



## FLUORESCÊNCIA 3D DE SÓLIDOS: EFEITO DA CONCENTRAÇÃO E REABSORÇÃO

S. Mounier<sup>1</sup>, R. Redon<sup>1</sup>, G. Nicolodelli<sup>2</sup>, M. Gobato<sup>2</sup>, D.M.B.P. Milori<sup>2</sup>

(1) Laboratoire PROTEE, Université de Toulon, BP 20132, 83957, La garde, France, mounier@univ-tln.fr, roland.redon@gmail.com

(2) Embrapa Instrumentation, Rua XV de Novembro, 1452, CEP 13560-970 São Carlos, SP, gunicolodelli@hotmail.com, debora.milori@embrapa.br

**Resumo:** A fluorescência 3D é uma ferramenta muito utilizada no meio ambiente para estudar a matéria orgânica dissolvida. Apesar dos modelos de fluorescência em meio líquido serem bem conhecidos e permitirem uma caracterização precisa, isso não pode ser afirmado para a fluorescência dos sólidos. Este trabalho tem como objetivo o estudo da fluorescência do triptofano (TRP) e da fluoresceína, uma molécula cujo comportamento da fluorescência é bem conhecido e altamente fluorescente em líquidos, porém nunca estudada na fase sólida. Pastilhas de TRP e de fluoresceína foram preparadas com matriz de ácido bórico e estudadas utilizando fluorescência 3D, fluorescência induzida por laser (FIL) e reflectância. Foi obtida uma curva da intensidade de fluorescência com a concentração para ambas moléculas no estado líquido, para comparar o comportamento dessas nas matrizes água e ácido bórico. Os resultados mostraram que no líquido a curva de fluorescência pode ser ajustada com modelo físico. Para as medidas de fluorescência 3D em sólidos, a fluoresceína mostrou resposta em qualquer teor, enquanto no TRP mostrou uma resposta linear para os teores baixos e uma saturação para os altos níveis. Já para as medidas de FIL verificamos um decréscimo da intensidade do sinal para a fluoresceína e uma reta linear sem saturação para o TRP. A conclusão deste trabalho é que um modelo físico deve ser desenvolvido para entender o comportamento do TRP tanto para a FIL, como para a fluorescência 3D. Além disso, os resultados mostram que a fluoresceína não apresenta uma resposta de fluorescência tão eficiente para ambas às técnicas FIL e espectroscopia de fluorescência 3D.

**Palavras-chave:** fluorescência, sólido, triptofano, fluoresceína.

### 3D FLUORESCENCE OF SOLIDS: EFFECT OF CONCENTRATION AND REABSORPTION

**Abstract:** The 3D fluorescence is a widely tool used among environmental studies to watch and dissolved organic matter. If the models of fluorescence in liquid medium is well known and allows a thin characterization, it is not the same for the fluorescence of solids. This paper propose the systematical study of tryptophan fluorescence and of the fluorescein as there are respectively a molecule that is found in previous studies, and a high fluorescent molecule in liquids but not yet studied in solids. Therefore, powder and pellets of tryptophan and fluorescein were made with boric acid and 3D fluorescence matrix of the solid laser-induced fluorescence and reflectance were done. Also the curve of the inner filter effect was made by both molecules in the liquid to compare the behavior in water and boric acid. Results show that liquid in the fluorescence curve may be modeled with the physical model. Solid 3D fluorescence measured for fluorescein shown no response in any content while the tryptophan show a linear response from the weak content to the saturation levels. The same solid measured by FIL show a decrease of the intensity of signal for fluorescein and a linear trend without saturation for tryptophan. The conclusion of this work is that a physical model should be developed to understand the behavior of both TRP and FLU with FIL and 3D fluorescence. Also, the results show that fluorescein do not fluoresce for both FIL and 3D fluorescence techniques.

**Keywords:** fluorescence, solid, tryptophan, fluorescein.

#### 1. Introdução

A fluorescência 3D é uma ferramenta muito usada para medir e caracterizar a matéria orgânica dissolvida (CARSTEA et al., 2010; COBLE, 1996; MURPHY et al., 2013; PATEL-SORRENTINO; MOUNIER; BENAÏM, 2002). Porém, para a caracterização da matéria orgânica dos solos sempre é necessário se fazer uma extração, induzindo uma seleção de moléculas e talvez uma modificação, devido ao meio químico que atinge a estrutura dos geopolímeros (AMINE-KHODJA et al., 2006; GUO et al., 2012; HE et al., 2011). Por isso, é interessante desenvolver um método que permita a observação direta da matéria orgânica sem a necessidade de uma extração prévia.

