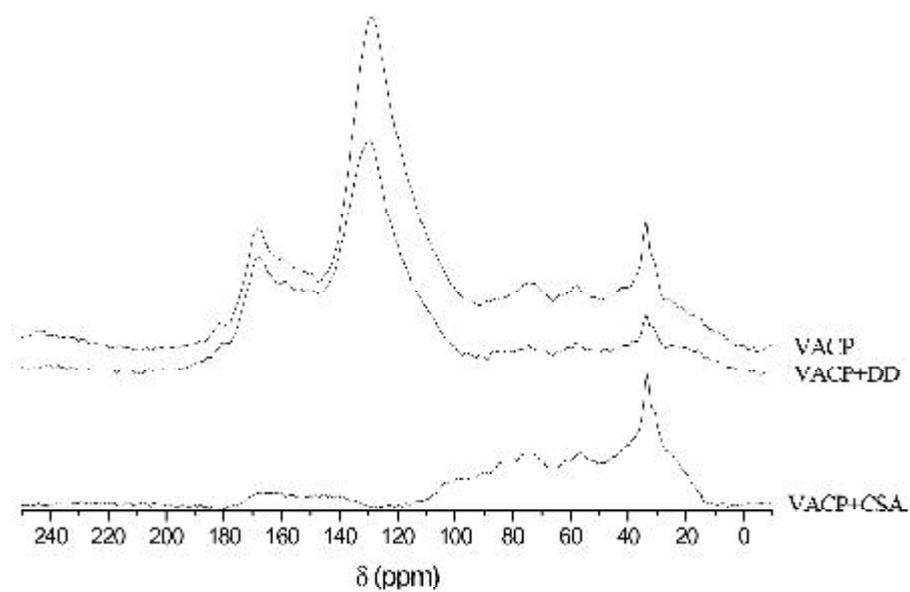


Figura 4. Espectros: VACP (12 kHz MAS); VACP (12 kHz MAS) após Desacoplamento Defasado (70 μ s); e VACP (5 kHz MAS) após CSA (70 μ s) com TOSS e "q-integral" de uma amostra de ácidos húmicos extraídos de uma área rica em carbono pirogênico.

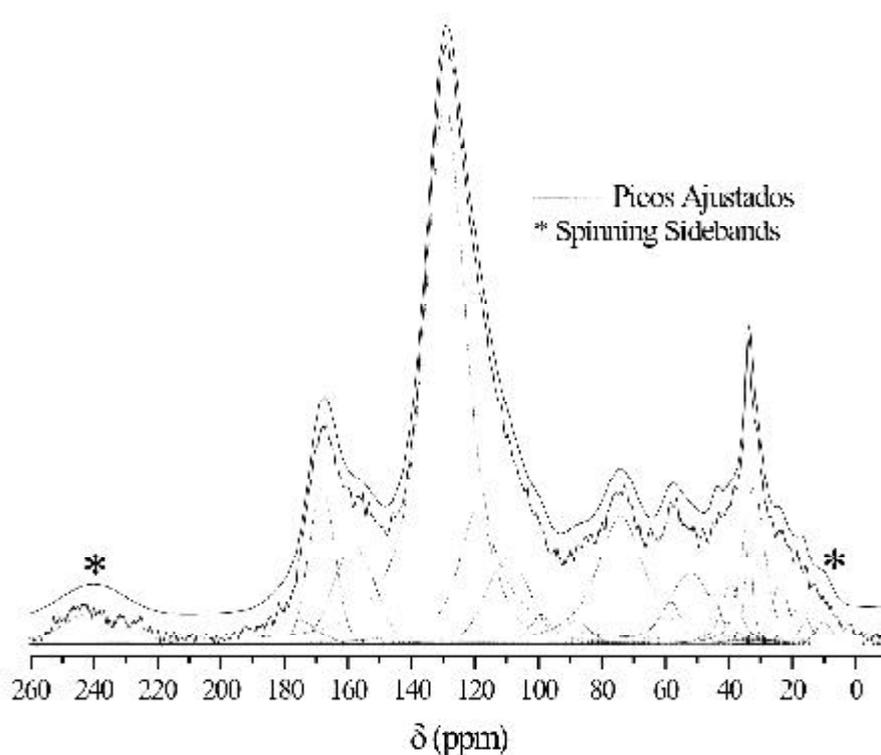


Figura 5. Espectro VACP (12 kHz MAS) de uma amostra de ácidos húmicos extraídos de uma área rica em carbono pirogênico e picos ajustados para a quantificação dos grupos funcionais.

