

**CARACTERIZAÇÃO DIRETA DA MATÉRIA ORGÂNICA EM SOLOS E SEDIMENTOS
POR MICROSCOPIA CONFOCAL E IMAGEM DE TEMPO DE VIDA**

A. Tadini¹, C.P. Morais¹, A. C. C. Bernardi², M. Falvo⁴, O. M. Bruno⁴, S. Mounier³, L. Martin
Neto¹, D.M.B.P. Milori¹, F.E.G. Guimarães^{4,*}

¹ Embrapa Instrumentação, São Carlos, SP, Brazil

² Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP, Brazil

³ Université de Toulon, Laboratoire PROTEE, CS 60584, 83041 Toulon CEDEX 9, França

⁴ Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, CEP13566-590, São Carlos, SP

* Autor correspondente, e-mail: guimarães@ifsc.usp.br

Resumo: A presente contribuição pretende mostrar que Microscopia Confocal (MC) por varredura pode ser usada como técnica de fluorescência não destrutiva capaz de caracterizar a matéria orgânica (MO) diretamente em solos e em sedimentos sem a preparação prévia das amostras e o uso de extração ou fracionamento químico de seus componentes. Imagens espectrais e de tempo de vida de solos e sedimentos em meio aquoso (pH~7) revelam que a MO se encontra na forma de agregado molecular interagindo com a fração mineral, o que garante alto contraste espectral e de tempo de vida dos particulados minerais. Além disso, o uso de excitação por dois fótons no infravermelho se mostrou adequado para a excitação seletiva desses estados moleculares agregados. Os resultados sugerem que a migração seguida de relaxação energética do estado excitado ao longo da densidade de estados agregados são responsáveis pelos deslocamentos espectrais e mudanças do tempo de vida da fluorescência que dependem da concentração da MO dadas pela porcentagem de carbono total (%C) nos solos. Estas características da microscopia confocal, juntamente com processos fotofísicos produzidos na MO permitem, de forma simples e direta, o entendimento da estrutura morfológica molecular original desse material e de sua estabilidade na natureza.

Palavras-chave: microscopia confocal, matéria orgânica, solo, sedimentos, agregados moleculares.

***DIRECT CHARACTERIZATION OF ORGANIC MATTER IN SOILS AND SEDIMENTS BY
CONFOCAL MICROSCOPY AND LIFE-TIME IMAGE***

Abstract: The present contribution intends to demonstrate that Scanning Confocal Microscopy (MC) can be used as a non-destructive fluorescence technique capable of characterizing organic matter (OM) directly in pristine soils and sediments without prior sample preparation, as well as chemical extraction or fractionation of its constituent elements. Spectral and life time images of soils and sediments in aqueous medium (pH ~ 7) reveal that the OM is found in the form of molecular aggregates interacting with the surface of the mineral fraction which ensures high spectral and lifetime contrast of the mineral particulates. In addition, the use of infrared two-photon excitation proved to be adequate for selective excitation of these aggregate molecular states. The results suggest that the migration and energetic relaxation of the excited state along the aggregate state density are responsible for spectral shifts and fluorescence lifetime changes that depend on the MO concentration given by the percentage of total carbon (% C) in soils. These characteristics of confocal microscopy together with photophysical processes produced in OM allow, in a simple and direct way, the understanding of the original molecular morphological structure of this material and its stability in nature.

Keywords: confocal microscopy, organic matter, soil, sediment, molecular aggregates.