Alguns autores tentaram observar as propriedades de fluorescência das moléculas nos sólidos. Estes trabalhos foram realizados em fármacos (ALVES; POPPI, 2009), alimentos (ALLAIS; EDOURA-GAENA; DUFOUR, 2006) e resíduos orgânicos (MULLER et al., 2011). Geralmente, os compostos que foram observados

são de moléculas simples com alta eficiência de fluorescência como TRP, cafeína e celulose. A matéria orgânica humificada em solos nunca foi avaliada através de análises de fluorescência 3D com um ângulo de observação perpendicular a excitação, apenas em sistemas para a realização de espectroscopia de fluorescência induzida por laser (FIL) bidimensionais com incidência da excitação paralela à coleta do sinal de emissão (MERYD et al., 2009; MILORI et al., 2011; MULLER et al., 2011).

Apresentaremos nesse trabalho um estudo sistemático da resposta da fluorescência do TRP em uma matriz de ácido bórico. Além disso, a resposta da fluoresceína, uma molécula com alta fluorescência, na mesma matriz também foi investigada. Objetivo principal deste trabalho foi entender o modelo que rege a fluorescência 3D de moléculas simples numa matriz controlada, visando aplicar este modelo em matrizes mais complexas como solos e a própria matéria orgânica dos solos.

## 2. Materiais e Métodos

Pastilhas de ácido bórico foram preparadas com teor de TRP e fluoresceína no intervalo de 100% até 0% em massa. O pó de cada produto foi moído até obter um pó homogêneo, referenciado PO\_1. Uma parte do pó foi utilizada (2x0,3g) para fabricar duas pastilhas referenciadas PA\_1 e PA\_2. O pó e as duas pastilhas foram analisadas por fluorescência 3D, FIL e reflectância.

A medida de fluorescência 3D foi realizada com um aparelho PERKIN Elmer LS50B. As pastilhas foram introduzidas na base sólida do suporte e fixadas com uma placa de quartzo. As amostras de pó foram colocadas na base sólida do suporte e prensadas até formar uma superfície homogênea sobre a placa de quartzo. A fluorescência foi medida com um ângulo de 25°. O comprimento de onda de excitação foi variado a cada 10 nm no intervalo de 200 a 800 nm com uma janela de 5 nm. O comprimento de onda de emissão foi medido de 200 a 800 nm com uma precisão de 0,5 nm, uma velocidade de varredura de 250 nm/min e uma janela espacial de 5 nm. A Matriz de Excitação e Emissão de Fluorescência (MEEF) foi extraída dos espectros consecutivos de emissão com o programa de extração 3D *export* do PERKIN Elmer.

As medidas de FIL foram obtidas com um laser de 405 nm de excitação. O espectro de emissão foi obtido pela média de 5 espectros de 440 a 800 nm, com um tempo de integração de 1s.

A medida de reflectância foi realizada com uma montagem óptica no laboratório. A pastilha ou pó foram introduzidos no porta amostra do PERKIN Elmer que fica sobre um disco. Uma luz branca produzida por um LED foi fixada sobre um disco giratório exterior, no mesmo plano que a amostra, e com graduação de ângulo. Uma fibra óptica foi fixada com um ângulo fixo em relação à superfície da amostra. O espectro de reflectância foi coletado em diferentes ângulos com intervalos de 10° de 0 a 90°.

## 3. Resultados e Discussão

As MEEF (exemplo figura 1) foram tratadas com CP/PARAFAC. No caso da fluoresceína, nenhuma fluorescência foi observada exceto o sinal de difusão do ácido bórico. No caso do TRP foram obtidos três compostos como mostrado na figura 2.

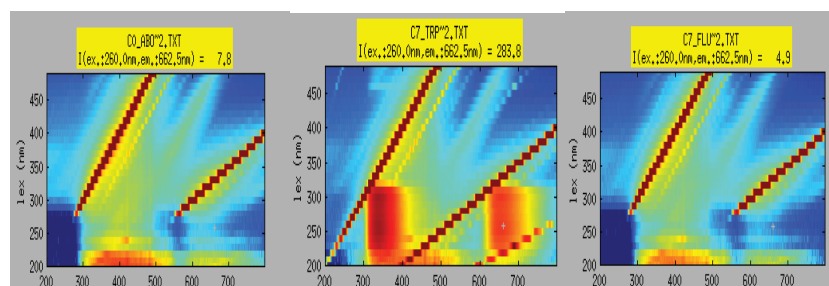


Figura 1. Matriz de Excitação Emissão de fluorescência de pastilhas de ácido bórico, TRP (0,18%) e fluoresceína (0,28%) em ácido bórico.

