

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS – FÍSICA

ROSANA ALES

METODOLOGIA PARA OBTENÇÃO DE IMAGENS DE ÁCIDO HÚMICO POR MEIO
DA TÉCNICA DE MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA

PONTA GROSSA

2014

ROSANA ALES

METODOLOGIA PARA OBTENÇÃO DE IMAGENS DE ÁCIDO HÚMICO POR MEIO
DA TÉCNICA DE MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre na Universidade Estadual de Ponta Grossa, no Programa de Pós Graduação em Ciências, área de concentração Física.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio da Costa Saab.

PONTA GROSSA

2014

TERMO DE APROVAÇÃO

ROSANA ALES

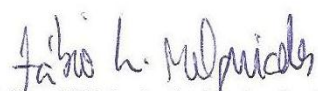
“Metodologia para Obtenção de Imagens de Ácido Húmico por Meio da Técnica de Microscopia de Força Atômica”

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciências - Física da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela seguinte banca examinadora.

Orientador:



Prof. Dr. Sérgio da Costa Saab
Departamento de Física - UEPG/PR.



Prof. Dr. Fábio Luiz Melquiades
Departamento de Física – UNICENTRO/PR



Profa. Dra. Christiana Andrade Pessoa
Departamento de Química – UEPG/PR.

Ponta Grossa, 30 de maio de 2014

Ficha Catalográfica
Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG

Ales, Rosana

A371 Metodologia para obtenção de imagens de
 ácido húmico por meio da técnica de
 microscopia de força atômica/ Rosana Ales.
 Ponta Grossa, 2014.
 93f.

 Dissertação (Mestrado em Ciências -
 Área de Concentração: Física),
 Universidade Estadual de Ponta Grossa.
 Orientador: Prof. Dr. Sérgio da Costa
 Saab.

 1.Imagens de AFM. 2.Metodologia.
 3.Substâncias húmicas. I.Saab, Sérgio da
 Costa. II. Universidade Estadual de Ponta
 Grossa. Mestrado em Ciências. III. T.

CDD: 539.2

Dedico aos meus pais Pedro e Marlene

AGRADECIMENTOS

- A Deus, por estar sempre ao meu lado;
- Ao meu orientador, Sérgio da Costa Saab, pela oportunidade, paciência, compreensão e dedicação neste trabalho;
- À Nívea Maria Piccolomini Dias, pela ajuda, apoio e conhecimento compartilhado;
- Ao Emerson Rigoni, que me incentivou e apoiou para o ingresso no mestrado;
- Aos meus irmãos e principalmente minha irmã Rosilene Ales, pelo carinho, cuidado e apoio recebidos;
- À Jaqueline Ribaski Borges - uma irmã desde a graduação - pelo companheirismo, incentivo e amizade todos estes anos;
- À Jose, secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciências/Física, por nunca negar ajuda em vários momentos do curso;
- À Andréia Kruk Menon pelo companheirismo nos momentos difíceis;
- Aos laboratoristas do Multiusuários; pelo auxílio nas medidas experimentais;
- E a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

“Renda-se, como eu me rendi. Mergulhe no que você não conhece como eu mergulhei. Não se preocupe em entender, viver ultrapassa qualquer entendimento.”

(Clarice Lispector)

RESUMO

A técnica de microscopia de força atômica (AFM) vem sendo uma das técnicas mais utilizadas para elucidar e caracterizar os modelos estruturais das Substâncias Húmicas (SH). Embora essa técnica seja empregada na análise de SH, não existe na literatura uma metodologia padronizada de preparo dessas amostras para análise por AFM. A matéria orgânica do solo (MOS), que é proveniente de sua fase sólida, pode ser dividida em substâncias não húmicas e substâncias húmicas. Esta última é constituída, geralmente, por ácido húmico (AH), ácido fúlvico (AF) e humina (HU). Existem várias propostas estruturais para as substâncias húmicas, mas nenhuma é inteiramente satisfatória pelo fato delas serem constituídas de uma mistura heterogênea de grupos funcionais e não terem características químicas definidas, apresentando falta de identidade estrutural genética. A procura por uma estrutura ou por modelos estruturais para as SH é um dos temas mais controversos na área da Ciência do Solo. Devido a diferentes abordagens, a atual pesquisa teve por objetivo testar e propor procedimentos metodológicos para obter imagens de ácido húmico (uma das frações das substâncias húmicas) de solo por Microscopia de Força Atômica. O solo em que o ácido húmico foi extraído pelo processo de fracionamento químico, é proveniente de uma área de várzea, cultivada, localizada na Estação Experimental do Instituto de Agrônomo do Paraná localizado na cidade de Ponta Grossa – PR, com profundidade de coleta de 0 – 10 cm. Foram realizados diversos procedimentos metodológicos para obtenção de amostras de AH, tanto no processo convencional (em agitação) da solução, como com a utilização do ultrassom, ambos para dissolução do ácido húmico. As duas metodologias para o preparo das amostras são válidas para obtenção de imagens de AH através da AFM, no entanto, com a utilização do ultrassom, as amostras foram preparadas em um período menor.

Palavras-chave: Imagens de AFM. Metodologia. Substâncias Húmicas.

ABSTRACT

The technique of atomic force microscopy (AFM) has been one of the most used techniques to elucidate and characterize the structural models of Humic Substances (HS). Although this technique has been employed in the analysis of SH, there is not in the literature a standardized methodology of preparation of samples for analysis by AFM. The soil organic matter (SOM), which comes from its solid phase, can be divided into humic and not humic substances. The last one is usually constituted by humic acid (HA), fulvic acid (FA) and humin (UH). There are several structural proposals for humic substances, but none is entirely satisfactory because they consist of a heterogeneous mixture of functional groups and chemical characteristics are not defined, showing lack of genetic structural identity. The search for a structure or structural models for SH is one of the most controversial topics in the field of Soil Science. Due to different approaches, the current research aimed to test and propose methodological procedures to obtain images of humic acid (one of the fractions of humic substances) in soil by Atomic Force Microscopy. The soil in which the humic acid was extracted by chemical fractionation process is from a floodplain area, cultivated, located in the Experimental Station of the Agronomic Institute of Paraná in the city of Ponta Grossa – PR, with depth collection of 0 - 10 cm. Several methodological procedures were performed to obtain samples of HA, both in conventional procedure (stirring) of the solution and using the ultrasound to dissolve the humic acid. The two methodologies for sample preparation are valid to obtain images of HA through the AFM, however, with the use of ultrasound, samples were prepared in a shorter period.

Keywords: AFM Images. Methodology. Humic Substances.

LISTA DE ILUSTRAÇÃO

FIGURA 1 - Principais fatores determinantes da quantidade (-- →) efeitos (→) e origem da MOS	21
FIGURA 2 - Fracionamento do material orgânico das SH do solo e variação de suas propriedades	23
FIGURA 3 - Modelo de ácido húmico proposto por Fuchs, em 1931, adaptado por Stevenson, 1985.	24
FIGURA 4 - Estrutura para o ácido húmico proposta por Dragunov's em 1948 e reportada por Kononova em 1966.....	25
FIGURA 5 - Estrutura hipotética para o ácido húmico segundo Flaig (1960).	25
FIGURA 6 - Estrutura proposta por Stevenson (1982) para o ácido húmico, contendo grupos OH fenólicos, estruturas quinonas, grupos oxigenados na forma de carboxilas e anéis aromáticos.	26
FIGURA 7 - Modelo proposto por Kleinhempel's (1970) para as substâncias Húmicas.	27
FIGURA 8 - Estrutura proposta por Schulten e Schnitzer (1993) para o ácido húmico – modelo bidimensional.....	28
FIGURA 9 - Estrutura proposta em 1997 por Schulten & Schnitzer, para o Ácido Húmico pela teoria macromolecular, em 3 dimensões. Carbono = azul; oxigênio = vermelho; nitrogênio = preto e hidrogênio = branco. As letras A, B e C indicam os espaços “vazios” presentes na molécula capazes de interagir com outros compostos orgânicos e inorgânicos.	29
FIGURA 10 - Modelo Supramolecular para as SH proposto por Simpson <i>et al.</i> (2002).	30
FIGURA 11 - Microscópio de Força Atômica - Shimadzu 9600 - Laboratório de Multiusuários da UEPG.	31

FIGURA 12- Esquema do princípio de funcionamento do Microscópio de Força Atômica.	32
FIGURA 13 - Forças entre a ponta e a amostra em função da distância entre elas e os modos de operação.	34
FIGURA 14 - Representação das forças de van der Waals. a) Forças de orientação; b) Forças de indução; c) Forças de dispersão.	37
FIGURA 15 - Representação esquemática dos modos de operação em AFM: (a) modo contato, (b) modo não contato e (c) modo intermitente.	39
FIGURA 16 - Representação de um suporte ("chip") com <i>cantilever</i> e ponta.	43
FIGURA 17- <i>Cantilever</i> com ponteira Si ₃ N ₄ na forma piramidal.	43
FIGURA 18 - <i>Cantilever</i> de SiO ₂ (a) com diamante na composição da ponta e (b) ponte de diamante sem ser lapidado.	44
FIGURA 19- <i>Cantilever</i> com ponta de Si em forma cônica.	44
FIGURA 20 - Imagens TM-AFM, modo intermitente, adsorvidos em mica: (a) do SRHA, 10 mg L ⁻¹ , 50 mmol L ⁻¹ de NaCl, pH 5,5, 60 nm x 60 nm, (b) do PHA 10 mg L ⁻¹ , 5 mmol L ⁻¹ de NaCl, pH 3,2, 2 µm x 2 µm, (c) do PHA 10 mg L ⁻¹ , 5 mmol L ⁻¹ de NaCl, pH 6,8, 2 µm x 2 µm.	47
FIGURA 21- Imagens em 2-D e os resultados da análise para a secção (a), uma amostra seca por congelamento e (b) uma amostra seca ao ar. Tamanho da varredura para (a) é de 1,25 x 1,25 µm e para (b) é de 1,0 x 1,0 µm. O intervalo de z é de 5,0 nm para ambas as amostras.	48
Figura 22 - Imagem de AFM de ácido húmico extraído de solo (AH1) adsorvidos em mica para pH 3,5 usando modo contato (5 µm x 5 µm).	50
Figura 23 - Imagem de AFM de ácido húmico sintético sorvido em mica para pH 3,5 modo contato. (a) AHSII e (b) AHSIII.	51

FIGURA 24 – Perfil da linha das imagens por AFM de AH em 0,01 mol L ⁻¹ de NaNO ₃ (a) em pH 4,0 (b) em pH 10,0 (c) pH 4,0 na presença de 0,1 mol L ⁻¹ de NaNO ₃ e 4,3 × 10 ⁻⁵ M Pb (NO ₃) ₂	52
FIGURA 25 - Imagem de AF através de AFM a pH 3,0 (a) 2D (b) 3D (c) altura representada pelos segmentos 1 e 2 da Figura 25 (a).....	53
Figura 26 - Imagem de AF através de AFM a pH 9,0. (a) 2D (b) 3D (c) altura representada pelos segmentos 1 e 2 da Figura 26 (a).....	54
Figura 27 - Imagens de AFM modo de contato (20 × 20 μm) de ácido húmico pedogenético (pH = 3,5) adsorvido na superfície mica. (a) sem enxágue e (b) enxaguado.....	55
Figura 28 - Imagem AFM modo contato (20 × 20 μm) de ácido húmico antropogênico (a) sem enxágue, (b) enxaguadas e (c) ampliação da Figura 28(a) mostrando as estruturas do tipo anel (7 × 7 μm).	56
Figura 29 - Imagem obtido por AFM a pH 3,5, modo contato, 2 x 2 μm (a) AH e (b) SHA.....	57
Figura 30 - Imagens de AFM de SHA com metais complexados: (a) de cobre (SHA-Cu), (b), de ferro (SHA-Fe), e (c) de cloreto de manganês (SHA-Mn), adsorvido em mica, a pH 3,5, no modo de contato.....	58
Figura 31 – (a) Mica sendo clivada com fita adesiva para retirar impurezas e deformações (b) mica clivada.....	61
Figura 32 - (a) Mica colada no porta amostra com fita adesiva dupla. (b) Porta amostra com a mica contendo AH, no AFM.	62
Figura 33 - Aparato utilizado para deixar a mica em agitação por 48 horas.	62
Figura 34 - (a) Recipiente com a solução de AH em um outro com gelo, (b) utilização do ultrassom para dissolução do AH.	63
Figura 35 - AH + água deionizada ultrapura com diferentes massas.....	65

FIGURA 36 – Espectros de absorção no infravermelho da amostra de ácido húmico.
.....68

Figura 37 - Potencial Zeta do ácido Húmico de solo cultivado: determinação das cargas superficiais a pH 3, pH 7, pH 8, pH 10 e pH 11.....69

FIGURA 38 - Gráfico do Potencial Zeta: tamanho das estruturas de ácido húmico a pH 3, pH 7, pH 8, pH 10 e pH 11.....70

FIGURA 39 - (a) Imagem topográfica de AH de solo obtido por AFM, pH 9,0, método tradicional, sem ultrassom, mica em repouso, 5 μm x 5 μm , em 2D, (b) imagem em 3D, (c) imagem da fase do AH e (d) altura dos segmentos 1, 2 e 3 de (a).71

FIGURA 40 - (a) Imagens de AH de solo obtido por AFM, pH 9,0, método tradicional, sem ultrassom, mica em agitação, 5 μm x 5 μm , em 2D, (b) 3D e (c) altura dos segmentos 1, 2 e 3 da figura 40 (a).....72

FIGURA 41 - Imagem de AH de solo obtido por AFM, pH 9,0, método utilizando o ultrassom, 5 min, (a) potência 10 W, 1 μm x 1 μm , em 2D, (b) altura dos segmentos 1, 2 e 3 de (a), (c) potência 20 W, 1 μm x 1 μm , em 2D, (d) altura dos segmentos 1, 2 e 3 de (c), (e) potência 30 W, 5 μm x 5 μm , em 2D, (f) altura dos segmentos 1, 2 e 3 de (e), (g) potência 40 W, 5 μm x 5 μm , em 2D, (h) altura dos segmentos 1, 2 e 3 de (g).....74

Figura 42 - Imagens de AH de solo obtido por AFM, pH 9,0, método utilizando o ultrassom, potência 30 W, mica em repouso, (a) 1 minuto, 1 μm x 1 μm , em 2D, (b) 3D e (c) altura dos segmentos 1, 2 e 3 de (a); (d) 3 minutos, 5 μm x 5 μm , em 2D e (e) altura dos segmentos 1, 2 e 3 de (d); (f) 7 minutos, 5 μm x 5 μm , modo em 2D e (g) altura dos segmentos 1, 2 e 3 de (f).77

Figura 43 - Imagem de AH de solo obtido por AFM, pH 9,0, método utilizando o ultrassom, 5 min, potência 30 W, mica em repouso, 5 μm x 5 μm , (a) 1,0 mg de AH e (b) altura dos segmentos 1, 2 e 3 de (a); (c) 2,0 mg de AH e (d) altura dos segmentos 1, 2 e 3 de (c); (e) 3,0 mg de AH e (f) altura dos segmentos 1, 2 e 3 de (e); (g) 4,5 mg de AH e (h) altura dos segmentos 1, 2 e 3 de (g); (h) 6,0 mg de AH e (i) altura dos segmentos 1, 2 e 3 de (h).....79

Figura 44 - (a) Imagens de AH de solo obtido por AFM, pH 9,0, método utilizando o ultrassom, 3 mg de AH, 5 min, potência 30 W, mica em repouso, modo não contato, 5 μm x 5 μm , em 2D, (b) 3D, (c) fase e (d) altura dos segmentos 1, 2 e 3 de (a).81

FIGURA 45 - (a) Imagens de AH de solo obtido por AFM, pH 3,0, utilizando o ultrassom, 5 min, potência 30 W, mica em repouso, 5 μm x 5 μm , modo não contato em 2D, (b) 3D e (c) altura dos segmentos 1, 2 e 3 da figura 45 (a).82

FIGURA 46 - (a) Imagens de AH de solo cultivado obtido por AFM, pH 3,0, método utilizando o ultrassom, 5 min, potência 30 W, mica em repouso, 1 μm x 1 μm , modo não contato em 2D, (b) 3D e (c) altura dos segmentos 1, 2 e 3 de (a).....83

LISTA DE TABELA

Tabela 1- Comparativo dos modos da Microscopia de Força Atômica	45
Tabela 2 - Síntese dos métodos utilizados.....	67

LISTA DE SIGLAS

AF	Ácido Fúlvico
AFM	Microscopia de Força Atômica
AH	Ácido Húmico
CTA	Capacidade de troca Aniônica
CTC	Capacidade de troca Catiônica
ddp	Diferença de Potencial
FTIR	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier
HU	Humina
IHSS	Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas
K	Constante de Mola
K _{eff}	Constante Elástica Efetiva do <i>Cantilever</i>
MEV	Microscópio Eletrônico de Varredura
mg	Miligrama
mL	Mililitro
MOS	Matéria Orgânica do Solo
Nm	Nanômetro
pH	Potencial Hidrogeniônico
SH	Substâncias Húmicas
SHA	Ácido Húmico Sintético
SPM	Scanning Probe Microscope
TEM	Microscópio Eletrônico de Transmissão
µm	Micrometro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. MATÉRIA ORGÂNICA DO SOLO	20
2.1. ESTRUTURAS DAS SUBSTÂNCIAS HÚMICAS	24
3. MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA	31
3.1. PRINCÍPIO FUNDAMENTAL DO FUNCIONAMENTO DO MICROSCÓPIO DE FORÇA ATÔMICA.....	31
3.2. FORÇAS QUE AGEM ENTRE A PONTA E A AMOSTRA E OS MODOS DE OPERAÇÃO DO AFM	33
3.3. MODOS DE OPERAÇÃO DO AFM	37
3.4. CANTILEVER E PONTEIRA	42
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	46
4.1. SUBSTÂNCIAS HÚMICAS E IMAGENS DE AFM.....	46
5. MATERIAIS E MÉTODOS	59
5.1. AMOSTRAS DE ÁCIDO HÚMICO	59
5.2. OBTENÇÃO E ANÁLISE DAS IMAGENS	59
5.3. ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR).....	59
5.4. POTENCIAL ZETA	60
5.5. METODOLOGIAS DAS AMOSTRAS DE ÁCIDO HÚMICO PARA OBTENÇÃO DE IMAGENS UTILIZANDO O MICROSCÓPIO DE FORÇA ATÔMICA.	61
5.5.1. MÉTODO CONVENCIONAL, SEM ULTRASSOM, pH 9,0 E MICA EM REPOUSO PARA DEPOSIÇÃO DO AH	61
5.5.2. MÉTODO CONVENCIONAL, SEM ULTRASSOM, pH 9,0 E MICA EM AGITAÇÃO PARA DEPOSIÇÃO DO AH	62
5.5.3. MÉTODO UTILIZANDO O ULTRASSOM PARA DISSOLUÇÃO DO AH E MICA EM REPOUSO PARA DEPOSIÇÃO	63
5.5.3.1. Método utilizando diferentes potências no ultrassom, pH 9,0 e mica em repouso	64

5.5.3.2. Método utilizando diferentes tempos no ultrassom, pH 9,0 e mica em repouso	64
5.5.3.3. Método utilizando o ultrassom com diferentes massas de AH, pH 9,0 e mica em repouso.....	65
5.5.3.4. Método utilizando o ultrassom, pH 3,0 e mica em repouso	66
5.6. SÍNTESE DOS MÉTODOS UTILIZADOS.....	66
6. RESULTADOS E DISCUSSÕES	68
6.1. ESPECTRO DO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER .	68
6.2. POTENCIAL ZETA	69
6.3. MÉTODO CONVENCIONAL, SEM ULTRASSOM, pH 9,0 E MICA EM REPOUSO PARA DEPOSIÇÃO DO AH.	70
6.4. MÉTODO CONVENCIONAL, SEM ULTRASSOM, pH 9,0 E MICA EM AGITAÇÃO.....	72
6.5. MÉTODO UTILIZANDO DIFERENTES POTÊNCIAS NO ULTRASSOM, pH 9,0 E MICA EM REPOUSO.....	73
6.6. MÉTODO UTILIZANDO DIFERENTES TEMPO NO ULTRASSOM, pH 9,0 E MICA EM REPOUSO	75
6.7. MÉTODO UTILIZANDO O ULTRASSOM COM DIFERENTES MASSAS DE AH, pH 9,0 E MICA EM REPOUSO	78
6.8. RESUMO DAS MELHORES CONDIÇÕES A pH 9,0, UTILIZANDO O ULTRASSOM.....	80
6.9. MÉTODO UTILIZANDO O ULTRASSOM, pH 3,0 E MICA EM REPOUSO	81
7. CONCLUSÕES.....	84
8. SUJESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS.....	85
9. REFERÊNCIAS	86

1. INTRODUÇÃO

Desde o séc. XV, a percepção de visualizar o mundo ficou diferente quando os cientistas inventaram os primeiros microscópios¹ com os quais as imagens poderiam ser ampliadas até 30 vezes. Detalhes de objetos que até então eram tidos como invisíveis, foram revelados aos olhos.

Os primeiros microscópios que surgiram no século XVII eram ópticos. Eles utilizavam luz e um sistema de lentes para ampliar a imagem dos objetos. Com a evolução destes, surgem os microscópios eletrônicos e de varredura por sonda, chamados *Scanning Probe Microscope* (SPM).

Os primeiros pesquisadores a desenvolverem a ideia de um microscópio que utilizava um feixe de elétrons foram Max Knoll e Ernst Ruska, na Alemanha, em 1931. O Microscópio Eletrônico de Transmissão (TEM) possui sistemas de iluminação e vácuo que produzem feixes de elétrons de alta energia (energia cinética), que, ao incidir sobre uma amostra de tecido ultrafina (na espessura de nanômetro), fornece imagens planas, imensamente ampliadas, e possui a capacidade de aumento útil de até um milhão de vezes. A amostra deve ser fina, para que os elétrons – acelerados por uma diferença de potencial de até 100 kV – não diminuam muito de velocidade quando a atravessarem. O primeiro TEM comercial foi construído em 1938, pela Siemens Corporation, no Reino Unido, e o início da produção regular começou com a Siemens e Halske, na Alemanha, em 1939. Este microscópio exerceu grande influência na biologia e na ciência ao permitir o estudo das ultra-estruturas dos materiais em meados do século XX (UNIFESP, 1994-2008).

No século XX surgiram os microscópios eletrônicos que podiam obter imagens de átomos, como o MEV (microscópio eletrônico de varredura), com resolução nanométrica de 1nm ($1\text{nm} = 10^{-9}\text{ m}$) e que trabalhava num sistema de vácuo. Porém, o MEV não era capaz de dar boas informações sobre profundidade e trazia efeitos destrutivos para a amostra.

Novos microscópios foram desenvolvidos nesta área, sendo os mais recentes os microscópios de varredura por sonda (SPM – *Scanning Probe*

¹ Microscópio vem do grego Mikros, pequeno e Skopein, ver. É um instrumento utilizado para ver aquilo que não se pode observar a “olho nu”, ou seja, objetos muito pequenos (DE ROBERTIS, 1977).

Microscope), que continham basicamente sonda sensora, cerâmicas piezelétricas para posicionar o objeto amostra e fazer varreduras, circuitos de realimentação para controlar a posição vertical da sonda e um computador para mover os scanners de varredura, armazenar dados e converter em imagens por meio de softwares específicos para este fim (ZANETTE, 2010).

Foi em 1981 que Gird Binning e Heinrich Rohrer, da empresa IBM, em Zurique, Suíça, inventaram o primeiro instrumento capaz de gerar imagens reais de superfícies com resolução atômica - o STM (*Scanning Tunneling Microscope*) – microscópio de tunelamento com varredura. Com esta invenção ganharam o Prêmio de Nobel de Física, em 1986 (BINNIG and ROHRER, 1987; BINNIG and ROHRER, 1999).

A maior limitação do STM é a necessidade da amostra ter condutividade, pois este aparelho era útil apenas para caracterizar a superfície de metais e semicondutores em escala atômica.

Para superar este obstáculo do STM, Gird Binning, Calvin F. Quate e Christopher Herber, inventaram o AFM - Microscópio de Força Atômica. Eles modificaram o STM e combinaram com um aparelho para medir rugosidade em escala microscópica (*profilometro Stylus*) para, assim, medir as forças em escala atômica. O AFM é o único aparelho, até então, capaz de fazer imagens em três dimensões (ZAVALA, 2008).

Outra vantagem de utilizar o AFM é a possibilidade do estudo de materiais não condutores, pois ele não utiliza corrente de tunelamento para produção de imagens. As amostras podem ser analisadas nos meios: ar, líquido ou vácuo, não traz danos para as mesmas, ou então, estes danos são mínimos, e as imagens tem aumento de 10^9 vezes.

Um dos temas mais controversos na área da Ciência do Solo é a busca de uma estrutura ou de modelos estruturais para as Substâncias Húmicas (SH) (matéria orgânica estável do solo), pois existem várias propostas estruturais, mas nenhuma parece ser inteiramente satisfatória (STEVENSON, 1985).

A matéria orgânica do solo (MOS), que é proveniente da fase sólida do solo, tem como principal função fornecer apoio e suporte para as plantas que extraem dela água e seus nutrientes (WINTER, 1976). Mesmo representando em média 5% da composição do solo (MEURER, 2000), ela é de fundamental importância, pois sem ela não há solo ou será incompleto e deficiente. A MOS é utilizada há milhares

de anos na fertilização do solo (LUCHESE, FAVERO e LENZI, 2002), e pode ser dividida em substâncias não húmicas e substâncias húmicas. Esta última é constituída, geralmente, por ácido húmico (AH), ácido fúlvico (AF) e humina (HU).

A técnica de Microscopia de Força Atômica tem sido uma das técnicas mais utilizadas para elucidar e caracterizar os modelos estruturais das Substâncias Húmicas (CARTER & GREGORICH, 1996; BARRIQUELLO, 2005; FASSARELLA, *et. al.*, 2012). Embora essa técnica seja empregada na análise de SH, existem, na literatura, vários procedimentos de preparo de amostras, mas não uma metodologia padronizada para preparo e análise dessas amostras por meio do AFM.

Este trabalho tem como objetivo testar diferentes procedimentos metodológicos e propor uma metodologia para preparo de amostras para posterior obtenção de imagens de ácido húmico (uma das frações das substâncias húmicas) de solo por Microscopia de Força Atômica.

Especificamente, pretende-se testar métodos de preparo de amostras adaptados dos trabalhos de autores como Papadopoulos *et al.*, 2000, Barriquello, 2005; Saab *et al.*, 2010; Leite *et al.* 2012 que levam até uma semana para ficarem prontas. O diferencial neste trabalho é utilização do ultrassom para dissolução do AH a fim de diminuir o tempo de preparo das amostras esperando que as mesmas fiquem prontas em uma manhã ou uma tarde.

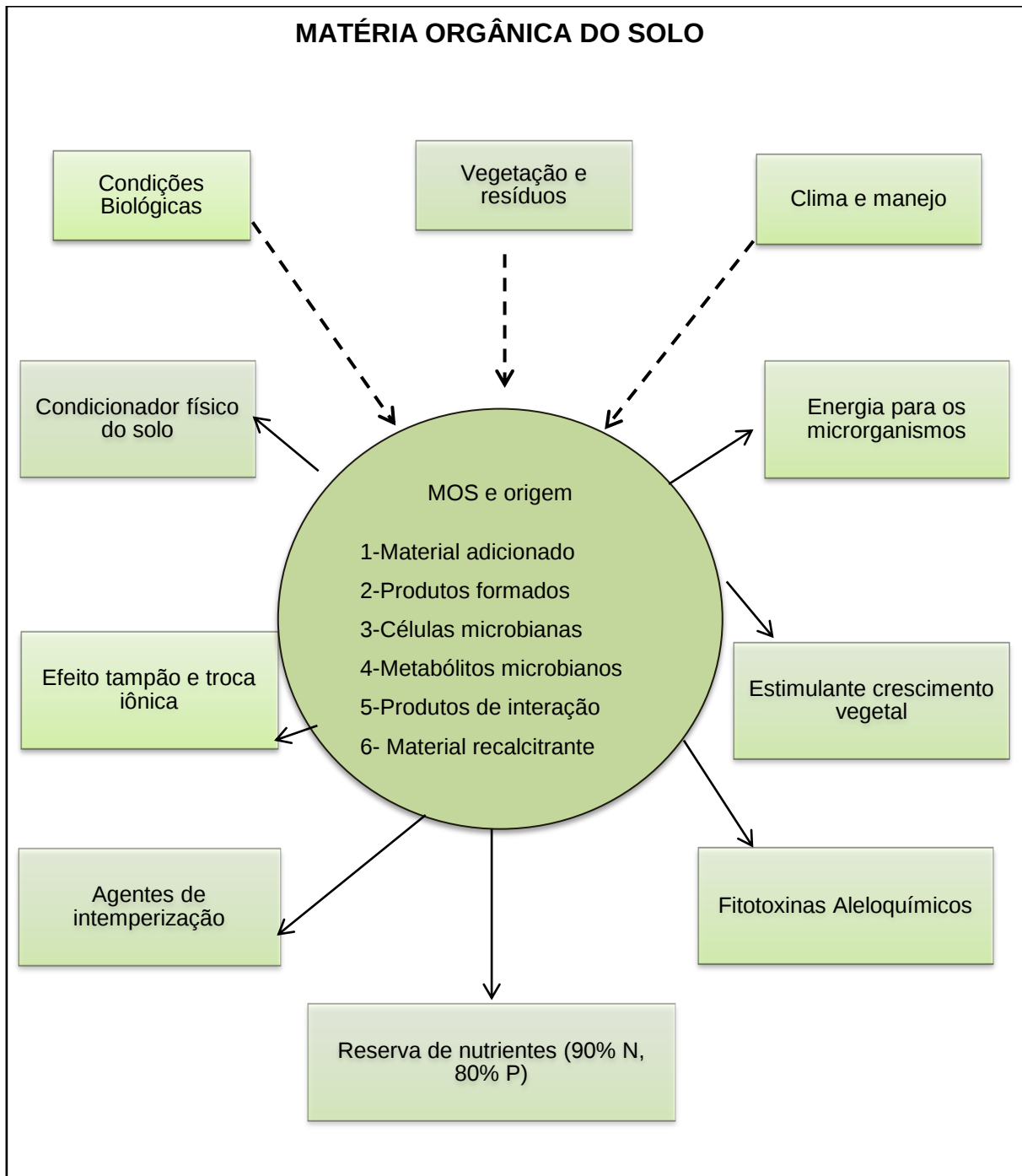
2. MATÉRIA ORGÂNICA DO SOLO

O solo é uma mistura de compostos orgânicos e minerais que são formados pela ação de agentes físicos, químicos e biológicos derivados da rocha primária (LUCHESE, FAVERO e LENZI, 2002) e é constituído por um sistema composto de três fases: líquida, gasosa e sólida. Segundo Kiehl (1979), a fase líquida é constituída pelas soluções do solo composta por água, sais em dissolução e matéria coloidal em suspensão. A fase gasosa é formada pelos gases entre as partículas do solo e é resultante de processos bioquímicos. A fase sólida é formada por matéria inorgânica (porção mineral que consiste de vários tamanhos, que são resultantes da desagregação e da decomposição das rochas que deram origem ao solo) e matéria orgânica (origem no acúmulo dos resíduos vegetais e animais, com diferentes estágios de decomposição e organismos vivos em atividade como fungos, moluscos e insetos). A principal função do solo é fornecer apoio e suporte para as plantas que dele extraem água e seus nutrientes (WINTER, 1976).