1. Introdução

A matéria orgânica compõe menos de 5% dos solos e sedimentos e se encontra frequentemente ligada à fração mineral particulada, formando um microssistema organo-mineral

que certamente contribui para a sua estabilidade no ambiente natural. Porém, a maioria das técnicas utilizadas para estudar e quantificar a matéria orgânica exige necessariamente a separação da fase orgânica da fase mineral através de métodos químicos ou físicos de extração e, posteriormente, de fracionamento, que destroem e/ou degradam a estrutura morfológica original agregada da MO. Embora esses procedimentos tenham sido importantes para responder questões fundamentais sobre a natureza da MO, ainda existe muita discussão sobre a aplicabilidade dos mesmos [KLEBER, M. et al., 2015 e 2019]. Além disso, ainda persistem muita discussão e questionamentos sobre a natureza da matéria orgânica e pouco se sabe a respeito de sua estrutura no agregado e das interações moleculares dentro desse complexo organo-mineral encontrado na natureza. Obviamente, a presença de contaminantes inorgânicos e de metais obscurece os detalhes mais finos desse quebra-cabeça que forma a MO e que são necessários para o entendimento mais completo de suas propriedades. [GRANT, D. 1977]

Uma propriedade importante da MO é capacidade de emissão eficiente de luz fluorescente oriunda da fração aromática ligada a uma estrutura supramolecular mais complexa [DROSOS, M. et al. 2018] chamada de substância húmica (SH). Assim, muitas técnicas óticas fluorescentes têm sido utilizadas para caracterizar principalmente a SH extraída em solução ou aquela encontrada diretamente de amostra de solo [TADINI, A. M. et al. 2017] usando luz de excitação de comprimento de onda adequado. Porém, essa estrutura supramolecular tem a tendência de se condensar na forma de agregado molecular estabilizado por interações intermoleculares fracas [DROSOS, M. et al. 2018]. Esse estado agregado da SH forma a fase orgânica depositada sobre a fase mineral particulada de solos e sedimentos e pode ser encontrada mesmo em solução alcalina dependendo da concentração da SH. No entanto, essa fase agregada da SH gera um contínuo de estados moleculares de baixa energia na região do visível o que confere a coloração indefinida escura (marron-preta) da MO dependendo da concentração.

Estados moleculares de agregados da SH que emitem fluorescência podem ser utilizados para caracterizar a MO no que diz respeito à estrutura morfológica sobre a fase inorgânica e às interações envolvidas na formação desse agregado. Estas propriedades determinam a estabilidade, bem como a sua compactação e os limites para empilhamento molecular da SH na superfície ativa da matéria inorgânica. A grande variabilidade da porcentagem de carbono total em solos se deve a essa capacidade de retenção da MO sobre a fase inorgânica.

Neste trabalho vamos demonstrar que microscopia confocal e as técnicas associadas de imagem multiespectrais e de tempo de vida podem ser usadas como ferramentas óticas não destrutivas poderosas para estudar, de forma simples e direta, os processos emissivos da MO em amostras de solos e sedimentos nas suas condições originais. Aqui, a excitação por 2 fótons (2P) no infravermelho se mostrou apropriada para excitar seletivamente estados agregados da SH na região do visível entre 400 e 700 nm e ter acesso direto dos aspectos fundamentais do estado agregado. O uso dessa técnica microscópica poderá se somar ao esforço para o entendimento maior da estrutura macromolecular da SH na natureza, bem como o seu feito na estabilização e na fixação em diferentes ecossistemas.

2. Materiais e Métodos

2.1. Materiais

Neste trabalho foram analisados solos do sistema Integrado Lavoura-Pecuária-Floresta (ILPF) e de Florestas próximas ao sistema ILPF localizados na região de São Carlos, SP. Sedimentos foram obtidos na área de estudo da bacia do Rio Tietê e do seu afluente Rio Piracicaba. Solos da margem concomitante aos sítios de coleta de sedimentos foram coletados e usados como referência. 20 mg de mostras de solo foram medidas em ambiente aquoso colocadas entre lamínulas para uso em microscopia confocal conforme Figura 1. A amostragem do solo ILPF e de floresta foi efetuada a partir fatias representativas obtidas em trincheiras de profundidade de 1 m a partir da superfície. Os solos de referência nas margens dos Rios Tietê e Piracicaba foram coletados na superfície na profundidade de 10 cm. Já as amostras de sedimentos nesses rios foram tomadas com

um tubo extrator que retirou em entre 40 e 70 cm de profundidade de sedimento.



