

DETERMINAÇÃO DA EMISSÃO DE NH₃ E N₂O PARA SOLO ALCALINO
COM DIFERENTES UMIDADES E NA PRESENÇA DA BACTÉRIA
Herbaspirillum Seropedicae UTILIZANDO UM LASER DE CASCATA
QUÂNTICA E ACOPLADO A UMA CÉLULA FOTOACÚSTICA
DIFERENCIAL

PAULO SÉRGIO GOMES DE ALMEIDA JUNIOR

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

NOVEMBRO-2015

DETERMINAÇÃO DA EMISSÃO DE NH₃ E N₂O PARA SOLO ALCALINO
COM DIFERENTES UMIDADES E NA PRESENÇA DA BACTÉRIA
Herbaspirillum Seropedicae UTILIZANDO UM LASER DE CASCATA
QUÂNTICA E ACOPLADO A UMA CÉLULA FOTOACÚSTICA
DIFERENCIAL

PAULO SÉRGIO GOMES DE ALMEIDA JUNIOR

Tese apresentada ao Centro de Ciência e
Tecnologia da Universidade Estadual do
Norte Fluminense, como parte das exigên-
cias para obtenção do título de Doutor em
Ciências Naturais.

Orientador: Professor Marcelo Gomes da Silva

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
NOVEMBRO-2015

**DETERMINAÇÃO DA EMISSÃO DE NH₃ E N₂O PARA SOLO ALCALINO
COM DIFERENTES UMIDADES E NA PRESENÇA DA BACTÉRIA
Herbaspirillum Seropedicae UTILIZANDO UM LASER DE CASCATA
QUÂNTICA E ACOPLADO A UMA CÉLULA FOTOACÚSTICA
DIFERENCIAL**

PAULO SÉRGIO GOMES DE ALMEIDA JUNIOR

Tese apresentada ao Centro de Ciência e
Tecnologia da Universidade Estadual do
Norte Fluminense, como parte das exigên-
cias para obtenção do título de Doutor em
Ciências Naturais.

**Professor Marcelo Gomes da Silva - Orientador
UENF – CCT – LCFIS**

**D. Sc. Marcelo da Silva Sthel - Co Orientador
UENF-CCT-LCFIS**

**D. Sc. Helion Vargas
UENF – CCT – LCFIS**

**D. Sc. Leonardo Mota
UENF – CCT – LCFIS**

**D. Sc. Carlos Frederico de Menezes Veiga
CCG/UFRRJ**

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
NOVEMBRO-2015

Agradecimentos

À Deus, pela graça e proteção nos momentos de dificuldades e pelo amor que nos oferece.

Aos meus pais, que sempre me apoiaram e me deram condições para chegar até aqui.

A minha Tia Márcia por acreditar em mim, pelo o apoio e sábias palavras num momento de decisão na minha vida.

A minha esposa Josilandia, pelo carinho e amor, pela compreensão nos momentos de ausência e apoio nos momentos de dificuldades.

Ao professor Marcelo Gomes da Silva pela oportunidade, incentivo e por ter sido além de um excelente orientador, um amigo e um exemplo de dedicação e excelência no trabalho.

Ao professor Marcelo Sthel por suas palavras amigas e motivadoras que contagiam o ambiente de trabalho.

Ao professor Fábio Olivares e a sua equipe, pelo auxílio, boa vontade e cooperação no trabalho.

Aos demais professores do LCFIS, pela amizade e pela minha formação.

As minhas colegas de trabalho Kariza e Sâmylla que me auxiliaram durante todas as etapas do doutorado sempre com muita dedicação e boa-vontade, sem vocês não teria conseguido.

Aos amigos do LCFIS Guto, Guilherme, Milton, Léo, Thallis, pela amizade.

Aos técnicos Luiz Antônio e Sergioe Israel pela boa vontade e o apoio no ajuste e manutenção de todo o laboratório.

Resumo

A agricultura é tida como uma atividade de grande impacto ambiental, em particular na emissão de gases estufas. Para reduzir tais perdas, são necessárias melhores práticas de manejo, incentivos econômicos para uso de fertilizantes balanceados e menores emissões de NO_x e NH_3 . Uma maneira de melhorar a eficiência, é associá-lo a compostos que permitiram segurar por mais tempo o nitrogênio no solo. Entre esses materiais pode-se destacar as zeólitas naturais, sendo utilizadas na agricultura para melhora a qualidade do solo, favorecendo a retenção de nutrientes e água. Os materiais analisados são granulados compostos por ureia fertilizante e zeólita natural. Esses sólidos foram fornecidos pela Embrapa Solos/RJ. Estes granulados estão separados pelo teor de zeólita contidos em cada grão. Este produto tem ureia misturada a dois tipos de zeólita: cubana e o concentrado zeolítico (zeólita brasileira). Neste trabalho, foi utilizado no porta amostra uma massa de 40g de solo com pH igual a 8,0 e disposto aleatoriamente sobre sua superfície o fertilizante (ureia combinado a zeólita natural), onde foram utilizados três proporções de zeólitas (5%, 20% e 40%) combinados a ureia e a ureia pura, para tal, foram utilizados as massas de 0,241g para 40% de zeólitas combinados a ureia, 0,183g para 20% de zeólitas combinados a ureia, 0,151g para 5% de zeólita incorporada a ureia e 0,144g de ureia. Os gases emitidos foram analisados em espectrômetro fotoacústico que consiste um laser de cascata quântica acoplado a uma célula fotoacústica diferencial. Os resultados mostraram um decréscimo na taxa de amônia emitido com o aumento do percentual de zeólita misturado à ureia, não apresentando, todavia, uma redução significativa para amostras com teores de 20% e 40% de concentrado zeolítico brasileiro incorporados, obtendo-se um efetividade similar das zeólitas cubanas frente ao concentrado zeolítico brasileiro, mas apresentaram uma maior emissão de óxido nitroso os fertilizantes misturados a ureia em relação a emissão da uréia pura.

Abstract

Agriculture is seen as an activity of great environmental impact, in particular on the issue of greenhouse gases. To reduce such losses, they are required best management practices, economic incentives for the use of balanced fertilizers and lower emissions of NO_x and NH_3 . One way to improve efficiency is to associate it with compounds that have allowed hold back any longer the nitrogen in the soil. Among these materials can highlight the natural zeolites are used in agriculture to improve soil quality, favoring the retention of nutrients and água. Os analyzed materials are granulated fertilizer composed of urea and natural zeolite. These solids were provided by Embrapa Solos / RJ. These granules are separated by the zeolite content contained in each grain. This product has mixed urea to two types of zeolite: Cuban and zeolite (Brazilian zeolite). In this work, we used the port sample a mass of soil 40g with pH of 8.0 and arranged randomly on the surface fertilizer (urea combined natural zeolite), which were used three proportions of zeolites (5%, 20% and 40%) combined pure urea and urea, to this end, the masses were used 0,241g for 40% of zeolites combined with urea, 0,183g for 20% of zeolites combined with urea, 0,151g for 5% zeolite incorporated urea and urea 0,144g. The exhaust gases were analyzed in photoacoustic spectrometer what constitutes a quantum cascade laser coupled to a differential photoacoustic cell. The results showed a decrease in ammonia rate output with increasing zeolite percentage mixed with urea, not showing, however, a significant reduction in samples with levels of 20% and 40% incorporated Brazilian zeolite, obtaining an effectiveness like the Cuban front zeolites the Brazilian zeolite, but had a higher emission of nitrous oxide fertilizers mixed with urea in relation to issuance of pure urea.

Sumário

1	Introdução	1
1.1	Objetivos	3
1.1.1	Objetivos Gerais	3
1.1.2	Objetivos Específicos	3
2	Revisão Bibliográfica	4
2.1	Zeólitas Naturais	4
2.1.1	Estruturas das Zeólitas	4
2.1.2	Peneira Molecular	7
2.1.3	Sítios ácidos de Brønsted e Lewis	8
2.2	<i>Herbaspirillum Seropedicae</i>	11
2.3	Ciclo do Nitrogênio	13
2.4	Espectroscopia Fotoacústica	16
2.4.1	Absorção Espectroscópica	16
2.4.2	Geração do Sinal Fotoacústico	19
2.4.3	Geração de Ondas Acústicas	21
2.4.4	Ressonadores Acústicos	23
3	Materiais e Métodos	26
3.1	Laser de Cascata Quântica	26
3.2	Célula Fotoacústica Diferencial	29
3.3	Espectrômetro fotoacústico acoplado com um laser de cascata quântica para detecção de amônia e óxido Nitroso	31
3.4	Micro-organismo	33
3.5	Contagem pelo número mais provável	33
3.6	Zeólitas Naturais	33
3.7	Montagem do Experimento	34
4	Resultados	36
4.1	Célula Fotoacústica Diferencial	36
4.2	Calibração do Espectrômetro Fotoacústico para Detecção de NH ₃ e N ₂ O	39
4.3	Volatilização de Amônia	46

4.4	Crescimento das Bactérias	53
4.5	Volatilização de N ₂ O	54
5	Conclusões	59
5.1	Perspectivas futuras	60
	Referências Bibliográficas	61

Lista de Figuras

2.1	Unidades estruturais básicas das zeólitas. (a) Tetraedro com um átomo de silício no centro e átomos de oxigênio nos vértices. (b) Tetraedro com átomo de Al substituindo o Si e ligado a um cátion monovalente para compensar a diferença de carga entre o Si e o Al. (c) Estrutura incluindo átomo divalente para balancear as cargas entre o Al e o Si numa cadeia múltipla de tetraedro (Luz, 1995)	5
2.2	Representação da disposição dos cátions de compensação (M) na estrutura da zeólita (Fujikata et al., 1998)	5
2.3	Unidades secundárias de ligação (Giannetto, 1990)	6
2.4	Poliedro secundários formados com as SBU's (Mascarenhas, 2001)	6
2.5	Estrutura de algumas zeólitas (Mascarenhas, 2001)	7
2.6	Representação esquemática das estruturas de cavidades da zeólita (Macedo, 2007)	8
2.7	Tipos de seletividade como peneira molecular (Schuchardt, 2001)	9
2.8	Esquema representativo das coordenações tetraédricas, seguindo a regra de Loewenstein, (Martins and Cardoso, 2006)	9
2.9	Algumas relações Si/Al em arranjos tetraédricos.	10
2.10	Foto da <i>Herbaspirillum Seropedicae</i>	12
2.11	Esquema ilustrativo pela ocupação da <i>Herbaspirillum Seroprδικae</i> (Monteiro et al., 2012)	12
2.12	As principais vias de transformação biológica de nitrogênio do ciclo do nitrogênio. (Canfield et al., 2010)	14
2.13	Descrição do ciclo do nitrogênio mundial na terra e no oceano . Os principais processos que transformam nitrogênio molecular em reativo são mostrados. Também é mostrado o acoplamento forte entre os ciclos de nitrogênio na terra e no oceano com os de carbono e fósforo . Fluxos azuis referem a (fluxos naturais) e fluxos laranja denotam a perturbação antrópica. (Gruber and Galloway, 2008)	15
2.14	Esquema dos processos que ocorrem durante a geração do sinal fotoacústico (Miklos et al., 2001)	17
2.15	Esquema representativo dos modos ressonantes longitudinal, azimutal e radial em um ressonador cilíndrico (Miklos et al., 1999)	25

3.1	Fontes de laser e sua cobertura dos comprimentos de onda (Tittel et al., 2003)	27
3.2	Esquema básico do funcionamento do laser de cascata quântica (Daniel Hofstetter, 2003)	28
3.3	Tunelamento de elétrons através dos poços quânticos presente na banda de condução de LASER de cascata quântica	29
3.4	(a) Célula fotoacústica utilizada para a detecção de amônia e (b) célula fotoacústica utilizada para a detecção de óxido nitroso.	30
3.5	Célula fotoacústica ressonante diferencial (Miklos et al., 2001)	31
3.6	Montagem experimental; (1) gás de arraste (nitrogênio), (2) fluxômetro eletrônicos, (3), (4) armadilha de nitrogênio líquido, (5) célula fotoacústica (detector), (6) laser, (7) amplificador “lock-in”, (7)-(9) – eletrônica usado para o funcionamento do laser.	32
3.7	Granulados compostos por ureia e concentrado zeolítico em três teores diferentes: (a)5%,(b) 20% e (c) 40%.	34
3.8	Granulados compostos por ureia e zeólita cubana em três teores diferentes: (a)5%,(b) 20% e (c) 40%.	34
3.9	Imagem do porta amostra utilizado para os ensaios experimentais	35
4.1	Varredura de frequências, para um ressonador cilíndrico. Na figura podemos visualizar os modos ressonantes longitudinal, radial e azimutal.	36
4.2	Medidas de ressonâncias utilizando com gás de arraste o nitrogênio (linha em preto)e o ar sintético (linha em vermelho) como gás de arraste para uma amostra de 3,9ppm de amônia.	37
4.3	Ressonância para uma amostra gasosa de 10ppm em nitrogênio.	38
4.4	Frequência de ressonância e fator de qualidade para diluição de N_2O em He.	39
4.5	Espectro foi obtido variando a temperatura do diodo LASER entre $-30^{\circ}C$ a $35^{\circ}C$.	40
4.6	O espectro foi obtido variando a temperatura do laser LCQ entre $-30^{\circ}C$ a $35^{\circ}C$.	40
4.7	O espectro teórico foi obtido do banco de dados do Hitran	41
4.8	Curvas de diluição de NH_3 utilizando o nitrogênio e o ar sintético com gás de arraste.	42
4.9	Curva de calibração do sinal fotoacústico em função da concentração de NH_3 . Na figura (a) foi utilizado o nitrogênio com gás de arraste e na figura (b) o ar sintético.	43
4.10	Relação do sinal fotoacústico com a potência emitida do diodo LASER.	44
4.11	Espectros fotoacústicas obtidos para três amostras de gases na faixa de emissão do LCQ utilizado para detecção de N_2O	44
4.12	Varredura teórica obtido através do banco de dados do Hitran.	45
4.13	Diluição do óxido nitroso utilizando ar sintético como gás de arraste.	46

4.14	Curva de calibração do óxido nitroso utilizando ar sintético como gás de arraste.	46
4.15	Volatilização da amônia para o fertilizante produzindo através da mistura de 40% de concentrado zeolítico brasileiro misturado com ureia para uma amostra de solo com pH de 8,0 com diferentes umidades do solo(seco, 22,5% e 25%)	47
4.16	Acumulativo da volatilização da amônia para o fertilizante produzindo através da incorporação de 40% de zeólita nacional nacional em uréia para diferentes umidades do solo.	48
4.17	Taxa de emissão amônia temporal para diferentes proporções do concentrado zeolítico nacional misturados a ureia.	49
4.18	Varredura espectral das amostras gasosas emitadas dos concentrados zeolíticos adicionado ao solo.	49
4.19	Emissão total de amônia ao longo dos dias, para os fertilizantes de continham proporções diferentes de concentrados zeolíticos brasileiros incorporados a ureia.	50
4.20	Taxa temporal de emissão de amônia para diferentes proporções de zólita cubana misturado a ureia triturada.	51
4.21	Varredura espectral das amostras gasosas emitadas das zeólitas cubanas mituradas a ureia e adicionado ao solo.	51
4.22	Emissão total de amônia ao longo dos dias, para os fertilizantes de continham proporções diferentes de zeólita cubana misturados a ureia.	52
4.23	Número mais provável de células de <i>Herbaspirillum seropedicae</i> estirpe HRC54. Cada valor representa a média de três repetições	53
4.24	Número de bactérias totais. Cada valor representa a média de três repetições	54
4.25	Emissão de óxido nitroso para concentrados zeolíticos misturados a ureia. .	55
4.26	Varreduras espectrais em função do tempo para a amostra CB 40%	55
4.27	Acumulativo das emissões de óxido nitroso para diferentes percentuais de concentrados zeolíticos misturados a ureia.	56
4.28	Evolução temporal da taxa de óxido nitroso emitido para zeólitas cubanas misturadas a uréia.	57
4.29	Acumulativo das emissões de óxido nitroso em função dos dias para zeólitas cubanas misturadas a ureia.	58

Lista de Tabelas

2.1	Valores dos parâmetros da solução de Bessel para os primeiros modos azimutal e radial de uma cavidade acústica cilíndrica(Hess, 1983)	24
-----	---	----

Capítulo 1

Introdução

A agricultura no século XXI apresenta vários desafios, entre eles: produzir mais alimentos para uma população crescente, mais matéria-prima para uma bioenergia com um mercado potencial e adotar métodos mais eficientes de produção sustentável que se adaptam à mudança climática.

A agricultura é tida como uma atividade de grande impacto ambiental, por consumir água e poluir intensamente as fontes de águas subterrâneas e superficiais com nitrado e amônia. A agricultura também contribui significativamente para a poluição das águas com fosfatos e libera gases que contribuem para a intensificação do efeito estufa (Houghton et al., 2001).

A quantidade de gases estufa liberada pela agricultura representa uma importante parcela do total das emissões, apesar deste ser raramente a dominante. Porém, relativamente, essa emissão danosa de gases tende a crescer, uma vez que as emissões derivadas da produção industrial e de energia crescem menos rapidamente. Os gases estufa relacionados à agricultura são: metano, ácido nítrico e amônia (este de forma indireta). Em alguns países, esses gases podem representar cerca de 80% do total de emissões de gases estufa na agricultura (de Tecnologia de Saneamento Ambiental CETESB, 2006; Mosier et al., 1998).

Entre as principais fontes de emissões estão os fertilizantes nitrogenados, sendo a ureia uma das fontes de nitrogênio mais utilizadas na agricultura. A ureia é um composto produzido em larga escala mundial, sendo mais de 90% da produção mundial destinada à produção fertilizante. Este material recebe destaque por apresentar alto teor de nitrogênio (46%) quando comparado a outros fertilizantes. Além dessa característica, a ureia apresenta o mais baixo custo de transporte e estocagem por unidade de nitrogênio contido.

Entretanto, a eficiência da ureia é bastante afetada pela perda de nitrogênio por meio do processo de volatilização de amônia para a atmosfera. A quantidade de nitrogênio perdido por volatilização, após a aplicação de ureia sobre a superfície do solo, pode atingir valores extremos de até 78% do N aplicado (Forsthofer et al., 2006).

O solo é uma das principais fontes de emissão de óxido nítrico (N_2O), que é produzido

por um processo biogênico natural. A produção de N_2O é incrementada pela agricultura através do uso de fertilizantes nitrogenados, resíduos de colheitas, urina e fezes animais e pela lixiviação de nitrogênio (Martins et al., 2015). A formação de N_2O é sensível ao clima, tipo de solo, práticas de cultivo, tipo de fertilizante e como este é utilizado. A emissão de N_2O também está associada à produção de ácido nítrico e amônia, que contribuem para a chuva ácida e acidificação dos solos e de sistemas de drenagem (Mosier and Kroezer, 1998a). Para reduzir tais perdas de nitrogênio, são necessárias melhores práticas de manejo, incentivos econômicos para uso de fertilizantes que emitem menos N_2O , e melhoramentos tecnológicos nas formulações do fertilizante para diminuir e retardar a perda de nitrogênio.

Uma maneira de melhorar a eficiência da ureia, é associá-la a compostos que permitiram reter por mais tempo o nitrogênio no solo. Para esse fim, as zeólitas naturais se destacam. O termo “zeólita”, de origem grega, tem o significado de pedra que “ferve” (zein (ferver) + lithos (pedra)). Este termo foi primeiramente utilizado para designar uma família de minerais naturais que apresentavam a propriedade de troca de cátions e de desorção reversível de água. Atualmente, este termo tomou aspectos mais amplos e as zeólitas passaram a ser definidas como aluminossilicatos hidratados altamente cristalinos, cujo arranjo estrutural apresenta cavidades e canais interconectados, nos quais estão presentes íons de compensação, como por exemplo: Na^+ , Ca^{2+} , Mg^+ , K^+ , além de H_2O (Schuchardt, 2001).

Zeólitas naturais são utilizadas na agricultura (para melhorar a qualidade do solo, favorecendo a retenção de nutrientes e água), no tratamento de água, no tratamento de efluentes industriais (remoção de metais pesados), no tratamento de licores radioativos (remoção de íons ^{137}Cs e ^{90}Sr , provenientes de usinas nucleares), na purificação e separação industrial de gases em controle de odor e na nutrição de animais (nutrientes são retidos no sistema de digestão animal)(Luz, 1995; Gorjiara, 2008).

Assim, a sua aplicação em solos inférteis passa a ter duas grandes vantagens. A primeira é econômica, isto é, está relacionada à otimização do uso, pois permite a redução da quantidade necessária de fertilizante em plantações. A segunda é ambiental, uma vez que minimiza a quantidade de amônia volatilizada para a atmosfera e dependendo de sua capacidade de troca catiônica (CTC), pode capturar gases que contribuem para o efeito estufa com o gás carbono e o gás metano (De Baerdemaeker and De Vos, 2013; Rehakova et al., 2004).

Alguns métodos de detecção de gases são amplamente usados para o desenvolvimento de várias áreas da ciência como a química, física, biologia e a medicina, uma vez que trata de avanços no monitoramento e controle da poluição atmosférica, diagnósticos médicos, monitoramento da vida de microrganismos entre outros. Todas essas aplicações requerem medidas sensíveis da ordem de parte por milhão (ppm) ou parte por bilhão (ppb) e, no geral, uma boa seletividade para detecção de um componente gasoso na amostra (Filho et al., 2006; da Silva et al., 2004; Rocha et al., 2014; Baptista-Filho et al., 2011; Alves et al., 2010; Lima et al., 2000).

Técnicas espectroscópicas convencionais, como a cromatografia, espectrômetro de massa ou quimioluminescência não preenchem todos os requisitos listados acima. A cromatografia gasosa requer uma preparação e extração da amostra gasosa resultando em um longo tempo de resposta impossibilitando as medidas contínuas e em tempo real e a quimioluminescência é baseada em reações químicas, modificando a composição inicial da amostra gasosa.

A espectroscopia com laser no infravermelho oferece vantagens importantes em relação as técnicas mencionadas acima. O seu curto tempo de resposta, alta seletividade e sensibilidade sem provocar alterações na mistura gasosa, são importantes características para medidas contínuas e em tempo real.

A sensibilidade e a seletividade são garantidas pelo uso de fontes de frequência única, proporcionando potências ópticas que vão desde alguns miliwatt ou dezenas de miliwatt (lasers de cascata quântica e semicondutores) para centenas de miliwatt (osciladores paramétricos ópticos) até vários watts (lasers de gás), e mostrando uma largura de linha que é geralmente muito mais estreita em relação a qualquer linha de absorção à temperatura e pressão ambiente (Tittel et al., 2003).

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivos Gerais

Esse trabalho visa propor uma nova metodologia mais precisa de monitoramento em laboratório de perdas de nitrogênio mineral de novas matrizes de fertilizantes por meio da volatilização de amônia (NH_3) e emissão de óxido nitroso (N_2O) quando aplicados em solo alcalino. O material de estudo foi fornecido pela Embrapa Solos - Rio de Janeiro e a espectroscopia fotoacústica, usando lasers de cascata quântica com fonte excitadora, foi empregada para monitorar as quantidades de NH_3 e N_2O .

1.1.2 Objetivos Específicos

- Monitorar e quantificar as concentrações das espécies químicas de N_2O e NH_3 , devido às emissões provenientes do solos analisados, por meio da espectroscopia fotoacústica;
- Caracterização da célula fotoacústica para detecção de amostras multicomponentes provenientes de solos
- Caracterização do sistema fotoacústica para detecção de NH_3 e N_2O ;
- Avaliar a emissão de NH_3 e N_2O em solo alcalino e com diferentes umidades relativas (com 22,5%, 25% e solos seco com atmosfera umidificada);
- Monitorar a emissão de NH_3 e N_2O para solos com uma vida microbiana monitorada *Herbaspirillum Seropedicae* para a umidade de 25% durante todo o perfil da volatilização dos gases.

Capítulo 2

Revisão Bibliográfica

2.1 Zeólitas Naturais

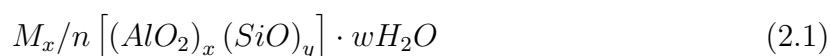
2.1.1 Estruturas das Zeólitas

A descoberta desse material se deu em 1756 pelo mineralogista sueco Barão Axel Fredrick Cronstedt. O mineral em questão era a estilbita.

As zeólitas são aluminossilicatos cristalinos, microporosos com uma estrutura sólida bem definida. A estrutura das zeólitas é definida por um encadeamento de unidades TO_4 , onde T é um átomo de alumínio ou silício, coordenados por quatro átomos de oxigênio em geometria tetraédrica (SiO_4 e AlO_4^-). A estrutura contínua da zeólita confere o fato de um átomo de oxigênio ser compartilhado por dois átomos T. Segundo a regra de Loewenstein, existe uma alternância entre o Al e o Si nos sítios tetraédricos, ou seja, não podemos ter ligações entre dois átomos de Al adjacentes (Al-O-Al). Devido à valência do Si e Al, existe a necessidade de um cátion de compensação que geralmente são metais alcalinos ou alcalinos terrosos. Esses cátions estabilizam a estrutura da rede cristalina, conforme a Figura 2.1. Estando situados em interstícios da rede cristalina, esses cátions podem ser trocados por outros cátions quando em solução, isso confere a zeólita a propriedade de troca catiônica.

A Figura 2.2 representa a formação da estrutura básica da zeólita e indica como os cátions de compensação (M) estão dispostos nas ligações entre os tetraedros.

A equação 2.1 abaixo representa a fórmula geral das zeólitas. Nesta equação, M é o cátion substituível; n é a valência do cátion; $(x + y)$ é o número total de tetraedros por célula unitária e w é número de moléculas de água (Breck., 1974).



Uma abordagem mais atual, segundo o *Subcommittee on Zeolites of International Mineralogical Association*, define como zeólita toda substância cristalina com estruturas de tetraedros contendo quatro átomos de oxigênio interligados por um cátion centralizado.