Os dois primeiros compostos estão relacionados com os picos de fluorescência do TRP na água. No primeiro composto  $C^{1,TRP}$  o pico principal está localizado na região (250/340 nm) e o pico secundário na região (250/680 nm). Este pico representa uma imagem de segunda ordem do primeiro. O segundo composto  $C^{2,TRP}$  também está ligado ao TRP e apresenta um pico principal localizado em (205/380 nm). Este deslocamento pode ser atribuído ao meio molecular do TRP, onde o comprimento de onda de emissão depende da polaridade do meio. O terceiro componente,  $C^{2,ABO}$ , está ligado a resposta do ácido bórico. Isso foi confirmado porque a contribuição deste composto fica constante quando o teor de TRP ou da fluoresceína (FLU) varia.

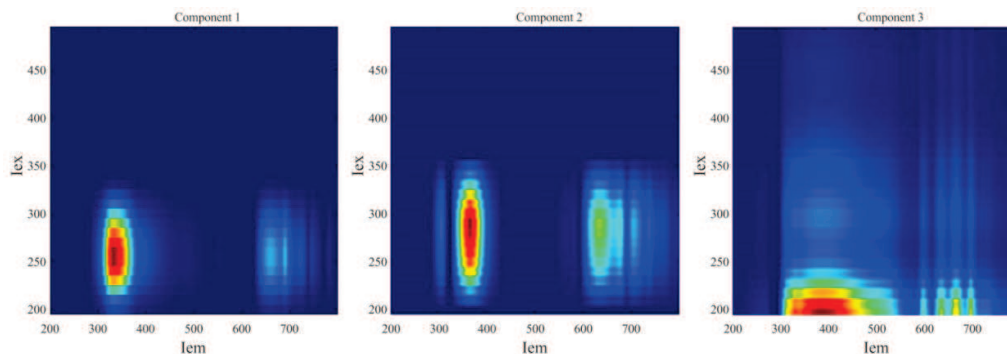


Figura 2. Resultado da decomposição CP/PARAFAC das MEEF das diluições do TRP em ácido bórico.

A contribuição do composto  $C^{1,TRP}$  em relação a teor de TRP apresenta um comportamento logarítmico. Colocando em escala logarítmica, a relação mostra uma reta com os valores baixos de TRP e uma saturação da fluorescência para teor acima de 2% em massa.

Os resultados de FIL mostram que o sinal de fluorescência nos sólidos com FLU aumentam quando o teor de FLU decresce (Figura 3). Isso pode acontecer para a FLU em concentrações onde o efeito de reabsorção é significativo (*inner filter effect*). Por outro lado, o sinal do TRP está muito bem relacionado com seu teor no sólido (figura 3), a FIL do TRP não mostra efeito de saturação como no caso da MEEF.

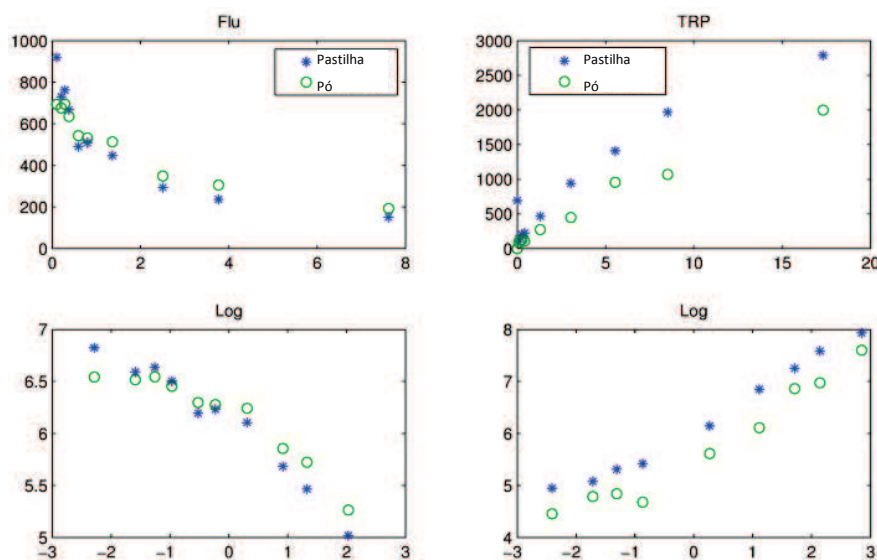


Figura 3. Evolução da intensidade de fluorescência máxima do espectro FIL para a fluoresceína (esquerda) e o TRP (direita). Acima os valores normais, abaixo os valores em logaritmo.