Figura 1: Pequenas amostras de solo para microscopia confocal foram preparadas em ambiente aquoso (pH~7).

2.2. Microscopia Confocal

Um microscópio confocal de varredura por fluorescência da marca Zeiss, modelo LSM 780 invertido foi utilizado com excitação por um fóton (1P) através de um laser de diodo em 405 nm e por dois fótons (2P) por meio de laser externo Coherent, modelo Cameleon em 800 nm, com largura de pulso de 100 fs e repetição de 80 MHz. A lente objetiva utilizada foi de 20x e 0,8NA. As imagens espectrais foram medidas através de arranjo de detectores GaAsP refrigerados de alta sensibilidade entre 400-700 nm. Imagens no modo canal foram obtidas em cor falsa e dão informação de características do recobrimento das partículas inorgânicas por SH e de textura. Nesse modo canal, outro detector NDD - Non-Scanned Detector foi utilizado para fazer imagem no modo de transmissão através da luz de excitação 1P e 2P. Dois detectores (canais CH1 e CH2) de avalanche foram usados para imagem e espectroscopia de tempo de vida da fluorescência (Fluorescence-lifetime imaging microscopy - FLIM) com resolução temporal de 75 ps e excitação 2P em 800 nm. A faixa espectral detectada pelo canal CH1 foi a região da clorofila de 645-700 nm e pelo canal CH2 foi de 500-550 nm, região espectral associada ao máximo de intensidade de emissão da matéria orgânica em solução (pH 9) na concentração de 1 ppm, usada como referência.

2.3. Análise das imagens

Imagens obtidas no modo espectral foram feitas em uma área de 225x225 μm^2 contendo 1024x1024 pixels, fornecendo varredura com sobreposição de 35% entre pixels sucessivos de resolução lateral de aproximadamente de 250 nm. Cada pixel de imagem possui um espectro de fluorescência associado e que gera um arquivo multiespectral. Os 1024x1024 espectros foram analisados através de programa de extração e de classificação espectral descrito por [Falvo, M., 2015], que fornece a assinatura espectral da amostra, as classes espectrais mais representativas e a imagem classificada através de cores falsas.

3. Resultados e Discussão

A Figura 2 exemplifica (a) imagem típica de microscopia confocal de solo ILPF no modo espectral e (b) imagem correspondente obtida pelo método de classificação em 7 classes espectrais mostradas em (c). As imagens foram feitas em água (pH~7) e possuem alto contraste, o que demonstra, dentro do limite de detecção nas condições do experimento, que a fração fluorescente da matéria orgânica se encontra depositada na superfície da fração inorgânica. A banda larga acima de 550 nm está associada a emissões envolvendo estados agregados da SH e sua posição espectral depende do grau de recobrimento ou concentração de moléculas de SH depositadas na superfície do mineral. Aqui, a banda deslocada para o azul (coloração azul) está associada à MO menos agregada ou a menor concentração de SH. Já o deslocamento para o vermelho pode ser associado a estados emissivos ocorrendo em um sistema molecular mais agregado (coloração vermelha). A mesma figura, embaixo, mostra imagem no modo canal (a') da mesma amostra em cor falsa vermelha, a imagem correspondente de luz transmitida (b') do laser de excitação por 2P em 800 nm e a superposição das duas imagens (c'). Pode-se ver que a fração mineral é transparente à luz de excitação e que a SH não interage com algumas as partículas minerais arenosas.