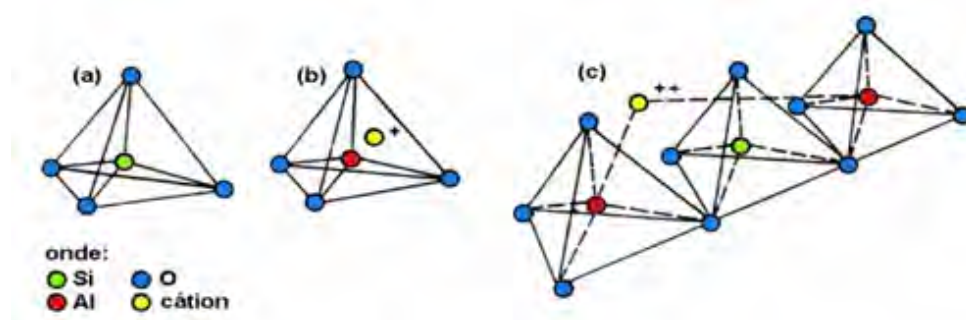


Figura 2.1: Unidades estruturais básicas das zeólitas. (a) Tetraedro com um átomo de silício no centro e átomos de oxigênio nos vértices. (b) Tetraedro com átomo de Al substituindo o Si e ligado a um cátion monovalente para compensar a diferença de carga entre o Si e o Al. (c) Estrutura incluindo átomo divalente para balancear as cargas entre o Al e o Si numa cadeia múltipla de tetraedro (Luz, 1995)

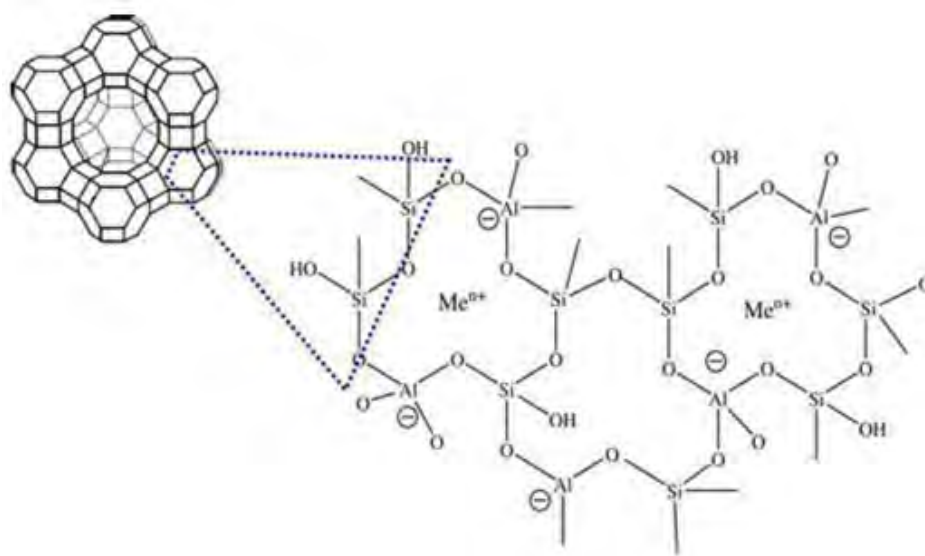


Figura 2.2: Representação da disposição dos cátions de compensação (M) na estrutura da zeólita (Fujikata et al., 1998)

Desta forma, compostos cuja organização molecular contém átomos, como Be, Ga, Ge e P, em organização tetraédrica podem ser considerados zeólitas. Segundo essa nova abordagem a fórmula estrutural da zeólita passaria a ser (Rehakova et al., 2004):

$$Me_x Me'_y N_z [T_m T'_n \cdots O_{2(m+n)-\epsilon} (OH)_{2\epsilon}] (OH)_{br} (H_2O)_p \cdot qQ \quad (2.2)$$

Onde $\epsilon = 0,1,2,3, \dots$; Me e Me' são cátions metálicos, N é um cátion não metálico, Q são moléculas sorvidas na estrutura zeolítica e T e T' são metais de coordenação tetraédrica.

A unidade estrutural básica da zeólita é a configuração tetraédrica de quatro átomos de O ao redor de um átomo central, geralmente Si e Al (Breck., 1974). Embora seja difícil conceber a construção de uma estrutura espacial contínua através de uma combinação de tetraedros, a formação pode ser visualizada mais facilmente por meio de unidades

secundárias de construção SBU (*secondary building units*) originadas das formações dos tetraedros Figura 2.3.

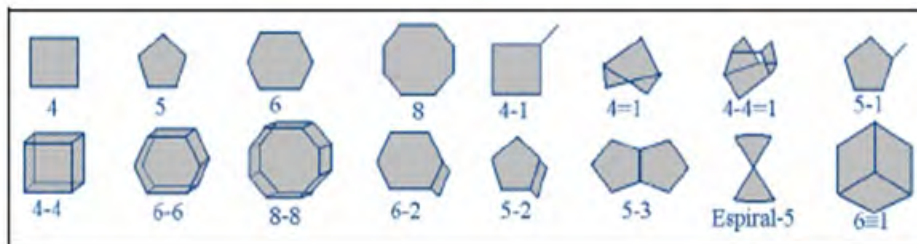


Figura 2.3: Unidades secundárias de ligação (Giannetto, 1990)

As SBU's se combinam formando poliedros, que também são conhecidos como cavidade(cavidade α , cavidade β e cavidade γ , por exemplo) e que podem ser característicos de certas famílias de zeólitas, conforme representado simplificada na (Figura 2.4).

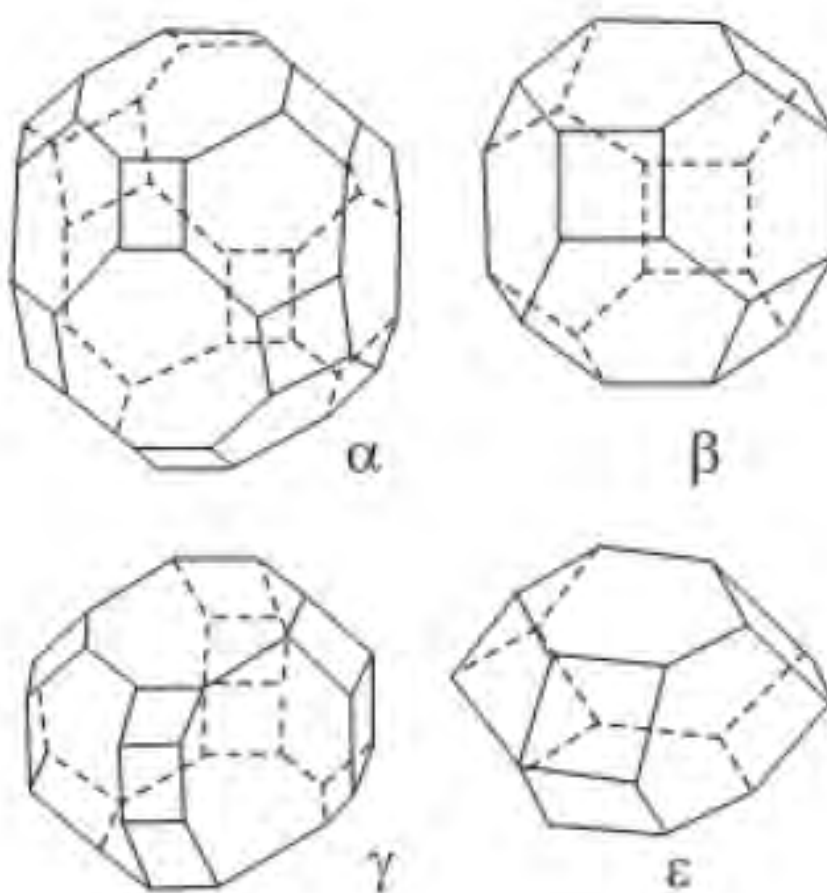


Figura 2.4: Poliedro secundários formados com as SBU's (Mascarenhas, 2001)

Essas cavidades podem ainda ser combinadas de diferentes formas, dando origem a diferentes estruturas zeolíticas, Figura 2.5. Assim, cada vértice do poliedro tem um átomo de silício ou alumínio e aproximadamente no meio das arestas tem um átomo de oxigênio.

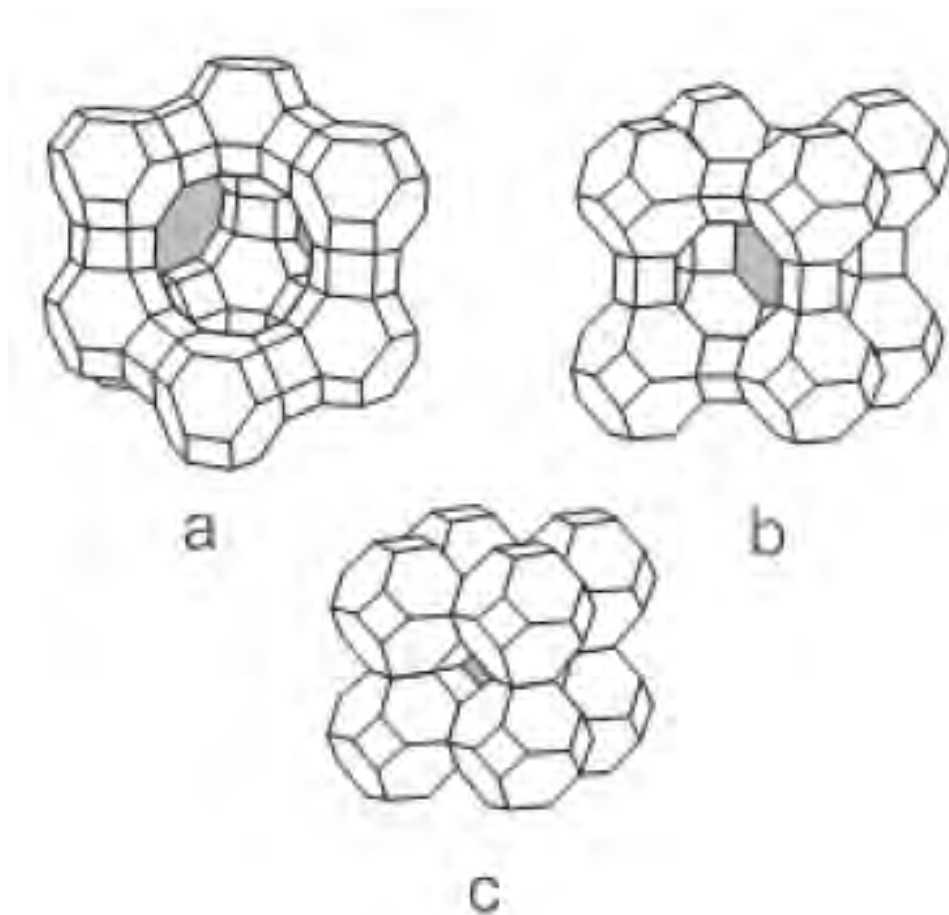


Figura 2.5: *Estrutura de algumas zeólitas (Mascarenhas, 2001)*

2.1.2 Peneira Molecular

A união de estruturas básicas tetraédricas, repetidas de múltiplas maneiras, leva a formação de estruturas tridimensionais com diversos tamanhos de canais e cavidades. A forma e o tamanho dos canais dependem da quantidade de T-O-T, ou simplificando, da quantidade de O.

Na Figura 2.6, temos a representação da zeólita Y (também conhecida como faujasita ou FAU). A estrutura cristalina dessa zeólita pode ser descrita pela união de prisma hexagonal formado pela junção de dois anéis de seis tetraedros (Figura 2.6 (a)) e por um octaedro formado pela união de 24 tetraedros, mais conhecida como caixa β ou caixa sodalita (Figura 2.6 (b)). O arranjo das unidades sodalitas levam a formação de uma cavidade maior conhecida como supercavidade α (Figura 2.6(c)). Entre as celas unitárias, criam-se um sistema tridimensional de canais (Figura 2.6(d,e)). A combinação é feita por um anel de 12 átomos de O com um diâmetro de 7,4 Å.

Esta estrutura microporosa permite a transferência de massa entre o espaço cristalino e o meio externo. No entanto, conforme podemos ver na Figura 2.6(d) o tamanho do canal da estrutura cristalina pode ser um seletor para esse transporte. Devido a essa característica a zeólita recebe o nome de peneira molecular (Ball, 1997). A alta eficiência na catálise

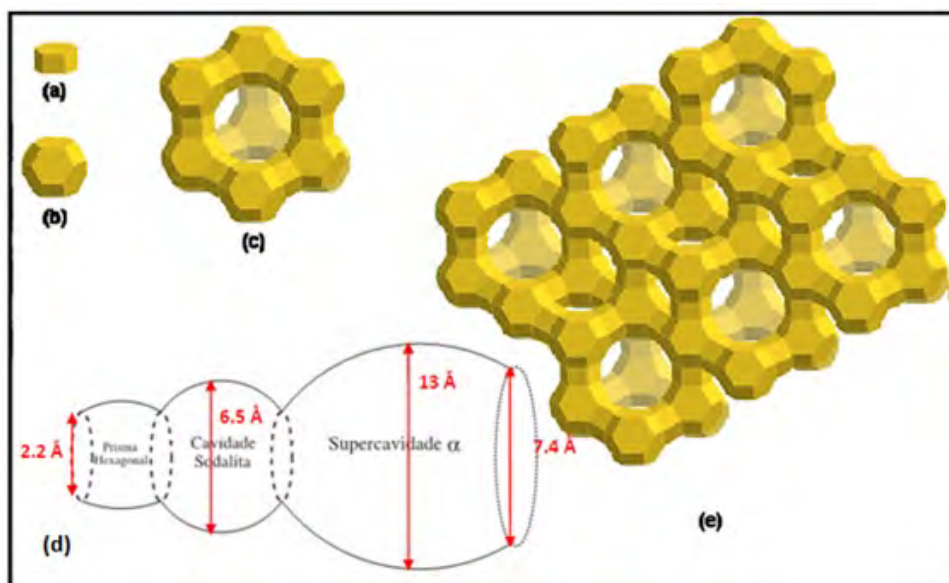


Figura 2.6: Representação esquemática das estruturas de cavidades da zeólita (Macedo, 2007)

das zeólitas está relacionada com sua grande superfície interna em relação a sua superfície externa, capacidade de adsorção, uma estrutura que permite a criação de sítios ativos, tais como sítios ácidos, cuja intensidade concentração podem ser controladas de acordo com a aplicação desejada (Corma, 1992), tamanho de canais e cavidades compatíveis com a maioria das moléculas das matérias-primas usadas na indústria (Giannetto, 1990), e uma complexa rede de canais que lhes confere diferentes tipos de seletividade de forma (Csicsery, 1986), seletividade de reagente, de produto e de estado de transição, como esquematizados na figura 2.7.

A seletividade de reagente ocorre em função do tamanho da molécula do regantes em relação à cavidade de entrada. A seletividade do produto acontece quando o produto gerado é volumoso impedindo de difundir pela estrutura. Quando isso acontece eles podem ser convertidos em moléculas menores (fissura) ou provocar desativação da estrutura pelo entupimento dos canais. Já a seletividade restrita de transição de estado ocorre quando determinadas reações são impedidas, porque o estado de transição exigiria mais espaço do que está disponível nas cavidades ou poros.

2.1.3 Sítios ácidos de Brønsted e Lewis

Zeólitas contendo apenas SiO_2 são neutras, mas quando um átomo de Si^{+4} é substituído por um cátion trivalente M (Al^{+3} , Ga^{+3} , Fe^{+3}) na unidade tetraédrica MO_4 , a estrutura zeolítica apresenta um desbalanceamento de cargas que resulta numa rede de cargas negativas. Essas cargas negativas devem ser balanceadas por, metais alcalinos e alcalinos terrosos. A troca catiônica admitem que os cátions substituem-se livremente numa mesma espécie de zeólita. A principal restrição para esse processo é o balanceamento das cargas. Dentre os átomos citados, o alumínio é o mais encontrado tanto em zeólitas naturais como

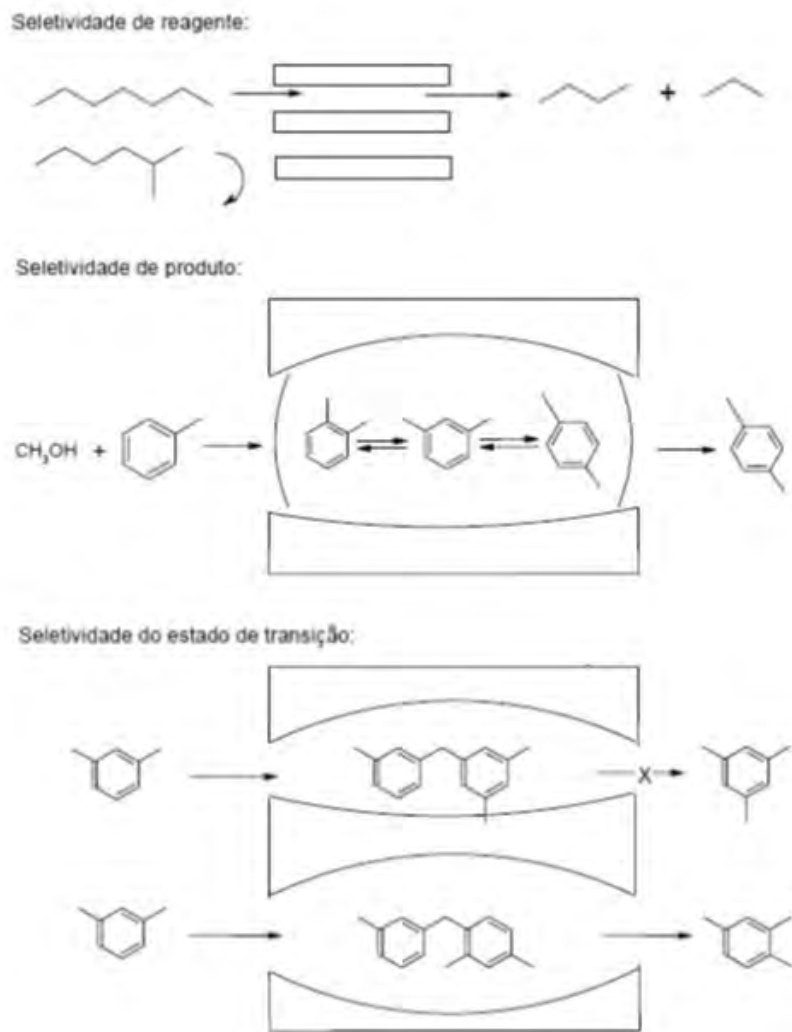


Figura 2.7: Tipos de seletividade como peneira molecular (Schuchardt, 2001)

nas sintéticas (Macedo, 2007).

Os prótons estão ligados ao oxigênio através da ligação Si-O-M, para formar grupos hidroxilas que agem como ácido forte de Brønsted nas interfaces sólido/gás e sólido/líquido, conforme a figura 2.8

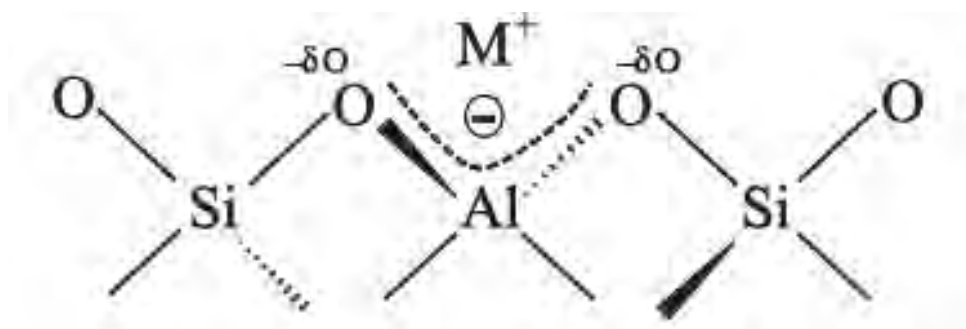


Figura 2.8: Esquema representativo das coordenações tetraédricas, seguindo a regra de Loewenstein, (Martins and Cardoso, 2006)

As características ácidas das zeólitas estão associadas a dois tipos de sítios: a átomos

de alumínio tetracoordenados, pertencentes à estrutura cristalina, cuja carga negativa é compensada por cátions e, particularmente, por prótons, resultando em acidez de Brønsted e, a átomos de alumínio com coordenação octaédrica localizados fora da rede, gerando acidez de Lewis. Por sua vez, os sítios básicos em zeólitas estão associados aos ânions oxigênio pertencentes à rede. Neste caso, por serem intrínsecos (ou estruturais), o número de sítios básicos é igual ao número de átomos de alumínio na estrutura. A força desses sítios depende, entre outros fatores, da acidez do cátion M^+ neutralizando a carga do oxigênio. Isso quer dizer que, quanto menor a acidez do cátion M^+ , maior a basicidade do ânion oxigênio. A acidez do cátion M^+ , por sua vez, diminui quando seu raio é aumentado, distribuindo sua carga positiva em um volume maior (menos eletronegativo). Por ex., para metais alcalinos presentes em zeólitas a basicidade do oxigênio de rede aumenta na seguinte ordem $Li < Na < K < Rb < Cs$ (Martins and Cardoso, 2006).

A força ácida de um centro protônico, bem como a sua atividade catalítica, depende de vários parâmetros, tais como, o ângulo da ligação Al-(OH)-Si, a proximidade entre os centros protônicos, a velocidade de troca iônica e a interação com sítios ácidos de Lewis (de Tarso Figueiredo Grecco e Maria do Carmo Rangel, 2013).

Teoricamente, numa zeólita protônica, um próton deve agir com um cátion de compensação para cada Al^{+3} da rede. Portanto quanto maior o número de átomos de alumínio na rede, maior o número de potenciais sítios ácidos. Desse modo, o número total de sítios ácidos de Brønsted presentes numa zeólita de razão Si/Al da rede.

Devido a instabilidade da ligação Al-O-Al, apenas metade de todos os átomos de silício podem ser substituídos por átomos de alumínio num material zeolítico (Regra de Loewenstein), que determina que a menor razão Si/Al deve ser igual a um. Algumas exemplos da distribuição de Si/Al na estrutura zeolítica podemos ver na Figura 2.9

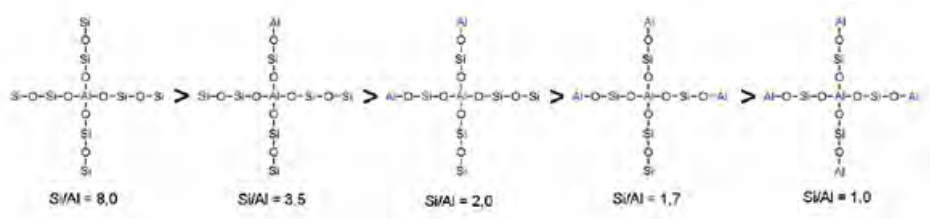


Figura 2.9: Algumas relações Si/Al em arranjos tetraédricos.

A quantidade de sítios ácidos nas zeólitas está relacionada à razão Si/Al ou SiO_2/Al_2O_3 ; ou seja, quanto menor esta relação, mais alumínio está presente na estrutura e maior a quantidade de cátions de compensação; isto é, maior o número de sítios ácidos, no caso de estar na forma protônica (de Tarso Figueiredo Grecco e Maria do Carmo Rangel, 2013; Martins and Cardoso, 2006).

Sítios ácidos de Lewis (sítios que aceitam pares de elétrons) estão relacionados à força de agregação de óxidos ou íons dentro dos poros das zeólitas. Em geral, essas espécies são aluminas, sílica-alumina ou íons metálicos trocados por prótons de sítios ácidos de Brønsted. Esses cátions juntamente com os átomos de oxigênio adjacentes da rede irão

como pares de ácidos e bases de Lewis e podem polarizar ligações em moléculas reagentes. Agregados de óxidos de alumínio contendo átomos de Al em coordenação tetraédrica e octaédrica serão normalmente sítios de Lewis que. As espécies de alumínio *framework* (que se agregam por fora da estrutura) são classificados com condensados ou não condensados e podem bloquear um sítio ativo por troca de íons com o próton; aumentar ou diminuir a acidez de um sítio de Brønsted devido ao efeito da polarização; ou bloquear o acesso aos micróporos formando volumosas espécies oligoméricas (Guisnet, 2004).

2.2 *Herbaspirillum Seropedicae*

H. seropedicae, pertencente à classe β do filo Proteobacteria, é um microrganismo diazotrófico e endofítico facultativo, capaz de fixar nitrogênio quando associado a plantas, é uma bactéria gram negativa, apresentando de 1 a 3 flagelos, com tamanho variando de 1,5 a 5 μm e com alta mobilidade quando próxima a fonte de O_2 . Ela é encontrada associada com várias plantas de interesse econômico como milho (*Zea mays*), arroz (*Oryza sativa*), sorgo (*Sorghum bicolor*), trigo (*Triticum aestivum*), cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), bananeiras (*Musa sp.*), palmeiras (*Euterpe edulis*) e abacaxizeiros (*Ananas comosus*) (Baldani et al., 1986, 1992; Cruz et al., 2001; Monteiro et al., 2008). A figura 2.10 mostra uma imagem da *Herbaspirillum Seropedicae*. A cepa mais estudada é a *Herbaspirillum Seropedicae* cepa SmR1, que é um mutante da cepa Z78 (ATCC 35893), espontaneamente resistente a estreptomicina, e teve seu genoma completo sequenciado e publicado sob número de acesso no GenBank NC-014323.1 (Pedrosa et al., 2011).

Nas etapas iniciais da associação com as plantas, *Herbaspirillum Seropedicae* é atraída pela fonte de carbono exsudada do sistema radicular, onde ocorre a adesão superficial e subsequentemente a infecção através dos pontos de emergência de raízes laterais, como representado na figura 2.11 (Monteiro et al., 2012), podendo também ocorrer em feridas na epiderme, conforme relatado por (Gyaneshwar et al., 2002).

Qualquer que seja o tipo da interação planta-bactéria, o crescimento e a sobrevivência do microrganismo em diversas partes do hospedeiro necessita de respostas adaptativas por parte da bactéria. Esta e outras pressões seletivas parecem ter direcionado a evolução de sistemas especializados de regulação que controlam a expressão dos fatores de colonização (Miller, 1989; Santi, 2013).

Uma vez concretizada a associação entre a bactéria e a planta, a *Herbaspirillum Seropedicae* pode promover o crescimento diferencial da planta através da produção e suprimento de fatores de crescimento, tais como fixação biológica de nitrogênio, produção de fitormônios, proteção do hospedeiro contra patógenos e produção de sideróforos (Balsanelli et al., 2010; Monteiro et al., 2012).

A disponibilidade de nitrogênio do solo para as plantas e outro fator que influencia a fixação biológica de nitrogênio, a contribuição das bactérias diazotróficas podem ser de 50 a 95% maior quando a planta recebe doses de fertilizantes nitrogenados (Dobbelaere



Figura 2.10: Foto da Herbaspirillum Seropedicae

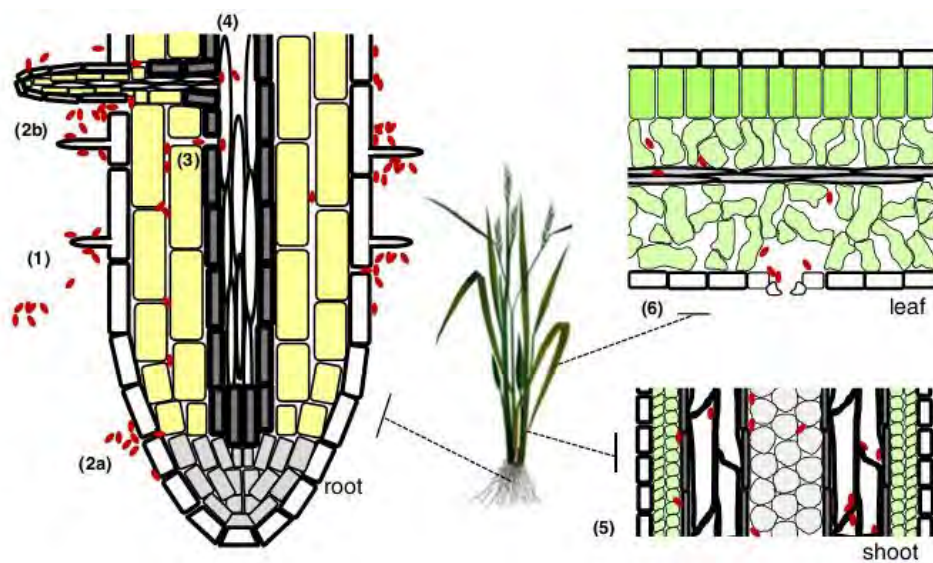


Figura 2.11: Esquema ilustrativo pela ocupação da Herbaspirillum Seroprδικae (Monteiro et al., 2012)

et al., 2003). No entanto, altas doses de fertilizantes nitrogenados já foram indicados com responsáveis pela diminuição do número da população de bactérias diazotróficas em variedades de cana-de-açúcar e em nódulos de soja (Mendes et al., 2007).

2.3 Ciclo do Nitrogênio

Nos solos, o nitrogênio combinado é geralmente o fator limitante para a produção agrícola. Nesse sentido, torna-se necessário a adição do nitrogênio combinado no solo para compensar esta limitação. Geralmente isto é realizado por meio de adubações químicas ou orgânicas com o objetivo de restaurar os níveis de N disponível e atender a demanda de N pelas culturas.