A matéria orgânica do solo engloba resíduos de plantas, animais e microrganismos em diversos estágios e em constante processo de decomposição, em associação com os minerais do solo (CHRISTENSEN, 1992). O conteúdo e a composição da MOS depende de diversos fatores, tais como: a topografia, o clima, o tipo de vegetação e o tempo “idade” (KIEHL, 1979).

A MOS atua nas propriedades químicas, físicas e biológicas do solo, corrige e melhora a fertilidade do solo, influencia na cor, na formação de agregados, no aumento da capacidade de retenção de água pelo solo e aumento da capacidade de troca catiônica (CTC) e aniônica (CTA), além de corrigir a acidez do solo (SANTOS, LIMA e CARVALHO, 2002). Ela também influencia na disponibilização de macro e micronutrientes (N, P, K e S após a sua mineralização e materiais húmicos), no controle do pH e na produção de substâncias que inibem ou ativam o crescimento de microrganismos. Como a MOS tem natureza química, origem muito complexa e diversidade estrutural (SAIZ-JIMENEZ, 1996), ela não é uma componente simples e homogênea, mas um conjunto heterogêneo de materiais orgânicos que se diferem em composição, grau de disponibilidade para a microbiota, materiais mais recalcitrantes (aqueles que resistem à decomposição de microrganismos) e diferentes ambientes (CARTER, 2001). Na figura 1, estão representados os principais fatores que determinam a quantidade de MOS, seus efeitos e sua origem.

FIGURA 1 - Principais fatores determinantes da quantidade (-- →) efeitos (→) e origem da MOS



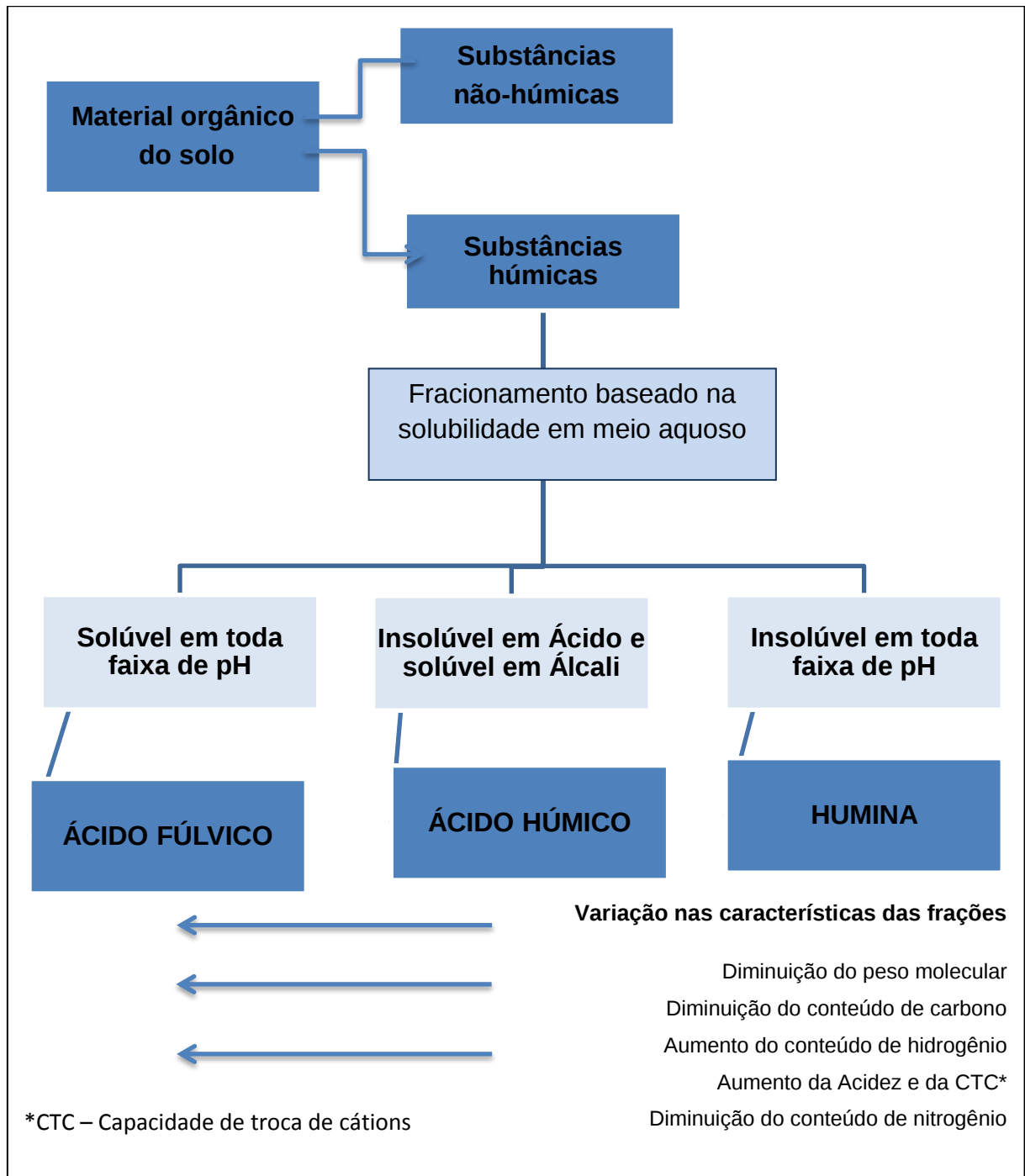
FONTE: Moreira e Siqueira, 2002.

Segundo Stevenson (1982), a MOS pode ser separada em dois grupos fundamentais: as substâncias húmicas (ou húmus) e as não húmicas. A principal diferença entre elas é que as substâncias húmicas não têm estrutura química complexa definida compondo um grupo de compostos heterogêneos. As substâncias não húmicas tem natureza definida, como por exemplo: os aminoácidos,

carboidratos, proteínas e ácidos orgânicos, entre outros, e constituem, aproximadamente, 10 a 15% da reserva total do carbono orgânico nos solos minerais. Ainda, as substâncias não húmicas geralmente são incolores e exclusivas do solo, sendo a maioria destas substâncias compostos simples de baixo peso molecular que geralmente é utilizado pelos microrganismos como substrato de existência transitória (FILHO e SILVA, 2002).

As substâncias húmicas constituem de 85% a 90% da reserva total do carbono orgânico (KONONOVA, 1982) e são encontradas tanto no solo quanto na água. Originam-se da degradação química e biológica de resíduos orgânicos, e os produtos formados tem coloração escura e elevado peso molecular. Uma das formas de se analisar as substâncias húmicas é baseada na sua solubilidade em diferentes solventes, que se subdividem nas três principais frações: Ácido Húmico, Ácido Fúlvico e Humina, conforme figura 2. Deste modo, observa-se que as características destas frações variam da direita para a esquerda (LUCHESE, FAVERO e LENZI, 2002).

FIGURA 2 - Fracionamento do material orgânico das SH do solo e variação de suas propriedades



FONTE: Hayes, 1978.

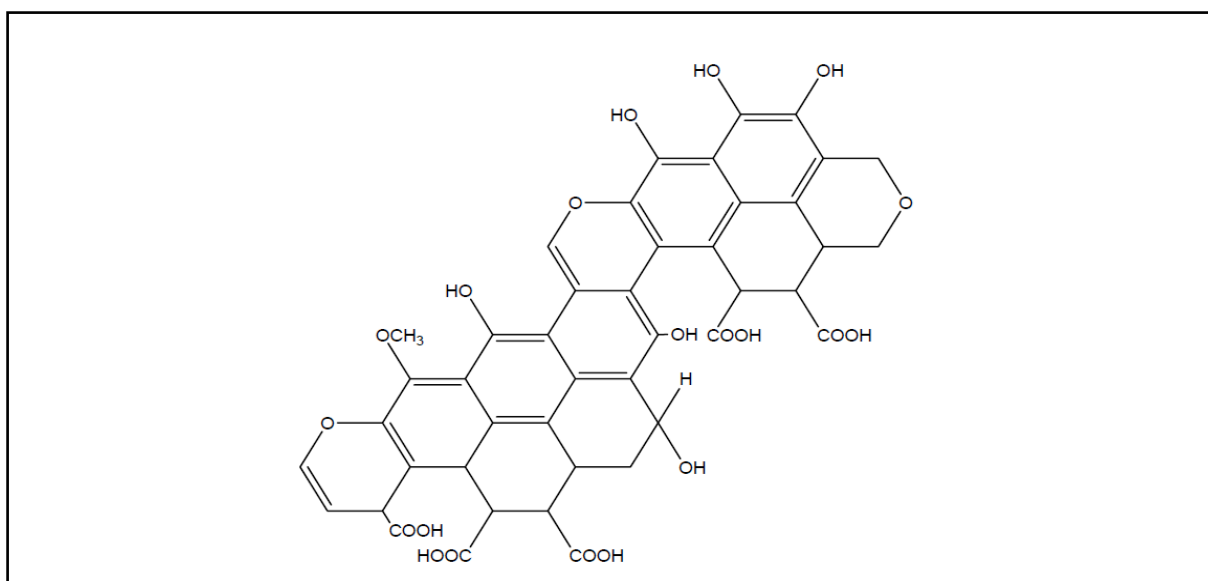
O ácido húmico (AH) é a fração das SH solúvel em meio alcalino diluído e que precipita pela acidificação do extrato alcalino (STEVENSON, 1994), possui fração escura e são muito complexos, quimicamente, com grandes estruturas, formados por polímeros, compostos aromáticos e alifáticos com alta massa molecular e grande CTC, densidade média de 1,6 g/cm³ (ORLOV, 1974). É também

a fração que mais sofre alterações estruturais durante o processo de humificação (CUNHA *et al.*, 2005). O ácido fúlvico (AF) permanece em solução quando o extrato alcalino é acidificado. Estes tem fração clara, baixa massa molecular e são quimicamente constituídos por polissacarídeos, aminoácidos, compostos fenólicos, entre outros. Eles formam complexos estáveis com ferro, cobre, cálcio e magnésio e possuem propriedades redutoras e combinam-se com óxidos de ferro, alumínio, argilas e outros compostos orgânicos (FILHO e SILVA, 2002). A humina é a fração não extraída por ácido ou álcali diluído e possui baixa solubilidade (STEVENSON, 1994).

2.1. ESTRUTURAS DAS SUBSTÂNCIAS HÚMICAS

Devido à sua natureza heterogênea e a complexidade das SH e apesar de muito esforço de pesquisadores da área, pouco se sabe sobre sua estrutura química (RÉ POPPI, 1992). Na literatura, existem muitas propostas estruturais para as SH, porém, segundo Stevenson (1985), nenhuma parece ser inteiramente satisfatória. Uma das estruturas mais populares, ilustrada na figura 3, foi proposta por Fuchs, no ano de 1931.

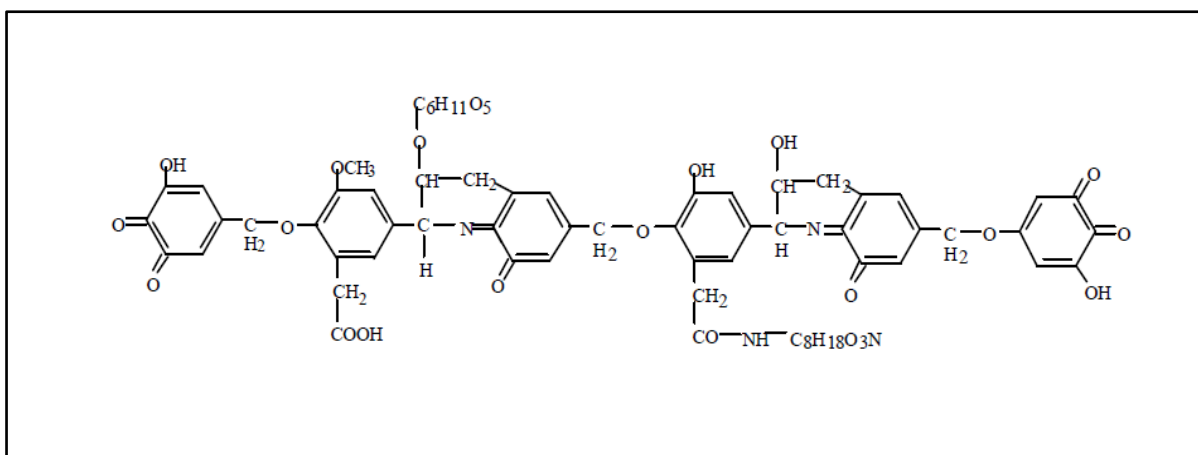
FIGURA 3 - Modelo de ácido húmico proposto por Fuchs, em 1931, adaptado por Stevenson, 1985.



FONTE: adaptado por Stevenson, 1985.

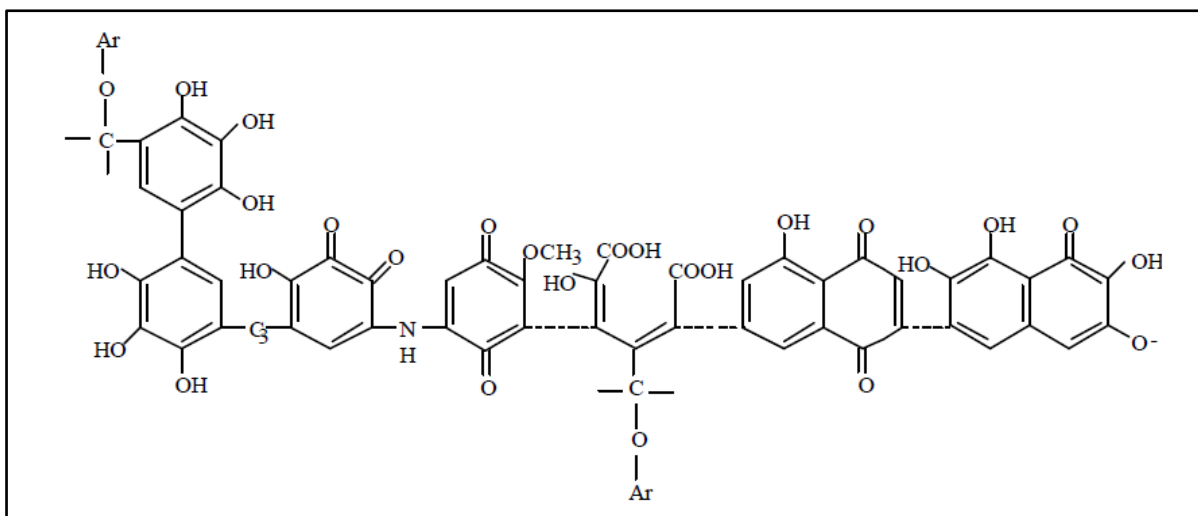
As estruturas propostas para o AH de Dragunov's, Flaig's e Stevenson (Figuras 4, 5 e 6), apresentam anéis aromáticos de di e trihidroxibenzeno, bem como a presença de grupos quinonas. Na figura 4, as estruturas de Dragunov's (KONONOVA, 1966), e na figura 5, a de Flaig's (1960)², contêm um número insuficiente de COOH em relação ao OH fenólico, que normalmente aparecem em maiores concentrações. As três estruturas apresentam nitrogênio como componente estrutural. As figuras 4 e 6 mostram a presença de carboidratos e resíduos de proteínas (ROSA, 1998).

FIGURA 4 - Estrutura para o ácido húmico proposta por Dragunov's em 1948 e reportada por Kononova em 1966.



FONTE: reportada por KONONOVA em 1966.

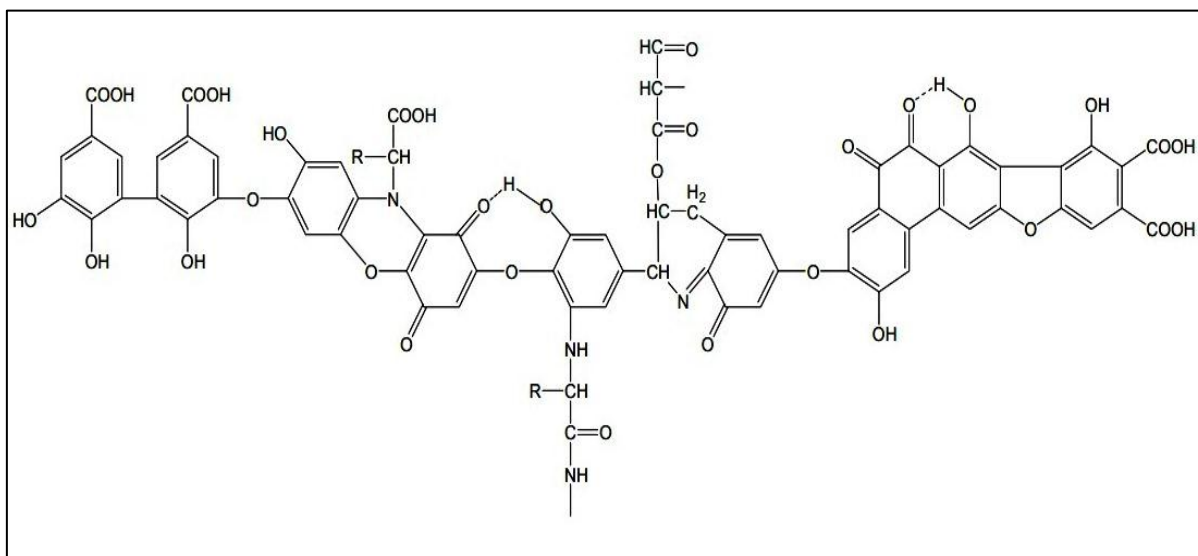
FIGURA 5 - Estrutura hipotética para o ácido húmico segundo Flaig (1960).



FONTE: Flaig, 1960.

² Continha anéis aromáticos e que foram substituídas por grupos hidroxilas, carboxilas e metoxilas.

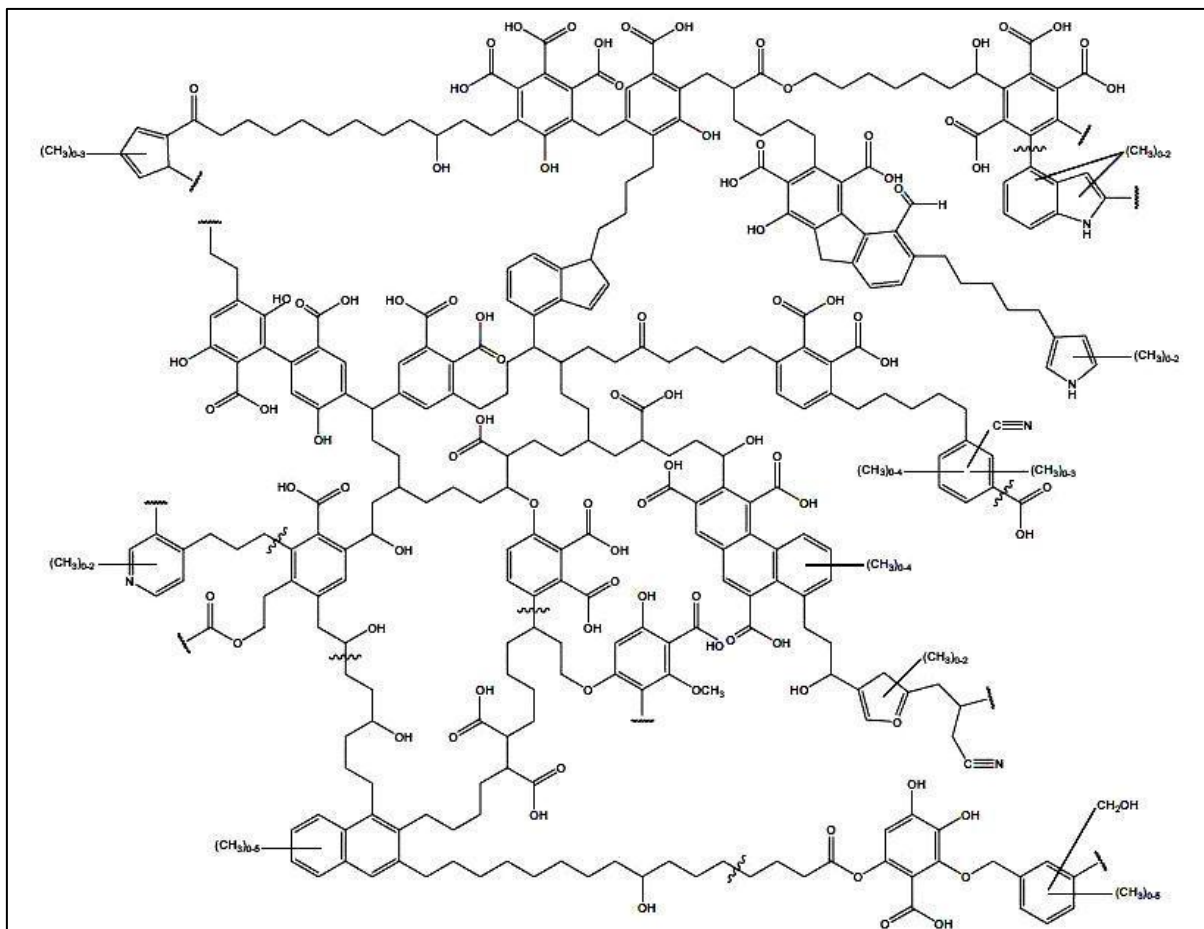
FIGURA 6 - Estrutura proposta por Stevenson (1982) para o ácido húmico, contendo grupos OH fenólicos, estruturas quinonas, grupos oxigenados na forma de carboxilas e anéis aromáticos.



FONTE: Stevenson, 1982.

As várias frações húmicas, segundo Kononova (1966), representam um sistema polimérico, onde os grupos de ácido húmico e ácido fúlvico não seriam tão diferentes. A humina estaria fortemente ligada a material inorgânico - estrutura com elevado teor de carbono, sendo assim, insolúvel em álcalis (BUFFLE, 1990). Na figura 7, está representado este modelo proposto por Kleinhempel's, em 1970, em que mostrou-se o papel de cátions polivalente, como Fe^{2+} , na associação entre SH e a porção mineral do solo (NOVOTNY, 2002).

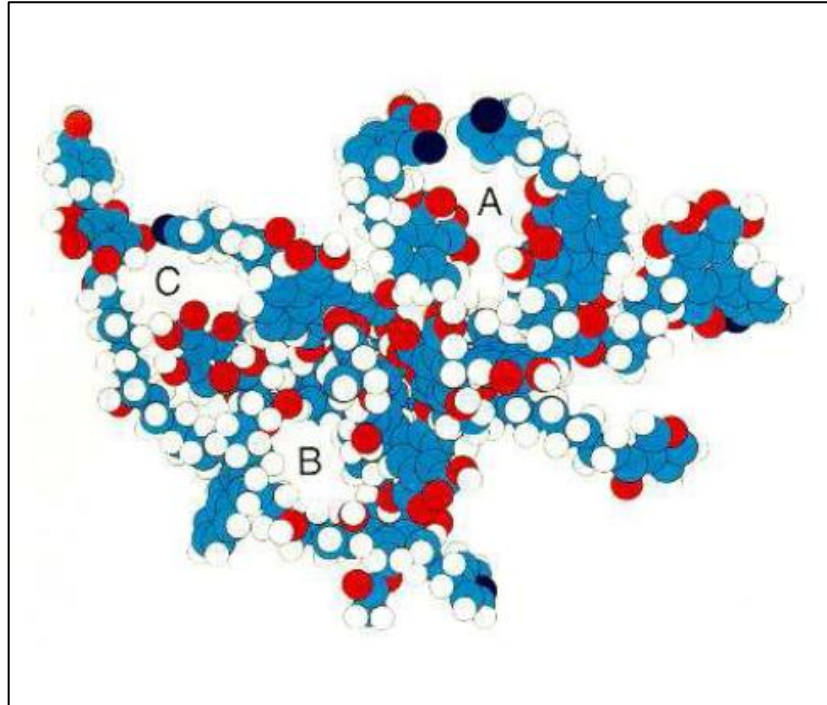
FIGURA 8 - Estrutura proposta por Schulten e Schnitzer (1993) para o ácido húmico – modelo bidimensional



FONTE: Schulten e Schnitzer, 1993.

Baseada na estrutura molecular da figura 8, os autores Schulten e Schnitzer, propuseram um modelo tridimensional para o AH, em 1997, em que as estruturas das substâncias húmicas contêm espaços vazios de diferentes tamanhos que poderiam interagir com outros compostos orgânicos (hidrofílicos ou hidrofóbicos) e também elementos inorgânicos (como argilas e óxidos-hidróxido) e seriam compostas por carbono, oxigênio, nitrogênio e hidrogênio. A figura 9 mostra esse modelo estrutural proposto pela teoria macromolecular.

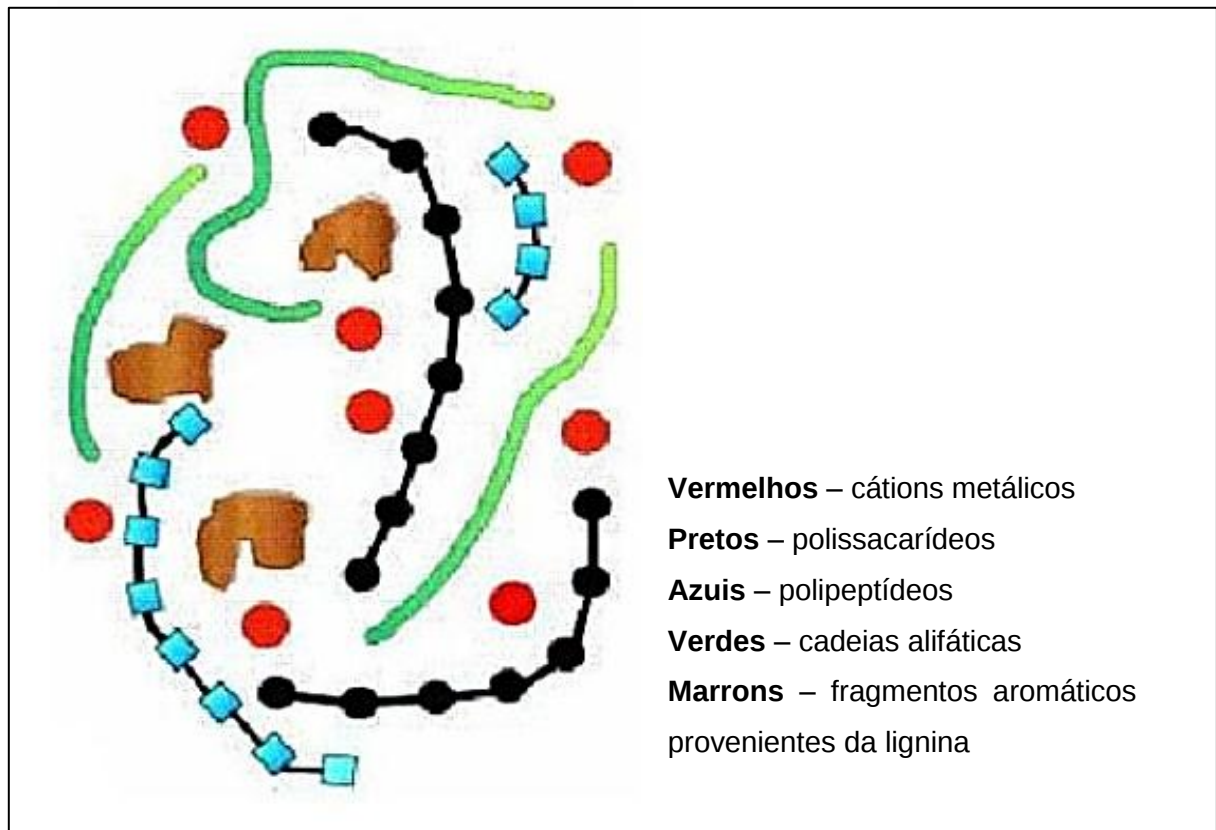
FIGURA 9 - Estrutura proposta em 1997 por Schulten & Schnitzer, para o Ácido Húmico pela teoria macromolecular, em 3 dimensões. Carbono = azul; oxigênio = vermelho; nitrogênio = preto e hidrogênio = branco. As letras A, B e C indicam os espaços “vazios” presentes na molécula capazes de interagir com outros compostos orgânicos e inorgânicos.