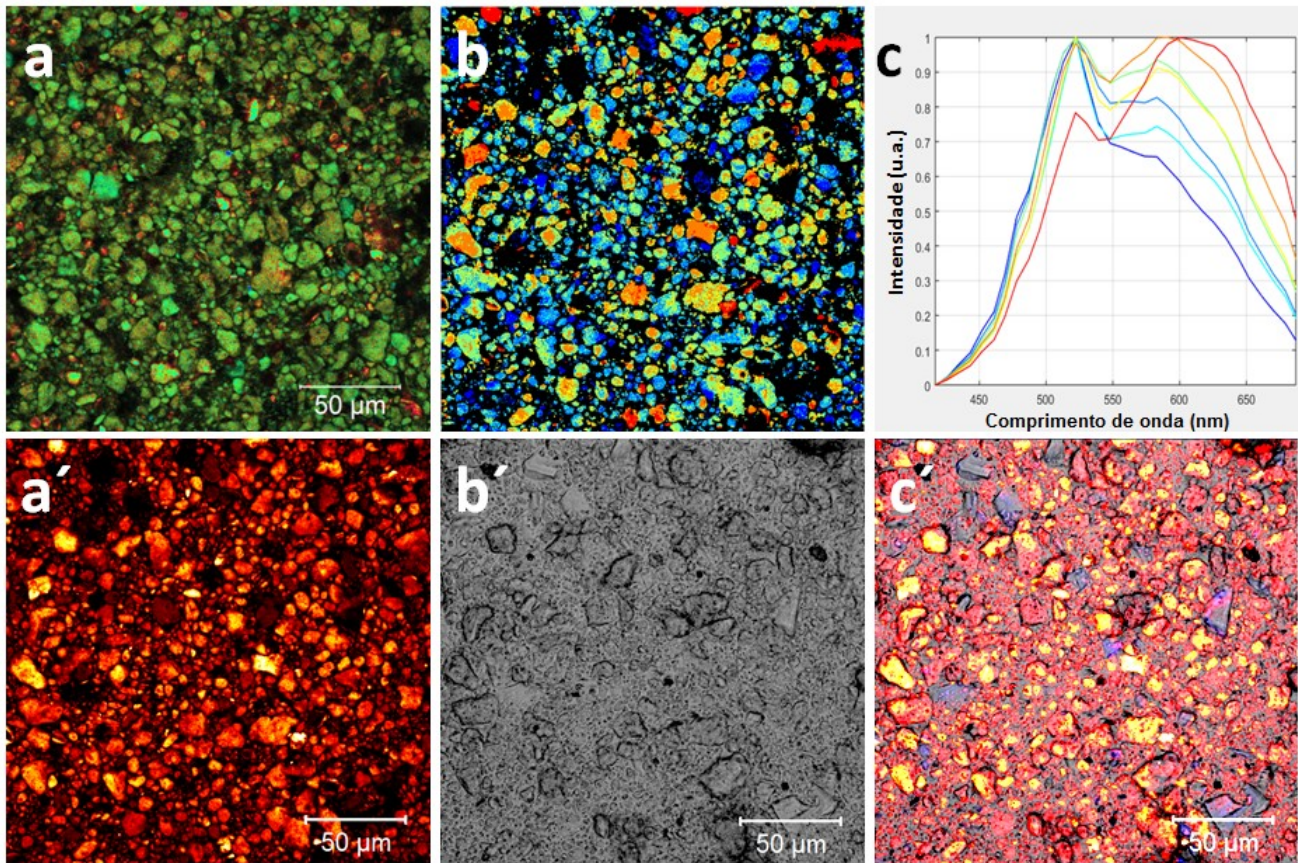


Figura 2. Em cima, a) imagem no modo espectral de amostra de solo ILPF e b) a correspondente imagem classificada em 7 classes espectrais mostradas no gráfico c). Embaixo, imagens a') no modo canal em cor falsa da mesma amostra de solo ILPF e b') a correspondente imagem de luz transmitida de campo amplo. A imagem c') corresponde à superposição das imagens a') e b'). A excitação 2P utilizada foi a de um laser em 800 nm.