Ao se comparar os dados obtidos por RMN e aqueles por outras técnicas, tais como termogravimetria e espectroscopia de UV-Vis (Benites et al., 2005) observa-se uma excelente correspondência entre elas (Figuras 7 e 8), onde quanto maior o índice de humificação ou, provavelmente, do conteúdo de estruturas aromáticas condensadas (elevado ITG e E^{HA}) maior o conteúdo de C-aromático determinado por RMN. Porém, é importante ressaltar que no caso da RMN obtém-se uma medida direta e quantitativa do conteúdo destas estruturas en-

quanto que as demais técnicas apresentam apenas uma proporcionalidade.

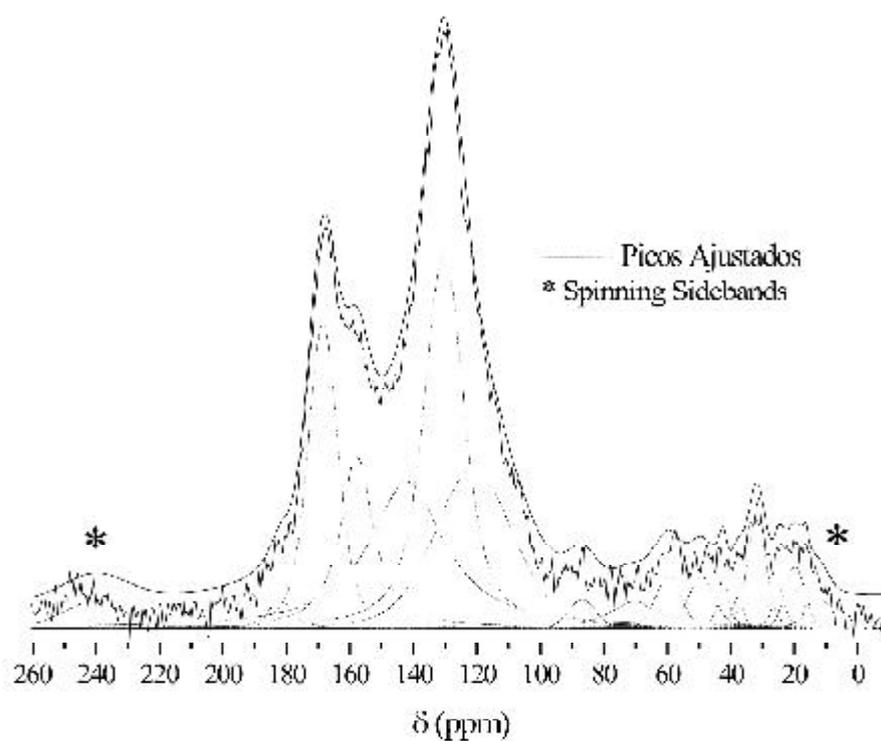


Figura 6. Espectro VACP (12 kHz MAS) após Desacoplamento Defasado (70 μ s) de uma amostra de ácidos húmicos extraídos de uma área rica em carbono pirogênico e picos ajustados para a quantificação dos grupos funcionais.