Na natureza, o nitrogênio apresenta um grande número de transformações mediadas por microrganismos específicos, visando a adição ou manutenção N disponível no solo. Entretanto, algumas transformações podem promover uma retirada do N do solo, tais como a volatilização e lixiviação. Assim, o N-disponível no solo depende de um manejo correto e conhecimento das transformações desse elemento nos ambientes agrícolas.

Embora a nitrogenase seja amplamente distribuída entre as linhagens procariotas, a maioria dos organismos não pode fixar o nitrogênio, mas sim obtê-lo diretamente do ambiente na forma NH_4^+ (nitrogênio orgânico), ou a partir da redução de NO_3^- para NH_4^+ , através da assimilação da redução de nitrato (David J. Richardson and Ferguson, 2007). Ambos, procariotas e eucariotas, são capazes de mediar este processo. O amônio é devolvido para o ambiente quando os organismos morrem, e seu destino (e a variedade de formas subsequentes de nitrogênio) depende se o ambiente local contém oxigênio (figura 2.12).

Na presença de oxigênio, NH_4^+ é oxidado e gerando em sequencialmente NO_3^- por específicos grupos de bactérias e arqueias. Nesta via, conhecido como nitrificação, organismos contendo a enzima Mono-oxigenase de amônio primeiro oxidar NH_4^+ pela hidroxilamina, a qual é subsequentemente oxidada a NO_2^- , por oxidorredutase de hidroxilamina, e, finalmente, o NO_2^- é oxidado para NO_3^- por Oxidorredutase de nitrito (Moenne-Loccoz and Fee, 2010). O gás N_2O é um subproduto neste processo. Sendo assim, a nitrificação de ambientes marinhos e terrestres são importantes contribuidores para a produção desse gás estufa (Dore et al., 1998; Mosier et al., 1998).

A redução de nitrato é acoplado a oxidação anaeróbio do carbono orgânico, produzindo de outro modo o NH_4^+ num processo conhecido como dissimilatória redução de nitrato para amônio (DNRA). Porém, o mais comum, é a produção de N_2O durante a desnitrificação.

As desnitrificadoras incluem representantes de mais de 60 gêneros de bactérias e arqueias, bem como alguns eucariotas (por exemplo, fungos, protozoários, e bentônica foraminífera e gromiida) (Canfield et al., 2010). O processo envolve quatro metaloenzimas: dissimilatória reductase de nitrato, reductase de nitrito, reductase óxido nítrico e reductase de óxido nitroso. O N_2O é um intermediário obrigatório, e, em última análise, uma parte é liberada para a atmosfera, devido ao fato de alguns micro-organismos não possuir todas as enzimas necessárias para promover todas as reações do processo, ou também, devido ao aumento da aeração dos sítios durante o processo. Consequentemente, a desnitrificação é uma outra fonte importante de produção de gás de efeito estufa em ambientes marinhos como terrestres (Mosier and Kroezer, 1998b). Uma via alternativa para transformar o

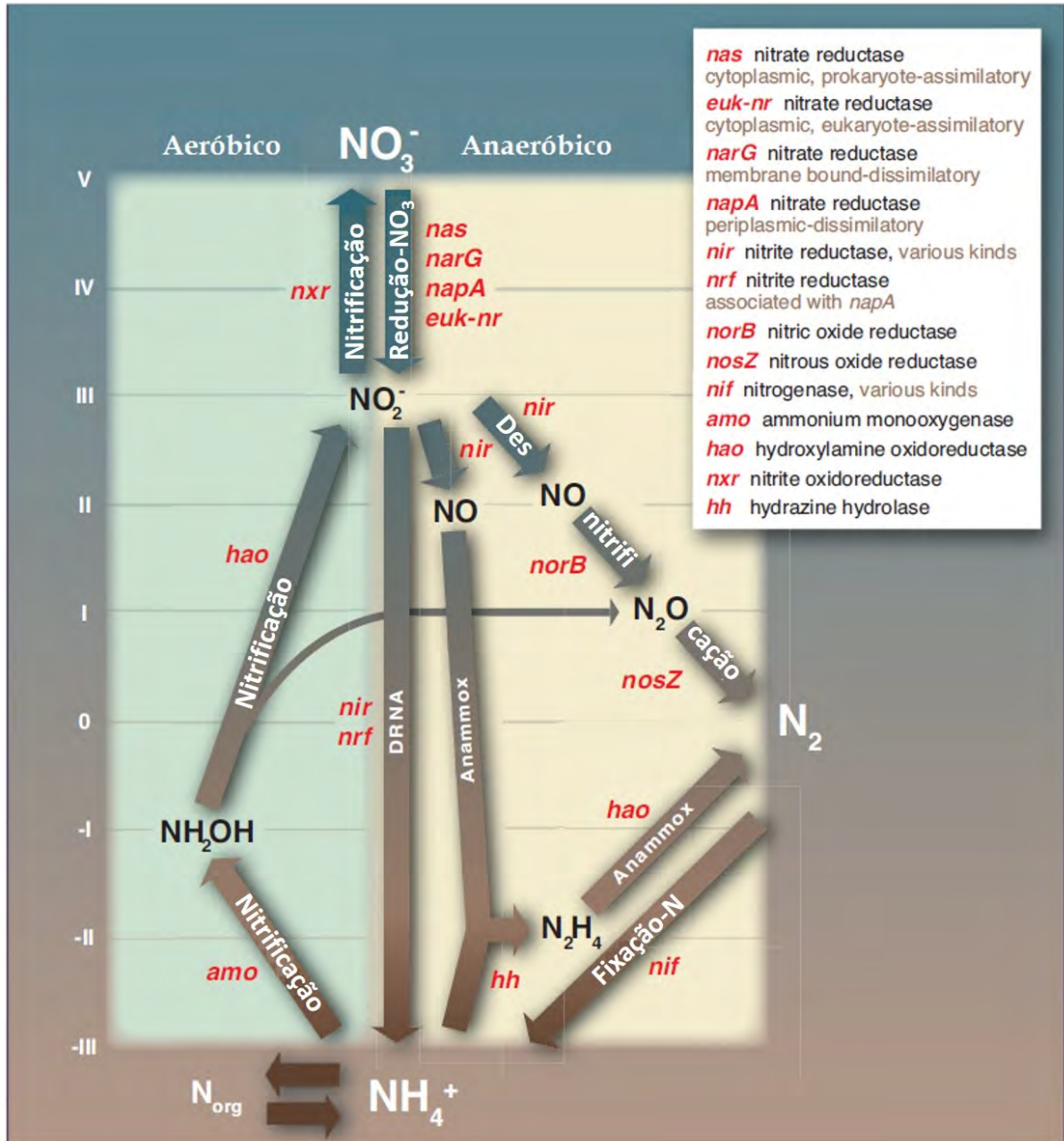


Figura 2.12: As principais vias de transformação biológica de nitrogênio do ciclo do nitrogênio. (Canfield et al., 2010)

de nitrogênio disponível para N_2 encontra-se entre um grupo de bactérias conhecido como Planctomycetes, onde a oxidação NH_4^+ é acoplado a redução NO_2^- num processo chamado anammox (oxidação anaeróbica de amônio), uma exergônica reação utilizado para o crescimento Quimioautotrófico (Strous et al., 2006). Este processo domina a produção de N_2 em muitos ambientes marinhos, mas, ao contrário de desnitrificação clássica, ele não conduz à produção de N_2O . Juntos, desnitrificação e anammox fechar o ciclo do nitrogênio, devolvendo gás N_2 de volta para a atmosfera (Mosier et al., 1998; Galloway et al., 2004).

No último século houve uma produção em larga escala de adubos nitrogenados através do processo Haber-Bosch para transformar N_2 atmosférico em amônia, sendo responsá-

veis pelo acréscimo na produção de alimentos que ajudaram a alimentar uma população humana em expansão durante o século 20, em consequência, o ciclo global do nitrogênio foi dramaticamente alterado, dobrando a entrada de nitrogênio no ciclo nos últimos cem anos pela ação antropogênica, Figura 2.13. As consequências negativas destas adições de nitrogênio são substanciais, que vão desde a eutrofização dos ecossistemas terrestres e sistemas aquáticos a acidificação global e a degradação da camada de ozônio com o óxido nitroso. Particularmente preocupante é o fato de que as transformações químicas do nitrogênio ao longo de sua via de transporte no ambiente muitas vezes levam a uma cascata de efeitos (Gruber and Galloway, 2008; Galloway et al., 2008; van Breemen, 2002; de Vries et al., 2013).

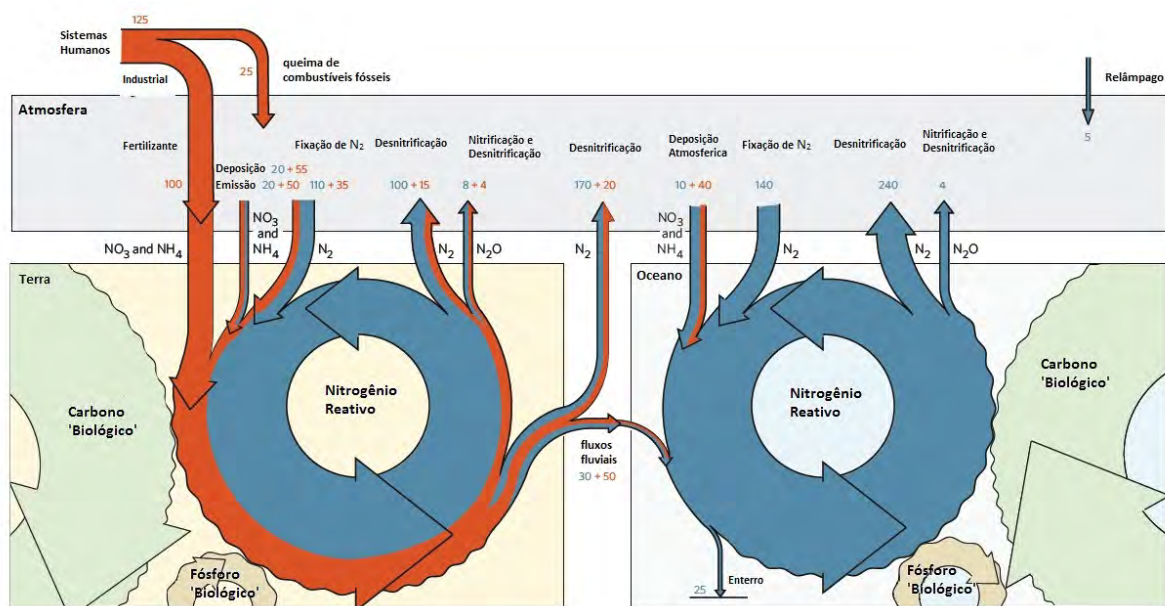


Figura 2.13: Descrição do ciclo do nitrogênio mundial na terra e no oceano. Os principais processos que transformam nitrogênio molecular em reativo são mostrados. Também é mostrado o acoplamento forte entre os ciclos de nitrogênio na terra e no oceano com os de carbono e fósforo. Fluxos azuis referem a (fluxos naturais) e fluxos laranja denotam a perturbação antropica. (Gruber and Galloway, 2008)

Os componentes naturais (não perturbados) do ciclo do carbono e do nitrogênio são ainda mais fortemente acoplado pois são componentes antropicos. Esta é uma consequência direta da presença de vida, que liga os ciclos elementares de carbono, nitrogênio e outros elementos no nível molecular, com uma dependência dos organismos para produzir estes elementos para construir seus tecidos. Este acoplamento ocorre com específicas estequiometrias elementares. No oceano, a relação C/N do fitoplâncton autótrofo responsável por quase toda a fotossíntese marinha varia muito pouco, enquanto que a relação C/N de plantas terrestres é substancialmente mais variável e também tende a ser maior do que aquele para marinho fitoplâncton. Compreender os processos que controlam as relações C/N dos organismos autotróficos em terra e no oceano é de suma importância para compreender os ciclos globais de nitrogênio e carbono do sistema Terrestre, dada a importância do

nitrogênio na limitação da produção primária global (Gruber, 2011; Gehlen et al., 2012; Deutsch et al., 2007)

2.4 Espectroscopia Fotoacústica

Um sistema fototérmico é constituído basicamente por quatro componentes: uma fonte de excitação, um modulador, um detector e um processador de sinal acoplado a um sistema de exposição do sinal. Como fonte de excitação, fontes incoerentes podem ser utilizadas, como lâmpadas e filamentos, ou coerentes, como lasers de CO₂, de CO, de hélio-neônio, de diodo, entre outros. O modulador pode ser mecânico, utilizando um disco circular com furos. Em lasers semicondutores, outra maneira de obter a modulação é de forma elétrica direta, onde um circuito alterna diretamente a corrente do laser (Sigrist, 1994; Kosterev and Titel, 2002)

Para o processamento do sinal, necessita-se de um sistema que permita extrair dados de qualidade, minimizando a presença de sinais de ruídos (Lima, 2014). Geralmente um amplificador “Lock-in” é utilizado, permitindo obter um sinal vetorial de saída que contém a amplitude e a fase do sinal fototérmico em relação a uma referência (Sigrist et al., 2008).

De forma geral, a ciência fototérmica abrange uma vasta extensão de técnicas e fenômenos, baseados na conversão da energia de excitação eletromagnética em calor. A onda eletromagnética incidente sobre a amostra interage com seus átomos ou moléculas excitando estados elétricos ou vibracionais (Patel, 1996). O decaimento para o estado fundamental envolve uma série de emissões radiativas e não radiativas. Os decaimentos não radiativos resultam, geralmente, em um aquecimento do material (Miklos et al., 2001).

Destes processos originam-se as técnicas fototérmicas. Entre elas, pode-se citar a espectroscopia fotoacústica que é a primeira da família dessas técnicas. A técnica consiste em gerar um sinal acústico dentro de uma célula fechada devido à absorção de radiação modulada (ou pulsada) por parte de uma amostra contida na célula. A absorção da radiação modulada causa um aquecimento periódico da amostra. O aquecimento periódico da amostra causa, por sua vez, uma expansão local do volume que passa a ser observada como uma onda de pressão com intensidade proporcional à quantidade de amostra presente. Assim, utilizando um microfone bastante sensível no interior da célula, é possível detectar esta onda mecânica (Figura 2.14) (Patel, 1996).

2.4.1 Absorção Espectroscópica

A teoria fundamental que governa a absorção de luz é a lei de Beer-Lambert. A intensidade da luz transmitida através de uma meio de absorção de comprimento l é:

$$I(\tilde{\nu}) = I_0 e^{-am} \quad (2.3)$$



Figura 2.14: Esquema dos processos que ocorrem durante a geração do sinal fotoacústico (Miklos et al., 2001)

Onde I_0 é a intensidade da luz incidente, $\tilde{\nu}$ é o número de onda incidente em cm^{-1} e a_m é a absorvância do meio. O número de onda $\tilde{\nu}$ é definido por:

$$\tilde{\nu} = \frac{\nu}{c} = \frac{E_m - E_n}{hc} \quad (2.4)$$

Onde ν é a frequência da luz em Hz, c é a velocidade da luz no vácuo e h é a constante de Planck, E_n é o estado de menor energia e E_m é o estado de maior energia.

A absorvância está correlacionado com o coeficiente de absorção através de

$$a_m = \alpha(\tilde{\nu}) l$$

. O coeficiente de absorção está relacionado com a seção de choque $\sigma(\tilde{\nu})$ da molécula por:

$$\alpha(\tilde{\nu}) = N\sigma(\tilde{\nu}) = -\frac{1}{l} \ln \left[\frac{I(\tilde{\nu})}{I_0} \right] \quad (2.5)$$

Onde N é a densidade do gás em (mol/cm^3). A seção de choque pode ser representado pela função normalizada $g\tilde{\nu}$, descrevendo a forma da linha de absorção, e a intensidade da linha S é expresso em ($\text{cm}^{-1}/\text{mol} \cdot \text{cm}^{-2}$) (Claspy, 1977):

$$\sigma(\tilde{\nu}) = Sg(\tilde{\nu}), \quad S = \int_0^\infty \sigma(\tilde{\nu}) d\tilde{\nu} \quad (2.6)$$

A obtenção da densidade em função do coeficiente de absorção e da seção de choque é

$$N = -\frac{1}{lSg(\tilde{\nu})} \ln \left[\frac{I(\tilde{\nu})}{I_0} \right] \quad (2.7)$$

e a concentração C do gás:

$$C = \frac{N}{N_{tot}} \quad (2.8)$$

O total da densidade de moléculas na temperatura T e pressão p_0 é definido por:

$$N_{tot} = N_L \frac{296}{T} p_0 \quad (2.9)$$

Onde $N_L = 2,479 \cdot 10^{19} \text{ mol cm}^{-3} \text{ atm}^{-1}$ é o número de Loschmidt.

A intensidade da linha espectral S de uma absorção e transição depende da população N_n do estado quântico inferior, que é uma função de distribuição de Boltzmann e a probabilidade da transição (dado pelo coeficiente de Einstein B_{nm}) entre o estado superior m e o estado inferior n , que depende de constantes específicas espectroscópicas como as transições particulares das moléculas:

$$S = \frac{1}{N} \frac{h\tilde{\nu}_{nm}}{c} B_{nm} N_n \left[1 - \exp \left(-\frac{hc\tilde{\nu}_{nm}}{kT} \right) \right] \quad (2.10)$$

Onde k é a constante de Boltzmann. A população do estado inferior é dado por:

$$N_n = \frac{N g_n}{Q_{int}} \exp \left(-\frac{hcE_n}{kT} \right), \quad Q_{int} = \sum_n g_n \exp \left(-\frac{hcE_n}{kT} \right) \quad (2.11)$$

Q_{int} é a função de partição interna total, E_n é o menor estado de energia de transição e g_n é a degeneração do menor estado. Combinando a equação 2.10 e 2.11 obtemos a relação da linha espectral com a temperatura:

$$S(T) = \frac{h\tilde{\nu}_{nm}}{c} B_{nm} \frac{g_n}{Q_{int}(T)} \exp \left(-\frac{hcE_n}{kT} \right) \left[1 - \exp \left(-\frac{hc\tilde{\nu}_{nm}}{kT} \right) \right] \quad (2.12)$$

A função de partição interna total $Q_{int}(T)$ pode ser aproximado pelo produto:

$$Q_{int}(T) = Q_n Q_v Q_J \quad (2.13)$$

Onde Q_n é a função de partição nuclear, Q_v vibracional e Q_J rotacional. Sendo que, somente as transições rotacional-vibracional Q_v e Q_J contribuem para o função de partição total. Essas são dadas por (Besson, 2006):

$$\begin{aligned} Q_v &= \sum_v g_v \exp\left(-\frac{E_v}{kT}\right) \\ Q_J &= \sum_J g_J \exp\left(-\frac{E_J}{kT}\right) \end{aligned} \quad (2.14)$$

2.4.2 Geração do Sinal Fotoacústico

Geração de taxa de calor

O calor produzido na amostra depende da densidade de moléculas no nível excitado e no nível fundamental. Para um caso simples, onde a absorção ocorre em um gás com densidade total N , pode ser modelado por uma sistema no qual coexistem dois níveis de estados vibracionais: o fundamental com densidade $N-N'$ e o estado excitado com densidade N' . Pode-se calcular a taxa de variação do estado excitado através da seguinte equação (?):

$$\frac{dN'}{dt} = (N - N') \sigma \phi - N' \sigma \phi - \frac{N'}{\tau} \quad (2.15)$$

Onde σ é a seção de choque e ϕ é o fluxo de fótons. O inverso de tempo τ^{-1} pode ser expresso através da soma respectiva das constantes de tempo não-radiativa e radiativa, ou seja:

$$\tau^{-1} = \tau_n^{-1} + \tau_r^{-1} \quad (2.16)$$

O primeiro termo do lado direito da equação 2.15, representa a absorção do fóton de frequência $\nu = (E_1 - E_0)/h$. O segundo termo representa a emissão estimulada de um fóton, enquanto o terceiro termo representa uma emissão espontânea de fótons e a relaxação não-radiativa. Para condições normais de atmosfera, τ_n é na ordem de 10^{-6} a 10^{-9} s, enquanto τ_r está entre 10^{-1} e 10^{-3} s. Logo, as emissões espontâneas por radiação dos níveis vibracionais são mais demoradas comparadas com o decaimento por colisão, e τ pode ser aproximado por τ_n . Assim, toda a energia transferida na amostra e liberada na forma de calor (Kreuzer, 1977).

Para absorções fracas, a taxa de excitação $\sigma \phi$ é pequena, com isso a densidade do estado excitado é considerado muito menor ($N' \ll N$), com isso a equação é reduzida para :

$$\frac{dN'}{dt} = N \sigma \phi - \frac{dN'}{\tau} \quad (2.17)$$

Para uma modulação de harmônicos da radiação incidente, o fluxo de fótons pode ser

expresso como:

$$\phi = \phi_0 (1 + e^{i\omega t}) \quad (2.18)$$

Onde $\omega = 2\pi f$ e representa a frequência angular. A equação 2.17 então pode ser representada por:

$$\frac{dN'}{dt} = N\sigma\phi_0 (1 + e^{i\omega t}) - \frac{dN'}{\tau} \quad (2.19)$$

Na equação 2.19 somente o termo do tempo dependente da frequência angular ω contribui para a geração do sinal fotoacústico. Uma possível solução seria:

$$N' = N_0' e^{i\omega t} \quad (2.20)$$

Onde

$$N_0' = \frac{N\sigma\phi_0\tau}{\sqrt{1 + (\omega\tau)^2}} e^{-i\varphi} \quad (2.21)$$

$\varphi = \arctan(\omega\tau)$ representa a fase entre densidade N' do estado excitado e o fluxo de fótons ϕ . A solução final da equação pode ser finalizada e escrita como:

$$N' = \frac{N\sigma\phi_0\tau}{\sqrt{1 + (\omega\tau)^2}} e^{i(\omega t - \varphi)} \quad (2.22)$$

A taxa de calor produzido H (por volume e unidade de tempo) relacionado a N' é

$$H = N' \frac{hc\Delta\tilde{\nu}}{\tau_n} \quad (2.23)$$

Onde $hc\Delta\tilde{\nu}$ é uma média da energia térmica depositada devido ao decaimento não radiativo. Para frequências de modulação baixas $\omega \ll 10^6 s$, $\omega\tau \ll 1$, a taxa de calor produzido pode ser simplificado por:

$$H = H_0 e^{i\omega t} \quad (2.24)$$

e

$$H_0 = N\sigma I_0 = \alpha I_0 \quad (2.25)$$

Onde α é o coeficiente de absorção do gás e $I_0 = \phi_0 hc\tilde{\nu}_{laser}$ representa a intensidade da luz emitida. A condição $\omega\tau \ll 1$ é facilmente satisfeita com frequências de modulação na faixa de kHz (Besson, 2006).

2.4.3 Geração de Ondas Acústicas

A geração de um sinal acústico devido a um aquecimento periódico no meio é um fenômeno físico regido pela lei de Navier- Stokes que envolve grandezas físicas com temperatura T , pressão p , densidade ρ e velocidade do fluido v . A complexidade do problema resulta na impossibilidade de encontrar uma solução exata para isso, a não ser que algumas aproximações sejam introduzidas. A primeira aproximação consiste em considerar que as variações das grandezas físicas sejam pequenas em relação aos seus valores absolutos (Morse and Ingard, 1968):

$$\begin{aligned} p(r,t) &= p_0 + p(r,t) \\ T(r,t) &= T_0 + T_a(r,t) \\ \rho(r,t) &= \rho_0 + \rho_a(r,t) \end{aligned} \quad (2.26)$$

Onde p_0 , T_0 , ρ_0 são os valores no equilíbrio da pressão, temperatura e densidade respectivamente e p , T_a , ρ_a são os pequenos incrementos provocado pelo aparecimento das ondas sonoras. Além disso, assumimos que o fluido está estático exceto pelo movimento devido a propagação da onda sonora e com isso a velocidade v se dá em pequenas quantidades. Com isso, produtos cruzados, produtos de ordem superior e quadrados podem ser desconsiderados. Sendo assim, para incluir a condução térmica e o atrito do fluido a equação de Navier- Stokes pode ser escrita como (Morse and Ingard, 1968):

$$\frac{dv}{dt} = -\frac{1}{\rho_0} \nabla p(r,t) + D_v \nabla (\nabla \cdot v_l) \quad (2.27)$$

Onde $D_v = 4\eta/3\rho_0 + \eta_b/\rho_0 \cdot \eta$. As letras η e η_b representam o coeficiente de viscosidade de cisalhamento e massa do fluido, respectivamente. Eles têm origem no fenômeno de relaxação associado com a compressão do fluido. O vetor velocidade pode ser separado pela soma de duas componentes, a longitudinal v_l e a transversal v_t , sendo que somente a longitudinal contribui para a pressão acústica portanto a componente transversal pode ser desconsiderada. As flutuações na pressão sonora são acompanhadas por flutuações na temperatura e a equação da difusividade térmica pode ser derivado de (S.W. Rienstra, 2015):

$$\frac{K}{\rho_0 C_p} \nabla^2 T_a(r,t) = \frac{\partial}{\partial t} \left(T_a(r,t) - \frac{\gamma - 1}{\gamma \beta_T} \kappa_T p(r,t) \right) - \frac{H(r,t)}{\rho_0 C_p} \quad (2.28)$$

Onde K é a condutividade térmica, C_p é a capacidade térmica a pressão constante, $\gamma = C_p/C_v$ é a razão entre o calor específico a pressão constante e o calor específico a volume constante, β_T é o coeficiente de expansão térmica, κ_T é a compressibilidade isotérmica e H é a intensidade do calor depositado. Para completar o modelo a equação da continuidade de massa-densidade (equação 2.29 e a equação termodinâmica de estado

da contribuição acústica para a pressão, temperatura e densidade(equação 2.30).

$$\frac{\partial \rho_a(r,t)}{\partial t} + \rho_0 \nabla \cdot v_l = 0 \quad (2.29)$$

$$\rho_a(r,t) = \left(\frac{\partial \rho}{\partial P} \right)_{T_0} p(r,t) + \left(\frac{\partial \rho}{\partial T} \right)_{p_0} T_a(r,t) = \frac{\gamma}{c_s^2} \left(p(r,t) - \frac{\beta_T}{\kappa_T} T_a(r,t) \right) \quad (2.30)$$

Onde c_s é a velocidade do som definido por:

$$c_s = \sqrt{\frac{\gamma RT}{M}} \quad (2.31)$$

As quatro relações descritas podem finalmente ser combinadas para se obter a equação da onda:

$$\nabla^2 p_a(r,t) = \frac{\partial^2 \rho_a(r,t)}{\partial t^2} - D_v \nabla^2 \frac{\partial \rho_a(r,t)}{\partial t} \quad (2.32)$$

Finalmente $\rho_a(r,t)$ é eliminado usando a equação de estado, onde obtemos a relação dependendo apenas da pressão e temperatura.

$$\nabla^2 p_a(r,t) = \frac{\gamma}{c_s^2} \left[\frac{\partial^2}{\partial t^2} - D_v \nabla^2 \right] \left(p_a(r,t) - \frac{\beta_T}{\kappa_T} T_a(r,t) \right) \quad (2.33)$$

Combinando as equações 2.28 e 2.33 duas soluções independentes podem ser obtidas. Uma solução corresponde a uma onda térmica fortemente amortecida e com comprimento de onda na ordem de sub-milímetros e a outra solução corresponde a uma onda sonora ligeiramente amortecido com comprimentos de onda de vão desde centímetros até metros. A onda térmica é observada na vizinhança do feixe de luz , devido ao seu significativo fator de amortecimento a sua contribuição acaba sendo pequeno em comparação as dimensões do detector (célula fotoacústica), sendo assim, iremos desconsiderar a contribuição da segunda derivada espacial de $T_a(r,t)$ e uma equação surge devido a essas duas contribuições

$$\nabla^2 p_a(r,t) - \frac{1}{c_s^2} \frac{\partial^2 p_a(r,t)}{\partial t^2} + \frac{1}{c_s^2} D_v \frac{\partial}{\partial t} \nabla^2 p_a(r,t) = -\frac{\gamma - 1}{c_s^2} \frac{\partial H(r,t)}{\partial t} \quad (2.34)$$

Correspondendo a uma equação de onda amortecido com um termo correspondente a fonte no lado direito. A contribuição de amortecimento relacionado pelas perdas através da viscosidade (terceiro termo do lado esquerdo), faz com que essa equação seja inviável de ser resolvida analiticamente. Portanto, nesse primeiro momento será utilizada a equação para uma onda não amortecida e as influências pelas perdas serão consideradas progressivamente (Besson, 2006).

$$\nabla^2 p(r,t) - \frac{1}{c_s^2} \frac{\partial^2 p(r,t)}{\partial t^2} = -\frac{(\gamma - 1)}{c_s^2} \frac{\partial H(r,t)}{\partial t} \quad (2.35)$$

2.4.4 Ressonadores Acústicos

Soluções da equação 2.35 dependem diretamente do formato e das dimensões do detector (célula fotoacústica). De um modo geral, as ressonâncias de uma célula acústica são dadas pela seguinte equação de onda homogênea:

$$\nabla^2 p_a(r,t) - \frac{1}{c_s^2} \frac{\partial^2 p_a(r,t)}{\partial t^2} = 0 \quad (2.36)$$

Então a onda de pressão pode ser dado pela soma de todos modos ressonantes da célula:

$$p_a(r,t) = A_0(t) + \sum_n A_n(t) p_n(r) \quad (2.37)$$

Onde $A_n(t)$ é a amplitude dos n modos e $p_n(r)$ é a distribuição espacial adimensional. Tendo em conta a dependência dos harmônicos com o tempo $e^{j\omega t}$ das ondas sonoras e a equação não homogênea pode ser dado como (Jr., 1977):

$$-\omega^2 A_0 + \sum_n (\omega_n^2 - \omega^2) A_n p_n(r) = j\omega(\gamma - 1) H(r) \quad (2.38)$$

Onde ω_n corresponde a frequência de ressonância para os modos n , respectivamente as amplitudes dos modos A_n são desenvolvidos assumindo que cada modo está ortogonal aos outros, sendo assim a integral espacial do produto cruzado entre dois diferentes modos é zero:

$$A_n = \frac{j\omega(\gamma - 1) \int_{V_{res}} H(r) p_n(r) dV}{\omega_n^2 - \omega^2 + j\frac{\omega\omega_n}{Q_n} \int_{V_{res}} |p_n(r)|^2 dV} \quad (2.39)$$

Onde V_{res} é o volume do ressonador e Q_n é o fator de qualidade n modos ressonantes. O significado físico do fator de qualidade é a razão entre a energia que um modo ressonante pode acumular e a energia que se perde durante o mesmo período, esses mecanismos de perda geram um alargamento do modo ressonante de modo que o fator de qualidade Q pode ser definido por (Miklos et al., 2001):

$$Q_n = \frac{\omega_n}{\Delta\omega_n} \quad (2.40)$$

Para alto valores do fator de qualidade Q , podemos usar outra definição:

$$Q = \frac{f_0}{\Delta f} \quad (2.41)$$

Onde f_0 e Δf são respectivamente a frequência de ressonância e a variação do valor da frequência a meia altura em relação a frequência de ressonância. A meia altura pode ser mensurado entre os pontos onde a amplitude vale $\frac{1}{\sqrt{2}}$ do valor do pico (Miklos et al., 2001).