FONTE: Adaptado de Schulten & Schnitzer, 1997.

Nas estruturas mais recentes, as SH não possuiriam estruturas extremamente complexas e seriam formadas pela agregação de pequenas moléculas, conforme estudos baseados em técnicas de separação de componentes como cromatografia e utilizando eletroforese capilar (PICCOLO, *et al.*, 2000). O outro modelo que tenta explicar as características das SH é o Supramolecular, criado após Conte e Piccolo (1999) determinarem, através de análise cromatográfica que as SH dissolvidas consistiriam em agregados de moléculas relativamente pequenas de massa molecular variável e mantidos por interações, como as ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas. O modelo Supramolecular para as SH, ilustrado na figura 10, proposto por Simpson *et al.* (2002), ilustra como as principais estruturas identificadas poderiam formar um agregado na presença de cátions metálicos de ocorrência natural nos ecossistemas terrestres (MARTINS, 2010).

FIGURA 10 - Modelo Supramolecular para as SH proposto por Simpson *et al.*(2002).



FONTE: Simpson *et al.*, 2002.

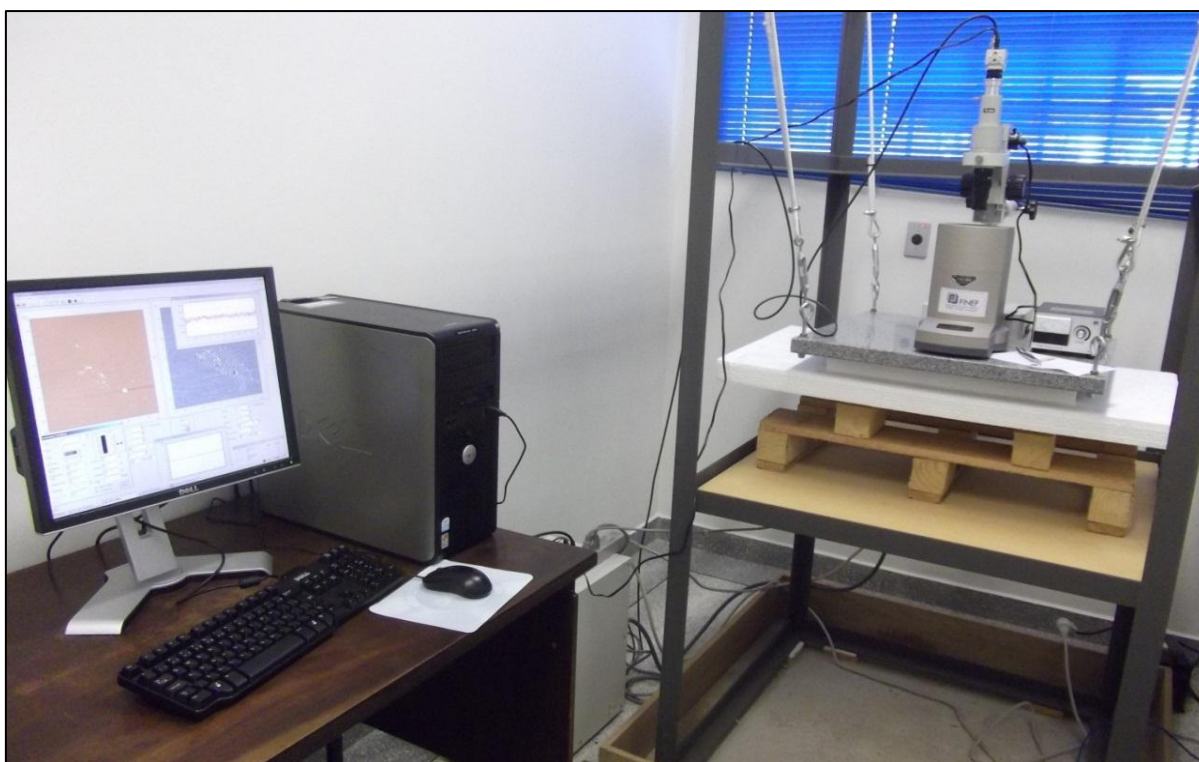
O modelo que melhor descreve as SH, segundo Sutton e Sposito (2005), seria aquele que propõe que as SH são agrupamentos de diversos componentes de massa molecular relativamente baixa em que suas associações sejam estabilizadas por interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio.

3. MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA

3.1. PRINCÍPIO FUNDAMENTAL DO FUNCIONAMENTO DO MICROSCÓPIO DE FORÇA ATÔMICA

Para obtenção das imagens de ácido húmico nesta dissertação, foi utilizado o Microscópio de Força Atômica da Shimadzu – 9600, do Laboratório de Multiusuários da Universidade Estadual de Ponta Grossa – UEPG (Figura 11).

FIGURA 11 - Microscópio de Força Atômica - Shimadzu 9600 - Laboratório de Multiusuários da UEPG.



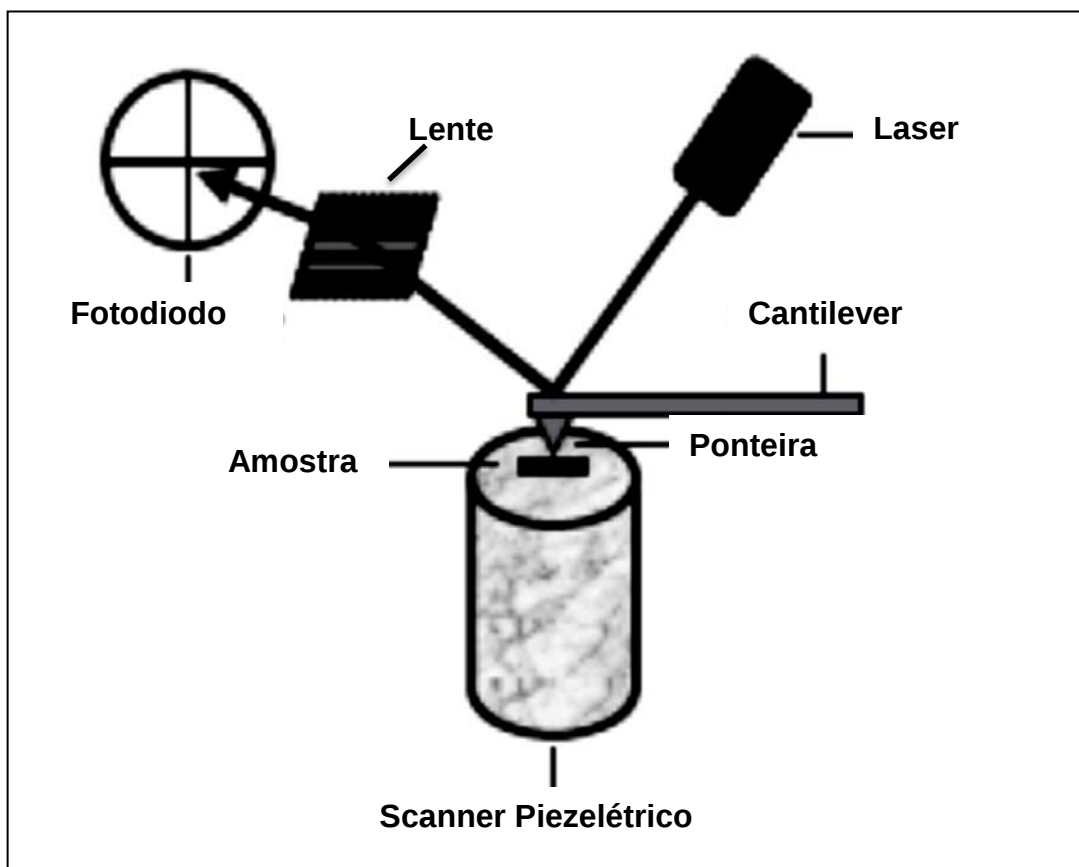
FONTE: A autora.

O Microscópio de Força Atômica tem como princípio fundamental a medida das deflexões de um braço ou suporte (de 100 a 200 μm de comprimento - *cantilever*) onde em sua extremidade livre está montada a sonda (ponta). Estas deflexões, no *cantilever*, são causadas pelas forças que agem entre a ponta e a amostra. Foi desenvolvido, após observação, que a ponta do STM exerce forças sobre a superfície da amostra na mesma ordem das forças interatômicas, e a AFM usa interação entre as forças sonda-amostra para traçar o mapa da superfície (FUKUI, 1992). Os modos de obtenção das imagens - de varredura ou de operação - referem-se à esta distância mantida entre a sonda (ponteira) e a amostra, no

momento da varredura, e às formas de movimentar a ponteira sobre a superfície a ser estudada.

O princípio de funcionamento de um microscópio de força atômica é baseado na reflexão da luz de um feixe de laser por um espelho. Após a reflexão, a luz do laser passa por uma lente e incide sobre um fotodetector de quatro seguimentos (Figura 12). A força que o raio de luz exerce sobre o *cantilever* é desprezível.

FIGURA 12- Esquema do princípio de funcionamento do Microscópio de Força Atômica.



FONTE: Ferreira e Yamanaka, 2006.

A incidência do feixe de laser no fotodetector provoca o aparecimento de uma diferença de potencial (ddp) em suas extremidades. Esta ddp depende da área iluminada pelo feixe de laser que, por sua vez, depende da altura da ponta de prova. Este método é muito sensível à asperezas na superfície da amostra. Entretanto, tem a desvantagem que o *cantilever* pode esquentar, mudando sua reflexão. Para isso, usa-se, em geral, laser de HeNe, que não aquece (ZANETTE, 1997).

A posição da ponta de prova varia conforme o relevo da superfície em estudo e a luz que o *cantilever* reflete e que se move sobre o fotodetector. Com isso, a ddp gerada pelo fotodetector traduz os deslocamentos da ponta durante a varredura. Estes deslocamentos são medidos com a amplificação da ddp gerada no fotodetector. As mudanças que ocorrem na saída do fotodetector são utilizadas para ajustar o scanner piezelétrico na direção vertical z , cujo valor é registrado em função das coordenadas (x,y) , para depois ser traduzido em topografia $z(x,y)$. As coordenadas x,y também são monitoradas através de voltagens aplicadas nos scanners piezelétricos colocadas nos *drives* x e y do *scanner*, assim como em z .

O fotodetector funciona como uma bateria variável (depende da incidência de luz) e seu sinal funciona como entrada para o amplificador operacional. A saída do amplificador operacional é conectada a um computador ou a um registrador gráfico (plotter) para a coleta e armazenamento dos dados que podem ser transformadas em imagens topográficas da superfície bidimensionais ou tridimensionais (FERREIRA E YAMANAKA, 2006). Isto permite uma menor agressividade sobre a amostra e a detecção de superfícies. O processo de conversão de variação do sinal no fotodetector para a variação de altura da amostra é complexo, e o método mais utilizado na geração de imagens topográficas é realizado determinando uma força fixa que se deseja aplicar sobre a amostra, ou seja, determina-se um valor do sinal que será constantemente observado pelo fotodetector.

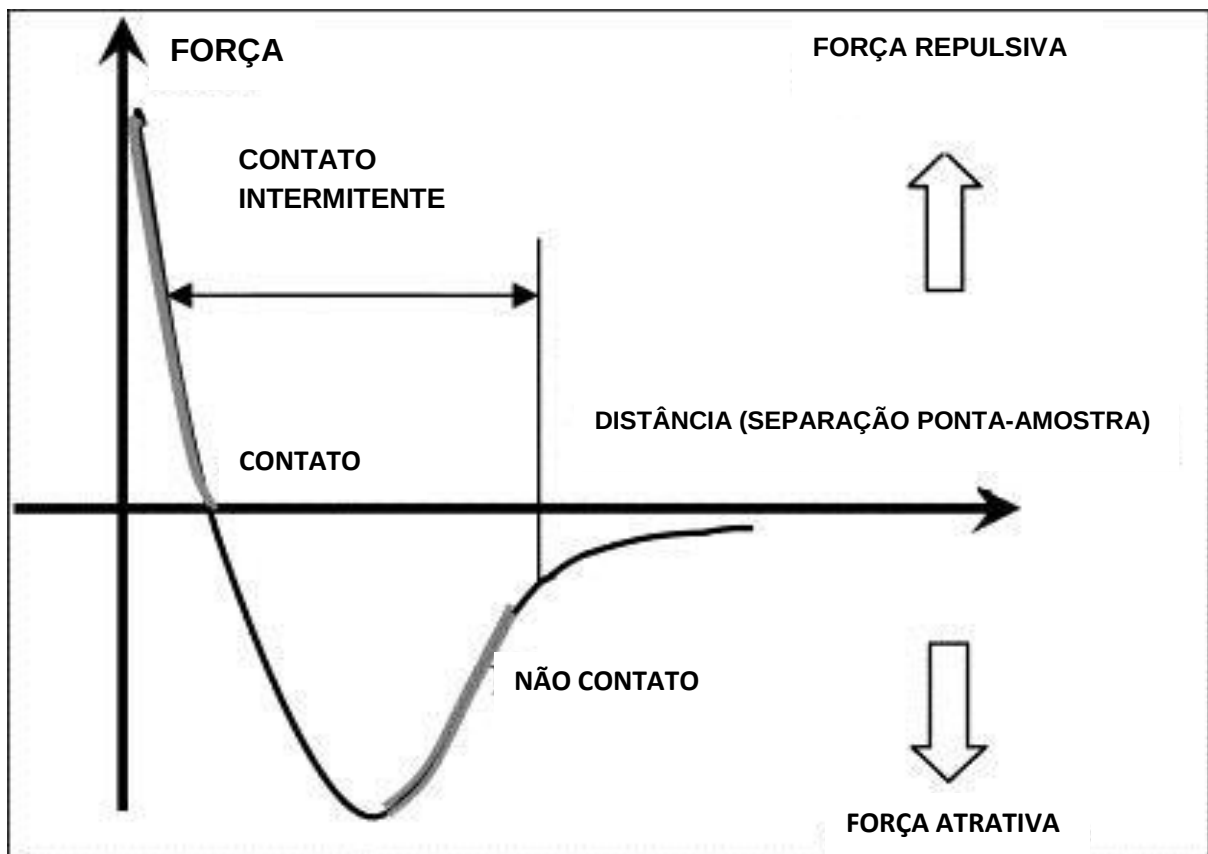
O computador, durante a varredura, ajustará a posição vertical da amostra através do "*scanner*" piezelétrico, de maneira a manter a força ou o sinal, no valor previamente determinado. A variação de altura no "*scanner*" corresponde exatamente à variação topográfica na amostra, e, assim, é revelada diretamente a morfologia da amostra, sem a necessidade de conversão do sinal do fotodetector. As forças de interação sonda-amostra podem ser atrativas ou repulsivas, que vão depender da distância mantida entre a sonda-amostra (NEVES, VILELA E ANDRADE, 1998).

3.2. FORÇAS QUE AGEM ENTRE A PONTA E A AMOSTRA E OS MODOS DE OPERAÇÃO DO AFM

O Microscópio de Força Atômica opera medindo forças entre a ponta e a amostra. Conforme a distância entre a ponta e a superfície, o tipo de força de interação entre elas variam e, assim, se definem os tipos de operação (também conhecido como modos de varredura).

Quando a ponta se aproxima da amostra, em um primeiro momento, a força de interação entre elas é predominantemente atrativa, devido às forças químicas do tipo de Van der Waals. Quando a ponta aproxima-se mais da superfície, os átomos de ambas estão tão próximos que seus orbitais eletrônicos começam a se repelir. Esta repulsão eletrostática enfraquece a força atrativa à medida que a distancia diminui. Quando a distância entre os átomos for da ordem de alguns ângstrons (da ordem da distância característica de uma ligação química) a força se anula. A partir do momento em que as forças se tornam positivas, os átomos da ponta e da amostra estão em contato, predominando, assim, as forças repulsivas (ZANETTE, 2010). Na figura 13 estão representadas essas forças que agem entre a ponteira e a amostra em função da distância que as separa e os modos de operação.

FIGURA 13 - Forças entre a ponta e a amostra em função da distância entre elas e os modos de operação.



FONTE: Jalili e Laxmiranayana, 2004.

Na área abaixo da linha de força nula, as forças são atrativas. Acima da linha do zero, as forças são repulsivas. As forças atrativas e repulsivas, na figura 13, são forças provenientes do potencial de interação entre dois ou mais átomos (Lennard-Jones), ou qualquer outro potencial de interação entre átomos, com uma dependência desse tipo em r , ou seja:

$$U(r) = \frac{A}{r^{12}} - \frac{B}{r^6} \quad (Eq. 1)$$

Sendo r a posição da ponteira em relação à superfície, e as letras A e B constantes de parâmetros empíricos.

O potencial é repulsivo na forma A/r^{12} , onde A é uma constante positiva. O potencial atrativo de longo alcance é dado por $-B/r^6$ e a força entre dois átomos é dada por $-dU/dr$. O potencial de Lennard-Jones tem a forma típica de basicamente todos os potenciais interatômicos: atrativo à longas distâncias, repulsivo à curtas distâncias, com um mínimo que indica a distância de equilíbrio entre dois átomos (KITTEL, 1978).

São muitas as forças existentes, portanto, é difícil classificá-las. Como exemplo, as forças intermoleculares podem ser classificadas em três categorias: 1. forças de origem, puramente eletrostáticas, que seriam as forças coulombianas entre cargas, dipolos permanentes ou quadrupolos; 2. forças de polarização, provenientes dos momentos dipolares induzidos nos átomos e nas moléculas por campos elétricos de cargas vizinhas e/ou dipolos permanentes e 3. forças de natureza mecânica quântica, que dão lugar às ligações covalentes – incluindo as interações de transferência de cargas – e às interações repulsivas de intercâmbio (devido ao princípio de exclusão de Pauli) e que são as que equilibram as forças atrativas a distâncias muito curtas. Já as forças de van der Waals não se enquadram dentro deste tipo de classificação e referem-se à elas, como forças intermoleculares atrativas de longo alcance e repulsivas de curto alcance (ZANETTE, 1997).

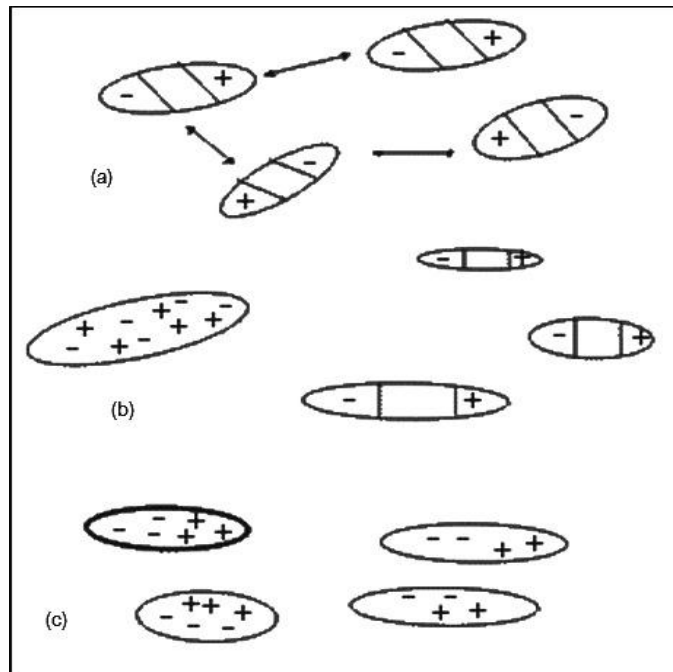
Para dois corpos eletricamente neutros e não magnéticos, mantidos à distâncias entre uma e algumas dezenas de nanômetros, predominam estas forças de atração à "grandes" distâncias. As interações das forças de van der Waals devido especificamente às flutuações dos elétrons em moléculas ficaram conhecidas com o nome de *London*, de flutuação de cargas, eletrodinâmicas, ou de dispersão, estão presentes até em moléculas polares permanentes e são, em geral, a maior

contribuição para as forças intermoleculares. É por isso que elas têm um papel muito importante em fenômenos diversos, tais como: adesão, tensão superficial e muitos outros.

A interação repulsiva de distâncias curtas origina-se no princípio de exclusão de Pauli, pois dois férmions não podem estar no mesmo estado, isto é, com o mesmo spin, o mesmo momento angular, a mesma componente z do momento angular e a mesma localização espacial. As forças de van der Waals, agindo entre dois átomos ou moléculas, podem ser classificadas em forças de orientação, de indução e de dispersão e estão representadas na figura 14. Nesta figura, as forças de orientação resultam da interação entre duas moléculas polares com momentos dipolares permanentes. As forças de indução, figura 14 (b), se devem à interação de uma molécula polar e uma não polar, onde a polar induz uma polaridade nas vizinhanças da outra. O campo elétrico da molécula polar destrói a simetria da distribuição de cargas da molécula não polar, resultando em uma atração semelhante à registrada entre moléculas polares.

As moléculas não-polares possuem dipolos flutuantes finitos e momentos multipolares grandes em intervalos de tempo muito curtos, os quais interagem, dando lugar à forças de dispersão entre elas. Para as moléculas não polares, a distribuição eletrônica é, em média, simétrica. Mas, a cada instante, uma parte da molécula possui mais elétrons que outra. Assim, cada molécula (ou átomo) se comporta como polar, mas esta "polarização" varia constantemente em grandeza e direção. Na figura 14 (c) estão presentes os momentos flutuantes.

FIGURA 14 - Representação das forças de Van der Waals. a) Forças de orientação; b) Forças de indução; c) Forças de dispersão.



FONTE: Zannete, 1997.

As forças de Van der Waals já foram estudadas experimentalmente durante muito tempo antes da invenção dos microscópios de varredura com sonda. Para isto, foram utilizados aparelhos como o *surface force apparatus*, instrumento mecânico que utiliza interferometria para medir distâncias e cuja resolução chega a 10^{-8} N. Para este tipo de medidas, o Microscópio de Força Atômica é capaz de conseguir resolução de 10^{-10} N (ZANETTE, 2010).

3.3. MODOS DE OPERAÇÃO DA AFM

A AFM possui vários modos de varredura e necessita, para cada um deles, a ponta adequada para respectiva medição. São eles: o Modo Contato, o Modo Dinâmico (Tapping) ou Não-Contato, o Modo Fase (phase), o Modo Força Magnética (MFM), o Modo Força Lateral (LFM), dentre outros que necessitam, além da ponta, acessórios adicionais para a medição.

Os diferentes modos de se obter uma imagem, como na figura 13 (ou modos de operação), se referem à distância mantida entre a sonda e a amostra no momento da varredura, e as formas de movimentar a ponteira sobre a superfície estudada. Na AFM, a ponta permanece fixa e a amostra se move com uso de

cerâmicas piezelétricas nas direções dos três eixos ortogonais que, por sua vez, dependem das forças líquidas entre a ponteira e a amostra (CHICHESTER, 1998).

O modo mais básico é o modo contato. Neste caso, a agulha varre a amostra e mantém a menor distância possível, sendo a poucos angstroms da superfície, na faixa das distâncias interatômicas (HERMANN *et al.*, 1997). As forças envolvidas são forças de repulsão. A ponta faz um leve “contato físico” na amostra que produz imagens com alta resolução, sendo necessário um cuidado grande para que a agulha não danifique a amostra por causa da compressão e das forças geradas durante a varredura (FERREIRA e YAMANAKA, 2006). Esse modo é melhor para amostras mais rígidas, pois para amostras mais frágeis e sensíveis pode ocorrer a deformação das mesmas.

A força de interação entre a sonda e a amostra, pode ser observada na figura 13. Nota-se que a direita da curva os átomos estão separados por uma grande distância e, quando se aproximam, gradativamente eles são atraídos fracamente um pelo outro. Estes átomos ficam tão próximos que seus orbitais eletrônicos começam a repelir. A repulsão eletrostática enfraquece a força atrativa quando a separação interatômica continua a diminuir. A força atinge um valor nulo quando a distância entre os átomos está em torno da ordem de alguns angstroms (do comprimento de uma ligação química). Quando a força de Van der Waals torna-se positiva os átomos estão em contato predominando as forças repulsivas (HOWLAND e BENATAR, 2005).

Neste modo a força realizada pela ponta da AFM é calculada através da multiplicação da deflexão do *cantilever* pela sua constante de mola (Equação 2). Assim, se um *cantilever* com uma constante de mola de 1 Newton/metro (N/m) é defletida de 1 nanômetro (nm), a força de mola realizada pelo *cantilever* é de 1 nN (10^{-9} N).

$$\vec{F} = -k.\vec{Z} \quad Eq.(2)$$

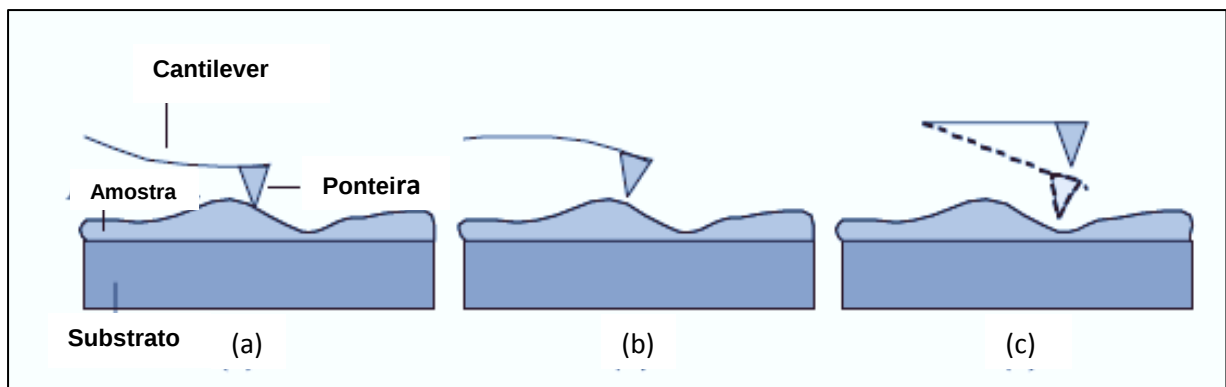
onde: $\vec{F}$ é a força em Newtons (N), k é a constante de mola ($N \cdot m^{-1}$) e $\vec{Z}$ é o valor da deflexão do *cantilever*.

A pequena força repulsiva entre a agulha e a amostra é da ordem de 10^{-6} a 10^{-9} N, neste modo contato (HERRMANN *et al.*, 1997).

A figura 15 apresenta os modos de operação da AFM. Ela demonstra que, durante a varredura no modo contato, quando o *cantilever* pressiona a ponta contra

a amostra, ele se curva forçando os átomos da ponta a se aproximarem dos átomos da amostra. Pode ocorrer deformação da superfície da amostra se um *cantilever* rígido exercer uma força muito grande sobre a amostra, pois a separação interatômica entre os átomos da ponta e da amostra irá diminuir muito (HOWLAND e BENATAR, 2005).

FIGURA 15 - Representação esquemática dos modos de operação em AFM: (a) modo contato, (b) modo não contato e (c) modo intermitente.



FONTE: Ferreira e Yamanaka, 2006.

Além das forças de van der Waals, durante a varredura, no modo contato, estão presentes duas outras forças: a de capilaridade, devido a uma fina camada de água frequentemente presente no ambiente (força atrativa de aproximadamente 10^{-8} N, da ponta com a amostra), e a exercida pelo próprio *cantilever*, que é semelhante à força de compressão de mola. As características do *cantilever*, tais como: geometria, frequência de ressonância e material utilizado em sua construção, são fundamentais para um bom desempenho no processo de obtenção de imagens (ZAVALA, 2008).

O modo não contato (NC) é uma técnica na qual o *cantilever* vibra próximo à superfície da amostra. O espaçamento entre a ponta e a amostra é da ordem de 10 – 100 nm. A força interatômica entre o *cantilever* e a amostra neste modo é a força atrativa (de longo alcance, em grande parte resultado das de Van der Waals, a eletrostática e a força de dipolo magnético) (HOWLAND e BENATAR, 2005). A ponta oscila em alta frequência (100 kHz a 1 MHz) (FERREIRA E YAMANAKA, 2006).

A força total entre a ponta e amostra, neste modo não contato, é bem menor do que no modo contato, ou seja, em torno de 10^{-12} N, minimizando a deformação da superfície da amostra devido ao menor contato físico entre a ponta e a amostra

(FROMMER, 1996). Nesta região, o *cantilever* de AFM se enverga na direção da amostra como mostrado na figura 15 (b).

Eletronicamente, a frequência do *cantilever* pode ser ajustada para o valor da frequência de ressonância, f , (frequência tipicamente de 100 a 400 kHz) permitindo, assim, uma maior sensibilidade que é dada pela Equação 3:

$$f = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{K}{m_{ef}}} \quad (\text{Eq. 3})$$

onde K é a constante elástica do *cantilever* e m_{ef} é a massa efetiva do *cantilever*. Na presença da amostra, a frequência de ressonância altera-se da frequência de ressonância original (MONTEIRO, 2009).

Nota-se que, apesar de não haver contato físico entre a ponta e a amostra, este é o modo mais indicado para superfícies macias ou elásticas, pois é a menos destrutiva, o que conduz a um maior tempo de vida da ponta (FALCÃO, FERREIRA e PINTO, 2009). Para amostras mais rígidas, os modos contato e não contato são igualmente eficientes para gerar a imagem topográfica. Neste modo, também pode ser obtida a imagem topográfica de amostras isolantes, semicondutoras e condutoras. Os *cantilevers* usados no modo não contato devem ser rígidos, pois se forem flexíveis podem ser puxados e colocados em contato com a superfície da amostra (HOWLAND e BENATAR, 2005).