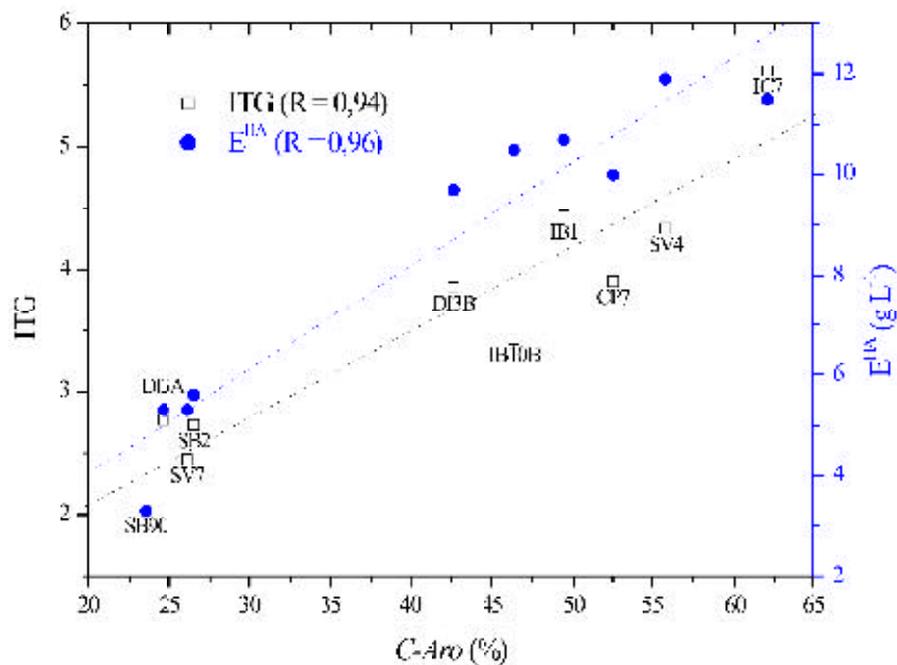


Figura 7. Regressão linear entre *C-Aromático* determinado por ^{13}C -VACP-MAS-NMR e índice termogravimétrico (ITG); e absorvância a 465 nm dos ácidos húmicos em solução de 1 g L^{-1} (E^{HA}).

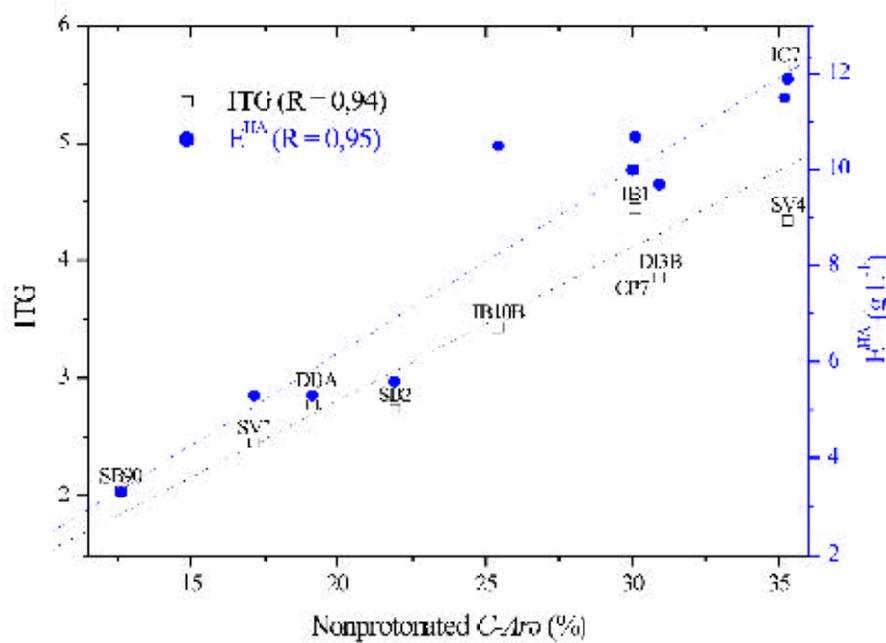


Figura 8. Regressão linear entre *C-Aromática* não protonado determinado por ^{13}C -VACP-MAS-NMR após Desacoplamento Defasado ($70 \mu s$) e índice termogravimétrico (ITG); e absorvidade a 465 nm dos ácidos húmicos em solução de $1 g L^{-1}$ (E^{HA}).

Conclusões

Foi possível a implementação e teste da metodologia proposta por Mao & Schmidt-Rohr (2004a,b) além da modificação desta com significativo ganho no tempo de aquisição dos espectros, sendo que ao invés de 18 horas por amostra é possível adquirir espectros quantitativos utilizando-se a VACP em apenas 1 hora.

Os resultados obtidos confirmam a possibilidade de quantificar-se anéis aromáticos condensados assim como corroboram o uso do índice termogravimétrico como um bom índice relativo para inferir-se sobre a presença deste tipo de estrutura em ácidos húmicos.

