



CARACTERIZAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS EXTRAÍDAS DE SOLOS ARENOSOS DE ALGUMAS REGIÕES DA AMAZÔNIA UTILIZANDO DIFERENTES TÉCNICAS DE FLUORESCÊNCIA E PARAFAC

C.H. dos Santos^{1,2}, G. Nicolodelli², R.A. Romano^{3,2}, A.M. Tadini^{1,2}, C.R. Montes⁴, S. Mounier⁵, P.R. Villas-Boas², L. Martin-Neto², D.M.B.P. Milori²

- (1) Instituto de Química de São Carlos, IQSC/USP, Avenida Trabalhador São-Carlense, 400, 13560-970, São Carlos, SP, cleberhilario@gmail.com, amandatadini@hotmail.com
- (2) Embrapa Instrumentação, Rua XV de Novembro, 1452, 13560-970, São Carlos, SP, gunicolodelli@hotmail.com, paulino.villas-boas@embrapa.br, ladislau.martin@embrapa.br, debora.milori@embrapa.br
- (3) Instituto de Física de São Carlos, IFSC/USP, Avenida Trabalhador São-Carlense, 400, 13560-970, São Carlos, SP, renan.romano@gmail.com
- (4) Centro de Energia Nuclear na Agricultura, NUPEGEL/CENA/USP, Avenida Centenário, 303, 13418-900, Piracicaba, SP, crmlauar@usp.br
- (5) Université de Toulon, PROTEE, EA 3819, 83957 La Garde, França, mounier@univ-tln.fr

Resumo: A floresta Amazônica tem a maior biodiversidade do mundo e representa um enorme reservatório de carbono, tanto na vegetação como no solo. O entendimento do ciclo do carbono neste bioma é muito importante, especialmente em questões que abordam as mudanças climáticas. No presente estudo, ácidos húmicos (AHs) obtidos a partir de uma topossequência de um sistema Latossolo-Espodosolo com caulim associado foi estudado utilizando a fluorescência induzida por laser (FIL), matrizes de fluorescência de excitação-emissão (MEE) combinada com a análise de fatores paralelos (PARAFAC). A MEE foi mais seletiva e sensível em relação às técnicas de fluorescência bidimensional para os AHs, mostrando informações interessantes relacionadas com as variações estruturais e as diferenças entre os cromóforos, em termos de sinal de fluorescência de AH. Os espectros de MEEs combinado com o PARAFAC permitiu identificar dois fluoróforos com CORCONDIA de 84,2%. A técnica FIL mostrou para o Espodosolo Humilúvico que no horizonte de transição (Tr) ocorreu um acúmulo de carbono em subsuperfície e a infiltração destes nos horizontes de caulim K1 (peneira molecular) e K2 (acúmulo de carbono mais humificado). Os resultados para o Espodosolo Humilúvico parecem confirmar o modelo de estrutura supramolecular para o AH, porque a proporção entre os fluoróforos muda ao longo do perfil. Portanto, a utilização de FIL, fluorescência 3D combinada com PARAFAC pode fornecer informações sobre os processos de transformação das substâncias húmicas (SHs) no solo, e tornar-se métodos analíticos interessantes para o estudo das SHs em diferentes solos.

Palavras-chave: fluorescência induzida por laser; ácido húmico; fluorescência tridimensional; fluoróforos; parafac.

CHARACTERIZATION OF HUMIC SUBSTANCES EXTRACTED OF SANDY SOIL FROM SOME REGIONS OF THE AMAZON USING DIFFERENT TECHNIQUES OF FLUORESCENCE AND PARAFAC