O princípio de funcionamento do modo contato intermitente, também conhecido por “*quasi non-contact*” ou “*tapping mode*”, é similar ao modo não contato, isto é, o *cantilever* vibra, por intermédio de um sistema piezelétrico, próximo a sua frequência de ressonância (HERRMANN *et al.*, 1997). Assim, a ponta toca a superfície da amostra levemente e periodicamente (oscilando), o que tende a ser menos destrutivo, pois é eliminada a força de atrito entre a ponta e a amostra, conforme mostra a figura 15 (c) (FALCÃO, FERREIRA e PINTO, 2009).

Neste modo, a agulha oscila com uma amplitude de vibração do *cantilever* entre 20 e 100 nm, mas somente “toca” na amostra por um período de tempo curtíssimo do tempo total de vibração - a agulha salta para fora da amostra entre 50.000 a 500.000 vezes por segundo (HERRMANN *et al.*, 1997).

O modo intermitente, em geral, é mais eficiente que o modo não contato, pois obtêm imagens de grandes áreas e que podem conter grandes variações da topografia, além de superar algumas limitações das técnicas de AFM nos modos não

contato e contato (HOWLAND e BENATAR, 2005). As superfícies são menos modificadas no modo intermitente quando comparadas com as superfícies no modo contato (FERREIRA E YAMANAKA, 2006). Este modo é utilizado em materiais biológicos, polímeros e amostras demasiadamente rugosas, pois estes são maleáveis e deformáveis pela ponta nos outros modos.

O modo fase para obter a imagem de fase é realizado através da monitorização entre o sinal aplicado ao *cantilever* e a sua real oscilação e da diferença de fase, o que resulta no amortecimento da vibração, por interação da ponta com a superfície da amostra, e depende das propriedades da superfície da mesma, como as propriedades mecânicas, fricção e adesão (FALCÃO, FERREIRA e PINTO, 2009). Neste modo é possível a perfeita visualização entre a amostra e o substrato de mica.

Outro modo de operação, o de força lateral, a agulha é varrida na direção perpendicular ao seu comprimento, ou seja, lateralmente ao eixo de varredura mais rápida. A torção ou rotação do *cantilever* irá aumentar ou diminuir dependendo das características de fricção da superfície, sendo que um aumento da fricção irá aumentar a torção resultante (HERRMANN *et. al.*, 1997). Nesse modo os movimentos do *cantilever*, em resposta a variações na topografia da superfície, são detectados por variações na corrente do fotodetector, utilizando, assim, estas variações da corrente de saída do detector para fazer a imagem de força lateral.

A topografia neste modo é realizada em força constante e usando a voltagem para manter a distância entre a ponteira e a amostra. Isto é feito a partir da medição da diferença entre a saída das metades superior e inferior do fotodetector de quatro setores. Quando o *cantilever* entortado no eixo z, as quantidades relativas de luz que batem nas metades superior e inferior mudam, fornecendo assim dados topográficos. Este modo pode ser usado para ajudar na interpretação de imagens, assim como para estudos de tribologia, efeitos de contato (ZANNETTE, 1997).

No modo Força Magnética é utilizado um cantilever oscilante com uma ponta recoberta por um filme de material magnético permanentemente imantado. Esse modo produz imagens tridimensionais resultantes da interação da ponta com a superfície magnética da amostra. Durante a varredura, a ponta oscila acima da superfície e sofre influência do campo magnético da amostra, o que altera seu movimento. A variação na frequência é proporcional ao gradiente do campo magnético na direção vertical, aplicado à ponta pela superfície e pode ser detectada

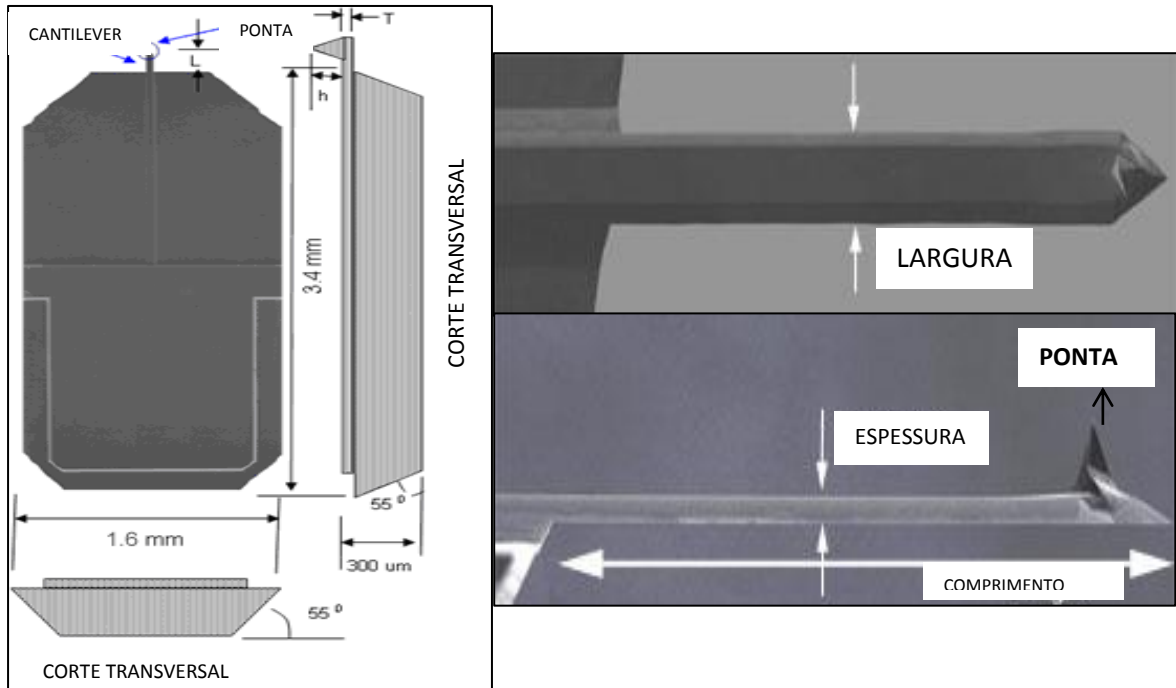
por fase, por amplitude ou pela medida direta da variação da frequência. A imagem obtida fornece informações de topografia e propriedades magnéticas da superfície analisada. Com a varredura da ponta sobre a superfície da amostra é possível obter informações de domínios magnéticos existentes (SANTOS, GHENO e KURI, 2007)

3.4. CANTILEVER E PONTEIRA

Como já foi visto anteriormente, as características do *cantilever*, como geometria e material utilizado para sua construção, e da ponta (sonda), como a forma e o tamanho, são parâmetros essenciais para a análise da amostra. Assim, de acordo com o tipo de interação entre a ponta e a superfície da amostra, que depende da separação entre ambas, caracteriza o modo de operação do AFM. A componente mais crítica num AFM corresponde ao *cantilever*, que pode ser visto como um sistema massa/mola (FALCÃO, FERREIRA e PINTO, 2009). Esses dois últimos são os elementos sensores dos microscópios de varredura por força. O *cantilever* mede a força de interação entre a ponta e a amostra, e a ponta colocada no final do *cantilever*, que pode ter forma de **v** ou de haste, em geral, retangular, vai mapear a amostra (HERRMANN et. al, 1997).

Atualmente, os *cantilevers* são feitos de óxido de silício (SiO_2), nitreto de silício (Si_3N_4) - para o modo contato, ou silício puro - para o modo não contato ou intermitente. Utilizam-se técnicas de fotolitografia, com ponteiros piramidais ou cônicas, para as quais se conseguem raios menores de 300 Å (ZANNETE, 1997). A figura 16 ilustra um suporte que contém um *cantilever* de silício e uma ponta.

FIGURA 16 - Representação de um suporte (“chip”) com *cantilever* e ponta.

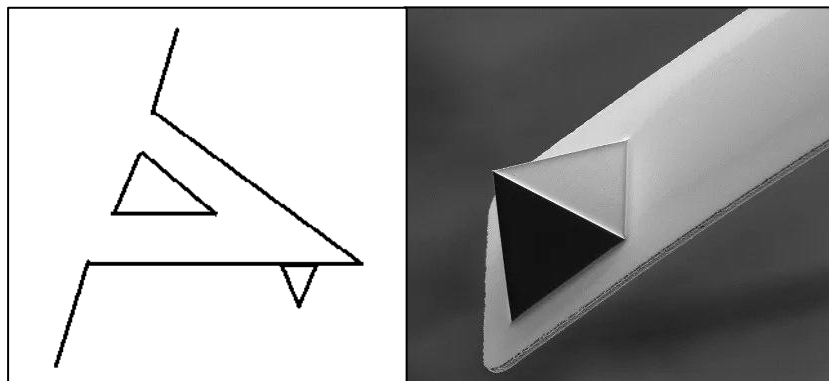


FONTE: Nano Science Instruments, 2012.

Existe uma variedade de constantes de mola para os *cantilevers* comerciais, desde 0,01 até 100 Newtons/metro, e oferece uma vasta gama de opções de medida para uma infinidade de materiais.

Deve-se conhecer o material da amostra, a geometria e composição das pontas (ponteiras ou sondas) para obter bons resultados. As ponteiras piramidais (figura 17) são as mais comuns em AFM. Consiste em uma pirâmide de nitreto de silício, cuja base é um quadrado de aproximadamente 5 μm de lado e o raio da ponteira da ordem de 1000 Å. Existem, também, ponteiras piramidais de base triangular.

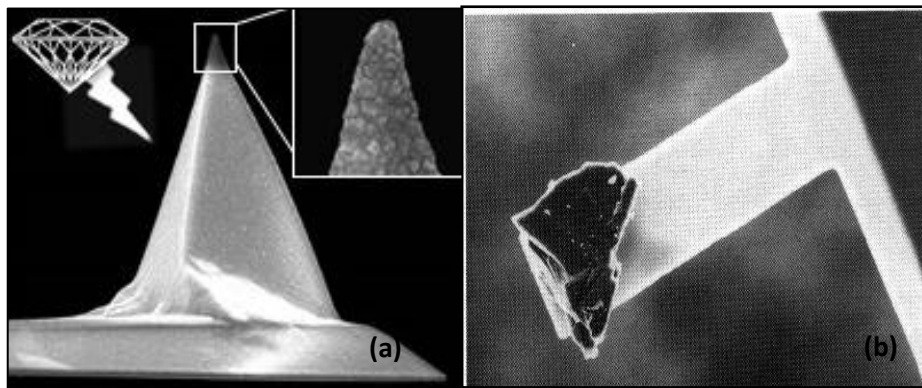
FIGURA 17- *Cantilever* com ponteira Si_3N_4 na forma piramidal.



FONTE: Adaptado de Pojar, 2011.

As ponteiros por deposição química de vapor, na figura 18, são muito finas e podem ser feitas com um feixe de elétrons combinado com deposição química de vapor. Algumas ponteiros possuem diamante na extremidade de uma ponteira padrão piramidal, figura 18 (a), e outras possuem diamante em sua composição, figura 18 (b), o que as torna muito rígidas. Outras dimensões típicas são: 1,5 a 2 μm de comprimento e raio de 100 Å.

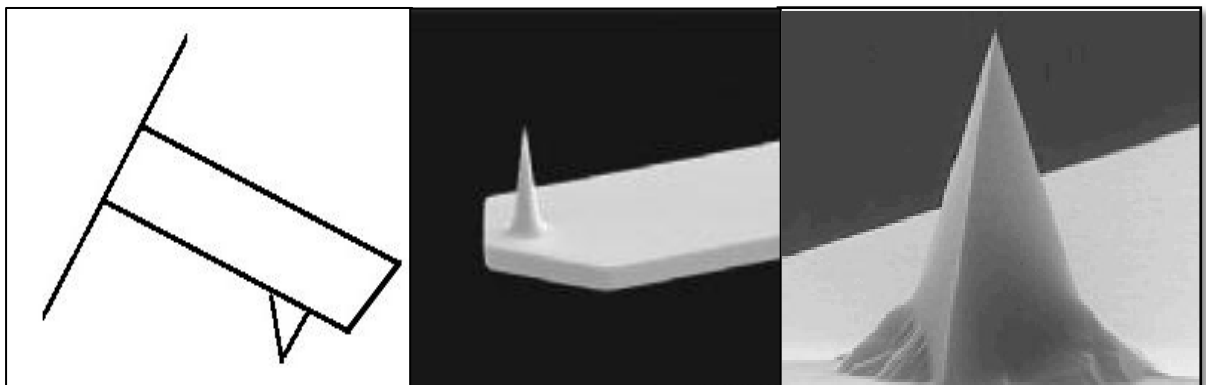
FIGURA 18 - *Cantilever* de SiO_2 (a) com diamante na composição da ponta e (b) ponte de diamante sem ser lapidado.



FONTE: Adaptado de Güntherodt, R. Wiesendanger, 1995.

São vendidas comercialmente, na forma piramidal, as *ponteiras piramidais gravadas*, mas trabalhadas com ácido de forma que suas extremidades fiquem muito agudas. Nas *Ponteiras cônicas de silício*, figura 19, o silício é frequentemente utilizado para fazer ponteiros sobre *cantilevers* ressonantes, para serem usadas no modo não contato. As ponteiros assim feitas, possuem raios na base do cone de 3 a 6 μm e alturas de 10 a 20 μm . Os raios das extremidades são de aproximadamente 200 Å.

FIGURA 19- *Cantilever* com ponta de Si em forma cônica.



FONTE: Adaptado de Pojar, 2011.

As ponteiros cônicas, se usadas no modo contato, quebram mais facilmente que as piramidais. A vantagem destas ponteiros feitas de silício é que elas podem ser dopadas para fazê-las condutoras tornando-as mais versáteis (ZANNETE, 1997). Elas podem ser utilizadas para fazer microscopia de força elétrica, por exemplo, ou para prevenir cargas não desejadas na ponteira e/ou na amostra.

Na tabela 1, estão sintetizados os modos para obtenção de imagens com os parâmetros para a utilização para o Microscópio de Força Atômica.

Tabela 1- Comparativo dos modos da Microscopia de Força Atômica

MODO	GRANDEZA FÍSICA AVALIADA	VARREDURA	CARACTERÍSTICAS DOS CANTILEVERS	PONTEIRA	AMOSTRA
CONTATO	Força de repulsão	A ponta entra em contato físico com a amostra	Óxido de silício e nitreto de silício, com constante de mola da ordem de 0,02 a 2 N/m	Piramidal, com raio de 1000 Å	Rígidas
NÃO CONTATO	Força de atração	<i>Cantilever</i> vibra próximo a superfície da amostra, sem tocá-la	Silício puro, com constante de mola da ordem de 10 a 80 N/m	Cônicas, com raio de 200 Å	Macias ou elásticas
INTERMITENTE	Força de atração e repulsão	A ponta toca a superfície da amostra levemente e periodicamente (oscilando)	Silício puro, com constante de mola da ordem de 10 a 80 N/m	Cônicas, com raio de 200 Å	Qualquer amostra, inclusive as que contêm grandes variações de topografias

FONTE: A autora.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1. SUBSTÂNCIAS HÚMICAS E IMAGENS DE AFM

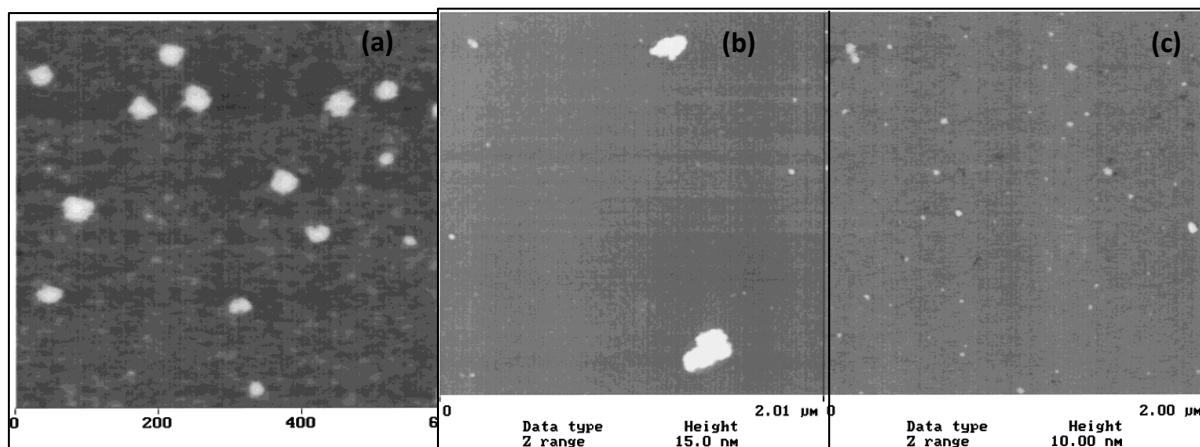
Dentre os vários trabalhos existentes sobre substâncias húmicas de solo e aquática utilizando imagens de AFM para caracterizá-las, um dos primeiros trabalhos foi o estudo do efeito do pH e da força iônica das substâncias húmicas por meio do AFM. Os autores Wilkinson *et al.* (1999) usaram o método de adsorção por camadas, onde a mica foi clivada com fita adesiva e em seguida colocada em um béquer que continha 5 mL de solução (de concentração de 10 mg L^{-1}) de ácido húmico durante 30 min. Após este período, a mica foi removida e imersa durante 30 s. em um segundo recipiente, contendo 5 mL de uma solução de pH e de força iônica semelhante. A mica foi deixada para secar em uma placa de Petri fechada.

Os autores estudaram dois ácidos húmicos. O primeiro foi um padrão da IHSS, ou seja, o AH do Rio *Suwannee* (SRHA) e o segundo foi um AH de turfa do U.K. *Geological Survey* (PHA) que nunca havia sido liofilizado. Uma solução de SRHA foi preparada em água Deionizada ultrapura com concentração de 200 mg L^{-1} . Todas as amostras foram equilibradas 24 horas antes da preparação para o AFM e utilizadas no prazo máximo de 2 semanas. As imagens foram medidas no modo intermitente.

No estudo do efeito do pH, a figura 20 (a) mostra a imagem do SRHA adsorvido em mica em pH 5,5, com macromoléculas individuais, possui forma globular e estão distribuídas homogeneamente sobre a mica. A altura média dos SRHA em $5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ NaCl}$ para diferentes pH foi de $1,3 \pm 0,9 \text{ nm}$ até o pH 3,5; $1,1 \pm 0,6 \text{ nm}$ até o pH 7,2 e $1,4 \pm 0,9 \text{ nm}$ até o pH 9,6, não ocorrendo variação significativa nas alturas, isso porque ocorre uma maior diferença na polidispersão das amostras.

Para o ácido húmico de turfa mais hidrofóbico (PHA), as imagens de AFM mostram os efeitos de pH, nas figura 20 (b) e figura 20 (c). Em pH 3,2, na figura 20 (b), há grandes agregados (altura até 22 nm) e pequenas macromoléculas (alturas de 1-3 nm) e para pH 6,8, figura 20 (c), possui um número menor de agregados e para pH neutro e básico quase ausência de agregados.

FIGURA 20 - Imagens TM-AFM, modo intermitente, adsorvidos em mica: (a) do SRHA, 10 mg L⁻¹, 50 mmol L⁻¹ de NaCl, pH 5,5, 60 nm x 60 nm, (b) do PHA 10 mg L⁻¹, 5 mmol L⁻¹ de NaCl, pH 3,2, 2 µm x 2 µm, (c) do PHA 10 mg L⁻¹, 5 mmol L⁻¹ de NaCl, pH 6,8, 2 µm x 2 µm.



FONTE: Wilkinson *et al.*, 1999.

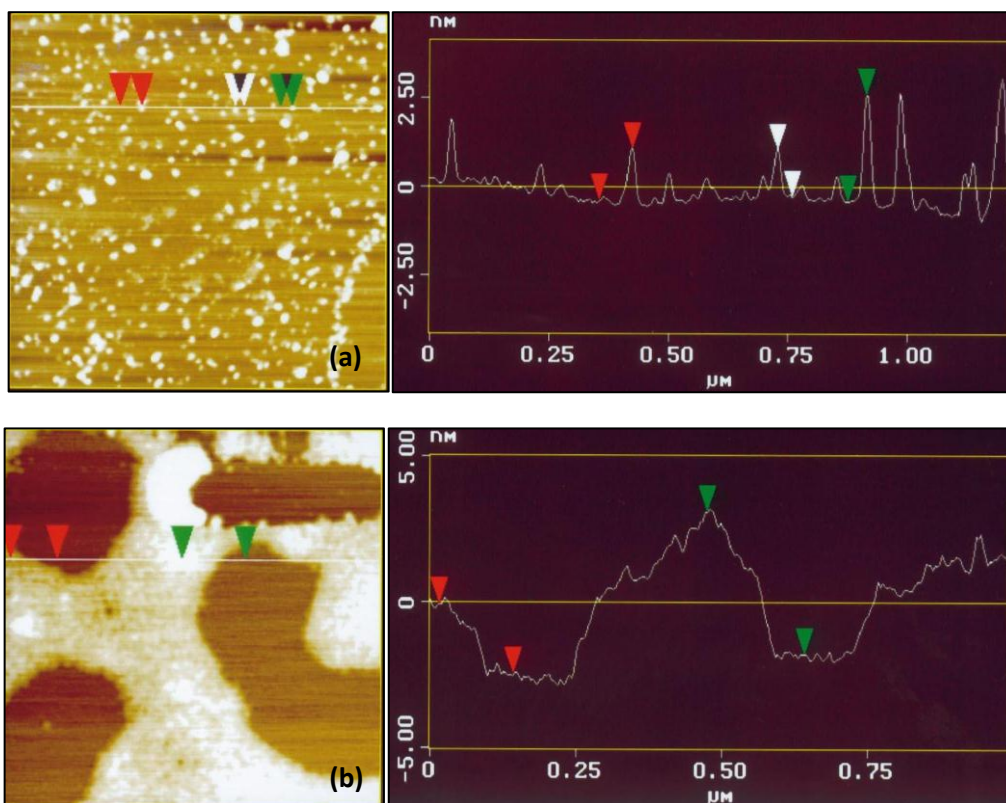
Segundo Wilkinson *et al.* (1999), a agregação das substâncias existe apenas para PHA e não para SRHA (Figura 20). Isto ocorre porque o PHA é conhecido por ser mais hidrofóbico do que o ácido húmico aquático. A função da concentração de eletrólito foi investigada a fim de determinar se as mudanças conformacionais podem ser induzidas por meio de uma modificação da força iônica a pH constante. Os experimentos foram realizados na amostra de PHA (10 mg L⁻¹, pH 7) a várias forças iônicas (5 - 500 mmol L⁻¹ de NaCl). Para forças iônicas < 500 mmol L⁻¹ de NaCl, os ácidos húmicos estão presentes, principalmente, como macromoléculas individuais, mas em força iônica igual a 500 mmol L⁻¹, foram observadas partículas grandes (agregados).

O AFM foi utilizado para medir a adsorção de AH sobre a mica no trabalho realizado por Papadopoulos *et al.* (2000). Neste trabalho, os autores utilizaram a mica como substrato que foi clivada com fita adesiva para que ficasse lisa e nivelada. A mica é utilizada por ter na superfície carga líquida negativa quando em solução. Após clivada a mica, ela foi colocada em imersão numa solução de 0,1 mol L⁻¹ de NaOH, por 15 minutos, e em seguida enxaguada com água destilada por duas vezes. Após este processo, a mica foi colocada na solução de AH por 1 hora. Então, foi retirada e lavada em água destilada, sendo feitos dois tipos de secagem: por congelamento e a secagem ao ar. A força iônica na solução foi mantida constante a 0,001 mol L⁻¹ de NaNO₃. O pH foi ajustado para valores pretendidos pela adição de

solução diluída em HNO_3 ou NaOH e inicialmente mantido o pH a 6,5. A concentração de AH foi mantido a $10,0 \text{ mg L}^{-1}$.

Nas figuras 21 (a) e 21 (b), estão os resultados encontrados pelos autores, neste trabalho de adsorção de AH sobre a mica, para as amostras secas ao ar e por congelamento, respectivamente. Apesar das diferentes estruturas no HA adsorvido, as análises mostraram resultados consistentes de alturas dos picos das camadas adsorvidas de HA nos dois casos. Como ilustrado por setas, as alturas dos picos correspondem à espessura da camada adsorvida.

FIGURA 21- Imagens em 2-D e os resultados da análise para a secção (a), uma amostra seca por congelamento e (b) uma amostra seca ao ar. Tamanho da varredura para (a) é de $1,25 \times 1,25 \text{ }\mu\text{m}$ e para (b) é de $1,0 \times 1,0 \text{ }\mu\text{m}$. O intervalo de z é de $5,0 \text{ nm}$ para ambas as amostras.



FONTE: Papadopoulos *et al.*, 2000.

As alturas de pico na figura 21 (a), da esquerda para a direita, tal como indicada com pares de flechas são de 5,6, 1,7 e 3,4 nm, respectivamente. As alturas dos picos em 21 (b), a partir da esquerda para a direita, são 2,3, 5,4 e 2,2 nm, respectivamente.

Segundo Papadopoulos *et al.* (2000), o método de secagem por congelação tem duas vantagens em comparação com o método de secagem ao ar: resfriamento brusco e movimento reduzido de moléculas à temperatura do nitrogênio líquido. Em amostras liofilizadas, é mais provável que o resfriamento brusco tenha congelado as 'caudas' e 'alças' das moléculas de HA adsorvido, mantendo, assim, a redução da água evaporada. Isto pode explicar o fato de que as camadas de adsorção tinham uma maior escala de altura do que aqueles em amostras secas ao ar. No processo de secagem ao ar, à temperatura ambiente, a secagem foi lenta, permitindo o possível movimento lateral e o alongamento das moléculas de HA ao longo da superfície da mica, enquanto a água foi evaporando. Neste caso, as moléculas se agregam lateralmente em agrupamentos moleculares de HA, explicando, assim, as camadas moleculares contínuas. Portanto, o processo de liofilização pode representar o estado de adsorção de AH úmido na mica: interface de água.

Moléculas de HA adsorvidas na superfície de mica têm uma tendência para se orientar de forma que a menor energia interfacial possa ser mantida. A interação favorável entre as moléculas de HA no processo de secagem por congelamento tem na superfície da mica orientações que maximizam a área de contato do estado sólido de interface líquido. De acordo com esta hipótese, as moléculas de HA tendem a formar uma monocamada na superfície da mica, na presença de água, devido à baixa força iônica e pH elevado (0,001 M e 6,5 , respectivamente). A altura do pico de camadas de AH adsorvidos medida no ensaio (90%) no trabalho de Papadopoulos *et al.* (2000), tem de 3,1-3,7 nm para as amostras secas ao ar e 4,2-5,7nm para a amostra liofilizada. Este valor é muito próximo do valor de raios utilizado no modelo de cálculo de uma configuração cilíndrica.

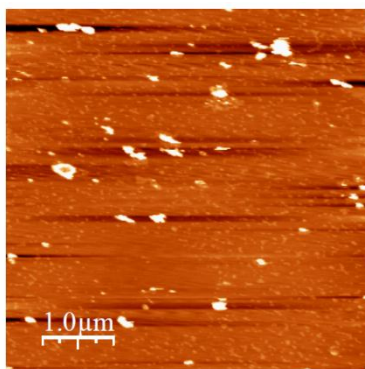
Barriquello (2005) usou a técnica de Microscopia de Força Atômica para estudar a influência de íons metálicos na estrutura de ácidos húmicos naturais (AH1) e sintetizados³ (AHS). A autora utilizou como concentração 100 mg L⁻¹ de AH naturais e sintetizados em pH 3,5, agitando esta solução durante 3 dias. As amostras foram fixadas em lâminas de mica, recém-clivadas, como substrato (sem tratamento prévio) em agitação por um dia. Após este período, as lâminas foram lavadas com água deionizada ultrapura e colocadas para secar em uma placa de

³ Ácidos húmicos sintéticos (AHS) são os produtos poliméricos devido a sensível ação de solução alcalina em polihidroxifenóis (como as hidroquinonas) e também como a p-benzoquinona (BARRIQUELLO, 2005).

Petri, em um dessecador, por 12 horas e, assim, analisadas por AFM em modo contato para obtenção das imagens.

Na imagem obtida pela AFM, figura 22, a autora observou pequenas partículas distribuídas pela superfície da mica e alguns agregados. Observou-se, também, uma tendência de interação entre as partículas adsorvidas, devido as associações intermoleculares que ocorrem entre as moléculas dos AH para valores baixos de pH. As partículas adsorvidas apresentaram aproximadamente 60 - 80 nm de diâmetro.

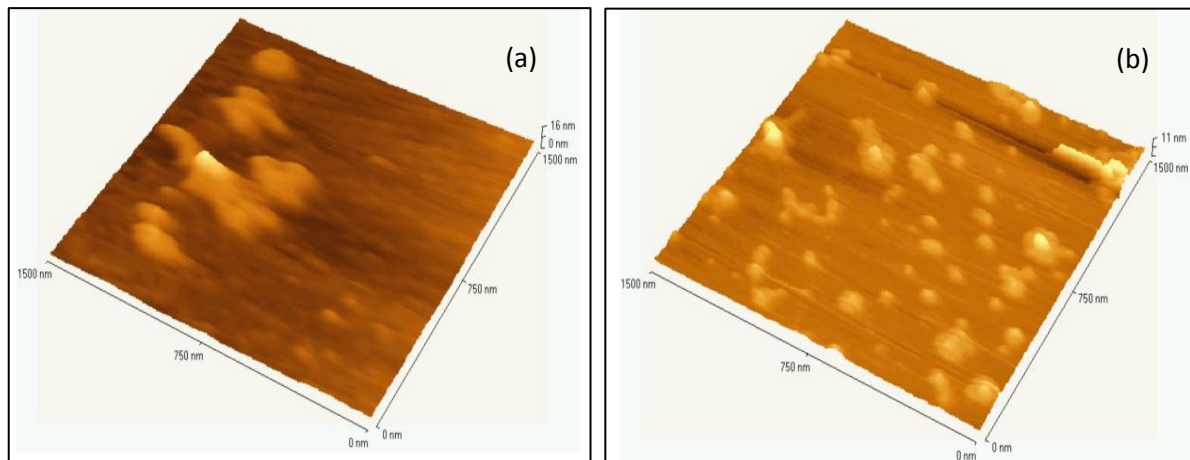
Figura 22 - Imagem através da AFM de ácido húmico extraído de solo (AH1) adsorvidos em mica para pH 3,5 usando modo contato (5 μm x 5 μm).