#### 4. Conclusões

Neste trabalho mostramos que o TRP se comporta em soluções aquosas diferentemente do que em sólidos. Porém, resultados diferentes dependem da técnica de análises FIL e da MEEF, mostrando que a eficiência de fluorescência não é a mesma: com FIL tem uma relação linear de 0 até 40% enquanto com MEEF a relação linear acaba desde 1,5% para atingir um valor limite. Para a fluoresceína o MEEF não apresenta sinal suficiente e a FIL mostra que a fluorescência medida decresce com o teor. Foi confirmado que o sinal de TRP é observado facilmente com fluorescência dos sólidos. A fluoresceína, mesmo fluorescendo nos líquidos, não fluoresce nos sólidos. Em conclusão, para aplicação da fluorescência 3D com solo é necessário entender o papel do estado sólido na fluorescência das moléculas. É aconselhável estabelecer um banco de dados das moléculas mais encontradas (usuais) para diferentes matrizes, particularmente no caso dos solos que são matrizes complexas.

#### Agradecimentos

Este trabalho foi realizado com apoio do programa de Pesquisador Visitante Especial, Ciência Sem Fronteira Processo N°313576/2013-0. Também agradecemos a FAPESP e EMBRAPA pelo suporte financeiro.

**Referências**

- ALLAIS, I.; EDOURA-GAENA, R.-B.; DUFOUR, É. Characterisation of lady finger batters and biscuits by fluorescence spectroscopy -Relation with density, color and texture. *Journal of Food Engineering*, v. 77, n. 4, p. 896–909, dez. 2006.
- ALVES, J. C. L.; POPPI, R. J. Simultaneous determination of acetylsalicylic acid, paracetamol and caffeine using solid-phase molecular fluorescence and parallel factor analysis. *Analytica chimica acta*, v. 642, n. 1-2, p. 212–6, 29 maio 2009.
- AMINE-KHODJA, A. et al. Humic-like substances extracted from composts can promote the photodegradation of Irgarol 1051 in solar light. *Chemosphere*, v. 62, n. 6, p. 1021–7, fev. 2006.
- CARSTEA, E. M. et al. Continuous fluorescence excitation-emission matrix monitoring of river organic matter. *Water Research*, v. 44, n. 18, p. 5356–66, out. 2010.
- COBLE, P. G. Characterization of marine and terrestrial DOM in seawater using excitation-emission matrix spectroscopy. *Marine Chemistry*, v. 51, n. 4, p. 325–346, jan. 1996.
- GUO, X. et al. Characterization of dissolved organic matter extracted from fermentation effluent of swine manure slurry using spectroscopic techniques and parallel factor analysis (PARAFAC). *Microchemical Journal*, v. 102, p. 115–122, maio 2012.
- HE, X. et al. Spectroscopic characterization of water extractable organic matter during composting of municipal solid waste. *Chemosphere*, v. 82, n. 4, p. 541–8, jan. 2011.
- MERDY, P. et al. A new method using laser induced fluorescence quenching for studying metal complexes in the solid state applied to CrIII, CuII and PbII in sandy soils. *Geoderma*, v. 150, n. 1-2, p. 179–187, abr. 2009.
- MILORI, D. M. B. P. et al. Sensor de teor e qualidade de matéria orgânica de solos Barzil, 2011. Disponível em: <<http://www.patentesonline.com.br/sensor-de-teor-e-qualidade-de-mat-ria-org-nica-de-solos-118685.html>>
- MULLER, M. et al. Solid-phase fluorescence spectroscopy to characterize organic wastes. *Waste management (New York, N.Y.)*, v. 31, n. 9-10, p. 1916–23, 2011.
- MURPHY, K. R. et al. Fluorescence spectroscopy and multi-way techniques. PARAFAC. *Analytical Methods*, v. 5, n. 23, 2013.
- PATEL-SORRENTINO, N.; MOUNIER, S.; BENAÏM, J. Y. Excitation-emission fluorescence matrix to study pH influence on organic matter fluorescence in the Amazon basin rivers. *Water Research*, v. 36, n. 10, p. 2571-81, maio 2002.