Abstract: The Amazon rainforest presents one of the greater biodiversity in the world and a huge and dynamic carbon reservoir, both in the vegetation and in the soil pools. The understanding of the carbon cycle in this biome is very important, especially on issues addressing climate change. In the present study, humic acids (HAs) obtained from a toposequence of an Oxisol-Spodosol system associated with kaolin was studied using laser-induced fluorescence spectroscopy (LIFS) and fluorescence emission-excitation matrix (EMM) combined with parallel factor analysis (PARAFAC). The EEMs were more selective and sensitive compared to two-dimensional fluorescence techniques for the HAs, showing interesting information related to structural variations and differences between the chromophores in terms of the HA fluorescence signal. The EEMs spectra combined with the PARAFAC allowed to identify two fluorophores with CORCONDIA 84.2%. The LIFS technique applied to the Humiluvic Spodosol soil showed that in the transition horizon (Tr) occurred an accumulation of carbon in subsurface and an infiltration in the kaolin (K1) horizon (molecular sieve) and K2 (accumulation of more humified carbon). The results for the Humiluvic Spodosol seem to corroborate to the model of supramolecular structure of humic acids, since the ratio between the fluorophores changes along the profile. Therefore, the use of LIFS, 3D fluorescence combined with PARAFAC can provide information about the transformation processes of humic substances (HSs) in soils, becoming an interesting analytical tool for studying HSs of different soils.

Keywords: laser-induced fluorescence spectroscopy; humic acid; three-dimensional fluorescence; fluorophores; parafac.

1. Introdução

A floresta Amazônica representa a maior biodiversidade do mundo, abrangendo um amplo e dinâmico reservatório de carbono, mas esta fonte de carbono pode ser liberada para a atmosfera através do desmatamento, uso não conservador do solo e mudança climática. Na Amazônia, as relações entre os estoques de carbono do solo e de carbono na vegetação natural são pouco compreendidos. A Amazônia tem uma vasta área de Espodosolos, caracterizada por horizontes arenosos espessos, recobrimdo horizontes mais argilosos e associados a sistemas Latossolo-Espodosolo (LUCAS et al., 2012).

A matéria orgânica do solo (MOS) é um componente essencial na qualidade e na sustentabilidade do solo (STEVENSON, 1994). É formada por frações orgânicas com diferentes labilidades. O estudo da vulnerabilidade do carbono orgânico do solo devido as atividade antrópicas e/ou mudanças climáticas é importante para a construção de modelos de simulação para prever futuros cenários e para auxiliar nas tomadas de decisões ambientais corretivas. Substâncias húmicas (SHs) são matéria orgânica (MO) que é altamente decomposta e o tipo de carbono mais estável no solo. Técnicas espectroscópicas são geralmente utilizadas para estudar a estrutura química das substâncias húmicas.

A espectroscopia de fluorescência induzida por laser (FIL) aplicada a solos é uma técnica recente, que tem se mostrado eficiente na análise da MO de solos inteiros (solos não submetidos a tratamentos químicos ou físicos), sem a necessidade de extração dos ácidos húmicos (AHs) (MILORI et al., 2006). FIL tem como princípio básico excitar a amostra de solo com um laser com emissão na região do azul ou violeta o que resulta na fluorescência de grupos funcionais mais complexos da MOS.

Devido à complexidade da estrutura química dos AHs, é normalmente muito difícil de extrair a informação quantitativa a partir dos espectros de emissão de fluorescência. Por esta razão, a espectroscopia de matrizes de fluorescência de excitação-emissão (MEE), combinada com a análise de fatores paralelos (PARAFAC) (LUCIANI et al., 2008) permite a caracterização e identificação de cada fluoróforo nos espectros de MEE. Portanto, este estudo teve como objetivo caracterizar a MO e os ácidos húmicos obtidos a partir de sistema Latossolo-Espodosolo, empregando a FIL e MEE combinada com a PARAFAC.

2. Materiais e Métodos

As amostras foram coletadas em São Gabriel da Cachoeira, estado do Amazonas, Brasil, entre as coordenadas geográficas 0°6'21" S and 66°54'22" W. O perfil de solo analisado é um Espodosolo Humilúvico. A amostragem foi realizada em profundidades de acordo com os horizontes do solo até atingir a rocha. O Espodosolo Humilúvico apresenta a seguinte sequência de horizontes: A1 e A2 (superficial organo-mineral); E1 e E2 (álbicos); Bh e Bhs (espódicos); Tr (transição); K1 e K2 (conjunto inferior de camadas de caulim com infiltração de MO). No total, 9 amostras foram coletadas. As amostras foram secas à temperatura ambiente, peneiradas para remover as raízes (2,0 mm), moídas e então peneiradas novamente (106 µm), a fim de se obter amostras homogêneas. AHs foram extraídos dessas amostras de solos utilizando o método recomendado pela Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas (IHSS).