FONTE: Barriquello, 2005.

Os ácidos húmicos sintéticos AHSII (com p-benzoquinona) e AHSIII (com ácido 4-aminobenzóico), foram investigados nas mesmas condições dos ácidos húmicos naturais. Nas figuras 23 (a) e 23 (b), observa-se uma forma globular para as partículas e uma tendência para agregação. Os diâmetros dos AHSII foram de 140 - 150 nm e para o AHSIII de 50-60 nm. Um aumento na força iônica ou um decréscimo do pH favorecem uma conformação mais globular das moléculas dos AH devido a proteção das cargas, levando a formação dos agregados húmicos.

Figura 23 - Imagem de AFM de ácido húmico sintético sorvido em mica para pH 3,5 modo contato. (a) AHSII e (b) AHSIII.



FONTE: Barriquello, 2005.

Segundo Barriquello (2005) todas as imagens das moléculas de ácido húmico, AH1, AHSII e ASIII, sorvidos em substrato mica, apresentaram estruturas globulares.

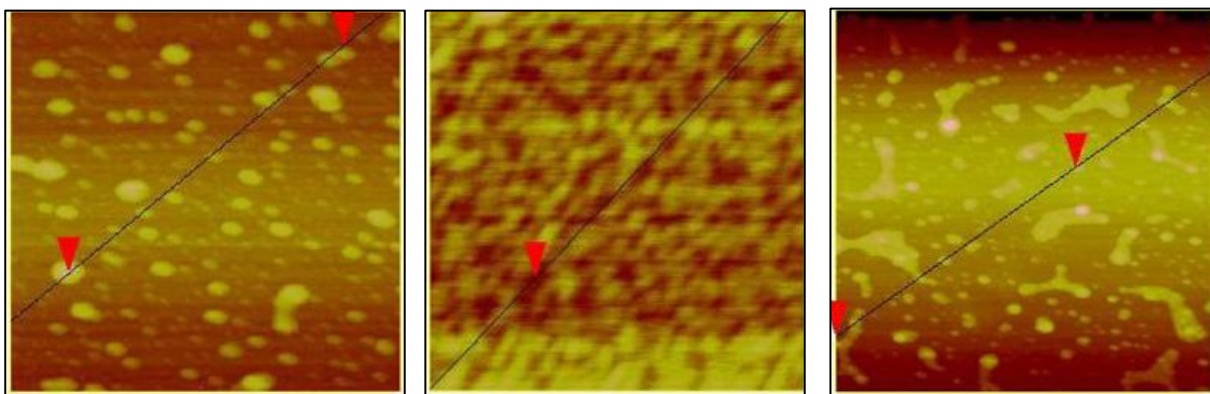
Wang *et al.* (2007), no trabalho sobre estrutura macromolecular de AH por AFM e SEM, dissolveram o AH numa solução de NaOH (a pH 9,0) para obter a concentração de AH de 100 mg L^{-1} . Em seguida, a solução padrão de AH foi usada para preparar uma solução de AH de concentração 50 mg L^{-1} a diferentes valores de pH. As medidas de AFM foram realizadas em modo contato em condições ambiente.

Na figura 24 (a), os autores mostram a imagem de AFM de colóides de ácidos húmicos em pH 4,0, com partículas esféricas e agregados com diâmetros coloidais aparentes $< 100 \text{ nm}$ e alturas que variam de $\sim 0,5$ a 7 nm . Algumas partículas são alongadas, com diâmetros e alturas na faixa de < 200 e $< 7 \text{ nm}$, respectivamente, não sendo encontrados nem a estrutura de anel ou furo no meio da estrutura. Os tamanhos e formas das partículas não são uniformes para todos os agregados, o que sugere que a agregação de AH molecular é opcional e espontânea.

Na figura 24 (b), Wang *et al.* (2007), mostram a imagem através da AFM a pH 10,0 em $0,001 \text{ mol L}^{-1}$ de NaNO_3 e é encontrada uma estrutura da rede compactada de AH. Os diâmetros e alturas dos agregados na rede compactada são menores do que as dos colóides de AH esféricos em valores baixos de pH (ver figura 24 (a)). A estrutura do HA adsorvido na superfície da mica é heterogênea com altura $< 2 \text{ nm}$. São encontrados vários pontos pequenos luminosos nas figuras 24, os

quais podem ser íons, cátions, tais como Na^+ , que formam complexos com o ácido húmico. A influência do Pb^{2+} e Na^+ na estrutura macromolecular de HA a pH 4,0 foi estudada e várias estruturas foram encontrados na imagem topográfica, figura 24 (c). Podem ser descritos como colóides esféricos, grandes agregados irregulares (estruturas heterogêneas de colóides inorgânicos presumivelmente cobertos com matéria orgânica), estruturas fibrosas e colóides alongados. Os grandes tamanhos das partículas dos colóides podem ser atribuídos a forte agregação de ácido húmico. Outros grupos funcionais, tais como ligações hidrofóbicas ou de hidrogênio, podem também contribuir para a formação de agregados.

FIGURA 24 – Perfil da linha das imagens por AFM de AH em $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ de NaNO_3 (a) em pH 4,0 (b) em pH 10,0 (c) pH 4,0 na presença de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de NaNO_3 e $4,3 \times 10^{-5} \text{ M Pb}(\text{NO}_3)_2$.



FONTE: Wang *et al.*, 2007.

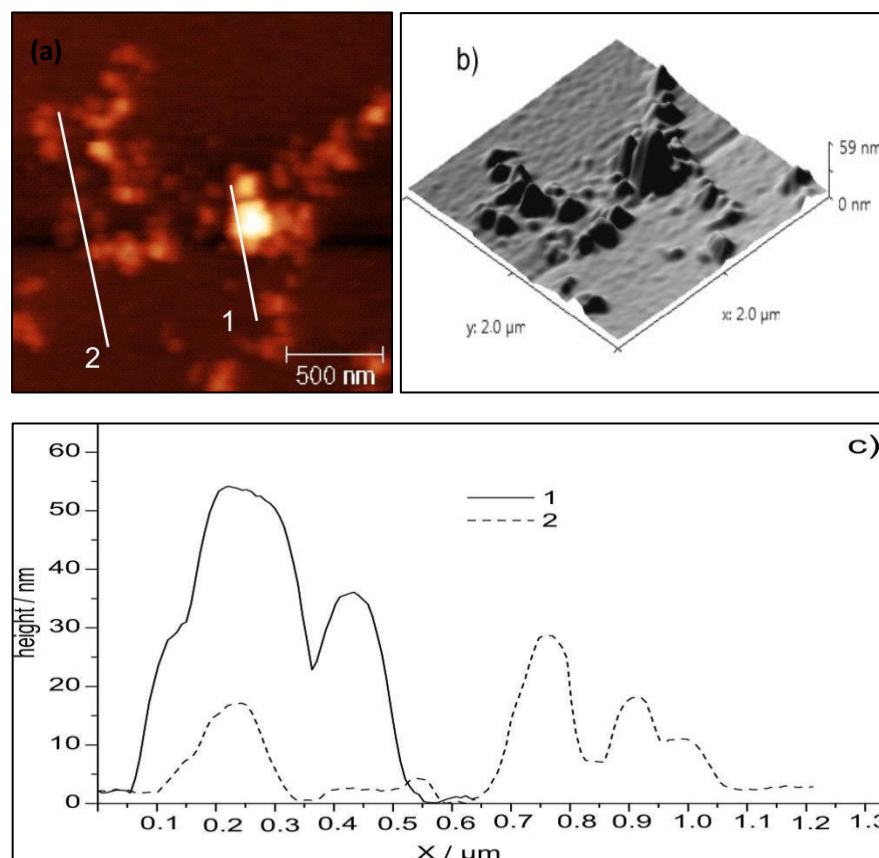
Os autores Wang *et al.* (2007), concluíram que as diferentes formas de AH, em diferentes condições, e as estruturas macromoleculares, não podem ser descritos exatamente de acordo com as condições da solução.

As imagens das amostras de ácido fúlvico (AF) de um rio brasileiro foram realizadas, por Saab *et al.* (2010), por meio do AFM em dois valores de pH: 3,0 e 9,0. Estas foram usadas para identificar alterações estruturais de AF quando o pH varia. No procedimento, que leva de 3 até 7 dias para as amostras ficarem prontas para posterior obtenção de imagens por AFM, foi utilizada a concentração de 100 mg L^{-1} de AF, com água desmineralizada. Em seguida, as soluções ficaram em agitação mecânica durante pelo menos três dias, ao abrigo da luz, antes da análise por meio do AFM. Foi utilizado HCl para o ajuste do pH em 3,0 e com NaOH e o pH foi ajustado para 9,0. O substrato de mica, com uma área de superfície de cerca de 1 cm^2 , foi clivado e introduzido num recipiente contendo 10 ml de soluções de AF.

Após um dia sob agitação constante, a mica foi retirada, lavada com água desmineralizada e colocada em uma placa de Petri, que ficou fechada num dessecador por no mínimo 12 horas antes da obtenção das imagens AFM. As imagens foram realizadas no modo contato, no AFM, e depois analisadas através do software livre Gwyddion SPM.

Os autores Saab *et al.* (2010) mostram as imagens obtidas de AF através da AFM A pH 3,0. Nas figuras 25 (a - c), podem ser vistas as imagens em 2D, 3D e a altura e diâmetro de partículas de AF, respectivamente, no substrato de mica medida a partir das duas linhas retas, indicados na figura 25 (a). Os aglomerados com a forma de pirâmides tem diâmetro em torno de 150-300 nm, e altura entre 10-55 nm, conforme foram observados na figura 25 (c).

FIGURA 25 - Imagem de AF através de AFM a pH 3,0 (a) 2D (b) 3D (c) altura representada pelos segmentos 1 e 2 da Figura 25 (a).

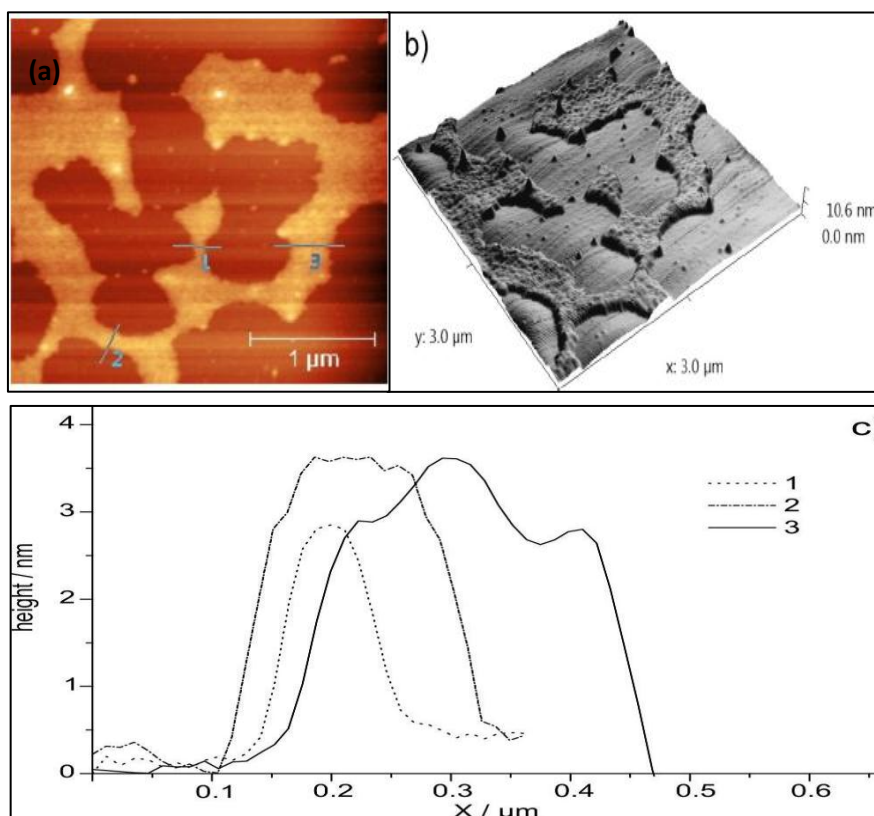


FONTE: Saab *et al.*, 2010.

No mesmo trabalho, as figuras 26 mostram as imagens de AFM do AF a pH 9,0. A figura 26 (a) indica uma distribuição mais aberta de AF no substrato de mica,

quando comparado com a imagem da figura 25 (a) em pH 3,0. A figura 26 (b) mostra a imagem em 3D, confirmando a imagem aberta de AF em pH 9,0. As dimensões podem ser observadas na figura 26 (c), onde a altura de AF na mica a pH 9,0 foi entre 2,5-4,0 nm e o diâmetro entre 100-300 nm.

Figura 26 - Imagem de AF através de AFM a pH 9,0. (a) 2D (b) 3D (c) altura representada pelos segmentos 1 e 2 da Figura 26 (a).



FONTE: Saab *et al.*, 2010.

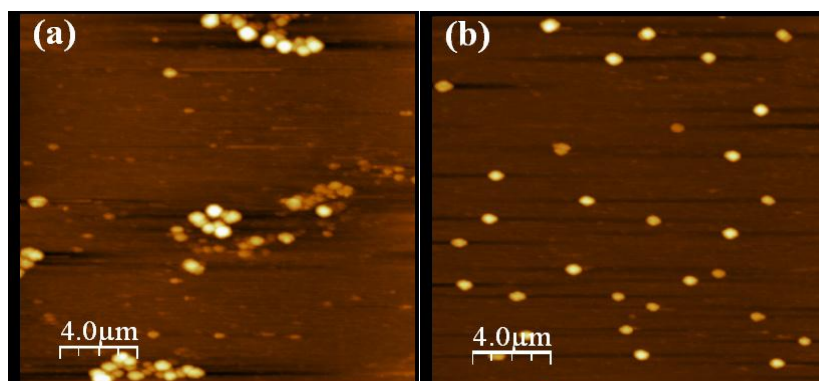
Neste trabalho, Saab *et al.* (2010), mostraram que os resultados em pH ácido as interações eletrostáticas são fracas e as ligações de hidrogênio são responsáveis pela formação de agregados, enquanto em pH alcalino as interações eletrostáticas são fortes devido ao aumento da ionização dos grupos fenólicos. A interação por meio de ligações de hidrogênio é baixa, formando estruturas mais abertas.

Em trabalhos mais recentes, a análise conformacional de AH da Amazônia foi observado por AFM. Em um desses trabalhos, Leite *et al.* (2012), utilizaram AH de solos diferentes, o solo pedogênico (solo de origem que se encontra nos primeiros metros do solo) (PIERINI e MIZUSAKI, 2007)) e o solo antropogênico (solos com alta fertilidade, incluem-se a “Terra Preta do Índio”), existentes na Região

Amazônica (WOODS, 2003)). Foram utilizados 100 mg L^{-1} de AH misturados em água deionizada, ficando em agitação por pelo menos três dias, com pH ajustado em 3,5. Após, a mica, já clivada, foi colocada na solução por um dia, sob agitação constante. Passado este período, a mica foi lavada com água deionizada e colocada para secar por um dia para obter as imagens por AFM no modo contato. Algumas amostras enxaguadas foram analisadas e utilizadas como comparação.

Nas figuras 27 (a) e 27 (b), os autores obtiveram por AFM a imagem de AH de solo pedogenético adsorvido na superfície da mica. Na figura 27 (a), podem ser observadas características globulares em forma de cone, divididas em ilhas de AH. Foram identificadas dois tipos gerais de estruturas, que podem ser resumidas como partículas ou esferóides e redes de partículas. Esta imagem mostra que coexistem agregados grandes e pequenas partículas. Na figura 27 (b), a análise foi realizada em diferentes áreas, ao longo de toda a amostra, para avaliar o efeito do procedimento de lavagem com a configuração das estruturas e a formação de camadas de AH adsorvido. Na superfície enxaguada foram também observados esferóides ou ilhas isoladas em forma de cone, com grãos menores. Esta imagem mostra estruturas individuais AH e revelam que as moléculas têm uma forma globular e estão homogeneamente distribuídas sobre a superfície, obtendo praticamente os mesmos resultados de Wilkinson *et al.* (1999), Barriquello (2005) e Saab *et al.* (2010), a pH baixo.

Figura 27 - Imagens de AFM modo de contato ($20 \times 20 \mu\text{m}$) de ácido húmico pedogenético (pH = 3,5) adsorvido na superfície mica. (a) sem enxágue e (b) enxaguado.

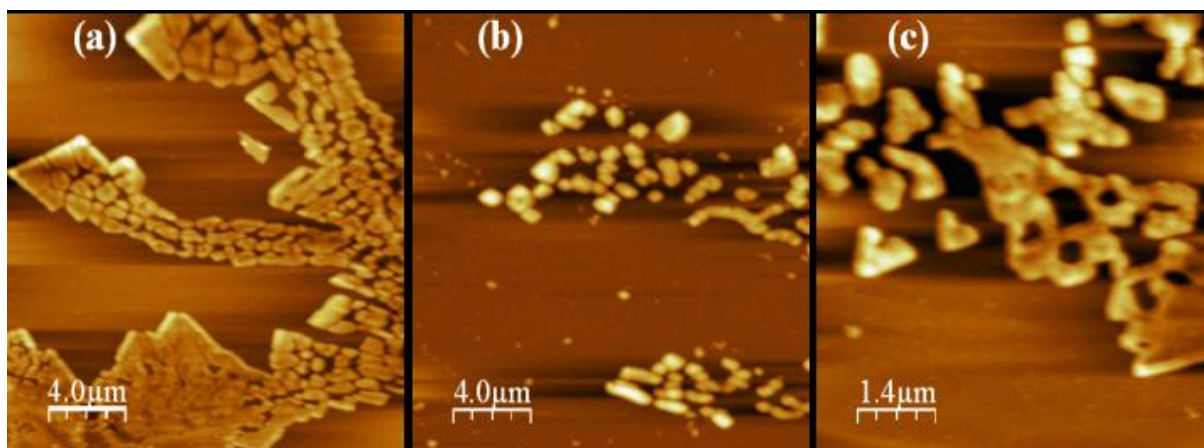


FONTE: Leite *et al.*, 2012.

Nas figuras 28 (a) e 28 (b), estão as imagens de AH antropogênico adsorvido na superfície de mica. Leite *et al.* (2012), observaram que as estruturas de

AH adsorvido em ambos os métodos de tratamento da amostra formam ilhas com tamanho sub-mícron. Na amostra sem enxágue, figura 28 (a), foram observadas as camadas contínuas de AH, em formato de anel. Nas amostras sem enxágue, as ilhas da amostra foram significativamente maiores do que os encontrados nos enxaguados. Estas estruturas, anéis homogêneos (ver figura 28 (c)), formados em baixa concentração de sal e baixos valores de pH, indicam evidências de estruturas supramoleculares de AH no ambiente natural e são dependentes do método de lavagem. O regime quase contínuo da AH, adsorvido em mica, antes do procedimento de enxágue, é uma característica das estruturas supramoleculares, onde pequenas partículas ou moléculas interagem formando uma estrutura de grandes dimensões. Se a estrutura fosse composta por moléculas isoladas, o procedimento de lavagem proporcionaria a remoção total do AH da superfície da mica ou manteria a estrutura inicial, com pequenas alterações. A figura 28 (b), obtida após o processo de lavagem, mostra alguns agregados esféricos em sua estrutura de AH, com diâmetros aparentes coloidais < 500 nm.

Figura 28 - Imagem AFM modo contato ($20 \times 20 \mu\text{m}$) de ácido húmico antropogênico (a) sem enxágue, (b) enxaguadas e (c) ampliação da Figura 28(a) mostrando as estruturas do tipo anel ($7 \times 7 \mu\text{m}$).



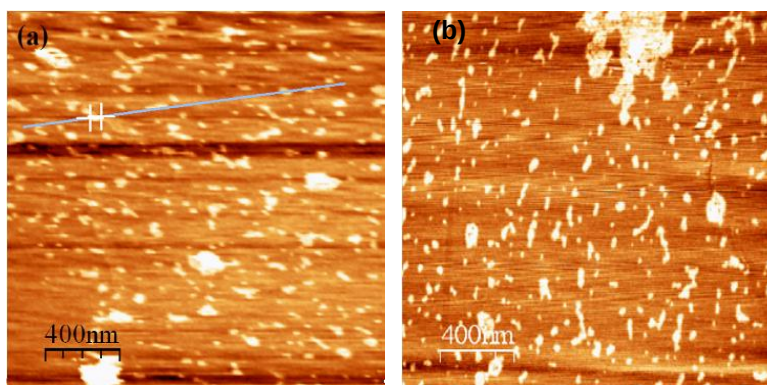
FONTE: Leite *et al.*, 2012.

Leite *et al.* (2012) concluíram que o AFM foi utilizado com sucesso para medir a adsorção de AH sobre a superfície de mica. As moléculas constituíram agregados em forma de anel, com diâmetros na escala de várias dezenas de nanômetros, em que anéis em escala nanométrica presentes ao longo da circunferência poderiam representar domínios hidrófobos. As formas diferentes de

AH, em diferentes condições, sugerem uma estrutura supramolecular. Os dados de AFM da dimensão vertical indicam colóides menores, devido às forças de adesão e o processo de ligação para a mica, favorecendo as partículas menores.

Barriquello *et al.* (2012) estudaram um tipo de Ácido Húmico do Modelo polímero por espectroscopia de fluorescência e Microscopia de Força Atômica. O ácido húmico sintético] e seus complexos com íons de cobre, ferro e metal Manganês foram estudados através do AFM. Ácidos húmicos naturais (AH) e ácidos húmicos sintéticos (SHA) foram examinados por espectroscopia de fluorescência visível, o que indicou similaridade de SHA e espectros de AH. Neste estudo, os autores mostraram que o AFM foi utilizado para analisar as estruturas macromoleculares e formas de ácido húmico e ácidos húmicos sintéticos a um pH baixo. As imagens de AFM do AH e ácido húmico sintético (SHA) das moléculas absorvidas no substrato mica exibiram estruturas globulares, como mostrado na figura 29 (a) para o AH e figura 29 (b) para o SHA.

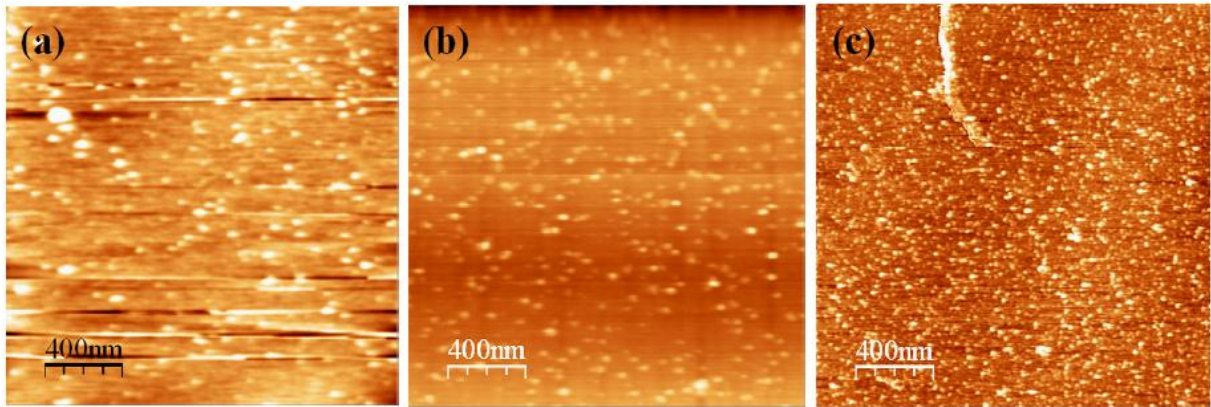
Figura 29 - Imagem obtido por AFM a pH 3,5, modo contato, 2 x 2 μm (a) AH e (b) SHA



FONTE: Barriquello, *et al.*, 2012.

Segundo os autores, a imagem de AFM de SHA e seus complexos revelou morfologias variáveis, pequenas esferas, agregados e uma estrutura esponjosa. A espectroscopia de fluorescência revelou que o SHA exibiu estrutura macromolecular semelhante aos naturais de AH, em que provavelmente seria devido à presença de grupos OH abundantes, e estas bandas estão provavelmente associadas a estruturas do tipo fenólico. A presença de íons de cobre, ferro e manganês, levou à formação de estruturas do tipo agregado, numa disposição aparente de partículas SHA menores, como pode ser observado nas figuras 30 (a-c).

Figura 30 - Imagens de AFM de SHA com metais complexados: (a) de cobre (SHA-Cu), (b), de ferro (SHA-Fe), e (c) de cloreto de manganês (SHA-Mn), adsorvido em mica, a pH 3,5, no modo de contato.



FONTE: Barriquello *et al.*, 2012.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. AMOSTRAS DE ÁCIDO HÚMICO

Os ácidos húmicos utilizados para o desenvolvimento deste trabalho foram extraídos dos solos provenientes de uma área de várzea, localizada na Estação Experimental do Instituto de Agrônomo do Paraná, na cidade de Ponta Grossa – PR. As amostras foram retiradas de uma área onde o solo tinha drenagem-cultivo e pousio, que para melhor compreensão será denominado de solo cultivado. A profundidade de coleta foi de 0 – 10 cm.

O fracionamento químico da matéria orgânica e isolamento dos AH deste solo cultivado foram realizados por Luz (2013) no Laboratório de Física Aplicada a Solos e Ciências Ambientais (FASCA), da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG). Para isto, foi utilizado o método de fracionamento sugerido pela Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas (IHSS) e por Swift (1996).

5.2. OBTENÇÃO E ANÁLISE DAS IMAGENS

Para obtenção das imagens de ácido húmico, foi utilizado o Microscópio de Força Atômica da Shimadzu SPM - 9600 do Laboratório de Multiusuários da Universidade Estadual de Ponta Grossa – UEPG. As imagens foram obtidas no sensor com força constante de 42 N.m^{-1} , com frequência de ressonância 298 kHz e no modo não contato para não destruir as amostras que são frágeis (FALCÃO, FERREIRA e PINTO, 2009). O *cantilever* utilizado é feito de silício puro e sua ponteira (ou sonda) é cônica de silício. As imagens foram salvas com resolução de 512 pixels e varridas em tamanhos de $5 \mu\text{m} \times 5 \mu\text{m}$ e algumas para melhor observação do AH sobre a mica em $1 \mu\text{m} \times 1 \mu\text{m}$. As análises das imagens foram feitas no SPM - 9600 e após tratadas no programa Gwyddion 2.28 (<http://www.winportal.com/gwyddion>) para obter a imagem em 3D e o gráfico da altura.

5.3. ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

A técnica de FTIR foi usada para identificar os compostos e elucidar a composição da amostra de AH. É uma espectroscopia de absorção que usa a região

do infravermelho do espectro eletromagnético com número de ondas entre 4000 – 400 cm^{-1} .

As medidas de FTIR foram feitas a partir do preparo de pastilhas com 200 mg de *KBr* seco e 2 mg de amostra de AH. A mistura de *KBr* e amostra foi homogeneizada em almofariz e pistilo. O branco foi obtido pela obtenção do espectro de uma pastilha de *KBr*.

A análise, utilizando FTIR, foi realizada a partir de 60 varreduras no intervalo entre 4000 e 400 cm^{-1} e resolução de 4 cm^{-1} , utilizando o espectrômetro da marca *Shimadzu*, modelo *IR Prestige – 2L*, do Laboratório Multiusuários da UEPG.

5.4. POTENCIAL ZETA

O potencial Zeta é o efeito causado pela formação de cargas elétricas nas partículas em uma dispersão coloidal aquosa o qual é influenciado pelas mudanças na interface com o meio dispersante, em razão da dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula ou da adsorção de espécies iônicas presentes no meio aquoso de dispersão (GUTERRES *et al.*, 2003)

A medida do potencial Zeta corresponde à determinação da carga eletrostática superficial de pequenas partículas sólidas dispersas em água (colóide), em que a maioria dos colóides na natureza tem carga negativa (DI BERNARDO, 1993).

Em relação à medida do tamanho de partículas, o potencial Zeta utiliza o espalhamento dinâmico de luz (DLS). É uma técnica utilizada para a determinação do tamanho de partículas em soluções coloidais. A amostra em estudo é iluminada por um laser e a intensidade da luz espalhada resultante é dependente do tamanho da partícula. Análises dessas flutuações de intensidade fornecem o coeficiente de difusão e através deste é calculado o tamanho das partículas (MARTELLI, 2011).

O Potencial Zeta foi realizado para determinar as cargas superficiais e diâmetros dos colóides de AH quando varia o pH do mesmo. Os pH utilizados foram: 3, 7, 8, 10 e 11. Foram preparadas cinco béqueres, contendo 3 mg de AH e 80 mL de água deionizada ultrapura. O pH 3 foi ajustado com HCl (0,5 mol L^{-1}) e os pH 7, 8, 10 e 11 foram ajustados com NaOH (0,5 mol L^{-1}). Os recipientes foram levados para agitação mecânica por 30 min. Após, foi levado para o ultrassom *Vibra-Cell* da *Sonics* por 5 minutos e potência de 30 W. Após o período no ultrassom, as soluções

foram levadas para o Potencial Zeta, no Laboratório de Multiusuários da UEPG, para medir as cargas superficiais e o diâmetro dos colóides das amostras de AH.