Tabela 2.1: Valores dos parâmetros da solução de Bessel para os primeiros modos azimutal e radial de uma cavidade acústica cilíndrica (Hess, 1983)

$\pi\alpha_{mn}$	n=0	n=1	n=2	n=3
m=0	0	3,832	7,016	10,173
m=1	1,841	5,331	8,526	11,706
m=2	3,054	6,706	9,969	13,170
m=3	4,201	8,015	11,346	14,586

Para uma onda se propagando em um célula cilíndrica de raio R_c e comprimento l a equação homogêneo da onda 2.36 pode ser escrita em coordenadas cilíndricas (r, Φ, z)

$$\frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left(r \frac{\partial p_j}{\partial r} \right) + \frac{1}{r^2} \frac{\partial^2 p_j}{\partial \Phi^2} + \frac{\partial^2 p_j}{\partial z^2} + k_j^2 p_j = 0 \quad (2.42)$$

A solução da equação é dado por (Besson, 2006)

$$p(r, t) = \frac{\cos}{\sin} (m\Phi) [AJ_m(k_r r) + BY_m(k_r r)] [C \sin(k_z z) + D \cos(k_z z)] \quad (2.43)$$

Onde J_m e Y_m são funções de Bessel de primeiro e segundo tipo respectivamente. Satisfazendo as condições de onda homogênia para a solução 2.43 temos (Morse and Ingard, 1968)

$$\begin{aligned} B &= C = 0 \\ k_z &= k \frac{\pi}{L} \quad k = 1, 2, 3, \dots \\ k_r &= \alpha_{mn} \frac{\pi}{R_c} \quad m = 1, 2, 3, \dots \end{aligned} \quad (2.44)$$

Onde α_{mn} é a solução da equação Bessel. Onde o n da raiz da equação envolvida e m é a ordem da função de Bessel

$$\frac{d}{dr} J_m \left(\frac{\alpha_{mn} \pi r}{R_c} \right) \Big|_{r=R_c} = 0 \quad (2.45)$$

Os modos normais da cavidade são dados por

$$p_j(r, \omega) = p_j \cos(m\Phi) \cos\left(k \frac{\pi z}{l}\right) J_m\left(\alpha_{mn} \frac{\pi r}{R_c}\right) \quad j = [k, m, m] \quad (2.46)$$

As frequências de ressonância para a cavidade aberto-aberto ou fechado-fechado podem ser definidos por

$$f_{kmn} = \frac{c_s}{2} \left[\left(\frac{\alpha_{mn}}{R_c} \right)^2 + \left(\frac{k}{l} \right)^2 \right]^{1/2} \quad (2.47)$$

Os valores (k, m, n) representam os respectivamente os índices longitudinais, azimutal

e radial respectivamente. entre os modos específicos da cavidade podemos ter o modo puramente longitudinal $m=0$ e $n=0$, azimutal $k=0$ e $n=0$ e radial $k=0$ e $m=0$. Os primeiros modos podemos ver na Figura 2.15.

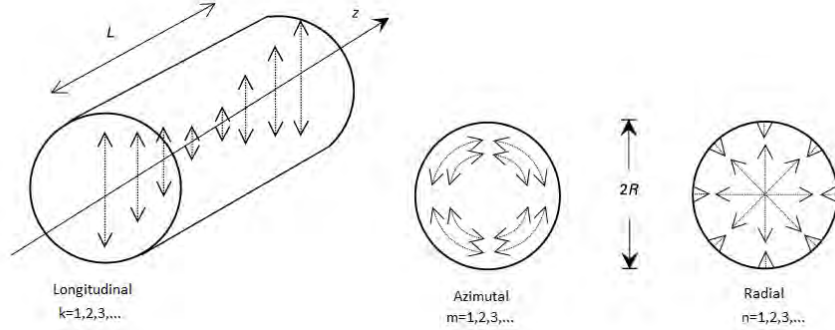


Figura 2.15: Esquema representativo dos modos ressonantes longitudinal, azimutal e radial em um ressonador cilíndrico (Miklos et al., 1999)

Quando um ressonador está sendo excitado com um laser modulado na frequência de ressonância as ondas de pressão detectadas por um microfone na região central do tubo ($r = r_m$), são definidas como:

$$p(r_m, \omega_j) = -(\gamma - 1) \frac{Q_j L}{\omega_j V_c} I_j p_j(r_m, \omega_j) \alpha P_0 \quad (2.48)$$

Retirando a quantidade (αP_0) o lado direito da equação são independentes do coeficiente de absorção e da intensidade do laser, e podem ser agrupadas e ser definidas como constante da célula

$$C_j(\omega_j) = -(\gamma - 1) \frac{Q_j L}{\omega_j V_c} I_j p_j(r_m, \omega_j) \quad (2.49)$$

A amplitude do sinal fotoacústico pode ser escrito como:

$$S = p(r_m, \omega_j) = C_j(\omega_j) \alpha P_0 \quad (2.50)$$

Capítulo 3

Materiais e Métodos

3.1 Laser de Cascata Quântica

Atualmente, existem uma variedade de fontes de radiação sintonizáveis no infravermelho médio. Essas fontes são de grande relevância para o estudo de amostras gasosas uma vez que as moléculas de interesse biológico e ambiental possuem valores altos de coeficiente de absorção óptica nessa região do espectro eletromagnético. Porém para aplicações que exigem análises quantitativas de alta sensibilidade e seletividade, existem requisitos que devem ser satisfeitos. Por exemplo, a fonte deve ter potência óptica suficiente para gerar um sinal que seja superior ao ruído eletrônico inerente à instrumentação utilizada, garantindo assim uma ótima relação sinal-ruído. Em termos de seletividade, no processo de geração de sinal deve ser garantido que apenas a molécula de estudo seja detectada. O laser é a fonte que possui características que mais atendem a esses requisitos. Ou seja, o laser é uma fonte pontual, e conseqüentemente possui alta densidade de energia. Por possuir emissão linear, a radiação do laser pode ser facilmente alinhada em detectores ópticos. O laser é uma fonte monocromática estável de alta qualidade, garantindo assim a seletividade uma vez que os espectros de absorção das moléculas são individualizados (“impressão digital”) (Ando et al., 1982)).

A cobertura espectral do infravermelho médio das fontes lasers sintonizáveis mais frequentemente usadas são mostradas na figura 3.1. Em geral, pode-se distinguir entre duas classes de fontes a laser: classe "A- aquela que inclui fontes que geram radiação laser diretamente do ganho de descarga em um gás, semicondutores, terras raras, de metal de transição dopado no estado sólido ou fibras ópticas e classe "B- fontes de laser baseados em óptica não-linear produzindo frequências do infravermelho próximo (Tittel et al., 2003).

O Laser de Cascata Quântica (LCQ) representa uma excelente fonte para o monitoramento de traços de gases. As principais vantagens são: a estabilidade do laser, a largura estreita da linha, a possibilidade de funcionamento à temperatura ambiente, a emissão em faixas de interesse onde a água não interfere (“janela” atmosférica), a durabilidade, etc (Gmachl et al., 2001; Faist et al., 1994). Os lasers de cascata quântica são fontes de

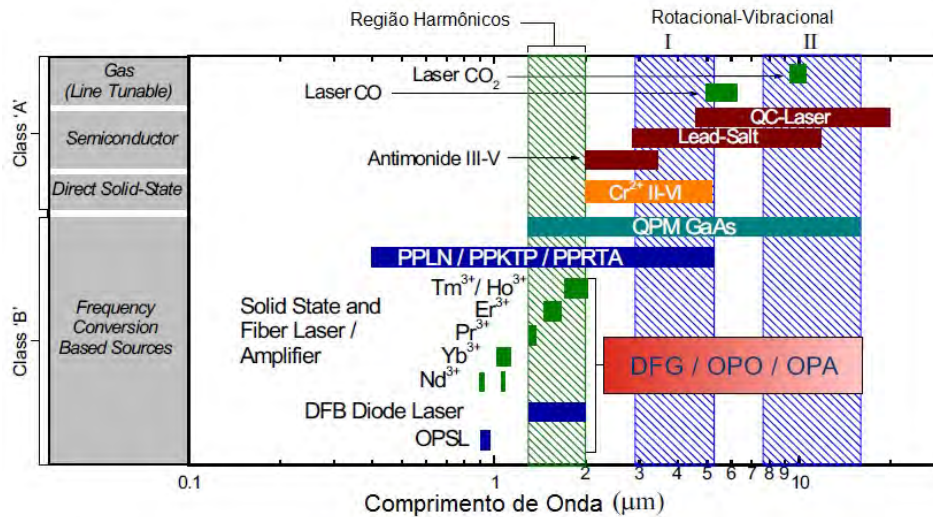


Figura 3.1: Fontes de laser e sua cobertura dos comprimentos de onda (Tittel et al., 2003)

radiação compactas e, junto com a célula fotoacústica, também compacta, permitem uma montagem experimental portátil e versátil (Gmachl et al., 2002).

Ao contrário dos lasers de diodo, as transições ópticas no LCQ ocorre entre sub-bandas presentes na banda de condução, ou seja, não envolve transições entre as bandas de condução e valência. Os LCQ são dispositivos unipolares, apenas os elétrons atuam como elemento portador de carga no processo de geração do fóton.

As sub-bandas dentro da banda de condução nos LCQs são produzidas por meio da deposição por epitaxia molecular de várias camadas finas alternadas de dois tipos de ligas semicondutoras (por exemplo: Al-In-Ga e Ga-In), formando assim super-redes com heterojunções que dão origem a regiões de aprisionamento de elétrons (poços quânticos). Devido ao aprisionamento da partícula, novos estados quânticos são produzidos. Assim, uma grande vantagem é que a separação dos estados da região ativa da sub-banda pode ser manipulado, "arquitetando" a espessura dos poços quânticos e das barreiras de tunelamento (Faist et al., 1994). Ou seja, o comprimento de onda de emissão deixa de estar limitado, como ocorre no diodo laser, ao separação inter bandas do semiconductor usado.

Para atingir o limiar de amplificação laser, seqüências de até 35 unidades de efeito laser (cada unidade contém uma região de injeção e outra de ganho) são produzidas com características especiais. A figura 3.2 mostra um esquema básico dos níveis de energia dentro de uma região de ganho e injeção (Daniel Hofstetter, 2003). A região de ganho é composta por três níveis de energia (nos lasers mais recentes são usados quatro níveis quânticos) onde a emissão característica do laser é determinada pela transição entre os níveis 3 e 2 (tempo de decaimento de $\tau_{32} = 2,0$ ps. A transição entre os níveis 2 e 1 ocorre por geração de fonos ópticos da super-rede da estrutura alternada de camadas depositadas e tem tempo de decaimento de $\tau_{32} = 0,5$ ps garantindo o esvaziamento rápido do nível 2 para outras transições $3 \rightarrow 2$.

Na estrutura básica de um LCQ, a região injetora desempenha diferentes tarefas, sendo

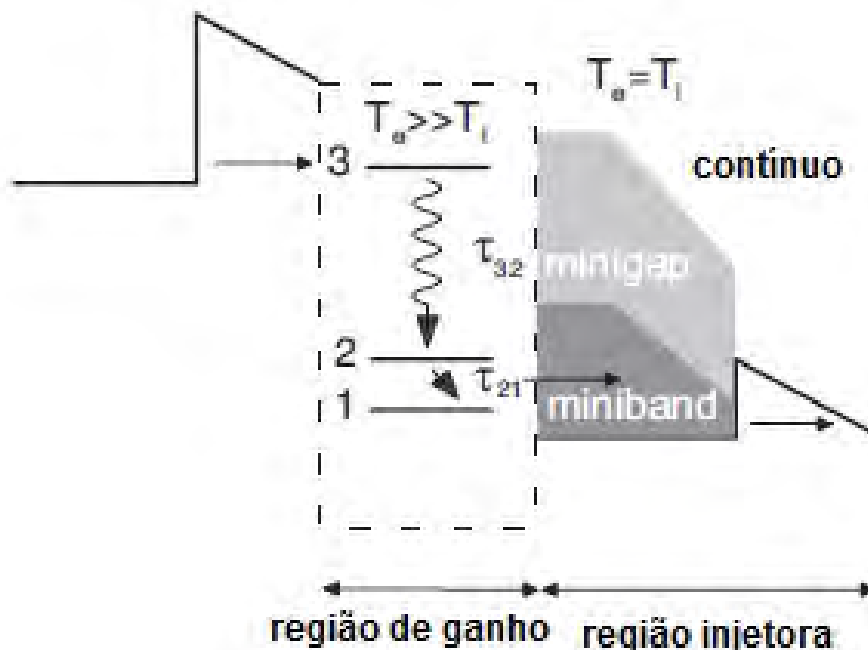


Figura 3.2: Esquema básico do funcionamento do laser de cascata quântica (Daniel Hofstetter, 2003)

que as mais importantes são: construir uma pequena separação de energia do primeiro nível inferior da região de ganho, formar uma mini-banda nos níveis mais baixos do laser, e injetar eficientemente elétrons na região ganho subsequente. A pequena separação de energia da região injetora em relação ao nível 3 da região de ganho é necessária para evitar que os elétrons injetados escapem diretamente para o contínuo (estado normal da banda de condução) e separação da mini-banda da região injetora (inclui nível 1) do nível 2 ajuda extrair de forma eficiente os elétrons da região de ganho intensificando a inversão de população. Na medida que os elétrons movem-se em direção da barreira de injeção, mini-banda reduz a sua largura por aproximadamente a metade. Este estreitamento é importante, a fim de esfriar a distribuição de elétrons dentro do injetor (Daniel Hofstetter, 2003), Figura 3.3.

Variando a temperatura do laser que provoca, por dilatação ou contração, pequenas variações nas larguras dos poços quânticos, é possível variar o número de onda emitido em pequenas quantidades de aproximadamente uma ordem de grandeza. Ou seja, o comprimento de onda pode ser sintonizado com a temperatura (Kosterev and Titel, 2002).

Em função do desenvolvimento da tecnologia de LCQ, existem atualmente no mercado diodos que emitem com intensidades de algumas dezenas de miliwatts a temperatura ambiente, o que possibilita, quando aplicados em conjunto com a célula fotoacústica diferencial, a detecção em até ppb da espécie química de interesse (Capasso et al., 2000).

Os laser LCQ podem ser fabricados para operar em ampla faixa variando de $3\mu\text{m}$ a $24\mu\text{m}$. Sendo assim, é possível escolher, dependendo da molécula, um determinado com-

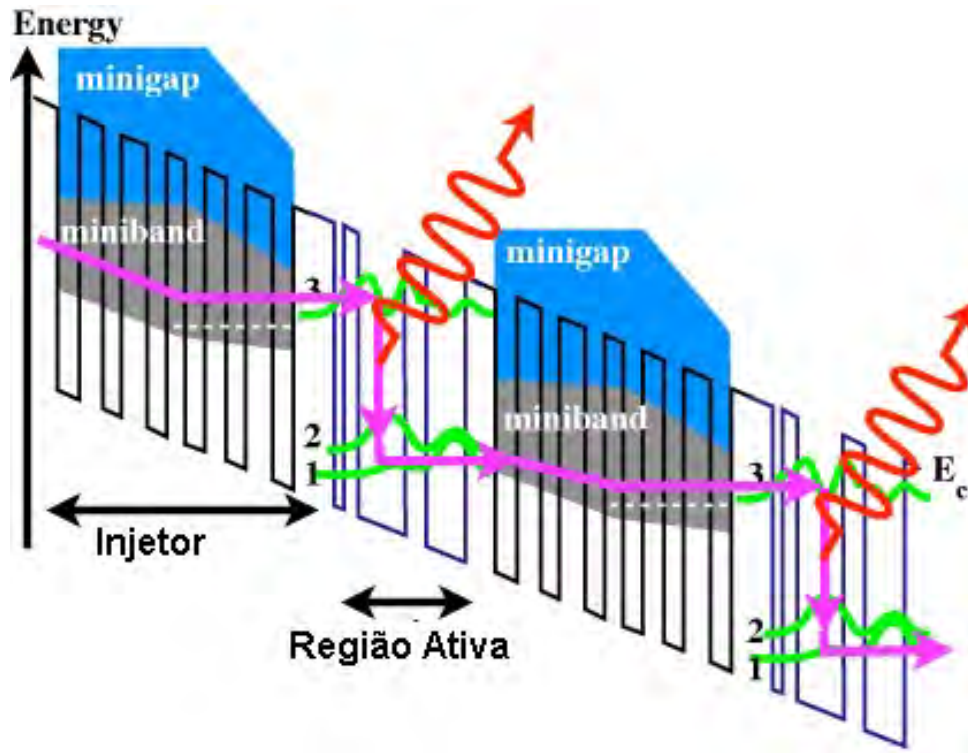


Figura 3.3: Tunelamento de elétrons através dos poços quânticos presente na banda de condução de LASER de cascata quântica

primário de onda no infravermelho que esteja dentro da chamada “janela atmosférica”, região do espectro infravermelho na qual a molécula de água não, ou quase não, absorve (?). Como aplicação, destacam-se o monitoramento de traços de gases poluentes, monitoramento de emissão de gases em sistemas biológicos, controle de processos das indústrias e biomédicos (Espécie Bueno et al., 2015; Baptista-Filho et al., 2006; da Silva; J.C. Polidoro; F.J. Luna; M.B.M. Monte; F. Souza-Barros; A. Miklos; H. VARGAS, 2008).

Em função do desenvolvimento da tecnologia de diodos, existem atualmente no mercado diodos que emitem com intensidades de algumas dezenas de miliwatt, o que possibilita a detecção em partes por bilhão da espécie química de interesse, quando aplicados em conjunto com a célula fotoacústica diferencial. Outra interessante vantagem do LCQ é a possibilidade de se escolher uma faixa de comprimento de onda. Ou seja, feito por encomenda, o comprimento de onda pode ser escolhido para uma determinada molécula numa faixa dentro de uma “janela atmosférica”; ou seja, numa região do espectro infravermelho dentro do qual a molécula de água não, ou quase não, absorve.

3.2 Célula Fotoacústica Diferencial

A célula fotoacústica é um detector onde ocorrem alguns processos físicos até o sinal ser detectado em um microfone. A geometria interna é o diferencial de várias tipos de células fotoacústicas usadas para a detecção de gases. Nelas são geradas ressonâncias do

tipo longitudinal, azimutal e radial.

Na realização desse trabalho foram utilizadas duas células fotoacústicas diferenciais. Para a detecção de NH_3 a célula fotoacústica usada tem uma ressonância acústica em aproximadamente 3,8 KHz, enquanto uma célula com frequência de ressonância de 6,3 KHz foi empregada para detectar N_2O . Essas células são arquitetadas para terem frequência de ressonância acima de 1KHz, a fim de diminuir a influência de ruídos externos e reduzir o tamanho do detector (Miklos et al., 2001). Através da figura 3.4 podemos ver uma imagem interna dessas duas células. A superfície interior da célula fotoacústica tem um recobrimento de politetrafluoroetileno (PTFE) que permite reduzir a adsorção de moléculas polares como a amônia.

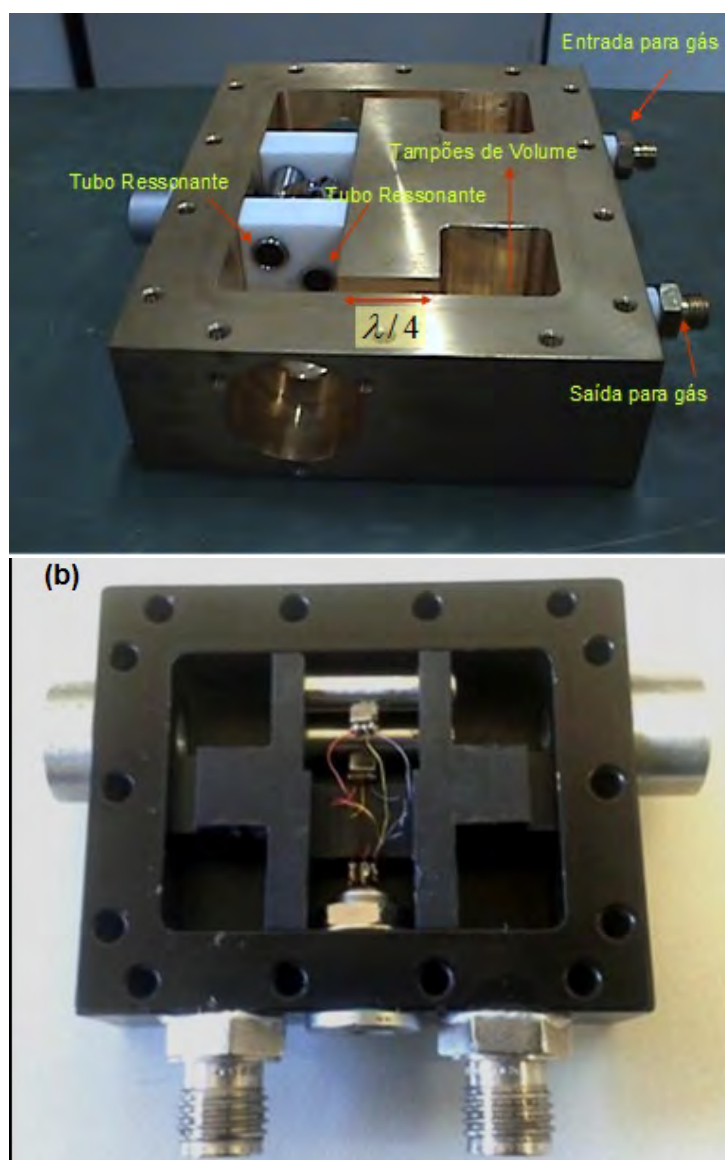


Figura 3.4: (a) Célula fotoacústica utilizada para a detecção de amônia e (b) célula fotoacústica utilizada para a detecção de óxido nítrico.

A Figura 3.5 esboça a célula fotoacústica diferencial utilizada (Miklos et al., 2001). Essa célula foi especialmente projetada de modo a garantir alta sensibilidade (baixos níveis de

ruído eletrônico e acústico) e rápida resposta. A célula possui uma configuração altamente simétrica e consiste de duas cavidades ressonantes (dois cilindros de diâmetro de 0,55 cm e 4 cm de comprimento, de quatro volumes acústicos que atuam na atenuação do ruído e de dutos de comprimento $\lambda/4$ que atuam como um filtro centrado na frequência de ressonância. A amostra gasosa em fluxo passa pelos dois cilindros produzindo assim o mesmo nível ruído de turbulência em cada um deles. Entretanto, o feixe do laser passa apenas por uma das duas cavidades ressonantes. No meio de cada cilindro, sobre a parede, existe um microfone acoplado (Knowles EK 3029). A radiação excitante ao passar através de um dos cilindros é absorvida pelas moléculas do gás presente e, ao decaírem não radiativamente, geram o sinal fotoacústico que é detectado pelos microfones. A intensidade do sinal fotoacústico é maior para aquele microfone que está no cilindro por onde passa a radiação. Com a diferença dos valores de intensidade detectados pelos microfones, os ruídos de janela, de fluxo e externos são reduzidos do sinal final.