Para a determinação do teor de carbono total no solo, foram utilizadas as amostras sem tratamento. As amostras foram moídas de forma a se obterem partículas menores que 0,15 mm. Estas amostras foram pesadas diretamente em cápsulas de estanho e analisadas por um analisador elementar CHNS/O da marca Perkin Elmer modelo 2400.

As soluções de AHs foram preparadas utilizando NaHCO₃ 0,05 mol L⁻¹. A concentração ideal para cada uma das amostras de AH foi determinada por espectroscopia de UV-vis. Para pH ao redor de 8,0 a absorção a 254 nm foi mantida inferior a 0,1. Este procedimento é necessário para reduzir as interações moleculares (efeito de filtro interno) (LUCIANI et al., 2008). O espectrômetro de absorção UV-vis SHIMADZU modelo UV-1601 PC foi usado. Os espectros de fluorescência foram adquiridos no modo de excitação-emissão (MEE), utilizando um espectrômetro de luminescência Perkin Elmer modelo LS-50B. As faixas de varredura foram 240-700 nm para emissão e 220-510 nm para excitação. Os espectros foram obtidos com um filtro de 290 nm e um incremento de excitação de 10 nm, totalizando 30 varreduras. PARAFAC foi usado para extrair informações a partir dos dados obtidos pela espectroscopia de fluorescência clássica de MEE, o que permitiu identificar a contribuição das intensidades dos fluoróforos mais representativos.

A avaliação do grau de humificação da MOS foi realizada através da espectroscopia de FIL. Os espectros de emissão de FIL foram obtidos a partir de amostras de solo secas à temperatura ambiente, moídas e peneiradas (106 µm). Após, cerca de 0,5 g de cada amostra foram submetidas a 10 ton de pressão durante 2 minutos para formar pastilhas. Para cada amostra de solo foram preparadas duas pastilhas. Os parâmetros adotados nas análises foram: intervalo de varredura entre 475-800 nm; tempo de integração de 30 ms; boxcar 4 e average 5.

3. Resultados e Discussão

Os valores dos teores de carbono das amostras de solo são mostrados na Tabela 1, de acordo com a análise elemental (CHNS). Como pode ser observado, as amostras apresentam diferentes variações nos teores de carbono do Espodossolo Humilúvico.

Tabela 1. Teores de carbono das amostras de solo inteiro obtidos para o Espodossolo Humilúvico.

Amostras ⁽¹⁾	Horizonte/ Camada	Profundidade (cm)	Teor de Carbono %
EH	A1	0 – 5	3,00 ± 0,10
EH	A2	5 – 30	0,77 ± 0,10
EH	E1	30 – 180	< LOD
EH	E2	180 – 202,5	< LOD
EH	Bh	202,5 – 204	0,38 ± 0,07
EH	Bhs	204 – 214	0,33 ± 0,06
EH	Transição	214 – 245	3,21 ± 0,01
EH	K1	245 – 290	0,73 ± 0,07
EH	K2	290+	< LOD

⁽¹⁾EH: Espodossolo Humilúvico. < LOD (limite de detecção): abaixo do limite de detecção do analisador elemental (CHNS).

A Figura 1 mostra dois exemplos dos espectros de fluorescência MEE obtido para o AH.

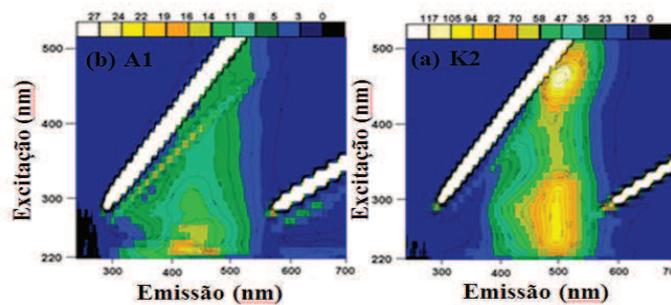


Figura 1. Espectro de fluorescência total no modo MEE obtidos para as amostras de AH (concentração 10 mg L⁻¹, pH 8,0) a partir dos horizontes (a) A1 e (b) K2 do Espodossolo Humilúvico.