5.5. METODOLOGIAS DAS AMOSTRAS DE ÁCIDO HÚMICO PARA OBTENÇÃO DE IMAGENS UTILIZANDO O MICROSCÓPIO DE FORÇA ATÔMICA.

Foram realizadas centenas de imagens por meio da técnica da AFM, em que posteriormente foram selecionadas as melhores para discussão dos resultados.

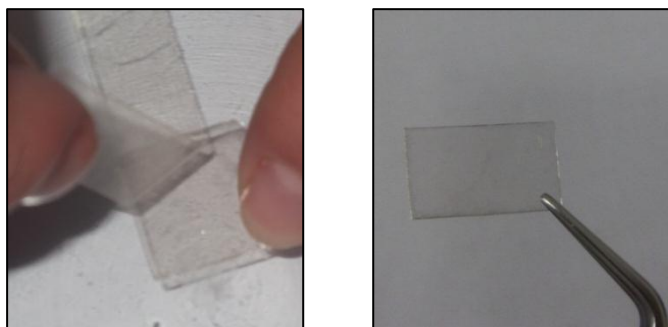
5.5.1. MÉTODO CONVENCIONAL, SEM ULTRASSOM, pH 9,0 E MICA EM REPOUSO PARA DEPOSIÇÃO DO AH

Neste procedimento foi utilizada uma adaptação da metodologia de Saab *et al.* (2010). Para o preparo desta amostra foi utilizado 3 mg de AH, misturado em 80 mL de água deionizada ultrapura.

A solução permaneceu em agitação mecânica e foi ajustado o pH em 9,0, com a solução de $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH. Após o ajuste do pH, a solução ficou em agitação por 24 horas. Após este período, mediu-se novamente o pH⁴.

Depois que o pH da solução estabilizou-se, a mica foi clivada com a fita adesiva, figura 31 (a), para retirar qualquer sujeira ou deformação da mesma, antes de ser colocada no béquer, figura 31 (b).

Figura 31 – (a) Mica sendo clivada com fita adesiva para retirar impurezas e deformações (b) mica clivada.



FONTE: A autora.

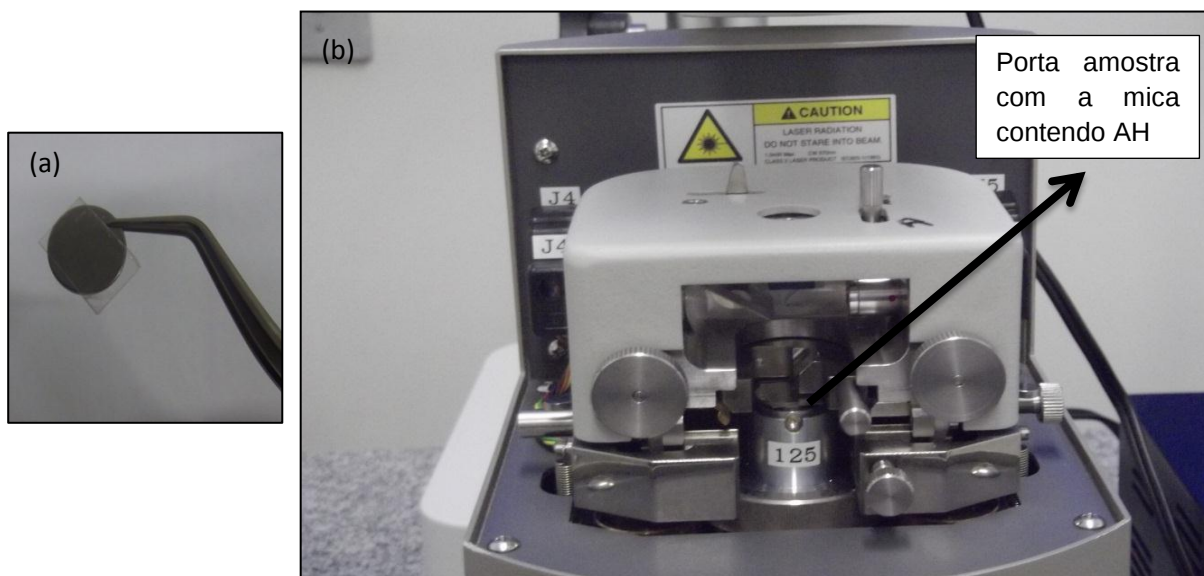
A mica foi deixada na solução em repouso por 48 horas. Após este período, a mica foi retirada da solução e apenas foi mergulhada em água deionizada

⁴ Se alterado, ajusta-se novamente o pH em 9 e deixa-os agitando por mais 24 horas. Decorrido às 24 horas e se o pH não estiver alterado, pode-se colocar as micas, caso contrário deixa mais 24 horas até o equilíbrio do pH.

ultrapura para retirar o excesso da solução. As amostras foram colocadas em uma placa de Petri e depositadas num dessecador por uma semana, aproximadamente.

Após o período de secagem, a mica foi colada no porta amostra, figura 32 (a), e levada para o AFM para obter as imagens das estruturas do AH, figura 32 (b).

Figura 32 - (a) Mica colada no porta amostra com fita adesiva dupla face. (b) Porta amostra com a mica contendo AH, no AFM.

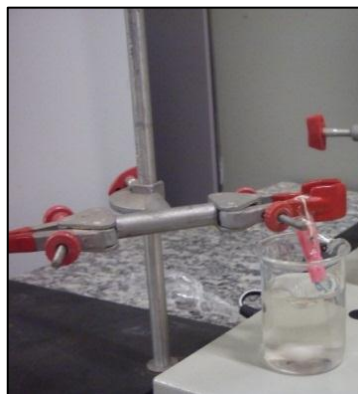


FONTE: A autora.

5.5.2. MÉTODO CONVENCIONAL, SEM ULTRASSOM, pH 9,0 E MICA EM AGITAÇÃO PARA DEPOSIÇÃO DO AH

Para este método, foram usadas as mesmas concentrações e o mesmo procedimento do item 5.5.1. No entanto, a mica foi mantida sob agitação para aderência do AH por 48 horas, conforme figura 33.

Figura 33 - Aparato utilizado para deixar a mica em agitação por 48 horas.



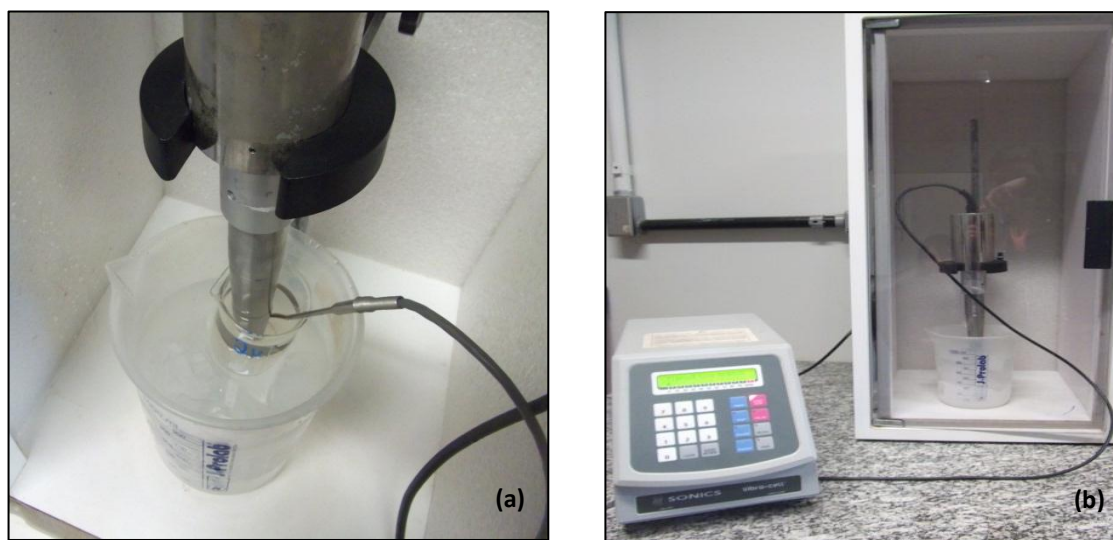
FONTE: A autora.

Decorridas às 48 horas, a mica foi retirada e mergulhada na água deionizada ultrapura. As amostras de mica com AH foram colocadas numa placa de Petri e alocadas num dessecador por 1 semana, aproximadamente, para ser usada posteriormente no Microscópio de Força Atômica para obtenção das imagens.

5.5.3. MÉTODO UTILIZANDO O ULTRASSOM PARA DISSOLUÇÃO DO AH E MICA EM REPOUSO PARA DEPOSIÇÃO

O diferencial nos procedimentos a seguir, é a utilização do ultrassom, com a finalidade de diminuir o tempo de preparo das amostras. Para isto, foram desenvolvidos e testados alguns procedimentos, em que foram variadas as potências e os tempos utilizados no ultrassom, a massa de AH e o pH da solução. Em todas as amostras, o AH foi misturado com 80 mL de água deionizada ultrapura. Para pH 9,0, o pH da solução foi ajustada com NaOH ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$) e para pH 3,0, o pH da solução foi ajustada com HCl ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$). A solução foi deixada em agitação mecânica por 30 minutos. Como o pH não alterou (se alterar ajusta novamente, com NaOH para pH 9,0 e HCl para pH 3,0, e deixa mais 30 minutos), a solução foi colocada no ultrassom Vibra-Cell da Sonics, para variar as potências e os tempos. Coloca-se o recipiente da solução de AH em outro recipiente contendo gelo, para não alterar a temperatura durante o processo do ultrassom, como mostra a figura 34.

Figura 34 - (a) Recipiente com a solução de AH em um outro com gelo, (b) utilização do ultrassom para dissolução do AH.



FONTE: A autora.

Completado o tempo no ultrassom, mediu-se o pH da solução novamente para verificar se não houve alteração. A mica foi clivada e colocada dentro do béquer com a solução e a mesma permaneceu em repouso por 2 horas.

Decorridas as duas horas, retirou-se a mica da solução e apenas foi mergulhada na água deionizada ultrapura, para retirar o excesso de solução. A mica foi depositada em uma placa de Petri e deixada para secar em um dessecador por uma semana, aproximadamente, antes de fazer as imagens com o AFM.

5.5.3.1. Método utilizando diferentes potências no ultrassom, pH 9,0 e mica em repouso

Para o procedimento de variação de potência, foi utilizado o mesmo procedimento do item 5.5.3, porém, a massa foi fixa e o tempo determinado em 5 minutos durante o processo utilizando o ultrassom.

Foram pesados 3 mg de AH e colocados em 4 béqueres separados contendo 80 mL de água Deionizada ultrapura cada. Foi ajustado o pH em 9 com NaOH e levados no agitador mecânico por 30 minutos. Foi medido o pH novamente (se alterado, ajusta novamente o pH em 9,0 e deixa-os agitando por mais 30 minutos). Decorridos os 30 minutos, como o pH não estava alterado, foi colocada a solução no ultrassom com tempo de 5 minutos nas seguintes potências:

Béquer 1 – Potência 10 W,

Béquer 2 - Potência 20 W,

Béquer 3 – Potência 30 W,

Béquer 4 – Potência 40 W,

cada recipiente da solução de AH foi colocado em outro contendo gelo, para não alterar a temperatura durante o processo do ultrassom.

Posteriormente, segue o procedimento final do item 5.5.3.

5.5.3.2. Método utilizando diferentes tempos no ultrassom, pH 9,0 e mica em repouso

Para a preparação destas amostras foi utilizada a concentração de 3 mg de AH e 80 mg de água deionizada ultrapura com potência fixa de 30 W e variados os tempos no ultrassom em 1 min, 3min, 7 min e 10 min.

Foram utilizados 4 béqueres, e cada um continha esta mistura de AH e água Deionizada ultrapura. Foi ajustado o pH em 9,0 com NaOH, e a solução ficou sendo agitada por 30 minutos. Após este período, foi medido o pH novamente e verificou-se que não havia desestabilizado. Então, as amostras foram levadas para o ultrassom nos seguintes tempos:

Béquer 1 – 1 minuto,

Béquer 2 - 3 minutos,

Béquer 3 – 7 minutos,

Béquer 4 - 10 minutos,

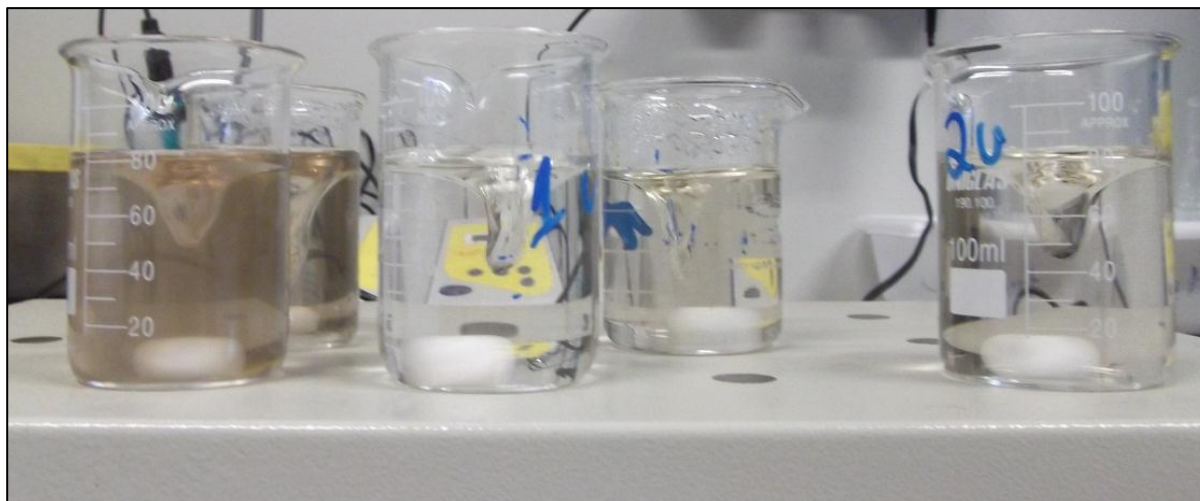
Decorrido o tempo no ultrassom, segue o processo final do item 5.5.3.

5.5.3.3. Método utilizando o ultrassom com diferentes massas de AH, pH 9,0 e mica em repouso

Neste procedimento foram usadas as concentrações de ácido húmico de 6 mg; 4,5 mg; 3 mg; 2 mg e 1 mg para verificar qual a melhor massa utilizar de HA para obtenção das imagens por AFM, seguindo os mesmos processos do método 5.3.3., com tempo fixo de 5 minutos e potência de 30 W no ultrassom.

Após a pesagem das diferentes massas de ácido húmico, elas foram colocadas em béqueres, separados, contendo 80 mL de água deionizada ultrapura em cada béquer. Os 5 béqueres foram colocados no agitador mecânico e ajustado o pH em 9,0 com NaOH ($0,5 \text{ mL L}^{-1}$) e deixados para agitar por 30 minutos, figura 35.

Figura 35 - AH + água deionizada ultrapura com diferentes massas



FONTE: A autora.

Decorridos os 30 minutos, mediu-se novamente o pH de cada béquer⁵. Concluiu-se o método seguindo os passos finais do item 5.5.3.

5.5.3.4. Método utilizando o ultrassom, pH 3,0 e mica em repouso

Neste procedimento, foi misturado 3 mg de AH e 80 mL de água deionizada ultrapura em um béquer. Para ajustar o pH em 3,0, foi utilizado HCl ($0,5 \text{ mL L}^{-1}$). O béquer com a solução foi levado ao agitador mecânico por 30 min. Após, foi medido novamente o pH de cada béquer. Obs.: Se alterado o pH, ajusta-o novamente com HCl deixa-os agitando por mais 30 minutos. Após os 30 minutos e o pH da solução não estando alterado, foi colocada a solução no ultrassom com potencia de 30 W e tempo de 5 minutos (coloca-se o recipiente da solução de AH em outro contendo gelo, para não alterar a temperatura durante o processo do ultrassom).

Terminado o processo no ultrassom, foi inserida uma mica já clivada (é preciso clivar as micas para tirar qualquer sujeira ou deformação das mesmas) e deixada a solução em repouso por duas horas. Após este tempo, a mica foi retirada e mergulhada na água deionizada ultrapura, para tirar o excesso da solução. Em seguida, foi depositada numa placa de Petri e colocada num dessecador por uma semana, aproximadamente, antes de fazer as imagens com o AFM.

5.6. SÍNTESE DOS MÉTODOS UTILIZADOS

Para melhor compreensão dos procedimentos, segue a ordem de realização:

1 - Método convencional, 3 mg de AH, 80 mL de água deionizada ultrapura, solução em agitação e 1 a 3 dias para dissolução do AH, pH 9,0, mica em repouso para deposição do AH por 48 horas;

2 - Método convencional, 3 mg de AH, 80 mL de água deionizada ultrapura, solução em agitação e 1 a 3 dias para dissolução do AH, pH 9,0, mica em agitação para deposição do AH por 48 horas;

3 - Método utilizando diferentes potências no ultrassom para dissolução do AH, com 3 mg de AH, 80 mL de água deionizada ultrapura, pH 9,0, tempo de 5 minutos no

⁵ Se alterado, ajusta novamente o pH em 9,0 e deixa-os agitando por mais 30 minutos. Após os 30 minutos e o pH não estando alterado, cada solução foi levada para o ultrassom com potência de 30 W e tempo 5 minutos.

ultrassom, potências de 10 W, 20 W, 30 W e 40 W. Mica em repouso para deposição do AH por 2 horas;

4 - Método utilizando diferentes tempos no ultrassom para dissolução do AH, com 3 mg de AH, 80 mL de água deionizada ultrapura, pH 9,0, potência de 30 W, tempos de 1 minutos, 3 minutos, 7 minutos e 10 minutos no ultrassom. Mica em repouso para deposição do AH por 2 horas;

5 - Método utilizando o ultrassom para dissolução do AH, com diferentes massas de AH: 1 mg, 2 mg, 3 mg, 4,5 mg e 6 mg de AH e 80 mL de água deionizada ultrapura. pH 9,0, tempo de 5 minutos, potência de 30 W no ultrassom e mica em repouso para deposição do AH por 2 horas;

6 - Método utilizando o ultrassom para dissolução do AH, com 3 mg de AH, 80 mL de água deionizada ultrapura, pH 3,0, tempo de 5 minutos no ultrassom, potência de 30 W e mica em repouso para deposição do AH por 2 horas.

A síntese dos métodos utilizados no preparo das amostras está representada na tabela 2 para melhor visualização:

Tabela 2 - Síntese dos métodos utilizados

MÉTODO	pH	MASSA DE AH	POTÊNCIA	AGITAÇÃO	TEMPO	DEPOSIÇÃO MICA
Método Convencional 1	9,0	3 mg	-	Mecânica	1 a 3 dias	Repouso 48 hrs
Método Convencional 2	9,0	3 mg	-	Mecânica	1 a 3 dias	Agitação 48 hrs
Método Ultrassom 1	9,0	3 mg	Variação potência 10 - 40 W	Ultrassom	5 min	Repouso 2 hrs
Método Ultrassom 2	9,0	3 mg	30 W	Ultrassom	1 a 10 min	Repouso 2 hrs
Método Ultrassom 3	9,0	1 - 6 mg	30 W	Ultrassom	5 min	Repouso 2 hrs
Método Ultrassom 4	3,0	3 mg	30 W	Ultrassom	5 min	Repouso 2 hrs

Fonte: A autora.

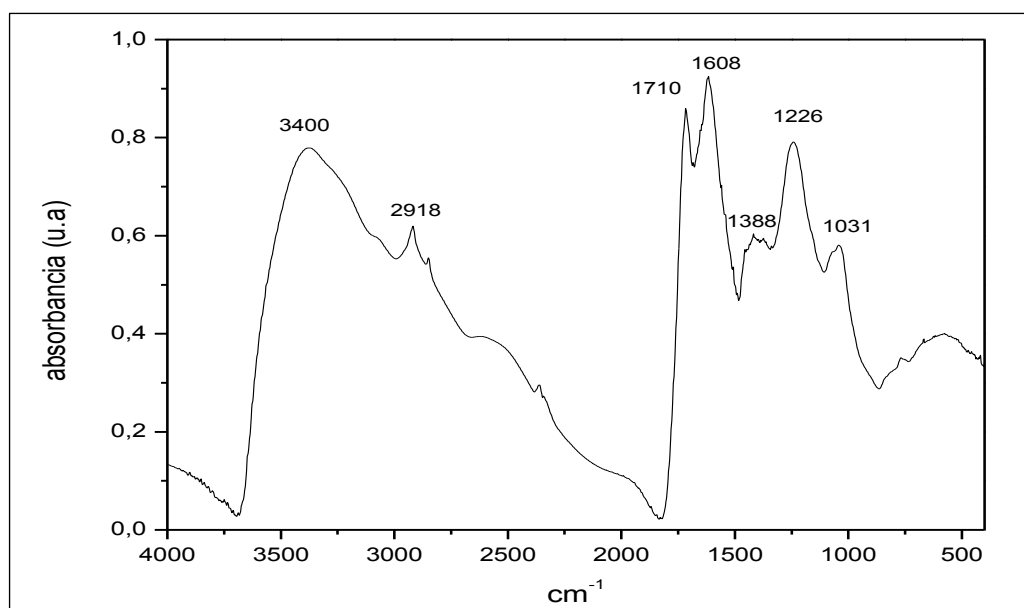
6. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Para analisar o ácido húmico utilizado, foram realizadas as medidas de FTIR e Potencial Zeta. Foram desenvolvidos e testados alguns métodos de preparo de amostras de AH para posterior aquisição de imagens por AFM. Após análise, preparo e obtenção de imagens por AFM, obteve-se os resultados descritos abaixo:

6.1. ESPECTRO DO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER

Os principais grupos funcionais de absorção no infravermelho, entre 4000 e 400 cm^{-1} (de acordo com Saab, 1999 e Senesi, 2003), identificados no espectro FTIR do AH mostrados na figura 36, são devidos ao estiramento O – H, estiramento N – H e estiramento OH ligado, na banda larga em 3400 cm^{-1} . A banda 2918 cm^{-1} corresponde ao estiramento C – H alifático. No pico 1710 cm^{-1} observou-se o estiramento C = O das cetonas e dos ácidos COOH. Estiramentos C = C dos anéis aromáticos e estiramento assimétrico C – O dos íons carboxilato COO^- são encontrados em 1608 cm^{-1} . O pico encontrado em 1388 cm^{-1} é formado por estiramento C – O de OH fenólico, deformação O – H e estiramento simétrico dos íons COO^- . A banda larga em 1226 cm^{-1} corresponde ao estiramento simétrico C – O e deformação OH dos COOH, estiramento C – O de álcoois, éteres, ésteres e fenóis e o pico 1031 cm^{-1} é referente ao estiramento C – O de polissacarídeos.

FIGURA 36 – Espectros de absorção no infravermelho da amostra de ácido húmico.



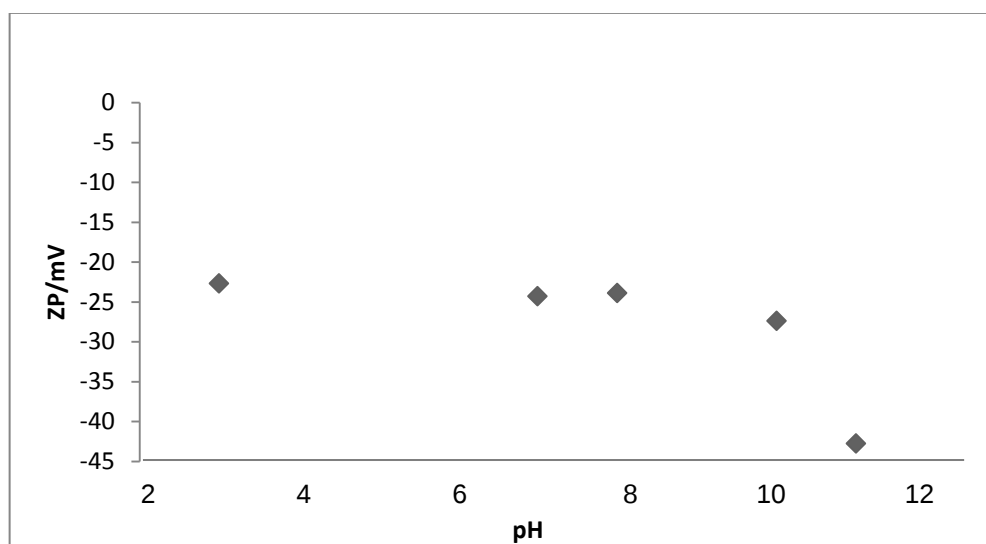
FONTE: A autora.

Ressalta-se que os resultados encontrados com o FTIR estão de acordo com os resultados já obtidos por Saab (1999), Senesi (2003), Bonometo (2010) e Luz (2013), em que o AH está livre de impurezas minerais, tendo espectro característico padrão de AH purificado.

6.2. POTENCIAL ZETA

O Potencial Zeta foi realizado com o AH nos pH 3, 7, 8, 10 e 11. A carga superficial dos colóides de AH torna-se mais negativo à medida que o pH aumenta, como mostra a figura 37.

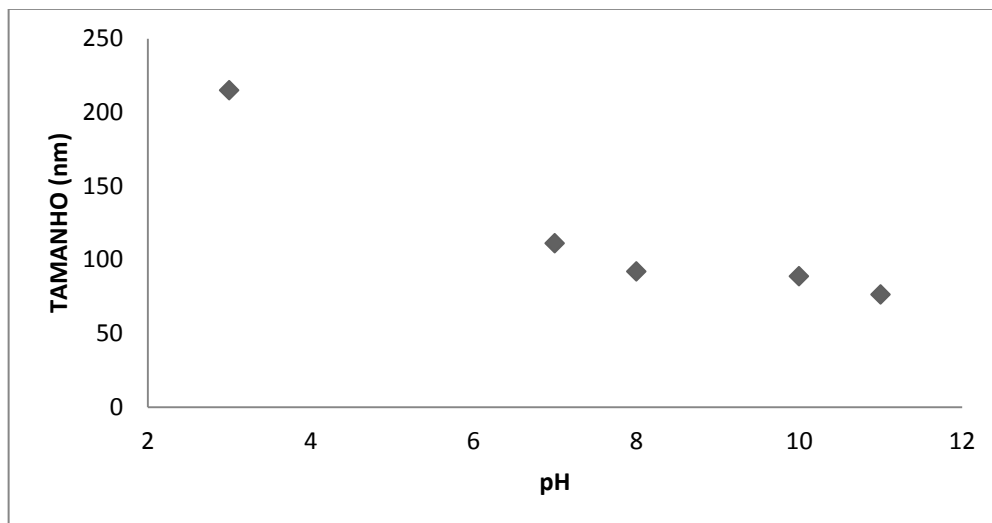
Figura 37 - Potencial Zeta do ácido Húmico de solo cultivado: determinação das cargas superficiais a pH 3, pH 7, pH 8, pH 10 e pH 11.



FONTE: A autora.

A figura 38 mostra o tamanho estimado das partículas em suspensão de AH pelo pH. A partir do pH 7, ocorreu aumento gradual da ionização dos grupos fenólicos do AH, como mostrado também por Saab *et al.* (2010).

FIGURA 38 - Gráfico do Potencial Zeta: tamanho das estruturas de ácido húmico a pH 3, pH 7, pH 8, pH 10 e pH 11.



FONTE: A autora.

O Potencial Zeta mostra o tamanho do AH que fica em média a pH 3,0 com 214,9 nm, em pH 7,0 com 111,1 nm, em pH 8,0 com 91,97 nm, em pH 10,0 com 88,65 nm e a pH 11,0 com 76,33 nm. Em valores menores de pH, as repulsões eletrostáticas são mais fracas e as ligações de hidrogênio são responsáveis pela formação de agregados (Saab *et al.*, 2010). A medida que o pH é aumentado, estas partículas tendem a se expandir e se repelir eletrostaticamente, como observado na figura do potencial Zeta (MARTELLI *et al.*, 2011). Por isso, sua altura diminui e há expansão e abertura de sua estrutura. A pH 11 temos o tamanho do AH em 76,33 nm, aproximadamente, bem menor do que a pH 3 que é 214,9 nm. Portanto, nas imagens de AH obtidas por AFM, espera-se que em pH 9,0, as estruturas dos AH se expandam e estejam mais abertas com menores alturas, e a pH 3,0 estas estruturas estejam aglomeradas em forma de glóbulos (maiores e menores) com maiores alturas.

Estes valores estão de acordo com o trabalho de Martelli (2011), que encontrou para pH 2,0 os tamanhos de AH entre 141-955 nm, para pH 7,0 tamanhos na faixa de 50-825 nm e pH 12,0 entre 58-825 nm.