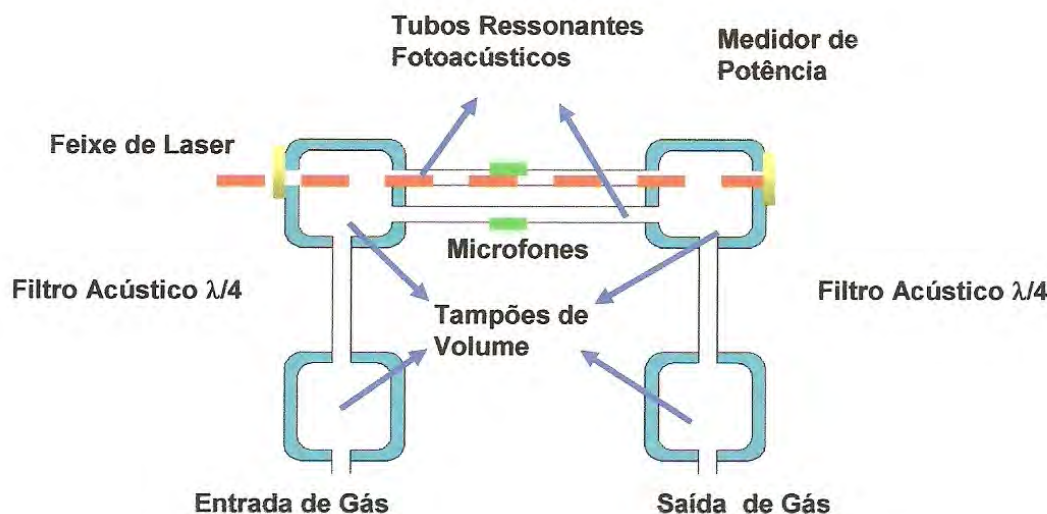


Figura 3.5: Célula fotoacústica ressonante diferencial (Miklos et al., 2001)

3.3 Espectrômetro fotoacústico acoplado com um laser de cascata quântica para detecção de amônia e óxido Nitroso

Os dois arranjos experimentais (espectrômetro fotoacústico) utilizados neste trabalho foram composto de um laser de cascata quântica pulsado e uma célula fotoacústica diferencial. Cada um utilizado para detectar a molécula de interesse.

Durante a geração do sinal fotoacústico, o laser foi modulado na frequência de ressonância das suas respectivas células através de um sinal TTL (*transistor-transistor-logic*) fornecido pelo amplificador síncrono (SR850, Stanford Research Systems). A diferença

entre os sinais fotoacústicos detectados por cada um dos dois microfones da célula fotoacústica foi amplificado pelo mesmo amplificador síncrono.

Para a alimentação do laser, foi utilizada uma fonte de corrente contínua (Tektronis, modelo PS280 DC Power Supply). A temperatura do diodo LASER foi controlada por um elemento Peltier que está em contato direto com o diodo laser. Um banho térmico (MQBMP- 01, Microquímica equipamentos) produz um fluxo de água para auxiliar no controle de temperatura do laser que está em contato com um dos lados do Peltier. O banho térmico transporta o calor para fora da caixa do laser, garantindo um bom funcionamento do elemento Peltier.

Durante a medida, a amostra gasosa foi mantida a um fluxo constante de 100 sccm (centímetro cúbico por minuto em condições normais de temperatura e pressão) pela célula fotoacústica, utilizando fluxômetros eletrônicos (Sierra Instruments).

A Figura 3.6 esboça a montagem experimental utilizada para a detecção de amônia.

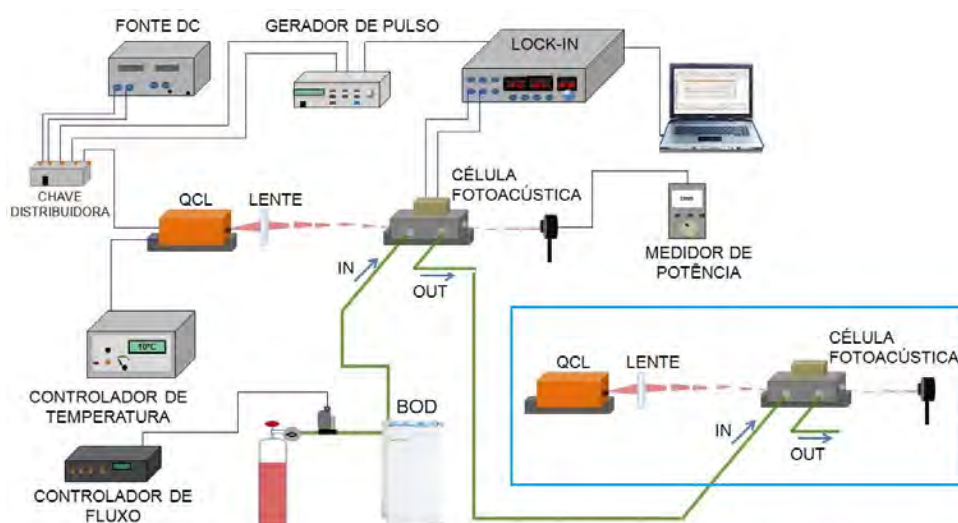


Figura 3.6: Montagem experimental; (1) gás de arraste (nitrogênio), (2) fluxômetro eletrônicos, (3), (4) armadilha de nitrogênio líquido, (5) célula fotoacústica (detector), (6) laser, (7) amplificador “lock-in”, (7)-(9) – eletrônica usado para o funcionamento do laser.

Usando o nitrogênio como gás de arraste (1), a amostra gasosa emitida pelo solo foi arrastada do porta amostra (3) até o interior do detector (célula fotoacústica (5)). Utilizando um fluxômetro eletrônico (2), Sierra Instruments, a vazão da amostra gasosa foi mantida constante através de todo o sistema. Embora a água não absorva significativamente na faixa espectral a ser usada, ela disputa sítios de adsorção na superfície interna do sistema, estimulando a liberação de amônia das paredes e aumentando assim a concentração de amônia no detector. A fim de eliminar esse efeito que levaria a uma medida superestimada da concentração de amônia na amostra gasosa, uma armadilha de nitrogênio líquido (4) para a retenção de água foi utilizada. Como fonte de excitação eletromagnética, um laser de cascata quântica (6) (Kosterev and Titel, 2002), Alpeslaser LCQ, foi empregado e a sua emissão foi sintonizada no comprimento de onda de maior absorção (Baptista-Filho

et al., 2011). O laser foi eletronicamente modulado na frequência de ressonância da célula fotoacústica no primeiro harmônico longitudinal.

3.4 Micro-organismo

A bactéria utilizada foi a *Herbaspirillum seropedicae* estirpe HRC 54 pertencentes ao estoque do Laboratório de Biologia Celular e Tecidual, na Universidade Estadual Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Os inóculos foram obtidos pelo cultivo de 20 μL do estoque bacteriano em meio DIGYS líquido (Dobereiner, 1989) por 24 horas em um agitador orbital (140 rpm, 30°C). Em seguida foi homogenizado, separando em frações de 1ml, centrifugada por 7 minutos, separando a fase líquida da fase sólida em fluxo laminar e adicionada 1ml de água esterilizada a fase sólida e colocada num agitador para ressuspender.

3.5 Contagem pelo número mais provável

Para a contagem da bactéria *H. seropedicae* estirpe HRC54 foi utilizado o método do número mais provável, em que do volume total de 800 μL duas alíquotas foram utilizadas, sendo que cada 100 μL foram transferidos para microtubos contendo 900 μL de água esterilizada (10^{-1}) e pelo método da diluição seriada foi obtida até 10^{-7} . Um volume de 100 μL das diluições 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} foi aplicado em vidros de penicilina contendo meio semi-sólido (JNFb) isento de nitrogênio, sendo três vidros para cada diluição. Todo esse procedimento foi realizado sob ambiente de fluxo laminar. A presença da bactéria foi confirmada pela formação de película aerotóxica esbranquiçada no meio semi-sólido alcalinizado (cor azul do azul de bromotimol), típica da bactéria, e a estimativa da população determinada com base na consulta à tabela de McCrady para três repetições por diluição.

3.6 Zeólitas Naturais

Os materiais analisados neste trabalho são granulados compostos por ureia fertilizante e zeólita natural. Esses sólidos foram fornecidos pela Embrapa Solos/RJ. Estes granulados estão separados pelo teor de zeólita contidos em cada grão. Este produto tem ureia misturada a dois tipos de zeólita: cubana e o concentrado zeolítico (zeólita brasileira). A figura 3.7 mostra os grãos misturados com concentrado zeolítico para três proporções diferentes: 5%, 20% e 40% e a figura 3.8 mostra os granulados compostos por ureia e zeólita cubana também nas proporções de 5%, 20% e 40%.



Figura 3.7: Granulados compostos por ureia e concentrado zeolítico em três teores diferentes: (a) 5%, (b) 20% e (c) 40%.

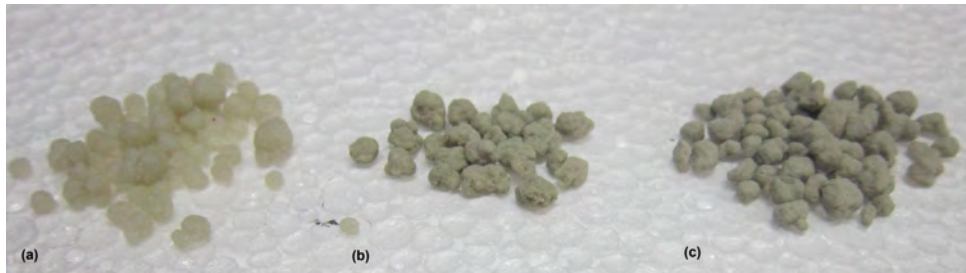


Figura 3.8: Granulados compostos por ureia e zeólita cubana em três teores diferentes: (a) 5%, (b) 20% e (c) 40%.

3.7 Montagem do Experimento

O experimento foi conduzido no laboratório LCFIS da UENF a uma temperatura controlada de 30°C, através de uma BOD (Eletrolab modelo 111/5), o solo utilizado foi também fornecido pela Embrapa-Solos. Através da figura podemos visualizar uma imagem do porta amostra acoplado a um borbulhador que foi utilizado para manter a umidade do solo.

Nesse experimento foi utilizado no porta amostra uma massa de 40 g de solo com pH igual a 8,0 e disposto aleatoriamente sobre sua superfície fertilizante (ureia combinado a zeólita natural), onde foram utilizados três proporções de zeólitas (5%, 20% e 40%) combinados a ureia e a ureia pura. Para todos os experimentos foram pesadas na balança (Shimadzu modelo AY220), uma massa de 0,065g de N para serem utilizados no solo, para tal, foram utilizados as massas de 0,241 g para 40% de zeólitas combinados a ureia, 0,183 g para 20% de zeólitas combinados a ureia , 0,151 g para 5% de zeólita incorporada a ureia e 0,144 g de ureia. A umidificação do solo foi realizada com água milli-q estereleizada e o solo foi umidificado antes de ser colocado o fertilizante sobre cobertura nos solos. Para os experimentos realizados com adição de uma solução contendo *Herbaspirillum Seropedicae* antes de ser colocado no solo foi homogenizado com o restante da água adicionado e logo em seguida colocado no solo. As proporções de água e da solução da bactéria utilizados foram informados nos resultados experimentais.

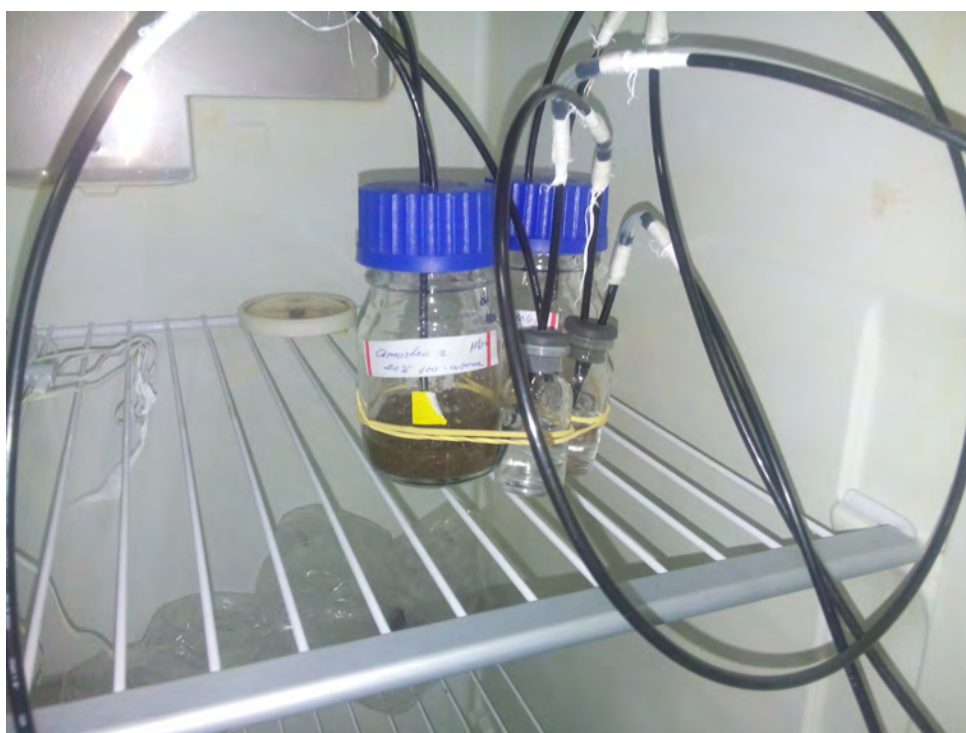


Figura 3.9: *Imagem do porta amostra utilizado para os ensaios experimentais*

Capítulo 4

Resultados

4.1 Célula Fotoacústica Diferencial

Na célula fotoacústica, o sinal é gerado a partir da interação entre a radiação e o gás. A interação é seletiva em função do comprimento de onda utilizado na radiação. Para a detecção de amônia, foi utilizada uma célula fotoacústica diferencial com tubos ressonadores com 5,5 mm de diâmetro e 40 mm de comprimento. Os modos ressonantes da célula foram caracterizados utilizando uma mistura padrão de 100 ppm de amônia diluída em nitrogênio e variando a modulação do laser numa região entre 0,6 e 14 kHz. A Figura 4.1 mostra os diferentes modos ressonantes identificados.

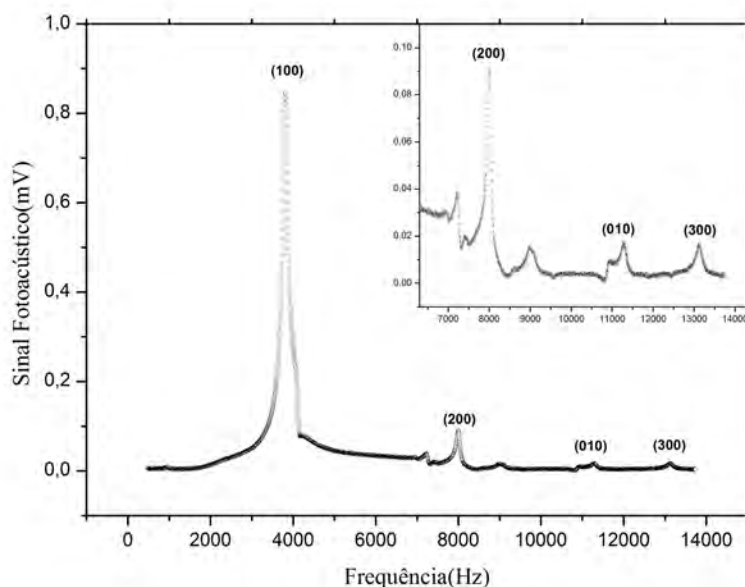


Figura 4.1: Varredura de frequências, para um ressonador cilíndrico. Na figura podemos visualizar os modos ressonantes longitudinal, radial e azimutal.

Por meio da Figura 2.15, podemos verificar que prevalece o modo ressonante longitudinal e de acordo com as equações 2.49 e 2.50 a amplitude é inversamente proporcional a

frequência de modulação do laser, sendo assim, o primeiro harmônico longitudinal (100) é o melhor para o uso. Os picos foram identificados utilizando a solução de Bessel conforme foi demonstrado no capítulo 2.

Foi verificada a relação da frequência com a alteração do gás de arraste, sendo de suma importância esse efeito para aplicações ambientais e biológicas uma vez que são sistemas que possuem diversas composições. Para tal, foi analisado o comportamento fotoacústico usando uma concentração de amônia de 3,9 ppm. Essa concentração foi obtida fazendo a diluição de uma amostra padrão de 10 ppm de amônia em nitrogênio em seguida diluindo em ar sintético. O resultado da ressonância no primeiro harmônico longitudinal (100) é mostrado na Figura 4.2 onde se percebe um deslocamento da ressonância para baixa frequência quando o ar sintético foi utilizado. Ao analisar a equação 2.31 podemos perceber que as alterações no gás de arraste provocam alterações no meio, modificando a velocidade de propagação das ondas sonoras, e assim, alterando a frequência de ressonância.

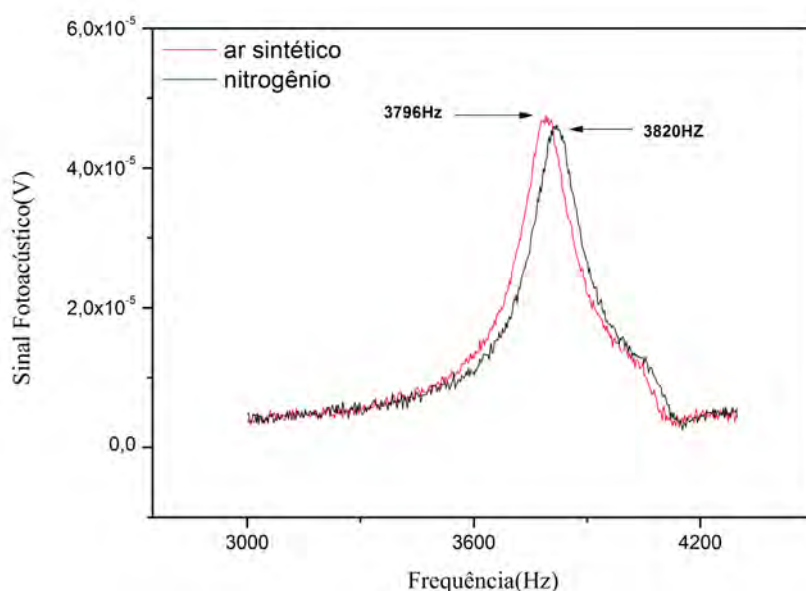


Figura 4.2: Medidas de ressonâncias utilizando com gás de arraste o nitrogênio (linha em preto) e o ar sintético (linha em vermelho) como gás de arraste para uma amostra de 3,9ppm de amônia.

O fator de qualidade da célula fotoacústica depende do tipo de gás de arraste usado. Ajustando a equação 2.41 aos dados experimentais apresentados na figura 4.2, um fator de qualidade 20,1 foi obtido com o uso do nitrogênio como gás de arraste e 19,4 para o ar sintético.

Para as análises do óxido nítrico N_2O foi utilizada uma célula fotoacústica diferencial com dimensões menores, compostas por dois ressonadores de 3,8 mm de diâmetro e 23,2 mm de comprimento. Na Figura 4.3 podemos visualizar o modo ressonante para uma mistura padrão de 10ppm de N_2O em nitrogênio.

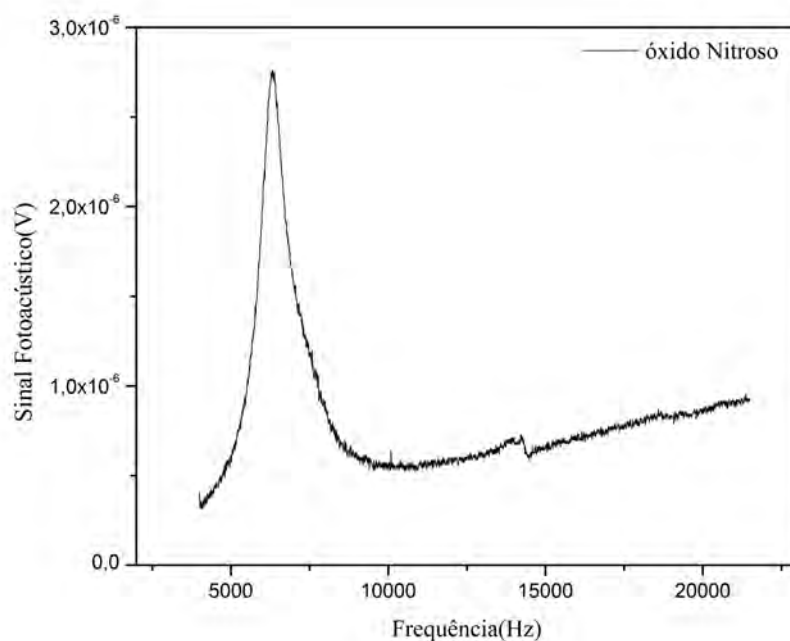


Figura 4.3: Ressonância para uma amostra gasosa de 10ppm em nitrogênio.

O fator de qualidade obtido para essa ressonância foi de 6,8 sendo menor daquele relatado no trabalho Lima et al para a mesma célula fotoacústica, que foi de aproximadamente 10. Tal diferença, se deve principalmente ao fato de que no presente trabalho foi utilizado um laser de cascata quântica como fonte de excitação, enquanto que no trabalho de Lima et al foi usado um diodo laser com feixe colimado. Ou seja, o laser de cascata quântica tem uma cintura maior do que a do diodo laser utilizado no trabalho de Lima et al. Sendo assim, a diferença do fator de qualidade demonstra uma perda maior de energia para cada ciclo de energia emitida pelo laser (Lima, 2014).

Pelo último termo do lado direito da equação 2.39, podemos observar que devido as suas dimensões reduzidas, é de se esperar que a célula diferencial utilizada para as análises de óxido nitroso tenha um fator de qualidade menor que a célula diferencial utilizada para as medições de amônia. Para aplicações biológicas e ambientais esse menor fator de qualidade se torna uma característica favorável, pois devido ao seu alargamento da ressonância, a sintonização do sistema fotoacústico não é prejudicada por pequenas variações causadas no gás da amostra.

Para melhor compreender a influência do gás de base (gás de maior concentração na mistura) sobre a frequência de ressonância da célula, o N₂O foi diluído em He puro(99,99%) e verificada a frequência de ressonância da célula e o seu fator de qualidade (Figura 4.4).

A frequência de ressonância depende diretamente da velocidade do som e tem uma relação inversa com o comprimento efetivo do tubo ressonador. Como a diluição de N₂O em He ocorre uma redução da massa molar da amostra resultante e um aumento da constante adiabática (γ) do meio comparada à diluição padrão realizada com N₂. Ou seja,

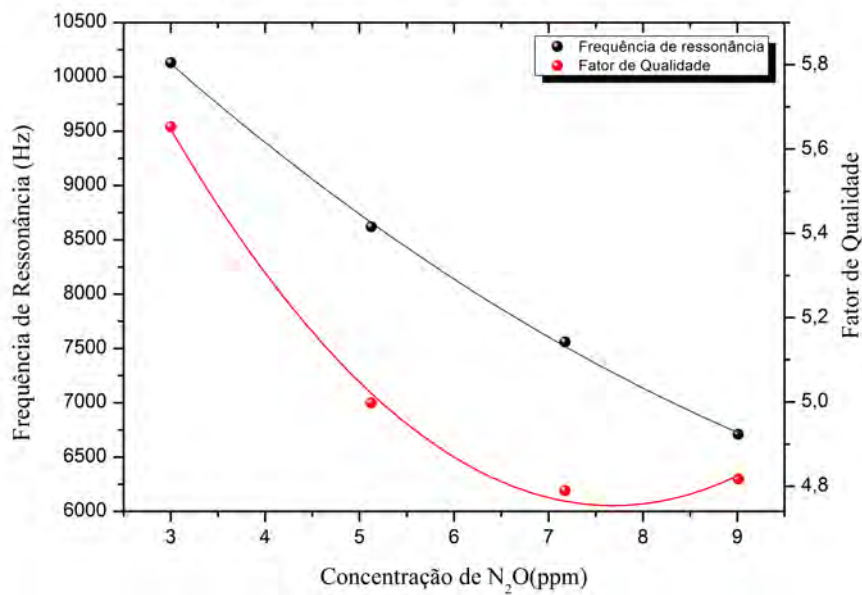


Figura 4.4: *Frequência de ressonância e fator de qualidade para diluição de N₂O em He.*

o gás de diluição predominantemente deixa de ser diatômico e passa ser monoatômico. Essas duas alterações contribuem para o aumento da velocidade das propagações das variações de pressões geradas por uma excitação transiente, conforme a equação 2.31. Por meio da equação 2.28 podemos ver que o calor depositado na amostra gasosa depende da condutividade térmica do mesmo e por conseguinte, pela equação 2.34 podemos perceber que o aumento do calor depositado acarreta no aumento da variação de pressão gerada dentro do detector. Com isso, o fator de qualidade aumenta com o aumento da concentração de He devido a uma melhora da condução térmica em relação ao nitrogênio, diminuindo as perdas de energia durante o processo.

4.2 Calibração do Espectrômetro Fotoacústico para Detecção de NH₃ e N₂O

Utilizando uma duração de pulso da corrente de 30 ns e taxa de repetição de 667 kHz (1,5 μ s), foram realizadas alguns ensaios, para determinar a dependência da corrente com a tensão aplicada, como também, a relação da potência com a corrente. Após o laser ter sido caracterizado em termos de seu funcionamento e comparado aos dados fornecidos pelo fabricante, foi escolhido uma tensão de alimentação que garantisse uma detecção satisfatória do gás em estudo.

Utilizando uma tensão de 19 V, um fluxo gasoso de 5 L/h (83,3 sccm) e variando a temperatura do laser de -30°C até 35 °C, foi obtido um espectro fotoacústico de uma amostra certificada pela empresa White Martins de 10 ppmV de amônia em nitrogênio

(Figura 4.5).

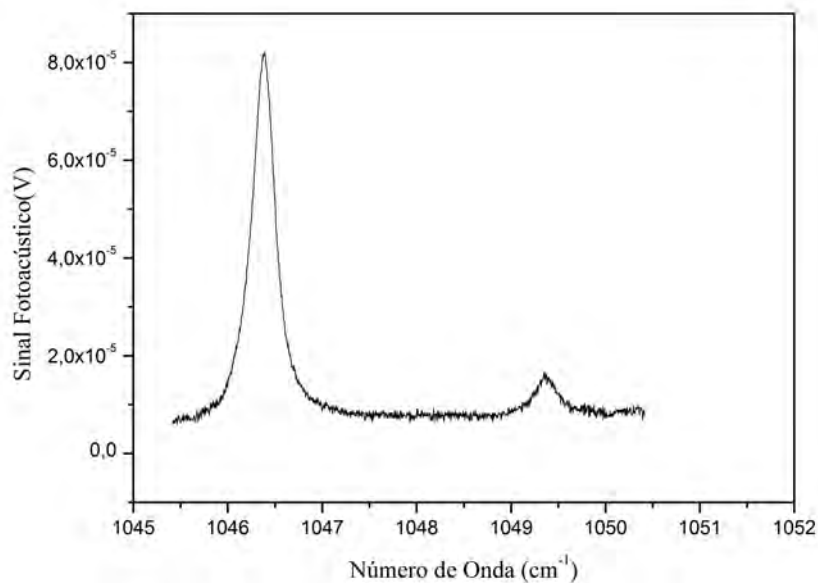


Figura 4.5: Espectro foi obtido variando a temperatura do diodo LASER entre -30°C a 35°C .

A relação entre o número de onda e a temperatura foi obtida medindo-se o espectro de CO_2 que também absorve, em menor intensidade, na mesma faixa espectral usada para a detecção de amônia (Baptista-Filho, 2005). Desta forma podemos determinar, para o modo de funcionamento utilizado, o número de onda onde ocorre a maior absorção pela molécula de amônia, Figura 4.6.