A Figura 3.a apresenta imagem típica de tempo de vida (FLIM) para a amostra de solo ILPF (Figura 3) extraída na profundidade entre 20-30 cm. A escala contínua de cores foi associada aos tempos de vida médios representativos entre 0,6 e 3,3 ns, calculados para cada pixel. O contraste de tempo de vida dá informação dos processos fotofísicos envolvidos no arranjo molecular excitado dentro da resolução óptica fornecida pelo volume confocal menor que femtolitros. Os decaimentos da fluorescência para amostras de solo extraídas em diferentes profundidades são mostrados na Figura 3.b. Os decaimentos para cada pixel foram ajustados pela superposição de duas exponenciais: uma de tempo de vida curto τ_c que variam de 0,2 e 0,5 ns e outra com tempo de vida longo τ_l da ordem de 2,5 a 3,1 ns. Essa variação está relacionada com a concentração ou compactação molecular sobre a superfície do particulado inorgânico e está correlacionado com valores de carbono total C% da amostra analisada. O processo de decaimento rápido dado por τ_c está associado diretamente à migração do estado excitado entre moléculas do agregado molecular e à desativação deste estado excitado dentro do intervalo do tempo de vida por processos não radiativos envolvendo, por exemplo, defeitos aceitadores de carga como grupamentos carbonila. As interações moleculares e a migração do estado excitado via transferência de energia são maiores em agregados moleculares mais densos em amostras de solo próximas à superfície e são menores em agregados menos densos para amostra com menor valor de C%. O tempo de vida longo τ_l está associado ao processo emissivo final que sobrevive à desativação por defeitos durante os processos rápidos de migração entre moléculas e de relaxação energética dentro dos estados de agregados moleculares.

Figura 3. a) Imagem de tempo de vida (FLIM) de amostras de solo ILPF obtida para a profundidade de entre 20-30 cm. A imagem usa escala de cores contínua associada ao tempo de vida médio calculado para cada pixel. b) Decaimentos médios da fluorescência correspondentes obtidos por integração dos decaimentos em cada pixel correspondentes a imagens para amostras de solo obtidas em diferentes profundidades.

4. Conclusões

O presente trabalho pretende mostrar que microscopia confocal pode fornecer informações valiosas da estrutura molecular original que forma a matéria orgânica de solos e sedimentos. O arranjo molecular em forma de agregado está correlacionado com o carbono total nesses materiais, uma vez que a densidade de moléculas nos agregados moleculares sobre a superfície da fração inorgânica depende da concentração da substância orgânica nos solos ou sedimentos.

Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio da Embrapa Instrumentação e da FAPESP (Fundação de Pesquisa de São Paulo) aos projetos 2013 / 07276-1 (CEPOF - Programa CEPID) e 2009 / 54035-4 (UEM).

Referências

- FALVO, M. Método de mapeamento espaço-espectral em imagens multi-espectrais e sua aplicação em tecidos vegetais. Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, 2015.
- GRANT, D. Chemical structure of humic substances. *Nature*, v. 270, p. 709-710, 22 Dec 1977.
- LEHMANN, J., KLEBER, M. The contentious nature of soil organic matter. *Nature*, v. 528, p. 60–68, Dec 2015.
- LEHMANN, J., KLEBER, M. Humic Substances Extracted by Alkali Are Invalid Proxies for the Dynamics and Functions of Organic Matter in Terrestrial and Aquatic Ecosystems. *Journal of Environmental Quality*, p. 207-216, March 2019,
- MARIOS DROSOS, M. et al. A molecular zoom into soil Humeome by a direct sequential chemical fractionation of soil. *Science of the Total Environment*, v. 586, p. 807–816, Mar 2016.
- TADINI, A. M. et al. Characterization of Organic Matter in Spodosol Amazonian by Fluorescence Spectroscopy. *International Journal of Geological and Environmental Engineering*, v.11, p.409-412, 2017