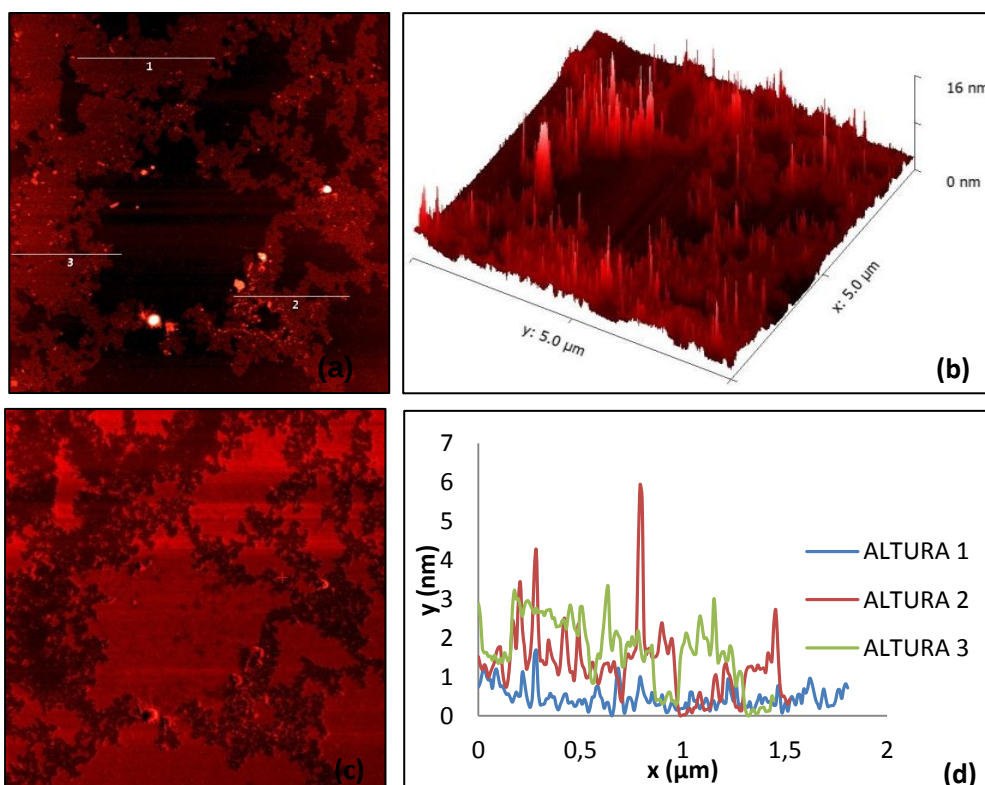
6.3. MÉTODO CONVENCIONAL, SEM ULTRASSOM, pH 9,0 E MICA EM REPOUSO PARA DEPOSIÇÃO DO AH.

A figura 39 (a), mostra a imagem topográfica obtida por AFM da amostra de AH, preparada pelo método convencional (agitação), sem a utilização de ultrassom,

com área de varredura de $5\ \mu\text{m} \times 5\ \mu\text{m}$. Nas figuras 39 (a) e (b), a parte mais clara é o ácido húmico e a parte mais escura é o substrato de mica. Nestas imagens, verifica-se a expansão do AH, a desagregação de suas partículas e a abertura de sua estrutura. Estes resultados estão de acordo com Saab *et al.* (2010).

Na figura 39 (c), está representada a imagem obtida por AFM da fase do AH, em que podem ser estudadas as diferentes propriedades, formas dos AH devido as diferentes fases, sendo a mica a parte mais clara e o AH a mais escura.

FIGURA 39 - (a) Imagem topográfica de AH de solo obtido por AFM, pH 9,0, método tradicional, sem ultrassom, mica em repouso, $5\ \mu\text{m} \times 5\ \mu\text{m}$, em 2D, (b) imagem em 3D, (c) imagem da fase do AH e (d) altura dos segmentos 1, 2 e 3 de (a).



FONTE: A autora.

A figura 39 (d) mostra as alturas dos ácidos húmicos, em que a maioria se encontra entre 0,2 – 3 nm, estando de acordo com os trabalhos de Papadopoulos *et al.* (2000), como pode ser visto figura 21 (b), e Saab *et al.* (2010), figura 26 (a).

Em pH 9, as partículas de AH se expandem e se repelem eletrostaticamente. Em meio alcalino, as repulsões eletrostáticas são mais intensas devido ao aumento da ionização dos grupos fenólicos e carboxílicos, e a interação por meio de ligações de hidrogênio é baixa, formando estruturas abertas (SAAB *et al.*, 2010). Este método leva em média 3 a 7 dias para obter uma amostra de AH, para depois ser analisada

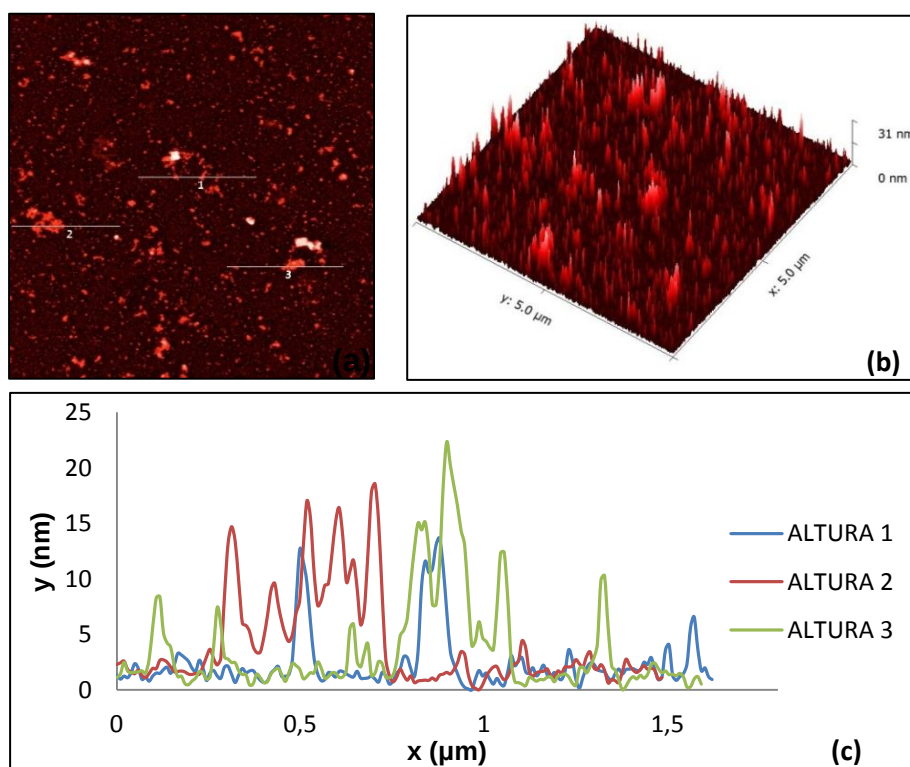
por meio da AFM, com a mica em repouso por 48 horas. É um procedimento mais demorado, mas é eficaz.

6.4. MÉTODO CONVENCIONAL, SEM ULTRASSOM, pH 9,0 E MICA EM AGITAÇÃO

Com a metodologia adaptada de Saab *et al.* (2010), foi realizado o procedimento do item anterior, 6.3., que leva de 3 a 7 dias para obter uma amostra de AH em mica e depois ser analisada por AFM. O diferencial neste método foi a mica ter sido colocada em um aparato para ficar em agitação por 48 horas.

A figura 40 (a), apresenta a imagem de AH obtida por AFM, no método tradicional (agitação), sem utilização do ultrassom, com varredura de 5 μm x 5 μm e mica em agitação para deposição do AH. Nas figuras 40 (a) e 40 (b), estão representados os ácidos húmicos (partes mais claras) e observa-se que os mesmos foram dissolvidos durante o procedimento de preparo, porém estão aglomerados (os pontos bem claros, quase brancos), sem expansão de suas estruturas.

FIGURA 40 - (a) Imagens de AH de solo obtido por AFM, pH 9,0, método tradicional, sem ultrassom, mica em agitação, 5 μm x 5 μm , em 2D, (b) 3D e (c) altura dos segmentos 1, 2 e 3 da figura 40 (a).



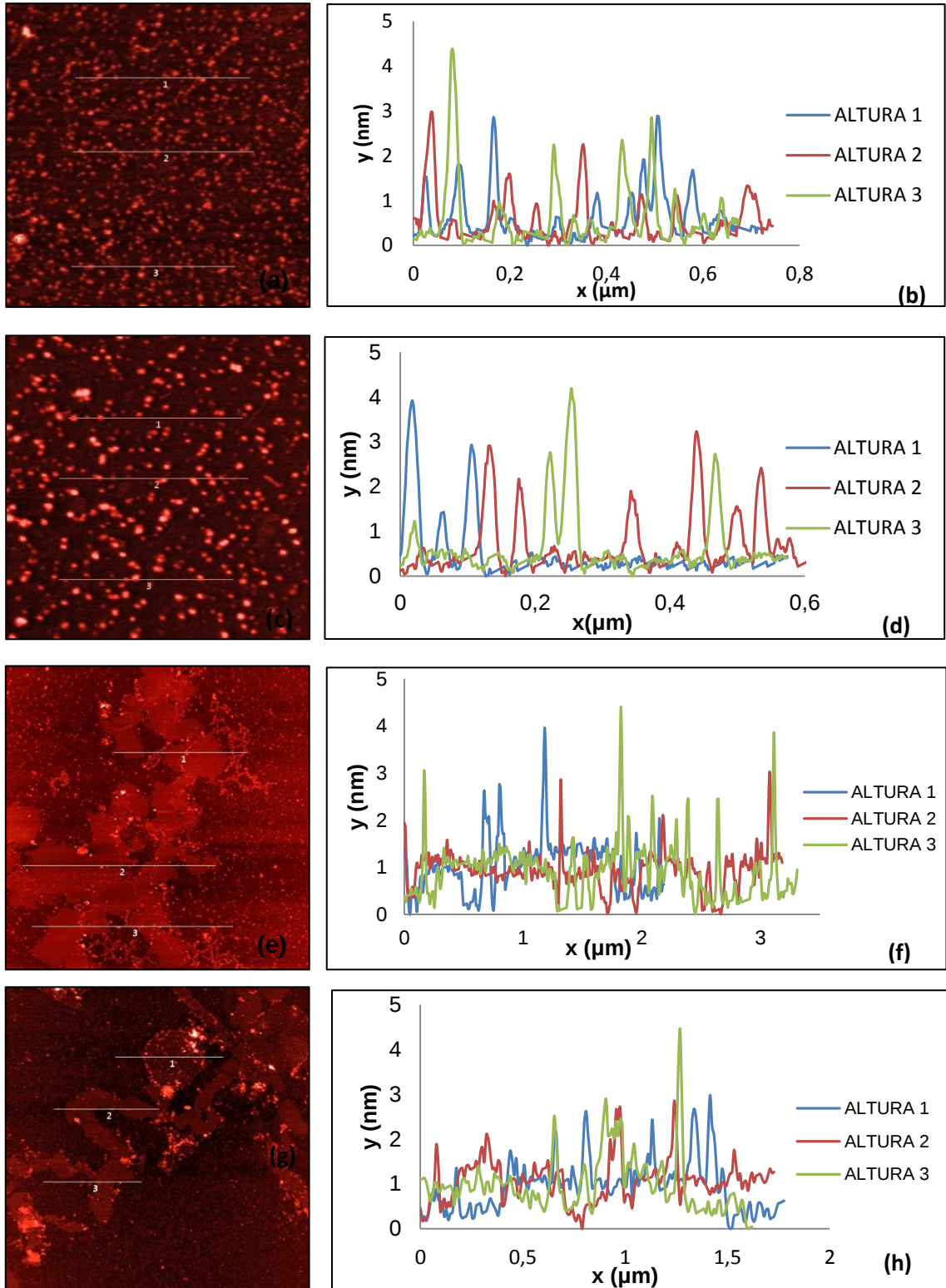
FONTE: A autora.

A figura 40 (c) mostra a altura dos AH que estão entre 1-3 nm e também os AH agregados que não se dissolveram acima de 5 nm, chegando a 31 nm como se pode observar na figura 40 (b). Segundo Stevenson (1994), os AH em meio alcalino são solúveis e, como observado nas figuras 40, este processo não ocorreu quando a mica ficou em agitação para deposição do AH, devido ao AH não imobilizar bem sobre o substrato de mica durante a agitação. Este método não possibilitou a obtenção de bons resultados, ou seja, não é adequado para o preparo das amostras.

6.5. MÉTODO UTILIZANDO DIFERENTES POTÊNCIAS NO ULTRASSOM, pH 9,0 E MICA EM REPOUSO

Dos resultados obtidos nos itens 6.3. e 6.4., o melhor foi o obtido no item 6.3., com a mica em repouso para disposição do AH. Assim sendo, será utilizado este procedimento para os próximos métodos. Com a finalidade de verificar as melhores potências para serem utilizadas no ultrassom para dissolução do AH, a mesma foi variada nestes processos. Nas Figuras 41 (a), com potência no ultrassom de 10 W e figura 41 (c) com potência de 20 W, as imagens de AH foram obtidas por AFM, em 2D com área varrida de $1\mu\text{m} \times 1\mu\text{m}$ para melhor visualização do AH. Nestas figuras, foi possível observar que o AH está distribuído de maneira uniforme sobre a mica, sem expansão e abertura de suas estruturas (pontos mais claros) com pequenas macromoléculas individuais, possuindo forma globular. Nas figuras 41 (e), com potência de 30 W e figura 41 (g), com potência de 40 W, as imagens de AH foram obtidas em 2D com área varrida de $5\mu\text{m} \times 5\mu\text{m}$. Ao analisar estas imagens, pode-se observar que a partir da potência de 30 W ocorre a expansão das moléculas do AH e a desagregação de suas partículas com formação de poucos aglomerados que não foram dissolvidos durante o processo de preparo (pontos bem claros).

FIGURA 41 - Imagem de AH de solo obtido por AFM, pH 9,0, método utilizando o ultrassom, 5 min, (a) potência 10 W, $1\ \mu\text{m} \times 1\ \mu\text{m}$, em 2D, (b) altura dos segmentos 1, 2 e 3 de (a), (c) potência 20 W, $1\ \mu\text{m} \times 1\ \mu\text{m}$, em 2D, (d) altura dos segmentos 1, 2 e 3 de (c), (e) potência 30 W, $5\ \mu\text{m} \times 5\ \mu\text{m}$, em 2D, (f) altura dos segmentos 1, 2 e 3 de (e), (g) potência 40 W, $5\ \mu\text{m} \times 5\ \mu\text{m}$, em 2D, (h) altura dos segmentos 1, 2 e 3 de (g).



FONTE: A autora

As figuras 41 (b), 41 (d), 41 (f) e 41 (h), mostram o gráfico das alturas dos seguimentos 1, 2 e 3 das figuras 41 (a), 41 (c), 41 (e) e 41 (g), respectivamente. Os gráficos das figuras 41 (b), potência de 10 W e 41 (d) potência de 20 W, indicam que a altura do AH expandido ficou em torno de 0,1 – 1,0 nm com alguns agregados acima deste valor. Para as potências de 30 W, figura 41 (f), e potência de 40 W, figura 41 (h) as alturas dos seguimentos ficou entre 0,5 – 2,5 nm estando de acordo com os resultados de Saab *et al* (2010) e Papadopoulos *et al.* (2000).

Comparando as imagens das figuras 41, percebe-se que o AH começa a se dissolver a partir da potência de 30 W no ultrassom, em que se observa a abertura e expansão das estruturas. Para a energia máxima utilizada no ultrassom de 40 W para dissolução do AH, houve expansão e desagregação das partículas do AH, figura 41 (g), porém esta imagem apresenta macromoléculas individuais maiores (pontos claros).

Este método, utilizando o ultrassom na potência de 30 W, figura 41 (e), é adequado para o preparo das amostras de AH, para posteriormente serem utilizadas no AFM, pois durante o tempo de 5 minutos, o AH foi dissolvido por completo, mesmo por menor período do que o processo convencional (agitação) que leva até 7 dias para uma amostra ficar pronta.

6.6. MÉTODO UTILIZANDO DIFERENTES TEMPO NO ULTRASSOM, pH 9,0 E MICA EM REPOUSO

Utilizando os resultados anteriores, este procedimento foi realizado com potência fixa de 30 W, a qual foi a melhor potência, como observado na figura 41 (e) para dissolução do AH variando os tempos no ultrassom, e para deposição, a mica foi deixada em repouso por 2 horas na solução.

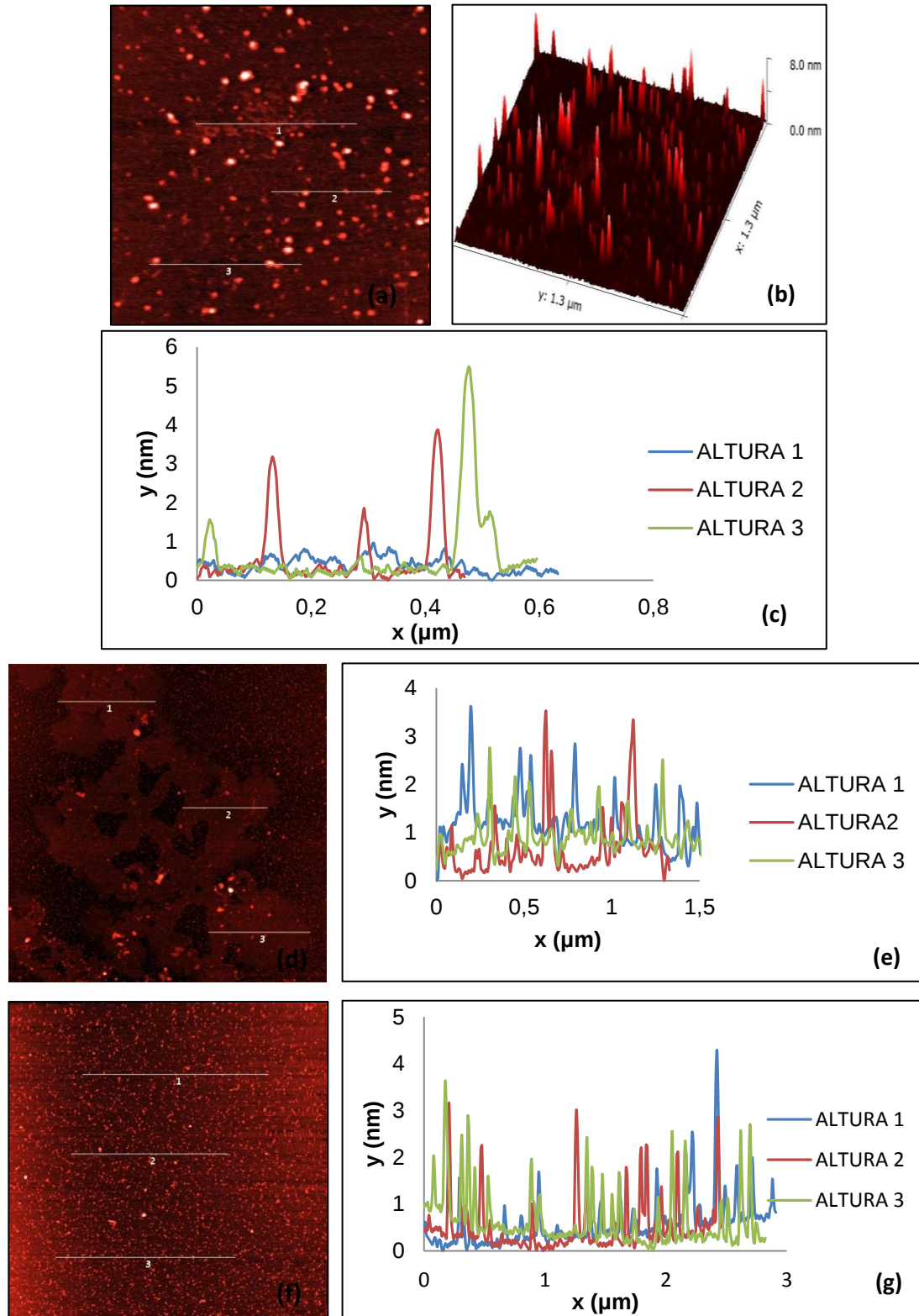
Para o tempo no ultrassom de 1 minuto, através da AFM obteve-se a imagem 42 (a) com área de varredura de 1 μm x 1 μm . Nesta figura e na figura 42 (b), observa-se que não houve expansão do AH e nem abertura na sua estrutura. A imagem foi varrida com menor resolução para poder visualizar melhor a adsorção do AH sobre a mica. Nota-se os aglomerados (pontos mais claros) em toda a superfície da mica, sendo estes em forma de pirâmides. Na figura 42 (c), observa-se que a altura do AH ficou em torno de 0,1-0,6 nm, sendo que neste processo não ocorreu dissolução do AH e nem desagregação na sua estrutura. Portanto, 1 minuto no

ultrassom é pouco tempo para dissolução do AH, não sendo possível obter boas imagens de AH por AFM.

Utilizando 3 minutos no ultrassom, destaca-se que o AH foi dissolvido durante o processo no ultrassom. Na figura 42 (d), nota-se a abertura de sua estrutura e a desagregação de suas partículas, com área varrida de 5 μm x 5 μm . A altura média do AH neste processo, ficou em torno de 0,3- 2,0 nm, como mostrado na figura 42 (e). Nota-se que, a partir de 3 minutos utilizando o ultrassom, o AH já é dissolvido, como também foi observado no item 6.3, figuras 41(e) e 41 (f), em que foram utilizados 5 minutos de ultrassom. Assim sendo, esta metodologia, a partir de 3 minutos, já é adequada para o preparo das amostras.

Para o preparo das amostras utilizando 7 e 10 minutos, maiores tempos no ultrassom, não se obteve boas imagens. A figura 42 (f) mostra a imagem utilizando 7 minutos no ultrassom. Percebe-se que não ocorreu a expansão da estrutura do AH. Nas imagens com 7 minutos de utilização de ultrassom, as mesmas contêm pequenos aglomerados uniformes (0,1- 0,5 nm) e agregadas mais altos, até 4,5 nm, como mostra a figura 42 (g). Uma possível explicação para este caso seria que até o tempo de 5 minutos o AH é dissolvido, após este tempo as suas estruturas começam a se quebrar, voltando a se aglomerar e formar glóbulos maiores.

Figura 42 - Imagens de AH de solo obtido por AFM, pH 9,0, método utilizando o ultrassom, potência 30 W, mica em repouso, (a) 1 minuto, $1\ \mu\text{m} \times 1\ \mu\text{m}$, em 2D, (b) 3D e (c) altura dos segmentos 1, 2 e 3 de (a); (d) 3 minutos, $5\ \mu\text{m} \times 5\ \mu\text{m}$, em 2D e (e) altura dos segmentos 1, 2 e 3 de (d); (f) 7 minutos, $5\ \mu\text{m} \times 5\ \mu\text{m}$, modo em 2D e (g) altura dos segmentos 1, 2 e 3 de (f).



FONTE: A autora.

Conforme observado, a dissolução do AH com a utilização do ultrassom ocorre com tempos entre 3 minutos (figura 42 (d)) e 5 minutos (figura 41 (e)). Portanto, para um método adequado, utilizando o ultrassom, estes tempos seriam apropriados para a dissolução do AH.

6.7. MÉTODO UTILIZANDO O ULTRASSOM COM DIFERENTES MASSAS DE AH, pH 9,0 E MICA EM REPOUSO

Neste procedimento, as imagens foram varridas com área de $5\ \mu\text{m} \times 5\ \mu\text{m}$. A figura 43 (a) mostra a imagem de AH obtida por AFM, com massa de 1,0 mg. O AH está disposto uniformemente sobre a mica, com poucos aglomerados sem expansão de suas estruturas, com altura em torno de 0,1 - 0,5 nm, figura 43 (b).

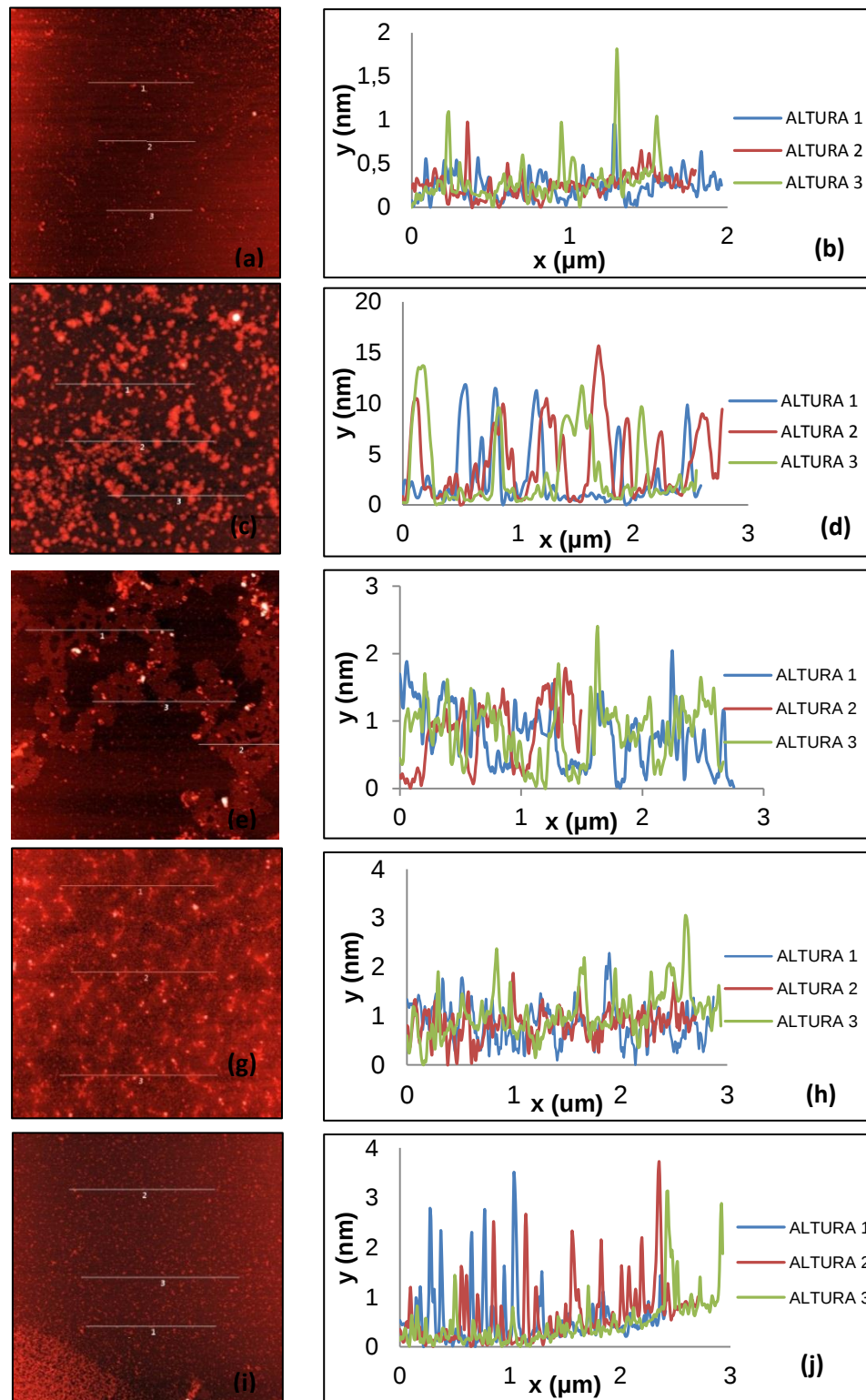
Na figura 43 (c), na imagem obtida por AFM com massa de 2 mg de AH, observa-se que o AH está distribuído de modo uniforme sobre o substrato de mica com mais aglomerados (pontos mais claros), sem abertura de suas partículas e sem expansão de sua estrutura. Pode-se verificar que neste procedimento o AH se aglomerou e não se dissolveu. A altura de seus aglomerados estão em torno de 0-10 nm, figura 43 (d) e outros agregados acima de 10 nm.

Para o processo utilizando 3 mg de AH, na figura 43 (e) nota-se a expansão do AH, a desagregação de suas partículas e a abertura de suas estruturas (parte mais clara), com altura em torno de 0,5-1,5 nm figura 43 (f). Neste procedimento, usando 3 mg de AH, o mesmo foi dissolvido com a utilização do ultrassom por 5 minutos, sendo assim, um método apropriado para a preparação das amostras de AH, em pH 9,0 para posterior utilização e obtenção de imagens através da AFM.

Para o procedimento usando 4,5 mg de AH, a figura 43 (g) mostra a imagem obtida por AFM em 2D em que o AH está distribuído uniformemente sobre o substrato da mica, com poucos aglomerados de até 8 nm (os pontos quase brancos) e com pouca abertura na sua estrutura devido a alta concentração de massa de AH. Na figura 43 (h), nota-se a dissolução do AH, em que a sua altura ficou em torno de 0,3–1,3 nm de altura.

A imagem de AH obtida para o procedimento proposto com massa de 6 mg de AH, pode ser observada na figura 43 (i), em que não houve expansão do AH, formando pequenos aglomerados e estes uniformes. Verificou-se, também, um aglomerado maior de AH, na parte inferior esquerda e mais clara. A altura média do AH, ficou em média em torno de 0,2 – 1,0 nm, figura 43 (j).

Figura 43 - Imagem de AH de solo obtido por AFM, pH 9,0, método utilizando o ultrassom, 5 min, potência 30 W, mica em repouso, 5 μm x 5 μm , (a) 1,0 mg de AH e (b) altura dos segmentos 1, 2 e 3 de (a); (c) 2,0 mg de AH e (d) altura dos segmentos 1, 2 e 3 de (c); (e) 3,0 mg de AH e (f) altura dos segmentos 1, 2 e 3 de (e); (g) 4,5 mg de AH e (h) altura dos segmentos 1, 2 e 3 de (g); (i) 6,0 mg de AH e (j) altura dos segmentos 1, 2 e 3 de (h).



FONTE: A autora.