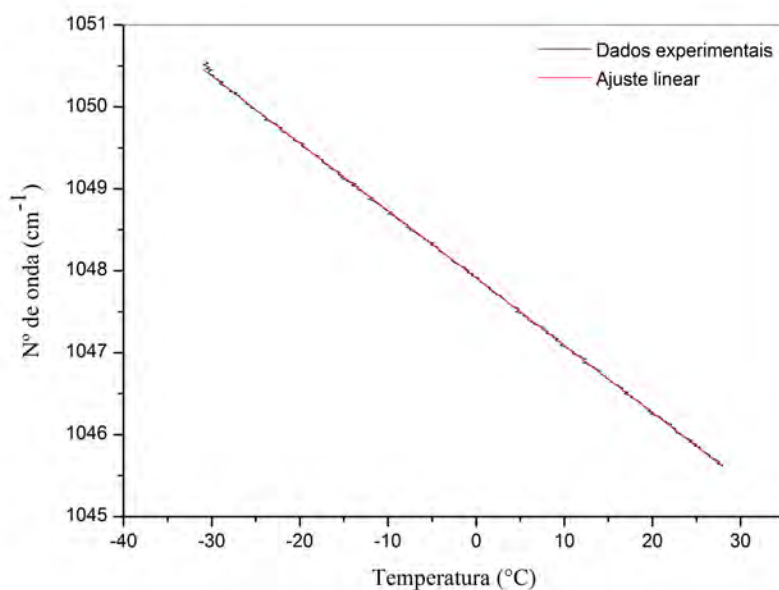


Figura 4.6: O espectro foi obtido variando a temperatura do laser LCQ entre -30°C a 35°C .

Ao comparar o espectro experimental com o espectro do banco de dados do HITRAN (Figura 4.7) na mesma faixa de número de onda, podemos certificar que a molécula de amônia interage com a radiação na faixa espectral entre 1045 e 1051 cm^{-1} , onde aparecem dois picos de absorção.

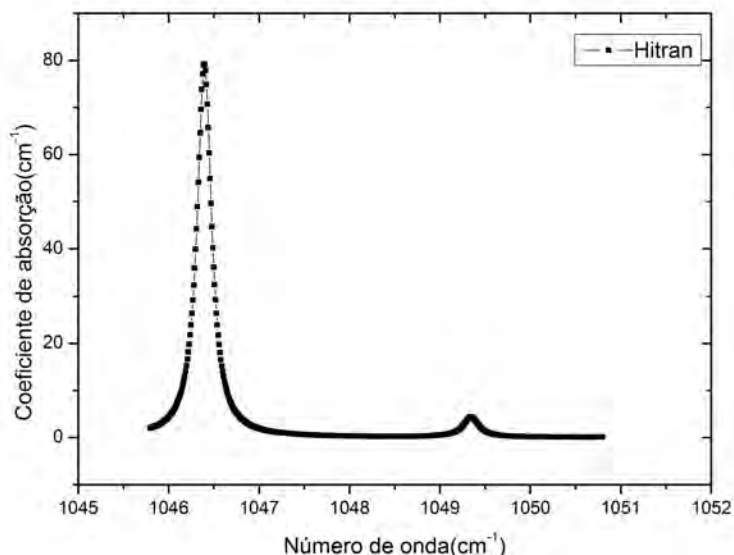


Figura 4.7: O espectro teórico foi obtido do banco de dados do Hitran

Uma vez obtido a configuração que otimiza a sensibilidade, um estudo quantitativo sobre o limite de detecção do sistema foi realizado para amônia. Para as calibrações do espectrômetro fotoacústico foi utilizado uma mistura padrão de 10 ppmV de NH_3 certificado pela White Martins, e foram verificados os limites de detecções realizando as diluições com nitrogênio puro (99,99%) e ar sintético (80 % N_2 e 20 % O_2). Sendo assim, obtivemos um sinal fotoacústico para cada concentração, conforme podemos visualizar na Figura 4.8.

Tal procedimento possibilitou obter o fator de linearidade entre a concentração e o sinal fotoacústico e o limite de detecção do sistema. Um comportamento linear foi obtido entre o maior sinal fotoacústico e o limite inferior de detecção. Para os valores de sinal fotoacústico apresentado na figura 4.9, O modo de amplitude do laser foi utilizado fixando os pulsos do laser em 30 ns com repetição de $1,5\mu\text{s}$. A temperatura do laser foi mantida a $22,4^\circ\text{C}$ correspondendo ao comprimento de onda de ($1046,42\text{ cm}^{-1}$) que corresponde na faixa de emissão do laser a linha de maior absorção da amônia. Uma corrente de 43 mA foi usada para alimentar o laser, resultando em um potência de 1,15 mW.

Além de uma boa linearidade do sinal fotoacústico com a concentração, o sistema apresentou um bom limite inferior de detecção, sendo de 120 ppbV para o modo de modulação por amplitude e para as condições de funcionamento utilizada possuiu uma resolução fotoacústica de 95 ppb, equivalente a duas vezes o desvio padrão do sistema. Em

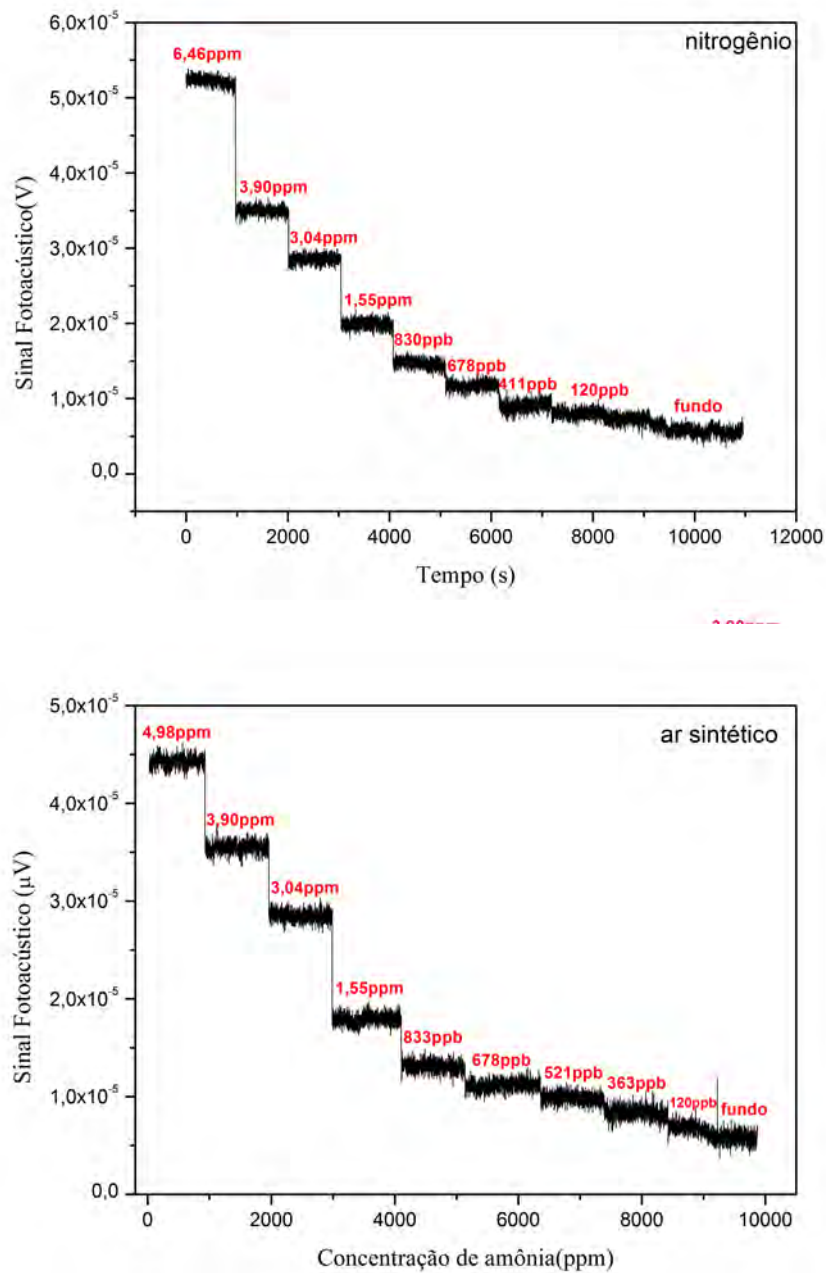


Figura 4.8: *Curvas de diluição de NH_3 utilizando o nitrogênio e o ar sintético com gás de arraste.*

trabalhos anteriores foi determinado um limite inferior de detecção de 70 ppb para uma condição de funcionamento que possibilitou uma maior potência de emissão do laser.

Para ilustrar, a Figura 4.10 mostra o comportamento linear do sinal fotoacústico em função da potência do laser, mostrando assim, que não ocorre saturação do número de moléculas excitadas pela absorção.

Nas medidas de óxido nitroso (N_2O), um segundo laser de cascata quântica foi utilizado. Para determinar a melhor escolha do comprimento de onda para a detecção de N_2O , foi aplicado uma tensão de de alimentação de 11 V no laser e, através da célula fotoacústica,

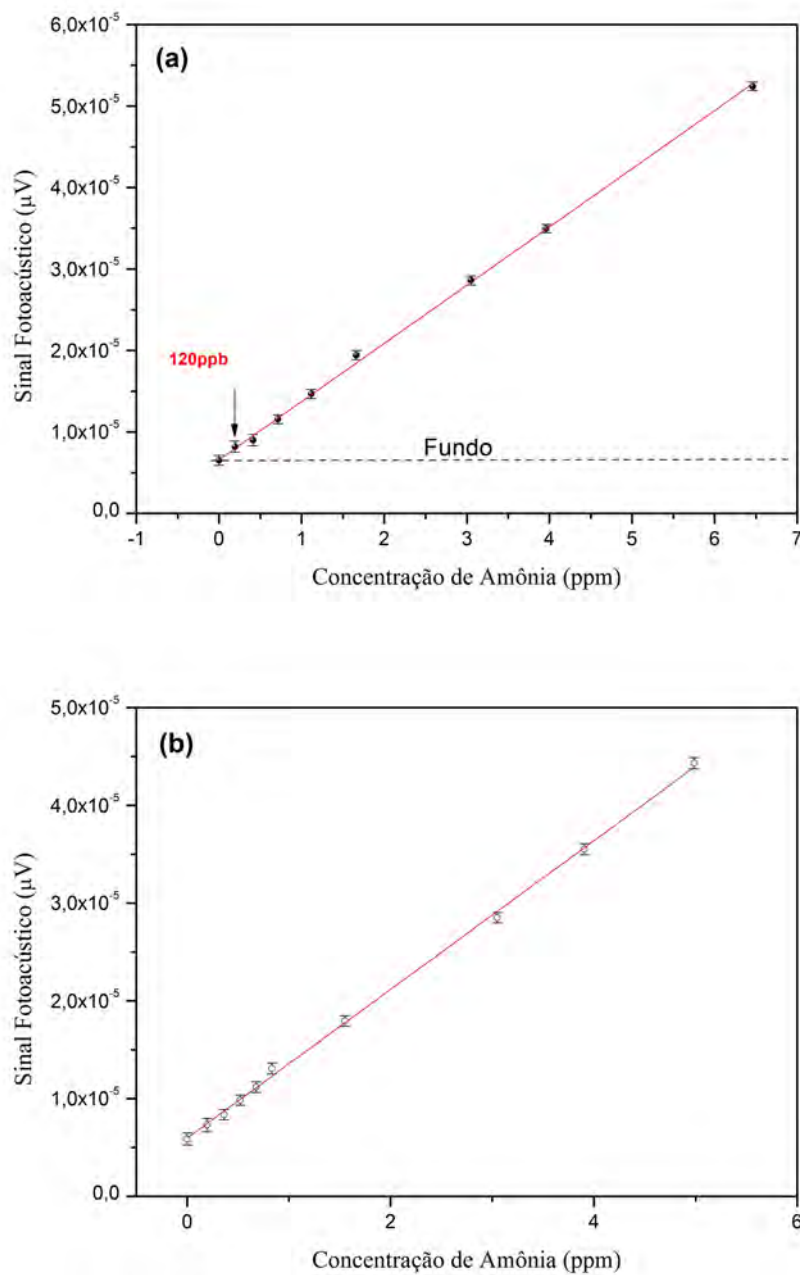


Figura 4.9: Curva de calibração do sinal fotoacústico em função da concentração de NH_3 . Na figura (a) foi utilizado o nitrogênio com gás de arraste e na figura (b) o ar sintético.

foi colocado um fluxo de 100 sccm de 10 ppmv de N_2O em nitrogênio. A temperatura do laser foi variada entre $0^\circ C$ e $35^\circ C$. Para esta faixa de temperatura, o laser varia o seu comprimento de onda dentro de uma das regiões de absorção do óxido nitroso. Como existe interferência da água sobre algumas linhas de absorção do N_2O na região espectral de análise, medidas foram realizadas com a amostra padrão de N_2O umidificada. A umidificação foi obtida passando fluxo de gás de análise por um recipiente contendo água (borbulhamento na água). O mesmo procedimento foi também realizado com nitrogênio puro (4.11). Com esses resultados, foi possível então identificar as linhas de absorção do

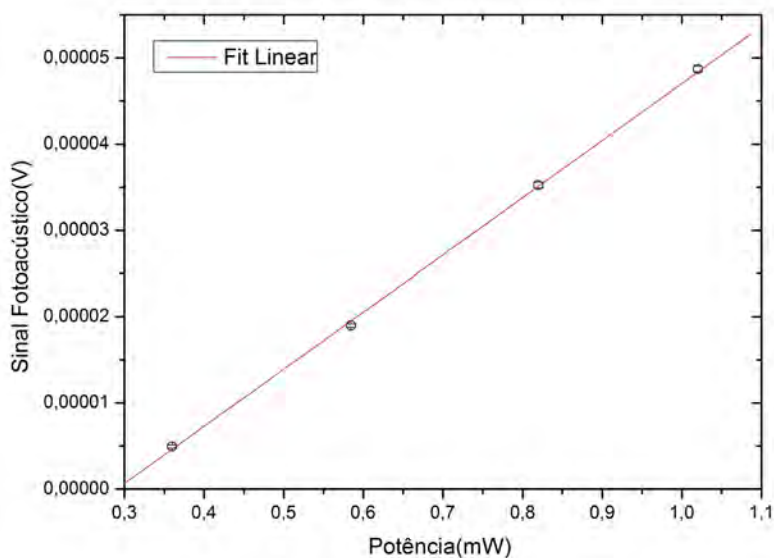


Figura 4.10: Relação do sinal fotoacústico com a potência emitida do diodo LASER.

óxido nítrico que sofrem menos interferência da água.

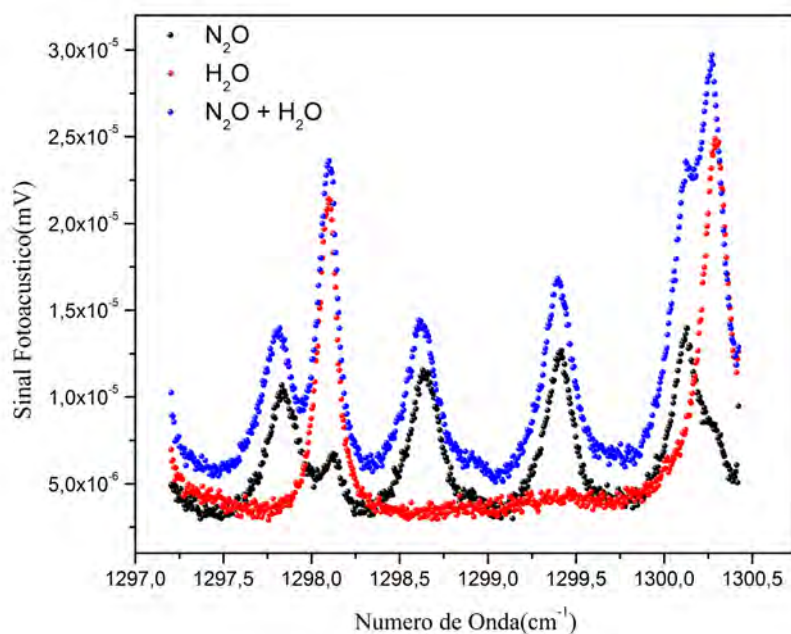


Figura 4.11: Espectros fotoacústicos obtidos para três amostras de gases na faixa de emissão do LCQ utilizado para detecção de N₂O

A Figura 4.12 mostra o espectro teórico na região de 1297,2 a 1302,8 cm⁻¹ para o N₂O gerado com o banco de dados Hitran. Ao comparar as varreduras experimentais com a região do banco de dados Hitran, podemos identificar os picos de absorção do óxido

nitroso, apesar de ter a influência da água.

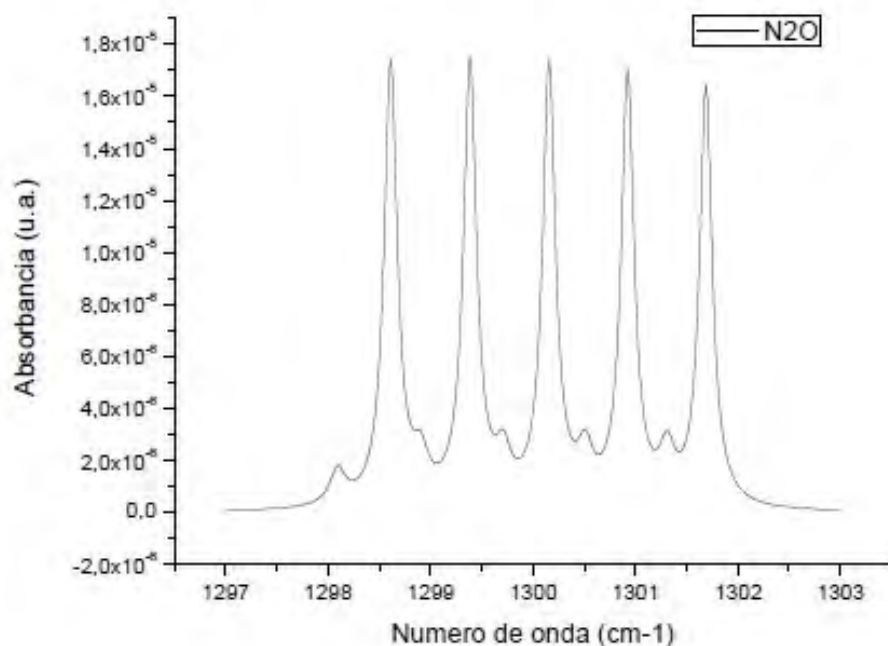


Figura 4.12: Varredura teórica obtido através do banco de dados do Hitran.

Após otimizar o funcionamento do espectrômetro para análise de N_2O melhor alinhamento do feixe do laser e condição de operação em amplitude com duração de pulso de 50 ns e taxa de repetição de 400 kHz $2,5\mu s$, o laser foi sintonizado no número de onda $1298,6\text{ cm}^{-1}$, pois nessa região não temos influência dos picos de absorção da água. Para determinar a sensibilidade do sistema para as condições escolhidas, foi realizado uma diluição de uma amostra certificada óxido de nitrogênio, 10 ppmv em ar sintético. A Figura 4.13 mostra a rampa de diluição.

Como os procedimentos experimentais foram todos realizados com o ar sintético como gás de arraste, a aferição também foi realizada com esse gás. Com a determinação do valor médio de cada rampa de sinal mostra na Figura 4.13 foi determinada a curva de calibração para o N_2O (Fig.4.14). A barra de erro corresponde ao desvio médio padrão calculado em cada uma das rampas de sinal fotoacústico. Novamente a linearidade do sinal em função da concentração foi obtida e o seu limite inferior de detecção pode ser determinado.

Para a configuração do laser utilizada para os procedimentos experimentais, obtivemos um limite de detecção de 108 ppbv e, considerando duas vezes o desvio médio padrão, o sistema possui uma resolução fotoacústica de 130 ppbv. Ou seja, esta corresponde a variação de concentração mínima detectável.

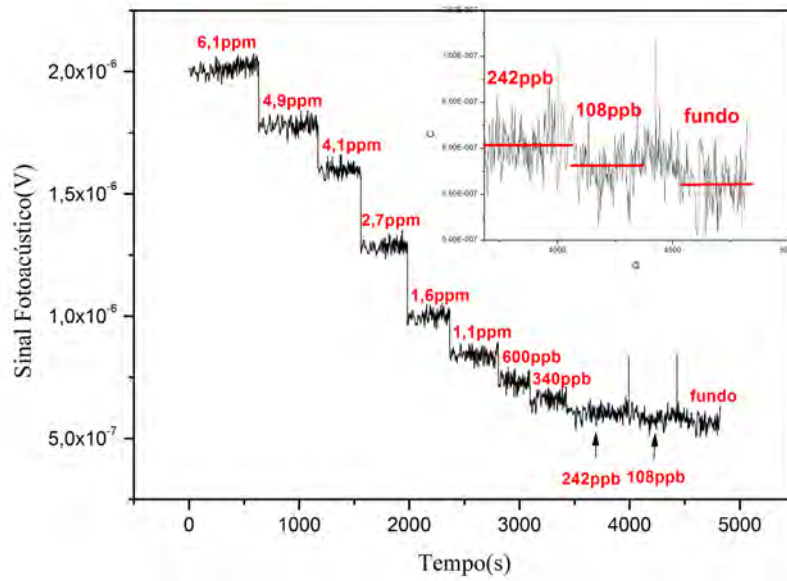


Figura 4.13: Diluição do óxido nítrico utilizando ar sintético como gás de arraste.

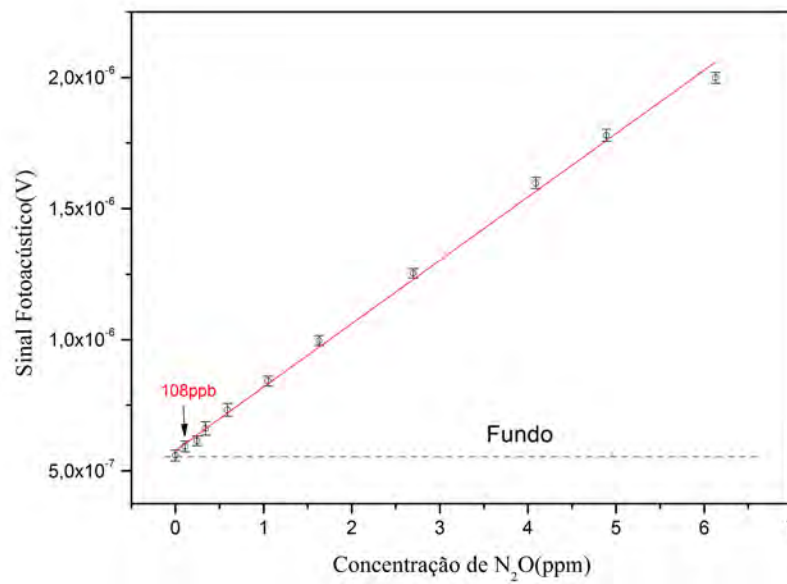


Figura 4.14: Curva de calibração do óxido nítrico utilizando ar sintético como gás de arraste.

4.3 Volatilização de Amônia

Para produzir a hidrólise da ureia e umidificar o solo foi utilizado água milli-q esterelizada. O ar sintético úmido foi utilizado como gás de arraste. A umidificação foi realizada passando o ar sintético seco por um recipiente contendo água milli-q esterelizada. A umidificação foi realizada para ajudar na manutenção da umidade do solo durante o experimento.

Para analisar a influência da umidade sobre a taxa de emissão de amônia, foi utilizado 40% de concentrado zeolítico em ureia e os testes foram realizados considerando as umidades de 0% (solo seco), 22,5% e 25%. A amônia volatilizada no porta amostra foi arrastada a um fluxo constante de 100 sccm para o sensor fotoacústico. Para a detecção de amônia, a temperatura do laser foi fixada em 22,4°C, correspondendo a uma emissão com número de onda igual a 1046,40 cm^{-1} (para a faixa espectral emitida pelo laser, esta linha corresponde a que possui o maior coeficiente de absorção da amônia). Na Figura 4.15, podemos visualizar o resultado temporal da volatilização de amônia em função de umidades diferentes dos solos.

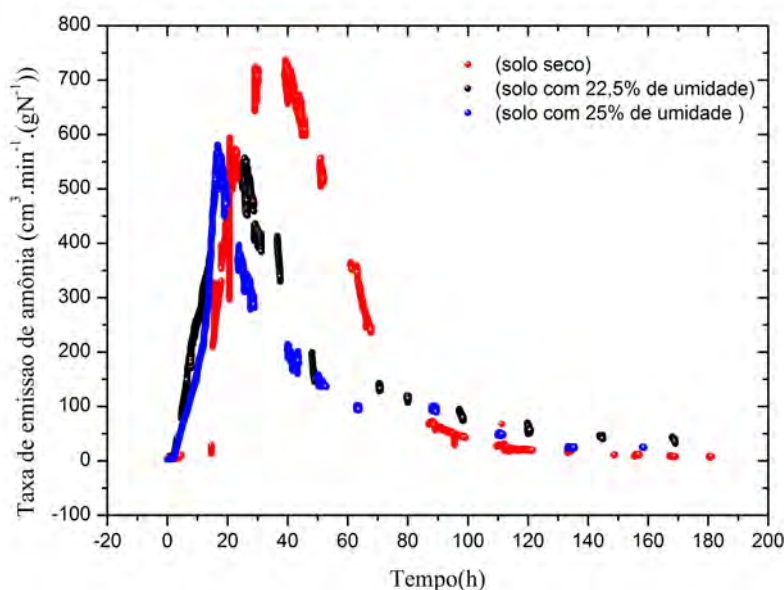


Figura 4.15: Volatilização da amônia para o fertilizante produzindo através da mistura de 40% de concentrado zeolítico brasileiro misturado com ureia para uma amostra de solo com pH de 8,0 com diferentes umidades do solo (seco, 22,5% e 25%)

Podemos verificar uma antecipação da taxa máxima de liberação de amônia em função do aumento da umidade do solo, chegando a uma diferença de cerca de 25 horas entre o solo seco e o solo com 25% de umidade. Outro resultado observado foi a redução dos máximos de emissão com o aumento da umidade, obtendo-se uma redução de aproximadamente 23% para os solos como 22,5% e 25% de umidificação em relação aos solo seco.

Com a Figura 4.16, podemos analisar a emissão total de amônia pelo processo de volatilização ao longo dos dias integrando em partes a curva da Figura 4.15. A integração mostra claramente a influência da umidade do solo sobre a quantidade total de amônia volatilizada.

Após 160 h de experimento podemos visualizar significativas reduções na perdas de N na forma de NH_3 com o aumento da umidificação do solo. Em relação ao solo seco, essas reduções foram respectivamente de 43% e 24% para os experimentos que tinham 25% e 22,5% de umidade no solo.

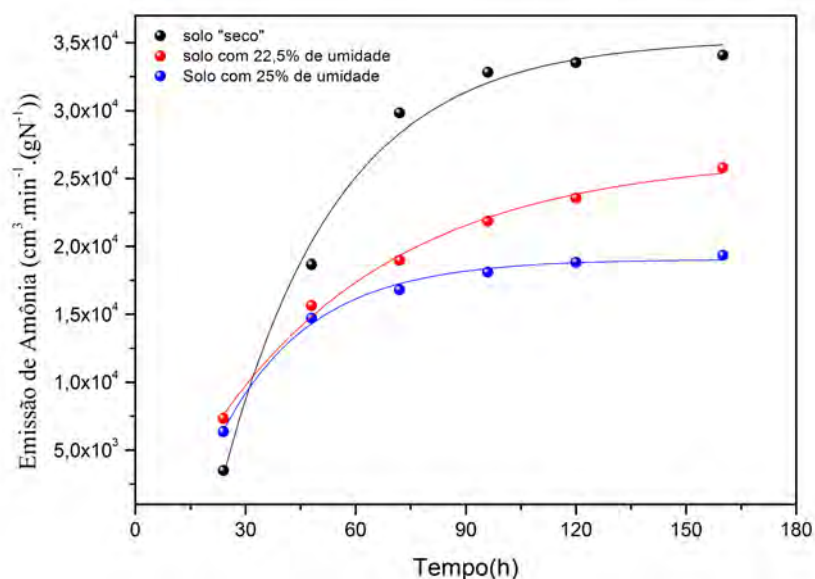


Figura 4.16: Acumulativo da volatilização da amônia para o fertilizante produzindo através da incorporação de 40% de zeólita nacional nacional em ureia para diferentes umidades do solo.