Suporte Financeiro

Embrapa Macroprograma 1 - Grandes Desafios Nacionais, Projeto em Rede: Rede de Conhecimento em Agricultura de Precisão para condições do Cerrado e dos Campos Gerais, Projeto Componente 2: Estratégias de Manejo da Variabilidade Espaço-Temporal do Sistema de Produção de Grãos em Sistema de Plantio Direto (55.2004.509.02).

Referências Bibliográficas

- BENITES, V.M.; MENDONÇA, E.S.; SCHAEFER, C.E.G.R.; NOVOTNY, E.H.; REIS, E.L.; KER, J.C. Properties of black soil humic acids from high altitude rocky complexes in Brazil. **Geoderma**, Amsterdam (in press). Disponível em: < www.sciencedirect.com > Acessado em 14 jan. 2005.
- CONTE, P.; PICCOLO, A.; VAN LAGEN, B.; BUURMAN, P.; JAGER, P.A. de. Quantitative aspects of solid-state ¹³C NMR spectra of humic substances from soils of volcanic systems. **Geoderma**, Amsterdam, v. 80, n. 3-4, p.327-338, nov. 1997.
- DUDLEY, R.L.; FYFE, C.A. Evaluation of the quantitative reliability of the ¹³C CP/MAS technique for the analysis of coals and related materials. **Fuel**, Oxford, v. 61, n. 7, p.651-657, jul. 1982.

FRÜND, R.; LÜDEMANN, H. -D. The quantitative analysis of solution- and CPMAS-C-13 NMR spectra of humic material. **Sci. Total Environ.**, Amsterdam, v.81-82, p.157-168, jun. 1989.

GONZÁLEZ-PÉREZ, J.A.; GONZÁLEZ-VILA, F.J.; ALMENDROS, G.; KNICKER, H. The effect of fire on soil organic matter - a review. **Environ. Int.**, Oxford, v.30, n. 6, p.855-870, ago. 2004.

HEMMINGA, M.A.; BUURMAN, P. Editorial: NMR is soil science. **Geoderma**, Amsterdam, v.80, n. 3-4, p.221-224, nov. 1997.

KINCESH, P.; POWLSON, D.S.; RANDALL, E.W. ¹³C NMR studies of organic matter in whole soils: I. Quantitation possibilities. **Eur. J. Soil Sci.**, Oxford, v.46, n. 1, p.125-138, mar. 1995.

MAO, J.; HU, W.; SCHMIDT-ROHR, K.; DAVIES, G.; GHABBOUR, E.A.; XING, B. Quantitative Characterization of Humic Substances by Solid-State Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance. **Soil Sci. Soc. Am. J.**, Madison, v.64, n. 3, p.873-884, maio-jun. 2000.

MAO, J.-D.; SCHMIDT-ROHR, K. Separation of aromatic-carbon ¹³C NMR signals from di-oxygenated alkyl bands by a chemical-shift-anisotropy filter. **Solid State NMR**, San Diego, v.26, n. 1, p.36-45, ago. 2004a.

MAO, J.-D.; SCHMIDT-ROHR, K. Accurate Quantification of Aromaticity and Nonprotonated Aromatic Carbon Fraction in Natural Organic Matter by ¹³C Solid-State Nuclear Magnetic Resonance. **Environ. Sci. Technol.**, Washington, v.38, n. 9, p.2680-2684, maio 2004b.

PEERSEN, O. B.; WU, X.; KUSTANOVICH, I.; SMITH, S.O. Variable-amplitude cross-polarization MAS NMR. **J. Magn. Reson. A**, San Diego, v.104, n. 3, p.334-339, out. 1993.

PRESTON, C.M.; BLACKWELL, B.A. Carbon-13 nuclear magnetic resonance for a humic and a fulvic acid: signal-to-noise optimization, quantitation, and spin echo techniques. **Soil Sci.**, Baltimore, v.139, n. 1, p.88-96, jan. 1985.

SMERNIK, R.J.; OADES, J.M. The use of spin counting for determining quantitation in solid state ^{13}C NMR spectra of natural organic matter. 1. Model systems and the effects of paramagnetic impurities. **Geoderma**, Amsterdam, v.96, n. 3, p.101-129, jun. 2000.