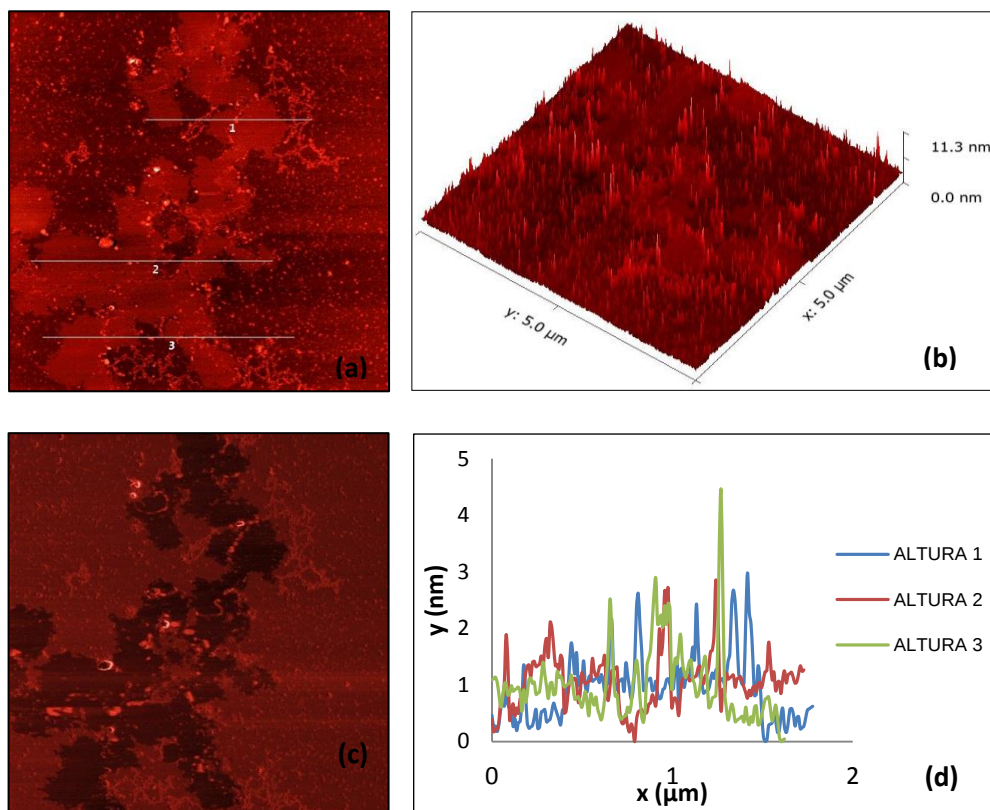
Nestes procedimentos, variando a massa do AH, pelas figuras 43 (a - j), nota-se que o melhor método é a utilização de 3 mg de massa de AH diluído em 80 mL de água Deionizada ultrapura a pH 9,0. Utilizando as massas de 1mg, 2 mg, 4,5 mg e 6 mg de AH, com a solução no ultrassom, pode se verificar que não houve completa expansão nas estruturas do AH. Deste modo, não se obteve uma boa imagem através do AFM nestas quantidades de massas, como ocorreu no procedimento usando 3 mg de massa de AH, figura 43 (e) e figura 43 (f).

6.8. RESUMO DAS MELHORES CONDIÇÕES A pH 9,0, UTILIZANDO O ULTRASSOM

Como observado nas imagens do método 6.3 (método convencional, sem ultrassom, pH 9,0 e mica em repouso), é um procedimento adequado para a preparação de amostras para obtenção de imagens por AFM, porém, o período de preparo da mesma é demorado, podendo levar até uma semana para a amostra ficar pronta. Um procedimento mais rápido para preparo de amostras de AH, foi utilizando o ultrassom para dissolução do AH. As amostras foram preparadas em período de tempo menor. O melhor tempo foi de 5 minutos, a melhor potência 30 W e a melhor massa foi de 3 mg para obtenção das imagens. Então, a solução contendo 3 mg AH e 80 mL de água Deionizada ultrapura, foi colocado em agitação mecânica por 30 minutos em pH 9,0 já ajustada com NaCl. Após este período, a solução foi levada para o ultrassom por 5 minutos e com potência de 30 W para dissolução do AH. A mica foi colocada na solução no período de 2 horas em repouso e depois retirada para, após uma semana de secagem, ser utilizada através da AFM.

A figura 44 (a) mostra a imagem obtida por AFM da amostra de AH preparada pelo método utilizando o ultrassom, com área de varredura de 5 μm x 5 μm . Nas figuras 44 (a) e 44 (b), observa-se também a abertura das estruturas dos AH e sua desagregação, parte mais clara. Na figura 44 (c), está representada a imagem de fase do AH. A altura das estruturas deste AH estão entre 0,5 – 2,0 nm como mostrado na figura 44 (d).

Figura 44 - (a) Imagens de AH de solo obtido por AFM, pH 9,0, método utilizando o ultrassom, 3 mg de AH, 5 min, potência 30 W, mica em repouso, modo não contato, 5 μm x 5 μm , em 2D, (b) 3D, (c) fase e (d) altura dos segmentos 1, 2 e 3 de (a).



FONTE: A autora.

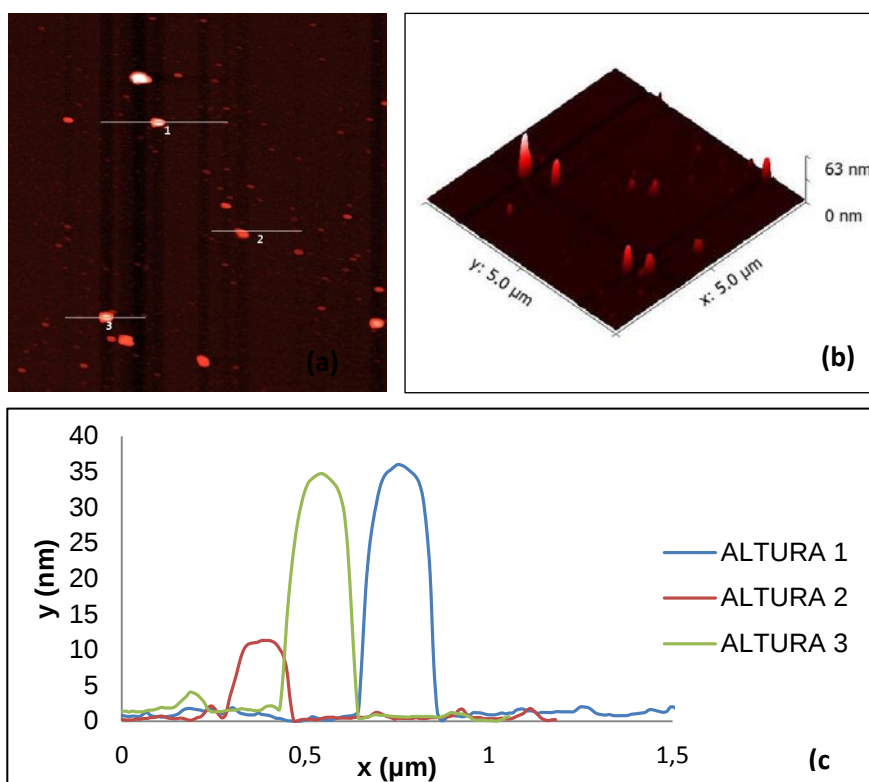
Nas figuras 44 (a - d), observa-se que, ao utilizar o ultrassom, o AH foi dissolvido completamente, sendo que foi usado um menor tempo (5 minutos) para dissolução. A vantagem deste método, utilizando o ultrassom, o mesmo foi usado para diminuir o tempo de preparo das amostras, que podem ser realizadas em uma tarde ou uma manhã, enquanto que na realização do procedimento sem a utilização do ultrassom (método convencional) a amostra leva até uma semana para ficar pronta. Este método é mais rápido e também é adequado para preparo das amostras para a posterior utilização na AFM.

6.9. MÉTODO UTILIZANDO O ULTRASSOM, pH 3,0 E MICA EM REPOUSO

No processo convencional, utilizando agitação mecânica, sem o ultrassom, e levando de 3 a 7 dias para o preparo da amostra, os autores Wilkinson *et al.* (1999), Saab *et al.* (2010), Barriquello (2005) encontraram pequenas partículas distribuídas pelo substrato da mica com alguns aglomerados com alturas de até 55 nm. Neste

processo, utilizando HCl para diminuir o pH da solução, AH com água deionizada ultrapura, a mesma foi levada para o ultrassom por 5 minutos na potência de 30 W, para verificar se o AH seria dissolvido no processo por um tempo menor. As figuras 45 (a) e 45 (b) trazem as imagens do AH obtida por AFM com área de varredura de $5\text{ }\mu\text{m} \times 5\text{ }\mu\text{m}$, no modo não contato.

FIGURA 45 - (a) Imagens de AH de solo obtido por AFM, pH 3,0, utilizando o ultrassom, 5 min, potência 30 W, mica em repouso, $5\text{ }\mu\text{m} \times 5\text{ }\mu\text{m}$, modo não contato em 2D, (b) 3D e (c) altura dos segmentos 1, 2 e 3 da figura 45 (a).

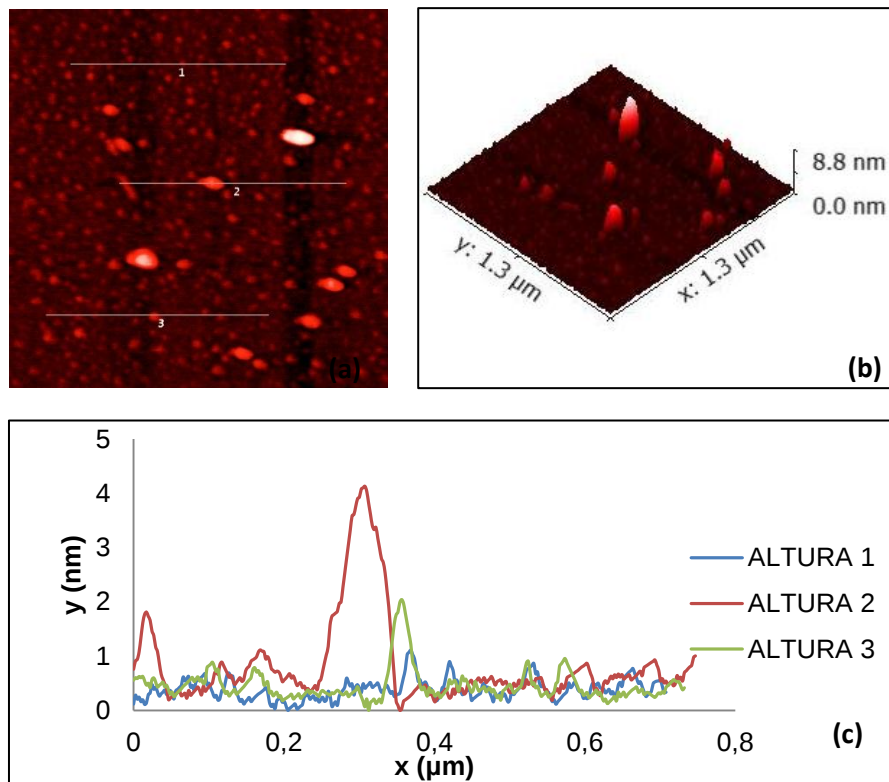


FONTE: A autora.

Observa-se, que não houve dissolução do AH, mesmo com a utilização do ultrassom, com alguns aglomerados até 35 nm, como na figura 45 (c) e outros maiores que chegam até 63 nm de altura como na figura 45 (b).

Para melhor visualizar o AH na mica, a imagem foi varrida com área de $1\text{ }\mu\text{m} \times 1\text{ }\mu\text{m}$, figuras 46. Nota-se os aglomerados em forma de pirâmide.

FIGURA 46 - (a) Imagens de AH de solo cultivado obtido por AFM, pH 3,0, método utilizando o ultrassom, 5 min, potência 30 W, mica em repouso, 1 μm x 1 μm , modo não contato em 2D, (b) 3D e (c) altura dos segmentos 1, 2 e 3 de (a).



FONTE: A autora

Estes resultados estão de acordo com Wilkinson *et al.* (1999), Saab *et al.* (2010), Barriquello (2005), Wang *et al.* (2007), Leite *et al.* (2012) e Barriquello *et al.* (2012), na figuras 20 (b); figura 22; figura 24 (a); figura 25 (a-c); figura 27 (b) e figura 29 (a) respectivamente, em que o AH, a pH baixo (pH 3,0) nas imagens, formam agregados, aglomerados ou macromoléculas pequena e grandes, devido ao AH ser insolúvel e precipitar pela acidificação do extrato alcalino (STEVENSON, 1994).

7. CONCLUSÕES

As imagens de AH, obtidas por AFM, permitiram a visualização ou não da forma do seu arranjo, dependendo do método para o preparo das amostras.

Após o desenvolvimento deste trabalho, conclui-se que os dois métodos, com a mica em repouso para o preparo das amostras, tanto no processo convencional (em agitação) como no processo com ultrassom, a pH 9,0, são válidos para obtenção de imagens de ácidos húmicos por meio da técnica da Microscopia de Força Atômica.

De acordo com Potencial Zeta se esperava que em pH 9,0 as estruturas de AH se abrissem e tivessem alturas menores e a pH 3,0 as estruturas estariam dispostas sobre o substrato de mica com glóbulos (grandes e pequenos) e com maiores alturas, confirmando assim estes resultados através das imagens obtidas por meio da AFM.

Com a utilização do ultrassom e pH 9,0, o melhor preparo de amostra para utilização na AFM foi com massa de AH de 3 mg, tempo de 5 minutos e potência de 30 W no ultrassom e a mica em repouso por 2 horas para deposição do AH. No processo convencional (em agitação) e pH 9,0, a massa foi de 3 mg de AH, agitação da solução por três dias e mica em repouso por 2 dias para deposição do AH. No entanto, com a utilização do ultrassom as amostras são preparadas em período menor, desta forma pode ser obtido um maior número de amostras em um dia para depois serem utilizadas no Microscópio de Força Atômica.

No método utilizando pH 3,0, verificou-se que as imagens são difíceis de serem obtidas, devido a não solubilidade do AH em pH ácido como já era esperado. Porém, obteve-se boas imagens utilizando ultrassom em potência de 30 W e tempo de 5 minutos.

8. SUJESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS

Podem ser realizados estes procedimentos com Ácido Fúlvico de solo, Ácido Húmico aquático e amostras padrão de Ácido Fúlvico e Ácido Húmico para obtenção de imagens por meio AFM, verificando o comportamento dos mesmos.

Com as imagens já obtidas, podem-se utilizar outras técnicas, como Espectroscopia de Ressonância Paramagnética (EPR), Ressonância Magnética Nuclear, Ultravioleta Visível entre outros, no intuito de fornecer mais informações sobre as propriedades físico-químicas do ácido húmico.

9. REFERÊNCIAS

BARRIQUELLO, M. F. **Influência de íons metálicos na estrutura de substâncias húmicas detectadas por espectroscopia**. 2005. 120 f. Tese (Programa de Pós Graduação Ciências/Química) Universidade de São Carlos. São Carlos, 2005.

BARRIQUELLO, M. F.; LEITE, F.L.; DEDA, D. K.; SAAB, S.C.; CONSOLIN-FILHO, N.; PIZA, M. A.; MARTIN-NETO, L. **Study of a Model Humic Acid-Type Polymer by Fluorescence Spectroscopy and Atomic Force Microscopy**. *Materials Sciences and Applications*, 2012, 3, 478-484.

BINNIG, G. and ROHRER, H. Scanning tunneling microscopy – from birth to adolescence. **Rev. Mod. Phys.** 59, 615–625, 1987.

BINNIG, G. AND ROHRER, H. In touch with atoms. **Rev. Mod. Phys.** 71, S324–S330, 1999.

BONOMETO, V. E. **Estudo da humificação da material orgânica de um cambissolo em diferentes sistemas de manejo por meio de técnicas espectroscópicas**. Dissertação (Programa de Pós Graduação em Ciências/Física) Universidade Estadual de Ponta Grossa. Ponta Grossa, 2010.

BUFLE, J. The analytical challenge posed by fúlvico and humic compounds. **Anal. Chim. Acta**. 232, p. 1-2, 1990.

CARTER, M. R.; GREGORICH, E. G. Methods to characterize and quantify organic matter storage in soil fractions and aggregates. In: CARTER, M.R.; STEWART, B. A. ed. **Structure and organic matter storage in agricultural soils**. Boca Raton, Lewis, p.449-466, 1996.

CARTER, M.R. Organic matter and sustainability. In: REES, R.M. *et al.* **Sustainable management of soil organic matter**. New York: CABI Publishing, p.9-22, 2001.

CHICHESTER, B. L. **Procedures in Scanning Probe Microscopies**, John Wiley & Sons, Inc.: England, 1998.

CHRISTENSEN, B. T. **Physical fractionation of soil and organic matter in primary particle size and density separates.** *Advances in Soil Science*. V. 20, p. 1-19, 1992.

CONTE, P. e PICCOLO, A. Conformation arrangement of dissolved humic substances: influence of solution composition on association of humic molecules. ***Environmental Science & Technology***, v.33, p. 1682-1690, 1999.

CUNHA, T. J. F. *et al.* Fracionamento da matéria orgânica humificada em solos brasileiros. In: CANELLAS, L. P.; SANTOS, G. A. **Humosfera: tratado preliminar sobre a química das substancias húmicas.** Campos dos Goytacazes: L. P. CANELLAS, G. A. SANTOS, Cap. 3. P. 54-80, 2005.

DE ROBERTIS, E. D. P.; DE ROBERTIS, M. F.; SAEZ, F.A. **Biologia celular.** 9. Ed. Rio de Janeiro: Ateneo, c 1977.

DI BERNARDO, L. **Métodos e Técnicas de Tratamento de Água.** Rio de Janeiro. ABES, v. 1 e 2, 1993.

FALCÃO, B.; FERREIRA, L.; PINTO, P.. **Microscopia de Força Atômica:.** Técnicas de Caracterização de Estruturas. Universidade de Aveiro, 2009.

FASSARELLA K. M. *et al.* **Caracterização quali-quantitativa da matéria orgânica do solo.** Rio Grande do Norte. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável.*, v. 7, n. 5, p. 18-30, 2012.

FERREIRA, A. A. P. E; YAMANAKA, H.. Microscopia de Força Atômica aplicada em imunoensaios. **Química Nova**, vol. 29 nº 1, 137-142, 2006. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/qn/v29n1/27869.pdf>>. Acesso em 12/03/2011.

FILHO, A. V. da S.; SILVA, M. I. V. Importância das Substancias Húmicas para a Agricultura. **Anais, vol. 2, emepa**, João Pessoa, p. 1-14, 2002.

FLAIG, W. Comparative chemical investigations on natural humic compounds and their model substances. **Sci. Proc. Roy. Dublin Soc.** v.4, p.149-162, 1960.

FROMMER, J.; **Scanning probe microscopy of organics, an update:** *Thin Solids Films*. v.273, p.112-115, 1996.

FUKUI, M. **Técnicas de Microscopia de Tunelamento de Elétrons (TEM) e Microscopia de Força Atomica (AFM) aplicadas ao estudo de superfícies de grafite e diamante.** BAE/22623, T/UNICAMP, São Paulo, 1992.

GÜNTHERODT H.-J.; R. WIESENDANGER, R. (Eds.), **Scanning Tunneling Microscopy II.** Second Edition, Spring-Verlag, Feb 1995.

GUTERRES, S. S.; SCHAFFAZICK S. R.; FREITAS, L. de L.; POHLMANN A. R. **Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos.** Quím. Nova. vol. 26 no.5. São Paulo, Sept./Oct., 2003.

GWYDDION 2.28. Download em: <http://www.winportal.com/gwyddion>. Acesso em 19/11/2013.

HAYES, M.H.B.; SWIFT. R.S.; "The chemistry of soil organic colloids". In: GREENLAND, D.J; HAYES, M.H.B. (eds.) **The chemistry of soil constituents**, Wiley & Sons, New York, p.179-230, 1978.

HERRMANN, P. S. P., et al. Microscopia de Varredura por Força: uma Ferramenta Poderosa no Estudo de Polímeros. **Ciência e Tecnologia** - Out/Dez - p. 51-61, 1997

HOWLAND, R., BENATAR, L. **A practical guide to scanning probe microscopy.** Veeco Instruments Inc. p. 1-30, 2005.

JALILI, N; LAXMIRANAYANA K. **A review of atomic force microscopy imaging systems: application to molecular metrology and biological sciences.** Vol. 14, Clemson, USA, 2004. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0957415804000455> Acesso em: 17/12/2012.

KIEHL, E. J. **Manual de Edafologia:** Relações Solo-Planta. Editora Agronômica Ceres, São Paulo, 1979.

KITTEL, C. **Introdução à Física do Estado Sólido.** 5º Ed. Editora: Guanabara Dois S.A., Rio de Janeiro, 1978.

KONONOVA, M.M. **Matéria orgánica del suelo; su natureza, propiedades y métodos de investigación**. Barcelona, Oikos-tau, 365p. 1982.

KONONOVA, M.M. **Soil organic matter**. Oxford: Pergamon Press, p. 272, 1966.

LEITE, F. L.; DEDA, D. K.; SIMÕES, M. L.; DA SILVA, W. T. L.; MARTIN-NETO, L.; DA CUNHA, T. J. F. **Conformational Analysis of Humic Acids from Amazonian Dark Earth Soils observed by AFM**. Science and Technology 2012, 2(4): 61-65;

LUCHESI, E. B.; FAVERO, L. O. B.; LENZI, E. **Fundamentos da Química do Solo**. Editora Freitas Bastos, Rio de Janeiro, 2002.

LUZ, F. M. de M. **Técnicas espectroscópicas na análise da humificação da matéria orgânica de solo de várzea**. Dissertação (Programa de Pós Graduação em Ciências/Física) Universidade Estadual de Ponta Grossa. Ponta Grossa-PR, 2013.

MARTELLI, L. F. A.; ALMEIDA, T.L., PIGATIN, L.B.F.; MILORI, D.M.B.P.; MARTIN-NETO, L.; DA SILVA, W.T.L. Potencial Zeta e medida de tamanho de partículas: possíveis aliadas nos estudos estruturais das SH. **IX EBSH, ANAIS**, ARACAJU, 2011.

MARTELLI, L. F. de A. **Avaliação quantitativa e qualitativa da matéria orgânica de solo sob a aplicação de efluente de esgoto tratado em biodigestor anaeróbio**. Dissertação (Instituto de Química de São Carlos) Universidade de São Paulo, 2011. Disponível em: [file:///C:/Users/Rosana/Desktop/artiogps%202014/LilianFernanda_deAlmeidaMartelliR%20\(1\)%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/Rosana/Desktop/artiogps%202014/LilianFernanda_deAlmeidaMartelliR%20(1)%20(1).pdf). Acesso em: 10/04/2014.

MARTINS, T. **Caracterização mineralógica e da matéria orgânica do solo por técnicas espectroscópicas e DRX**. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Química Aplicada) Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2010.

MEURER, E. J. **Introdução à ciência do solo**. Fundamentos da química do solo. 1ª ed. Porto Alegre: Gênese, p.11-21, 2000.

MONTEIRO, T. **Apontamentos de Nanociências e Nanotecnologias**, 2009.

MOREIRA, F. M.S. e SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. Lavras: Editora UFLA, Minas Gerais. 2002.

NANO SCIENCE INSTRUMENTS, 2012. Disponível em: <<http://www.nanoscience.com/products/afm/afm-probes/>>. Acesso em 18/12/2012.

Neves, B. R. A.; Vilela, J. M. C. e Andrade, M. S. Microscopia de varredura por sonda mecânica: uma introdução. *Cerâmica*. vol.44 n.290. São Paulo, Nov./Dec. 1998.

NOVOTNY, E. H. **Estudos espectroscópicos e cromatográficos de substâncias húmicas de solos sob diferentes sistemas de preparo**. Tese (Programa de Pós-Graduação em Ciências – Físico Químico) Universidade de São Carlos, São Paulo, 2002.

ORLOV, D.S. **Humus acids of soils**. Moscow: Moscow University Publisher, p. 378, 1974.

ORLOV, D.S. **Humus Acids of Soils**. Rotterdam, A.A. Balkema, 1985.

PAPADOPOULOS, *et al.* AFM on humic acid adsorption on mica. In: Liu *et al*: **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects** 174 (2000) 245–252

PICCOLO, A. Differences in high performance size exclusion chromatography between humic substances and macromolecular polymers. In: GHABBOUR, E.A.; DAVIES, G. (Eds.) **Humic substances versatile components of plants, soil and water**, Royal Society of Chemistry, Cornwall, pp.111-124, 2000.

PIERINI, C. e MIZUSAKI, A.M. P. **Significados Paleoambientais e Paleoclimáticos dos Paleossolos: Uma Revisão**. *Revista Pesquisas em Geociências*, 34 (1): 45-61, 2007.

POJAR, M. **Técnicas de Caracterização: AFM E SPM**. Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011. Disponível em: <https://www.google.com.br/searchq=aula+scanning+microscope&rlz=1C1GGGE_ptBRBR572BR572&oq=aula+scanning+microscope&aqs=chrome..69i57.8901j0i7&sourceid=chrome&espv=210&es_sm=93&ie=UTF8#q=aula+scanning+probe+microscopy-+mariana+pojar.pdf>. Acesso em 21/03/2012.

RÉ POPPI, N.; TALAMONI, J.; Estudo dos ácidos húmico e fúlvico, extraídos de solos, por espectroscopia de infravermelho. **Química Nova**, v.15, p.281-285, 1992.

ROSA, A. H. **Desenvolvimento de metodologia para extração de substâncias húmicas de turfas utilizando-se hidróxido de potássio**. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Química) Instituto de Química de Araraquara, Araraquara-SP, 1998.

SAAB, S. C. **Caracterização da matéria orgânica em gleissolos por espectroscopias de EPR, RMN, IV e UV-Visível**. 1999, 111 f. Tese (doutorado em Ciências – Química Analítica) – Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, 1999.

SAAB, S.C.; CARVALHO, E. R.; BERNARDES FILHO, R.; MOURA, M. R.; MARTINETO, L.; MATTOSO, L.H. pH Effect in Aquatic Fulvic Acid from Brazilian River. **Journal of the Brazilian Chemical Society, J. Braz. Chem. Soc.**, Vol. 21, No. 8, São Paulo, p.1490-1496, 2010.

SAIZ-JIMENEZ, C. The chemical structure of humic substances: recent advances. In: PICCOLO, A. (ED.). **Humic substances in terrestrial ecosystems**. Amsterdam: Elsevier, p. 1-44, 1996.

SANTOS, A. A. do E.; LIMA, J.S.; CARVALHO, G.C. de. **Técnicas de aplicação de composto orgânico, proveniente de resíduos urbanos domésticos, no desenvolvimento vegetal**. VI Simpósio Ítalo Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, 2002.

SANTOS, F. S.; GUENO, S. M. e KURI S. E. **Microscopia de varredura por sonda (SPM) aplicada a aços inoxidáveis dúplex**. R. Esc. Minas, Ouro Preto, 60(1): 183-187, jan. mar. 2007.

SCHULTEN, H.R.; e SCHNITZER, M. A state of the art structural concept for humic substances. **Naturwissenschaften**, v. 82, p.29-30, 1993.

SCHULTEN H-R, SCHNITZER M Chemical model structures for soil organic matter and soils. **Soil Sci** 162:115–130, 1997.

SENESE, N.; D'ORAZIO, V.; RICCA, G. Humic acids in the first generation of EUROSOILS. **Geoderma**, v. 116, n. 3-4, p. 325-344, Oct 2003.

SIMPSON, A. J. *et al.* Molecular structures and associations of humic substances in terrestrial environment. **Naturwissenschaften**, v. 89, p.84-88 2002.

STEVENSON, F.J. - Biochemistry of the formation of humic substances. In: STEVENSON, F.J. - **Humus chemistry**. Wiley & Sons, New York, p. 195-219, 1982.

STEVENSON, F.J. **Humus chemistry: Genesis, composition, reactions**. 2 ed. John Wiley & Sons, Nova Iorque, 1994.

STEVENSON, F.J.; Geochemistry of soil humic substances. In: AIKEN, G.R.; MCKNIGHT, D.M.; WERSHAW, R.L. (Eds.) **Humic Substances in Soil, Sediment and Water**, John Wiley & Sons, New York, p.13, 1985.

SUTTON, R. e SPOSITO, G. Molecular Structure in Soil Humic Substances: The New View. **Environmental Science and Technology**, v.39, n.23, p. 9009-9015, 2005.

SWIFT, R.S. Molecular weight, size shape, and charge characteristics of humic substances: Some basic considerations. In: HAYES, M. H. B.*et al.* **Humic substances II: In search of structure**. New York: John Wiley, p. 449-466, 1989.

SWIFT, R.S. Organic matter characterization. In: Sparks, D.L. *et al.* **Methods of soil analysis: chemical methods**. Soil Science Society of America; American Society of Agronomy, Madison. (SSSA. Book Series, 5). p. 1011-1020, 1996.

UNIFESP. **Laboratório de Neurofisiologia**, Universidade Federal de São Paulo, 1994-2008. Disponível em: <<http://www.neurofisiologia.unifesp.br/eletronica.htm>. Acesso em 01/12/2012>.

WAG, X.; CHEN, C.; JIANG, H.; HU, W. Direct observation of macromolecular structures of humic acid by AFM and SEM. **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects** 302. P. 121–125. 2007.

WILKINSON, K. J. *et al.*. Atomic Force Microscopy of Humic Substances: Effects of pH and Ionic Strength. Universidade de Geneva. Vol. 33, nº 21, **Environmental Science & Technology**, pg. 3911-3917, 1999.

WOODS, W.I. Development of antrosol research. In: LEHMANN, J.; KERN, D.C.; GLASER, B.; WOODS, W.I. (Ed.). **Amazonian dark earths; origin, properties and management**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2003. p.3-14.

WINTER, E.J. **A Água, o Solo e a Planta**. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 1976, 170p.

ZANNETE, S. I. **Introdução à microscopia de força atômica**. Ed. Livraria da Física, São Paulo, 2010.

ZANNETE, S. I. **Funcionamento de um microscópio de Força atômica**. Apostila CBPF, Rio de Janeiro, 1997. Disponível em: <<http://www.cbpf.br/~nanos/Apostila/>>. Acesso em: 21 de fevereiro de 2011.

ZAVALA, G. **Colloid Polym Sci.** 286, 85-95, 2008.