Na Figura 4.17 podemos observar os resultados das taxas de emissão de amônia em função do tempo para fertilizantes contendo diferentes teores de concentrado zeolítico brasileiro (CB), a saber: 5%, 20% e 40% da massa total, sendo o restante ureia pura. Para aumentar a atividade microbiana do solo foram utilizados 3 ml da solução com bactéria diazotrófica *Herbaspirillum Seropedicae*. Além disso foram acrescentados 7 ml de água para produzir uma umidificação de 25% do solo.

Ao analisar a Figura 4.17, podemos notar claramente uma redução na volatilização de amônia provocado pela atuação do CB. As perdas de N na forma de NH_3 deu-se nas primeiras horas obtendo uma taxa máxima de perda em aproximadamente 20h após a colocação o fertilizante sobre o solo. Em relação a ureia pura, os fertilizantes CB 20% e CB 40% reduziram essa taxa máxima em 57 % e o fertilizante CB 5% reduziu em 33%.

Para determinar o espectro de absorção da amostra gasosa, variou-se a temperatura do laser de -30°C até 30°C , variando assim o número de onda de $1045,98\text{cm}^{-1}$ a $1050,5\text{cm}^{-1}$. As varreduras espectrais foram realizadas quando as taxas de emissões de amônia atingiram os seus valores máximos; ou seja, em cerca de 20 h após a colocação do fertilizante sobre o solo. A Figura 4.18 mostra os resultados experimentais.

Comparando os espectros obtidos com o banco de dados do Hitran, confirma-se que houve apenas a detecção de amônia na faixa espectral utilizada. Como a amostra passa por um dedo frio (armadilha de água, filtro físico de nitrogênio líquido), ocorreu a condensação e acúmulo de gelo no filtro.

Na Figura 4.19, podemos ver as perdas acumuladas ao longo dos dias do experimento para os concentrados zeolíticos. Como a taxa de emissão diminui até atingir um valor

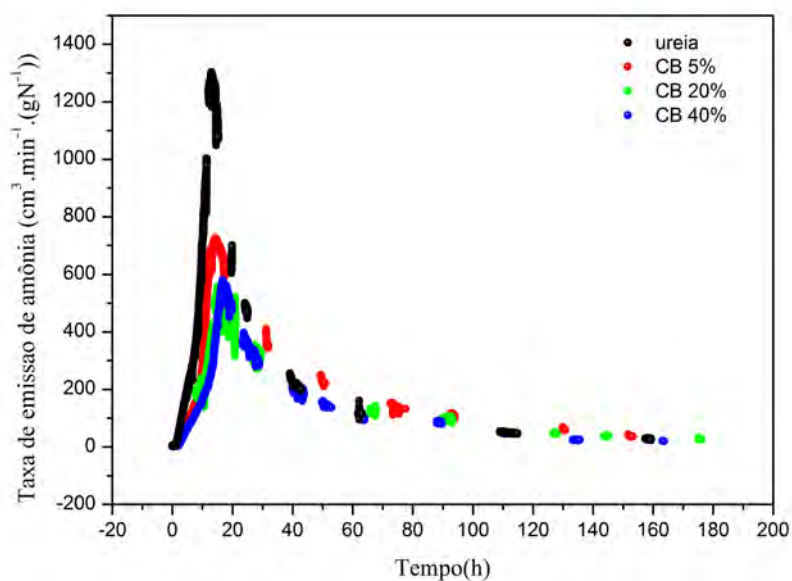


Figura 4.17: Taxa de emissão amônia temporal para diferentes proporções do concentrado zeolítico nacional misturados a ureia.

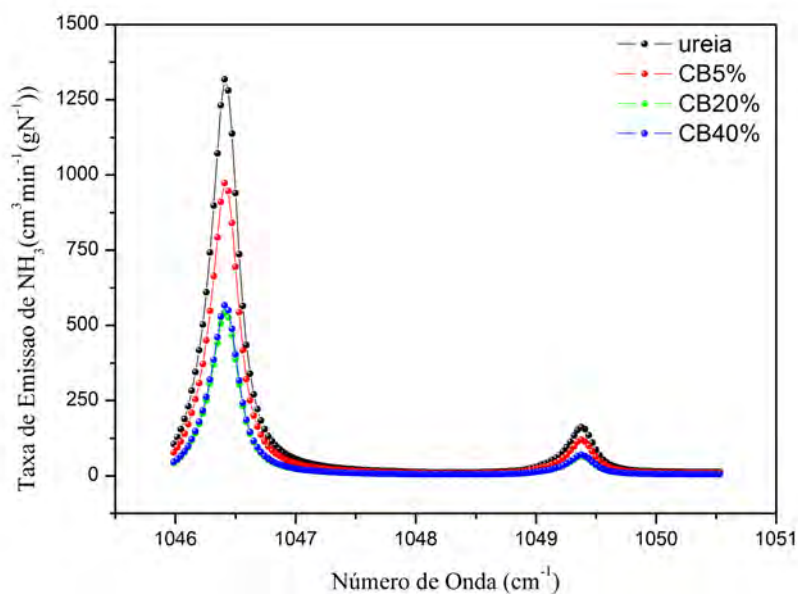


Figura 4.18: Varredura espectral das amostras gasosas emitidas dos concentrados zeolíticos adicionado ao solo.

não mais detectável pelo sistema, é esperado uma saturação das perdas acumuladas que corresponde ao total de amônia liberada pelo fertilizante sob as diferentes umidades.

De uma forma geral, a adição do concentrado zeolítico brasileiro (CB) na matriz do fertilizante diminui a volatilização de amônia. Após 160 h, quando as taxas de emissão deixam de ser detectáveis, as amostras com 20% e 40% de CB apresentaram uma redução,

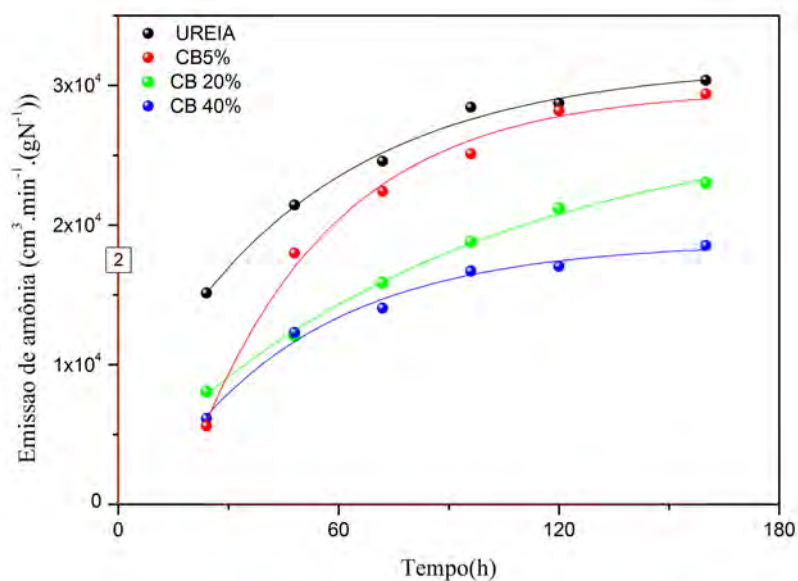


Figura 4.19: Emissão total de amônia ao longo dos dias, para os fertilizantes de continham proporções diferentes de concentrados zeolíticos brasileiros incorporados a ureia.

em relação a ureia pura, de 24,2% e 38,9%, respectivamente. Para o fertilizante CB 5%, a redução não foi significativa ficando em 3%, mas ao analisarmos a curva da emissão total desse fertilizante, porém notamos uma outra característica importante desse material que foi uma perda menor de N, em relação à ureia pura, durante os três primeiros dias após a aplicação do fertilizante ao solo. Ou seja, o fertilizante estaria disponível por um período maior para a absorção da cultura.

Bernardi et al utilizaram os concentrados zeolíticos em campo na cultura de milho e observaram um aumento na massa seca de até 5,5%, quando adubados com concentrados zeolítico (20%) misturado a ureia triturada (Bernardi et al., 2011). Em outro trabalho realizado em casa de vegetação com algumas matrizes de fertilizantes colocados sobre a superfície do solo (de Campos Bernardi et al., 2013), observou-se uma redução em torno de 20% na volatilização de amônia quando foi utilizado ureia misturado com 20% concentrados zeolítico, em relação a ureia pura .

Na Figura 4.20 podemos observar o resultado das taxas das emissões temporais da volatilização de amônia das zeólitas naturais cubanas(ZC), misturado a ureia pura nas seguintes proporções utilizadas (ZC 5%, ZC 20% e ZC 40%). Essa simbologia corresponde ao percentual da zeólita misturado a ureia. Para aumentar a atividade microbiana do solo foram utilizados 3ml da bactéria diazotrófica *Herbaspirillum Seropedicae*, junto com 7ml de água para produzir uma umidificação de 25% do solo.

As taxas máximas para as proporções de ZC misturadas a ureia se deu por volta de 20h, e notória a redução gradativa na taxa máxima com o aumento da proporção das ZC nos fertilizantes. Paras os fertilizantes ZC 5%, ZC 20% e ZC 40 % obtivemos uma

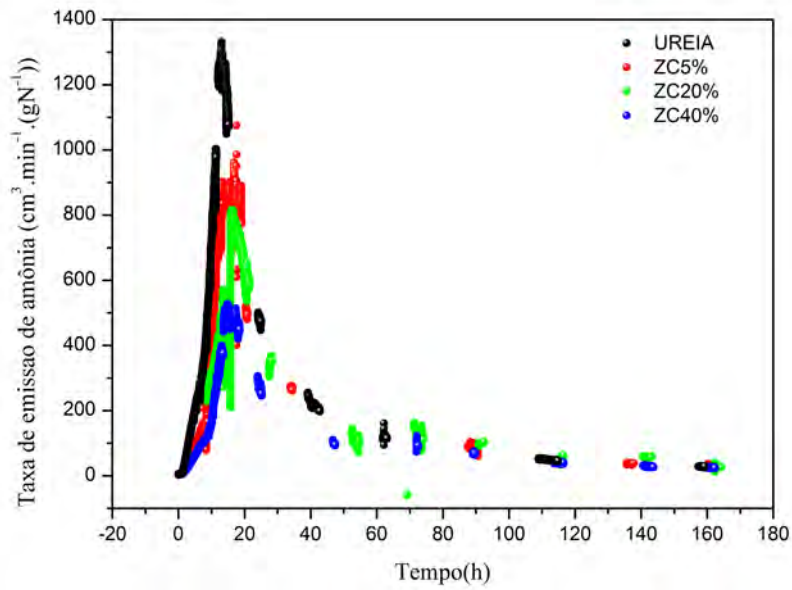


Figura 4.20: Taxa temporal de emissão de amônia para diferentes proporções de zólita cubana misturada a ureia triturada.

redução comparando com a taxa máxima da emissão temporal da ureia de 36%, 41% e 61%, respectivamente. Na Figura 4.21 podemos ver a varredura espectral realizada para determinar os picos de absorção para a amostra gasosa.

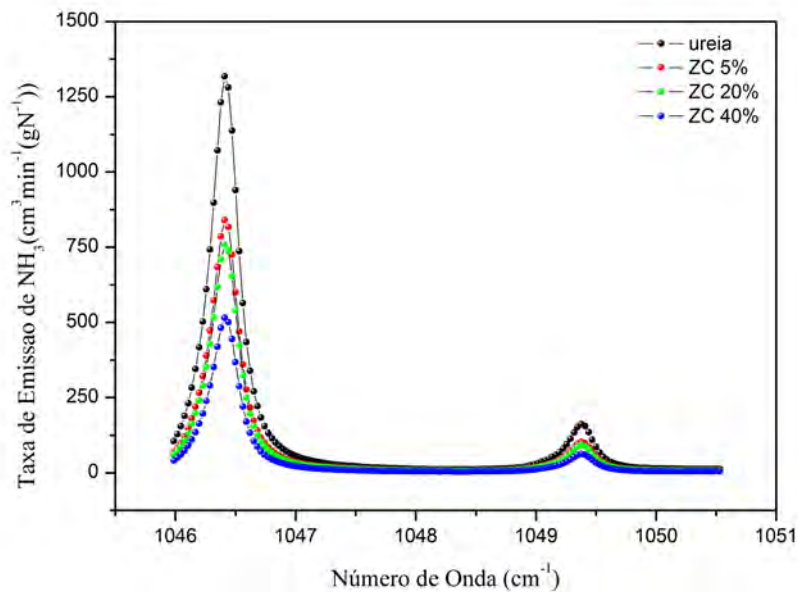


Figura 4.21: Varredura espectral das amostras gasosas emitadas das zeólitas cubanas misturadas a ureia e adicionado ao solo.

Para essa varredura variamos a temperatura do laser de -30°C até 30°C e comparando com a figura 4.7 podemos observar que apenas as moléculas de amônia interagiram com a

radiação emitida pelo laser.

Na Figura 4.22 podemos observar o total que foi emitido em função dos dias de análise. O resultado da emissão total foi obtido integrando a curva da taxa de emissão temporal após cada dia de emissão.

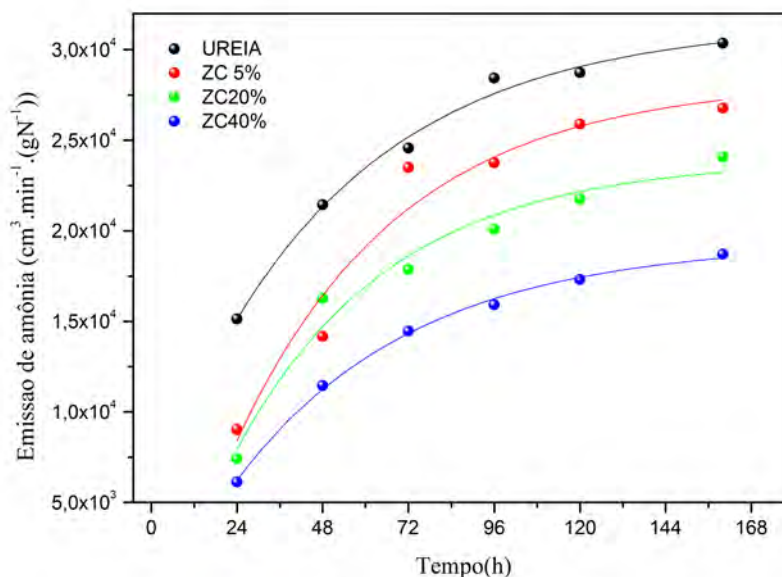


Figura 4.22: Emissão total de amônia ao longo dos dias, para os fertilizantes de continham proporções diferentes de zeólita cubana misturados a ureia.

Os fertilizantes ZC 5%, ZC 20% e ZC 40% após 160h produziram uma redução de 5%, 21% e 38,2%, respectivamente. Não foram observadas diferenças significativas das emissões entre as duas matrizes fertilizantes após 160h de experimento. Isso, devido à semelhança da capacidade de troca catiônica (CTC) dos dois materiais. No trabalho de Werneck (Werneck et al., 2012), foi relatado que a CTC das zeólitas cubanas são de 296 meq/100g das zeólitas e, no trabalho de Mariza (das Graças de Andrade da Mata Resende et al., 2008), foi determinado que a CTC do concentrado zeolítico brasileiro é de 255 meq/100g.

As significativas reduções nas perdas de nitrogênio por volatilização dos dois materiais podem ser explicadas pela alta eficiência de adsorção das zeólita cubanas (clinoptilolita) e concentrado zeolítico brasileiro (estilbita), em razão da sua grande superfície interna, e da sua alta habilidade de adsorção e capacidade de troca catiônica. Assim, o princípio de ação desses minerais, na regulação dos compostos nitrogenados, deve-se a três fatores: presença da molécula de ureia em suas estruturas, que confere proteção física, e a consequente redução na velocidade de hidrólise dessa molécula e a retenção do NH_4^+ em sua estrutura, que reduz sua concentração na solução do solo e consequentemente a liberação de NH_3 .

4.4 Crescimento das Bactérias

Foram analisados o crescimento das bactérias na presença do solo sob duas condições: solo umidificado a 25% adicionando 7ml de água e 3 ml de *Herbaspirillum Seropedicae*(tratamento 1) e a outra condição foi o solo umidificado com 10ml de água milli-q esterelizada para forma uma umidade de 25% no solo (tratamento 2), as condições de crescimento dessa bactéria e o método utilizado para contagem foram definidos no capítulo 3.

Na Figura 4.23 podemos ver o crescimento das amostras dos solos em meio Jnfb. Foram realizadas as leituras no tempo de 0h, 24h, 48h e 100h.

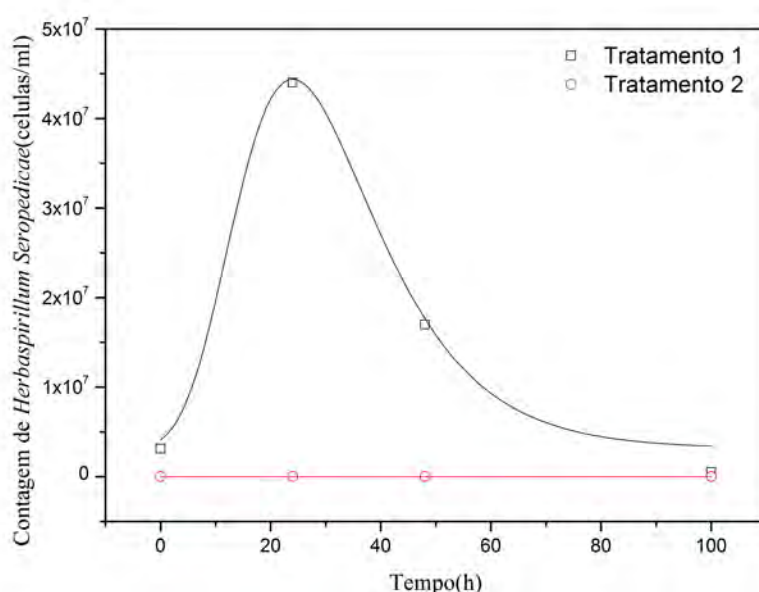


Figura 4.23: Número mais provável de células de *Herbaspirillum seropedicae* estirpe HRC54. Cada valor representa a média de três repetições

Podemos visualizar um crescimento do número provável das bactérias *Herbaspirillum seropedicae* no tratamento 1 nas primeiras 24h e esse valor vai decrescendo até o final da análise que dá em 100h. Contudo no tratamento 2, não obtivemos uma resposta positiva para o crescimento específico de *Herbaspirillum seropedicae*.

Na Figura 4.24 podemos visualizar o crescimento total micro organismo vivos nos dois tratamentos, essas análises se deu através da análise de crescimento em placas.

Através da Figura 4.24 podemos ver o crescimento de todos os microorganismos para os dois tratamentos. No tratamento 1 a curva segue a tendência do crescimento da colônia de *Herbaspirillum seropedicae*, porém em um ordem de magnitude superior a contagem anterior e no tratamento 2, podemos observar que depois que o solo foi umidificado a vida microbiana do solo cresce lentamente nas 100h primeiras do tratamento com uma tendência de saturação desse crescimento no final do experimento, ficando claro que o

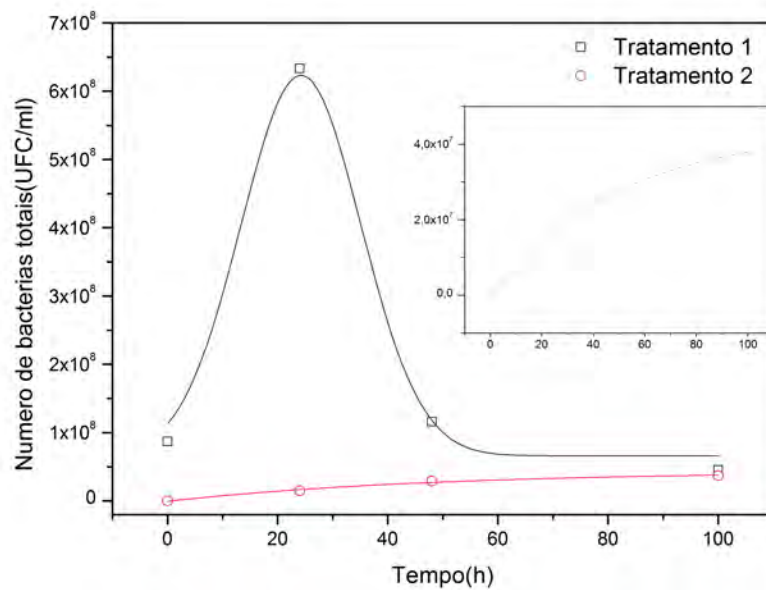


Figura 4.24: Número de bactérias totais. Cada valor representa a média de três repetições

solo sem a adição da *Herbaspirillum seropedicae* tem um vida atividade microbiana bem pequena.

4.5 Volatilização de N₂O

Para as análises do óxido nitroso (N₂O) liberado dos fertilizantes quando colocados sobre cobertura nos solos, o laser foi sintonizado no número de onda 1298,6 cm⁻¹. Neste comprimento de onda não ocorre interferência da água. Para os tratamentos com solos secos e solos umidificados (22,5% e 25%), nenhum sinal fotoacústico de óxido nitroso foi detectado. No primeiro caso, esse resultado era esperado devido ao fato de não haver a condição anaeróbica necessária para a ocorrência da desnitrificação. Mas para o solo umidificado, a possível explicação pode ser obtida analisando a Figura 4.24, onde podemos ver um número pequeno de micro-organismos durante a evolução do experimento, não gerando assim, uma concentração detectável de óxido nitroso emitido pelo sistema.

Na Figura 4.25 podemos observar a evolução temporal das taxas de N₂O emitidos dos experimentos realizados com solos com 25% de umidificação adicionando 7 mL de água mili-q esterelizada e 3 mL de *Herbaspirillum Seropedicae* em fase líquida, a metodologia utilizada e o procedimento experimental foram relatados no capítulo 3. Para efeito de uma melhor organização, iremos classificar os tratamentos como CB 5%, CB 20% e CB 40% que correspondem ao percentual de concentrado zeolítico nacional misturados à ureia triturada.

As taxas máximas das emissões de óxido nitroso foram entre 60-95h dependendo do fertilizante aplicado. Podemos perceber um deslocamento temporal em relação a taxa má-

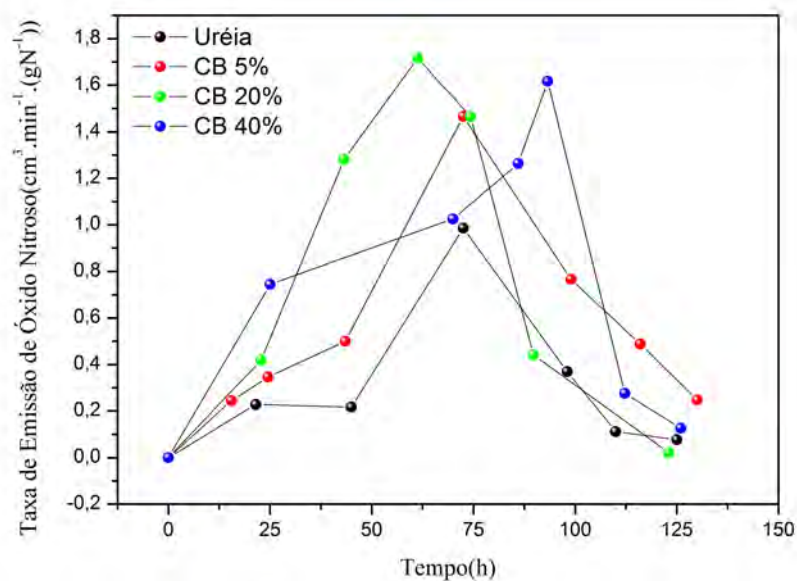


Figura 4.25: Emissão de óxido nitroso para concentrados zeolíticos misturados a ureia.

xima de volatilização de amônia de 40-75h, visto que, as taxas máximas de volatilização de amônia ocorreram aproximadamente 20h após a colocação da ureia sobre o solo, conforme a Figura 4.17. Essa distância entre os máximos dos dois processos já era esperado, devido NH_4^+ ser um dos produtos finais da hidrólise da ureia e ser o composto inicial para processos microbianos de nitrificação e desnitrificação. Na Figura 4.26 podemos ver varreduras realizadas durante o processo de análise para a amostra de CB 40%.

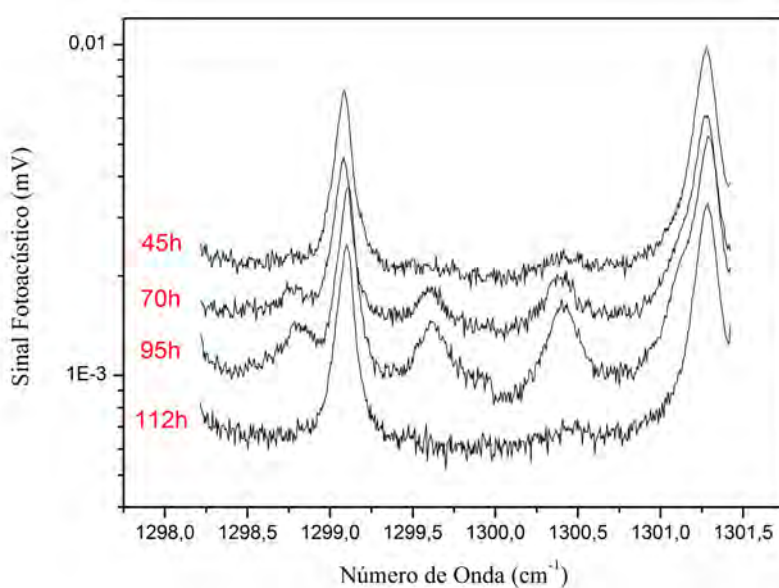


Figura 4.26: Varreduras espectrais em função do tempo para a amostra CB 40%

Por meio da Figura 4.26, podemos ver a evolução temporal do espectro fotoacústico na região de número de onda entre 1298,0 e 1301,5 cm^{-1} da amostra gasosa emitida. Comparando com os espectros da caracterização do sensor fotoacústico (4.11, conclui-se que os dois picos situados em 1299,1 e 1301,3 cm^{-1} correspondem a absorção da água, os demais picos são devido à absorção do óxido nítrico. Ao realizar tal procedimento, podemos ter a certeza que durante as medidas experimentais não teve absorção da radiação por outras espécies químicas.

Na Figura 4.27 podemos ver o acumulativo da emissão de N_2O durante o experimento.

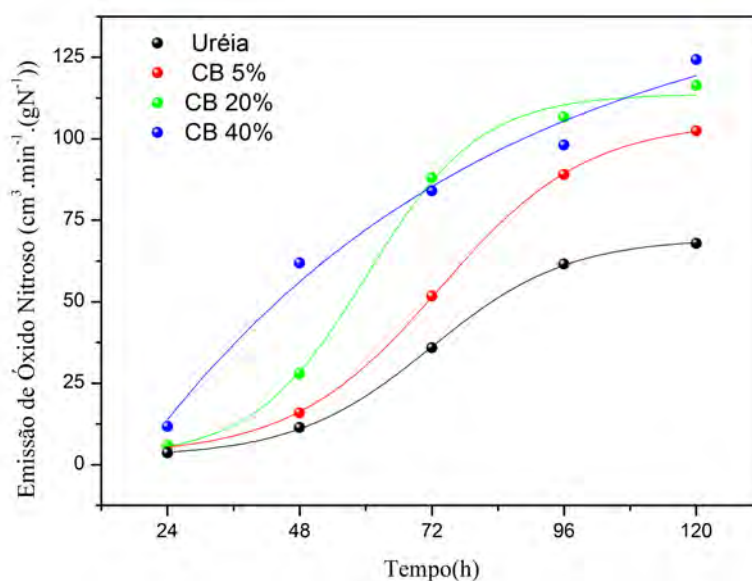


Figura 4.27: Acumulativo das emissões de óxido nítrico para diferentes percentuais de concentrados zeolíticos misturados a ureia.

Podemos notar que ocorre um aumento progressivo na emissão de N_2O quando se aumenta o percentual do concentrado zeolítico (CB) na mistura do fertilizante. Em relação ao total de N_2O emitido, os fertilizantes CB 40%, CB 20% e CB 5% tiveram um aumento de 83%, 71% e 51% em relação à quantidade emitida pela ureia pura, respectivamente. A redução da emissão de NH_3 devido a presença do concentrado zeolítico no fertilizante resulta em um aumento da concentração de NH_4^+ , que junto com a alta umidade do solo, favorece os processos de desnitrificação. Em função da quantidade de água absorvida por cada um dos grãos do fertilizante, observou-se que os grãos se dissociam aumentando a sua área de contato com solo. Então, possivelmente, houve um maior disponibilização de NH_4^+ para as bactérias aumentando o processo de desnitrificação.

A Figura 4.28 mostra taxas de emissão de N_2O , em função do tempo, para os fertilizantes de ureia com zeólitas natural cubana (ZC) nas proporções ZC 5%, ZC 20% e ZC 40%. Os experimentos foram realizados em solos com 25% de umidificação, adicionando 7 mL de água mili-q esterelizada e 3 mL de *Herbaspirillum Seropedicae* em fase líquida.

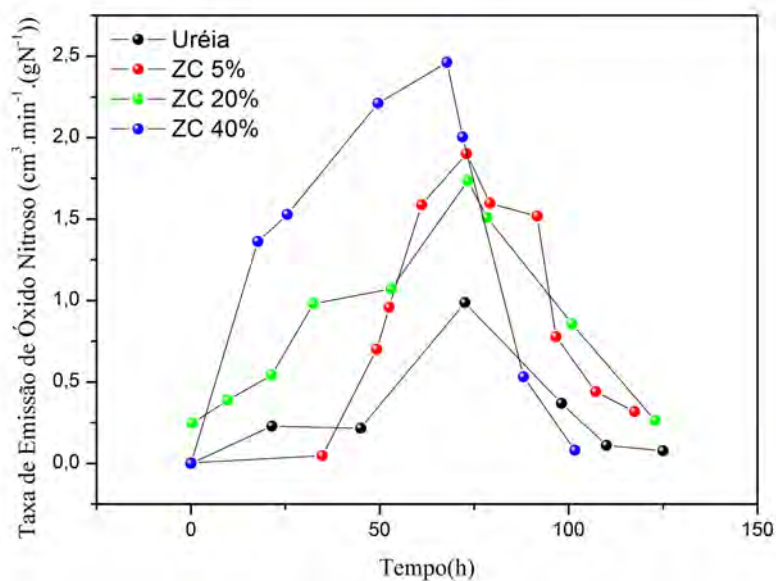


Figura 4.28: *Evolução temporal da taxa de óxido nítrico emitido para zeólitas cubanas misturadas a uréia.*

Analisando a Figura 4.28 podemos perceber que a taxa máxima de emissão para essa matriz de fertilizante ocorreu aproximadamente 75 h após o fertilizante ter sido aplicado sobre o solo, sendo notório, a padronização dessa curva de volatilização em relação ao fertilizante misturado ao concentrado zeolítico brasileiro. Isso se deve a maior pureza da zeólita cubana em relação a concentrado brasileiro, resultando em uma uniformidade maior nos canais e cavidades dos grânulos, e por conseguinte uma maior uniformidade na dessorção.

Na Figura 4.29 podemos visualizar o acumulativo da emissão de N₂O durante o experimento.

Durante o processo de volatilização podemos notar a influência dessas combinações quando analisamos o total que foi emitido no decorrer dos dias. Com o aumento da concentração de ZC na formação do fertilizante tivemos um aumento no N₂O emitido. Para os fertilizante ZC 5%, ZC 20% e ZC 40%, o aumento da emissão em relação a emissão da ureia pura foi de aproximadamente 27%, 69% e 118%.

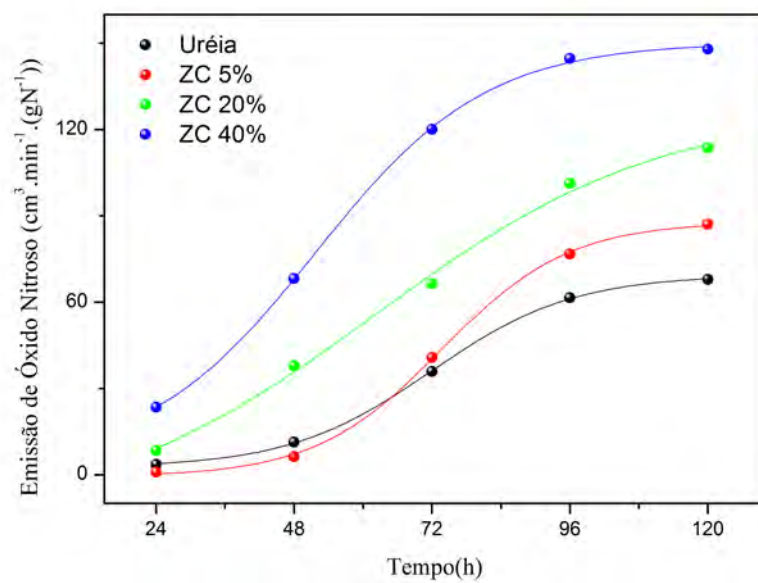


Figura 4.29: Acumulativo das emissões de óxido nítrico em função dos dias para zeólitas cubanas misturadas a ureia.

Capítulo 5

Conclusões

A espectroscopia fotoacústica, utilizando laser de cascata quântica acoplado a uma célula fotoacústica diferencial, mostrou-se ser adequada para medidas de NH^3 e N_2O em sistemas dinâmicos, como aplicações biológicas, ambientais, etc.

Os resultados obtidos de caracterização e calibração do sistema, tais como: limite de detecção, linearidade do sinal fotoacústico com a concentração gasosa e espectro de absorção experimental da molécula de boa resolução, são um indicativo de que a técnica e a montagem experimental possuem uma boa precisão e seletividade para a detecção de amônia e óxido nitroso oriundos do sistema fertilizante mais solo. Isto é um fator extremamente relevante, pois sistemas reais de uma forma geral sempre emitem amostras gasosas multicomponentes.

Os resultados mostraram um decréscimo na taxa de amônia emitido com o aumento do percentual de zeólita misturado à ureia, não apresentando, todavia, uma redução significativa para amostras com teores de 20% e 40% de concentrado zeolítico brasileiro incorporados. Para o granulado cubano (zeólita cubana misturado à ureia), a adição da zeólita cubana diminui o valor da taxa máxima de volatilização de amônia.

Comparando o acumulado de emissão de amônia dos dois fertilizantes, podemos perceber que não houve diferença significativa entre os acúmulos para os teores de 20% e 40% de zeólitas incorporados ao fertilizante. Para o teor de 5%, as zeólitas cubanas tiveram um efetividade maior que as zeólitas nacionais. Essa pouca diferença nos acumulados dos dois processos se deve a proximidade da capacidade de troca catiônica (CTC) das duas zeólitas.

Para todas as proporções utilizadas, as duas zeólitas quando misturadas à ureia emitiram mais óxido nitroso que a ureia pura. Isso é provavelmente devido ao aumento de NH_4^+ incorporado na estrutura zeólita, consequência da redução da amônia volatilizada. As taxas máximas não tiveram muita diferença significativa entre os tratamentos houve um aumento significativo no acumulado da emissão de óxido nitroso com o aumento do percentual de zeólita no fertilizante. Comparando os dois tratamentos, os fertilizantes formados por concentrados zeolíticos brasileiros emitiram mais que os fertilizantes formados

com zeólitas cubanas, exceto para a composição de 40% de zeólita cubana, pois foi a que mais emitiu na avaliação do seu acumulado.

De uma forma geral, não é representativo para as condições testadas utilizar mais que 20% de zeólita misturados a ureia, pois a taxa de liberação já considerando 40% foi muito próxima ao arranjo que continha 20% de zeólita. No acumulado a redução da volatilização dos que continha 40% de mistura de zeólita não produziram uma redução na volatilização de amônia em relação ao 20% que justificasse a sua utilização. E analisando o óxido nitroso, o aumento na incorporação de zeólita acarretou nos dois fertilizantes testados um aumento na perda de N por óxido nitroso.

De modo geral, constatou-se a incorporação do material poroso zeolítico ao fertilizante ureia tem como ponto positiva a redução da perda de nitrogênio mineral por volatilização de amônia. Porém, o aumento da produção de N_2O devido à presença zeólita é indesejável devido ao fato de se tratar de um gás estufa, mas considerando somente o N as zeólitas reduzem bastante as perdas devido ao fato de a concentração de amônia reduzida ser consideravelmente maior que a concentração de óxido nitroso emitido.

5.1 Perspectivas futuras

- Elaborar condições para que se analise os efeitos da volatilização de amônia e óxido nitroso para diferentes temperaturas;
- Analisar o efeito da *Herbaspirillum Seropedicae* na volatilização da amônia e do óxido nitroso alterando a quantidade de bactérias adicionadas ao solo;
- Pesquisar e propor arranjos experimental para investigar a possibilidade de a nitrificação e a desnitrificação acontecerem dentro das zeólitas, como uma condição de os canais possibilitarem a formação de sítios anaeróbico;
- Analisar o efeito da volatilização para solos com diferentes pH sob condições controladas.

Referências Bibliográficas

- Alves, G. V. L., dos Santos, W. C., Waldman, W. R., de Oliveira, J. G., Vargas, H., and da Silva, M. G. (2010). A photoacoustic technique applied to detection of ethylene emissions in edible coated passion fruit. *Journal of Physics, Conference Series*, 214:012020.
- Ando, T., Fowler, A. B., and Stern, F. (1982). Electronic properties of two-dimensional systems. *Rev. Mod. Phys.*, 54(2):437a672.
- Baldani, J. I., Baldani, V. L. D., Seldin, L., and Dobereiner, J. (1986). Characterization of herbaspirillum seropedicae gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 36:86–93.
- Baldani, V. L. D., Baldani, J. I., Olivares, F. L., and Dobereiner, J. (1992). Identification and ecology of herbaspirillum seropedicae and closely related pseudomonas rubrisubalbicans. *Symbiosis*, 13:65–73.
- Ball, P. (1997). *Made to Measure: new materials for the 21st century*.
- Balsanelli, E., Serrato, R. V., Baura, V. A. D., Sasaki, G., Yates, M. G., Rigo, L. U., Pedrosa, F. O., Souza, E. M. D., and Monteiro, R. A. (2010). Herbaspirillum seropedicae rfbB and rfbC genes are required for maize colonization. *Environ. Microbiol.*, 12:2233–2244.
- Baptista-Filho, M. (2005). *Aplicação da Espectroscopia Fotoacustica Utilizando o Laser de Cascata Quântica ao Estudo da incorporação de traços de Amônia em Zeolitas Natural*. PhD thesis, UENF.
- Baptista-Filho, M., da Silva, M. G., Stel, M. S., Schramm, D. U., Vargas, H., Miklos, A., and Hess, P. (2006). Ammonia detection using quantum-cascade laser photoacoustic spectroscopy. *Applied Optics*, 45:4966–4971.
- Baptista-Filho, M., Riter, H. G., da Silva, M. G., Luna, F. J., Werneck, C. G., Rech, I., Polidoro, J. C., Monte, M. B. M., Souza-Barros, F., Miklos, A., and Vargas, H. (2011). Ammonia traces detection based on photoacoustic spectroscopy for evaluating ammonia volatilization from natural zeolites at typical crop field temperature. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 158:241–245.

- Bernardi, A. C., de Souza, G. B., Polidoro, J. C., Paiva, P. R. P., and Monte, M. B. M. (2011). Yield, quality components, and nitrogen levels of silage corn fertilized with urea and zeolite. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 42(11):1266–1275.
- Besson, J.-P. (2006). *Photoacoustic Spectroscopy for multi-gas sensing using near infrared Laser*. PhD thesis, Ecole Polytechnique Federale de Lausanne.
- Breck., D. (1974). *Zeolite Molecular Sieves*. John Wiley & Sons.
- Canfield, D. E., Glazer, A. N., and Falkowski, P. G. (2010). The evolution and future of earths nitrogen cycle. *Science*, 330(6001):192–196.
- Capasso, F., Gmachl, C., Paiella, R., Tredicucci, A., Hutchinson, A., Sivco, D., Baillargeon, J., Cho, A., and Liu, H. (2000). New frontiers in quantum cascade lasers and applications. *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, 6(6):931–947.
- Claspy, P. C. (1977). *Optoacoustic Spectroscopy and Detection*, chapter Infrared Optoacoustic Spectroscopy and Detection, pages 134–166. Elsevier.
- Corma, A. (1992). *Zeolite Microporous Solids: Synthesis Structure and Reactivity*. Holanda.
- Cruz, L. M., Souza, E. M., Weber, O. B., Baldani, J. I., Dobereiner, J., and Pedrosa, F. (2001). 16s ribosomal dna characterization of nitrogen-fixing bacteria isolated from banana (*musa spp.*) and pineapple (*ananas comosus (l.) merril*). *Applied and Environmental Microbiology*, 67:2375–2379.
- Csicsery, S. (1986). Catalysis by shape selective zeolites. *science and technology Pure Appl. Chem.*, 58(841).
- da Silva, M. G., H. Vargas, A. M., and Hess, P. (2004). Photoacoustic detection of ozone using a quantum cascade laser. *Applied Physics B: Lasers and Optics*, 78:677–680.
- da Silva; J.C. Polidoro; F.J. Luna; M.B.M. Monte; F. Souza-Barros; A. Miklos; H. VARGAS, M. B.-F. M. (2008). Detection of ammonia released from zeolite by the quantum cascade laser based photoacoustic set-up. *European Physical Journal - Special Topics*, 153:547–550.
- Daniel Hofstetter, J. F. (2003). *Solid-State Mid-Infrared Laser Sources*, chapter High Performance Quantum Cascade Lasers and Their Applications, pages 61–98. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- das Graças de Andrade da Mata Resende, N., de Mello Monte, M. B., and de Paiva, P. R. P. (2008). *Rochas e Minerais Industriais*, chapter Zeolitas Naturais. CETEM.
- David J. Richardson, R. J. v. S. and Ferguson, S. J. (2007). *Biology of the Nitrogen Cycle*, chapter The Prokaryotic Nitrate Reductases, pages 21–36. Elsevier.

- De Baerdemaeker, T. and De Vos, D. (2013). Gas separation: Trapdoors in zeolites. *Nature Chemistry*, 5(2):89–90.
- de Campos Bernardi, A. C., Anchoa Oliviera, P. P., de Melo Monte, M. B., and Souza-Barros, F. (2013). Brazilian sedimentary zeolite use in agriculture. *Microporous and Mesoporous Materials*, 167:16–21.
- de Tarso Figueiredo Grecco e Maria do Carmo Rangel, S. (2013). Zeolitas hierarquicamente estruturadas. *Quimica Nova*, (131-142).
- de Tecnologia de Saneamento Ambiental CETESB, C. (2006). Emissões de metano no tratamento e na disposição de resos. in: Primeiro inventário brasileiro de emissões antropicas de gases de efeito estufa. disponível em: <<http://www.mct.gov.br/index.php/content/view/21465.html>>. Technical report, Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT).
- de Vries, W., Kros, J., Kroeze, C., and Seitzinger, S. P. (2013). Assessing planetary and regional nitrogen boundaries related to food security and adverse environmental impacts. *Current Opinion in Environmental Sustainability*, 5(3-4):392–402.
- Deutsch, C., Sarmiento, J. L., Sigman, D. M., Gruber, N., and Dunne, J. P. (2007). Spatial coupling of nitrogen inputs and losses in the ocean. *Nature*, 445(7124):163–167.
- Dobbelaere, S., Vanderleyden, J., and Okon, Y. (2003). Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 22(2):107–149.
- Dobereiner, J. (1989). Avanços recentes na pesquisa em fixação biológica de nitrogênio no Brasil. *Estudos Avançados*, 4:144–152.
- Dore, J. E., Popp, B. N., Karl, D. M., and Sansone, F. J. (1998). A large source of atmospheric nitrous oxide from subtropical north Pacific surface waters. *Nature*, 396(6706):63a66.
- Espécie Bueno, S. C., Filho, M. B., de Almeida, P. S. G., Polidoro, J. C., Olivares, F. L., Sthel, M. S., Vargas, H., Mota, L., and da Silva, M. G. (2015). Cuban zeolite as ammonium carrier in urea-based fertilizer pellets: Photoacoustic-based sensor for monitoring n-ammonia losses by volatilization in aqueous solutions. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 212:35–40.
- Faist, J., Capasso, F., Sivco, D. L., Sirtori, C., Hutchinson, A. L., and Cho, A. Y. (1994). Quantum cascade laser. *Science*, 264(5158):553–556.
- Filho, M. B., da Silva, M. G., Sthel, M. S., Schramm, D. U., Vargas, H., Miklos, A., and Hess, P. (2006). Ammonia detection by using quantum-cascade laser photoacoustic spectroscopy. *Applied Optics*, 45:4966–4971.

- Forsthofer, E. L., Silva, A. C., C., P. R. F., Strieder, M. L., Minetto, T., Rambo, L., Argenta, G., Sangoi, L., Suhre, E., and Silva (2006). Desempenho agrônômico e econômico do milho em diferentes níveis de manejo e épocas de semeadura. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 41(3).
- Fujikata, Y., Massuda, T., Ikeda, H., and Hashimoto, K. (1998). Measurement of the diffusivities within mfi- and y- type zeolite catalysts in adsorption and desorption processes. *Microporous and Mesoporous Materials*, 21:679–686.
- Galloway, J. N., Dentener, F. J., Capone, D. G., Boyer, E. W., Howarth, R. W., Seitzinger, S. P., Asner, G. P., Cleveland, C. C., Green, P. A., Holland, E. A., and et al. (2004). Nitrogen cycles : Past, present, and future. *Biogeochemistry*, 70(2):153a226.
- Galloway, J. N., Townsend, A. R., Erisman, J. W., Bekunda, M., Cai, Z., Freney, J. R., Martinelli, L. A., Seitzinger, S. P., and Sutton, M. A. (2008). Transformation of the nitrogen cycle: Recent trends, questions and potential solutions. *Science*, 320(5878):889a892.
- Gehlen, M., Gruber, N., Gangsto, R., Bopp, L., and Oschlies, A. (2012). *Ocean Acidification*, chapter Biogeochemical consequences of ocean acidification and feedbacks to the earth system, pages 230–248. Press Oxford.
- Giannetto, G. (1990). *Zeolitas: Características, propiedades y aplicaciones industriales*. Caracas, 1 edition.
- Gmachl, C., Capasso, F., Sivco, D. L., and Cho, A. (2001). Recent progress in quantum cascade lasers and applications. *Reports on Progress in Physics*, 64:1533–1601.
- Gmachl, C., Straub, A., Colombelli, R., Capasso, F., Sivco, D., Sergent, A., and Cho, A. (2002). Single-mode, tunable distributed-feedback and multiple-wavelength quantum cascade lasers. *IEEE J. Quantum Electron.*, 38(6):569–581.
- Gorjiara, S. A. Z. K. M. (2008). Ammonia removal from aqueous solutions by Iranian natural zeolite. *Separation Science and Technology*, 43:960–978.
- Gruber, N. (2011). Warming up, turning sour, losing breath : ocean biogeochemistry under global change. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 369(1943):1980–1996.
- Gruber, N. and Galloway, J. N. (2008). An earth system perspective of the global nitrogen cycle. *Nature*, 451(7176):293a296.
- Guisnet, M.;Ribeiro, F. R. (2004). *Zeolitos: um nanomundo a serviço da catalise*. Lisboa.
- Gyaneshwar, P., James, E. K., Reddy, P. M., and Ladha, J. K. (2002). Herbaspirillum colonization increases growth and nitrogen accumulation in aluminium-tolerant rice varieties. *New Phytologist*, 154(1):131–145.

- Hess, P. (1983). Resonant photoacoustic spectroscopy. *Topics in Current Chemistry*, pages 1–32.
- Houghton, J., Ding, Y., Griggs, D., Noguer, M., van der Linden, P., Dai, X., Maskell, K., and Johnson, C. (2001). Ipcc 2001: Climate change 2001. *The Climate change Contribution of Working Group I to the Third Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*, pages 156–159.
- Jr., F. D. (1977). *Optoacoustic Spectroscopy and Detection*, chapter Design of Optoacoustic Systems, pages 47–77. Elsevier.
- Kosterev, A. and Titel, A. A. (2002). Chemical sensors based on quantum cascade lasers. *IEEE Journal of Quantum Electronics*, 38:582–591.
- Kreuzer, L. B. (1977). *Optoacoustic Spectroscopy and Detection*, chapter The Physics of Signal Generation and Detection, pages 1–25. Elsevier.
- Lima, G. R. (2014). *Montagem de um Oscilador Parametrico Optico e Detecção de Amônia Utilizando um Sensor Fotoacustico Compacto*. PhD thesis, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro-UENF.
- Lima, J. A. P., Mar E., da Silva, M. G., Sthel, M. S., Vargas, H., Rezende, C., and Miranda, L. C. M. (2000). On the use of the thermal wave resonator cavity sensor for monitoring hydrocarbon vapors. *Review of Scientific Instruments*, 71:2928–2932.
- Luz, A. (1995). *Zeolitas: propriedades e usos industriais*. CETEM/CNPq, Rio de Janeiro.
- Macedo, J. L. (2007). *Preparação e caracterização de materiais com base zeolitica para aplicação em catalise*. PhD thesis, UNB.
- Martins, L. and Cardoso, D. (2006). Aplicação catalitica de peneiras moleculares basicas micro e mesoporosas. *Quimica Nova*, (358-364).
- Martins, M. R., Jantalia, C. P., Polidoro, J. C., Batista, J. N., Alves, B. J., Boddey, R. M., and Urquiaga, S. (2015). Nitrous oxide and ammonia emissions from n fertilization of maize crop under no-till in a cerrado soil. *Soil & Tillage Research*.
- Mascarenhas, A.J.; Oliveira, E. H. (2001). Peneiras moleculares: Selecionando as moleculas por seu tamanho. *Quimica Nova*.
- Mendes, R., Pizzirani-Kleiner, A. A., Araujo, W. L., and Raaijmakers, J. M. (2007). Diversity of cultivated endophytic bacteria from sugarcane: Genetic and biochemical characterization of burkholderia cepacia complex isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(22):7259–7267.

- Miklos, A., Hess, P., and Bozoki, Z. (2001). Application of acoustic resonators in photoacoustic trace gas analysis and metrology. *Review of Scientific Instruments*, 72:1937–1955.
- Miklos, A., Schafer, S., and Hess, P. (1999). Photoacoustic spectroscopy, theory. *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*, pages 1815–1822.
- Miller, J.F.; Mekalanos, J. F. S. (1989). Coordinate regulation and sensory transduction in the control of bacterial virulence. *Science*, 243:916–922.
- Moenne-Loccoz, P. and Fee, J. A. (2010). Catalyzing no to n₂o in the nitrogen cycle. *Science*, 330(6011):1632–1633.
- Monteiro, R. A., Balsanelli, E., Wassem, R., Marin, A. M., Brusamarello-Santos, L. C. C., Schmidt, M. A., Tadra-Sfeir, M. Z., Pankievicz, V. C. S., Cruz, L. M., Chubatsu, L. S., and et al. (2012). Herbaspirillum-plant interactions – microscopical, histological and molecular aspects. *Plant and Soil*, 356(1-2):175–196.
- Monteiro, R. A., Schmidt, M. A., Baura, V. A., Balsanelli, E., Wassem, R., Yates, M. G., Randi, M. A. F., Pedrosa, F. O., and Souza, E. M. (2008). Early colonization pattern of maize (*zea mays* l. poales, poaceae) roots by herbaspirillum seropedicae (burkholderiales, oxalobacteraceae). *Genet. Mol. Biol.*, 31:932–937.
- Morse, P. M. and Ingard, K. U. (1968). *Theoretical acoustics*. Princeton university.
- Mosier, A., Kroeze, C., Nevison, C., Oenema, O., Seitzinger, S., and van Cleemput, O. (1998). Closing the global n₂o budget : nitrous oxide emissions through the agricultural nitrogen cycle. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 52(2/3):225–248.
- Mosier, A. and Kroezer, C. (1998a). A new approach to estimate emissions of nitrous oxide from agriculture and its implications for the global change n₂o budget. *IGBP Global Change Newsletter*, 34:8–13.
- Mosier, A. and Kroezer, C. (1998b). A new approach to estimate emissions of nitrous oxide from agriculture and its implications for the global change n₂o budget. *IGBP Global Change Newsletter*, 34:8–13.
- Patel, D. A. P. (1996). *Photothermal Science and Techniques*. Chapman & Hall, London, 1st, edition.
- Pedrosa, F. O., Monteiro, R. A., Wassem, R., and Cruz, L. M. (2011). Genome of herbaspirillum seropedicae strain smr1, a specialized diazotrophic endophyte of tropical grasses. *PLoS Genetics*, page 7: e1002064.
- Rehakova, M., Cuvanova, S., Dzivak, M., Rimar, J., and Gavalova, Z. (2004). Agricultural and agrochemical uses of natural zeolite of the clinoptilolite type. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, 8(6):397–404.

- Rocha, A. M., Sthel, M. S., de Castro, M. P. P., Mothe, G. A., Silva, W. C., Perez, V. H., da Silva, M. G., Mikloos, A., and Vargas, H. (2014). Evaluation of nitrous oxide emitted from diesel/biodiesel blends during combustion in a diesel engine at laboratory scale by a photoacoustic spectroscopy technique. *Energy & Fuels*.
- Santi, C.; Bogusz, D. F. C. (2013). Biological nitrogen fixation in non-legume plants. *Ann Bot.*, 111:743–767.
- Schuchardt, F. L. U. (2001). Modificação de zeolitas para uso em catalise. *Quim. Nova*, 24:885–892.
- Sigrist, M. (1994). *Chemical Analysis - Air monitoring by spectroscopic techniques*. Wiley-Interscience Publication.
- Sigrist, M., Bartlome, R., Rey, D. M. J., Vogler, D., and Wachter, H. (2008). Trace gas monitoring with infrared laser-based detection schemes. *Appl. Phys. B*, 90:289–300.
- Strous, M., Pelletier, E., Mangenot, S., Rattei, T., Lehner, A., Taylor, M. W., Horn, M., Daims, H., Bartol-Mavel, D., Wincker, P., and et al. (2006). Deciphering the evolution and metabolism of an anammox bacterium from a community genome. *Nature*, 440(7085):790a794.
- S.W. Rienstra, A. H. (2015). *An Introduction to Acoustics*. Eindhoven University of Technology.
- Tittel, F. K., Richter, D., and Fried, A. (2003). "Mid-Infrared Laser Applications in Spectroscopy" in *Solid-State Mid-Infrared Laser Sources*, volume 89. Springer Berlin Heidelberg. pp. 445-516.
- van Breemen, N. (2002). Natural organic tendency. *Nature*, 415(6870):381–382.
- Werneck, C. G., Breda, F. A., Zonta, E., Lima, E., Polidoro, J. C., Balieiro, F. C., and Bernardi, A. C. C. (2012). Volatilizacao de amonia proveniente de ureia com zeolita natural. *Pesq. agropec. bras*.