O diagnóstico de consistência do tensor núcleo (CORCONDIA) é uma ferramenta eficaz para determinar o número apropriado de componentes nos modelos PARAFAC. Para o modelo proposto utilizando duas componentes, o CORCONDIA foi de cerca de 84,2%. A Figura 2 mostra os dois fluoróforos identificados utilizando o PARAFAC (LUCIANI et al., 2008).

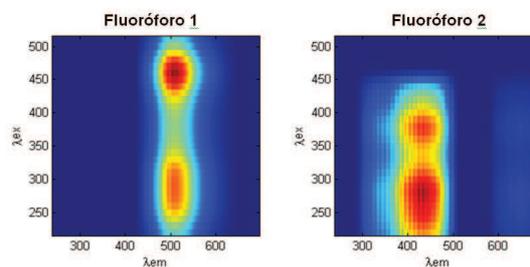


Figura 2. Fluoróforos 1 e 2 obtidos pelo método PARAFAC e descritivos da fluorescência tridimensional (MEE) dos AH extraídos do Espodossolo Humilúvico.

Com base no perfil do espectro mostrado na Figura 2, o Fluoróforo 1 parece estar associado com o AH mais complexo e mais humificado (STEVENSON, 1994; MILORI et al., 2002).

As contribuições dos fluoróforos em cada horizonte são apresentados na Figura 3 (a). Os resultados mostram que a estrutura química do AH mudou ao longo do perfil. Para o horizonte superficial e espódico (Bhs), a estrutura do AH tem uma maior contribuição do Fluoróforo 2. A partir do horizonte de transição (Tr), a contribuição do Fluoróforo 1 aumenta e torna-se maior do que o Fluoróforo 2.

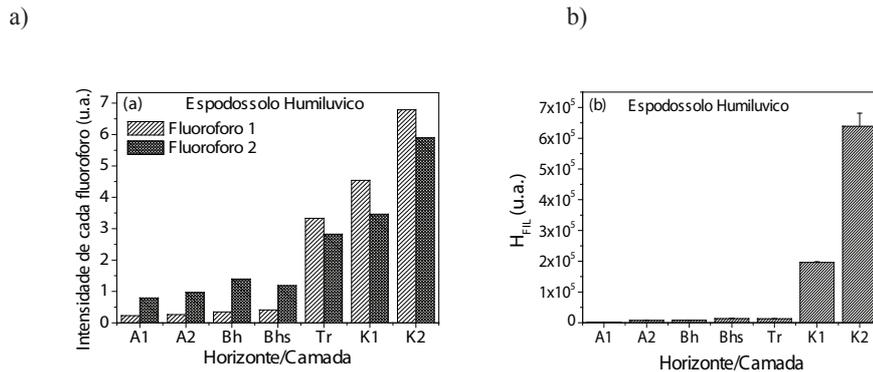


Figura 3. (a) Contribuições a fluorescência dos Fluoróforos 1 e 2 dos AH extraídos do Espodossolo Humilúvico, no perfil de amostragem. (b) Valores de HFIL obtidos para todas as amostras de solo inteiro do Espodossolo Humilúvico, no perfil de amostragem.

Assim, os resultados para o Espodossolo Humilúvico parecem confirmar o modelo de estrutura supramolecular para o AH, porque a proporção entre os fluoróforos muda ao longo do perfil (PICCOLO, 2001). Se consideramos o modelo macromolecular para o AH, a relação entre os diferentes fluoróforos de uma molécula deve ser mantida constante ao longo do perfil.

Na Figura 3 (b), tem-se o comportamento do índice de humificação em função das profundidades para o Espodossolo Humilúvico obtido por FIL. A técnica FIL mostrou para o Espodossolo Humilúvico que no horizonte de transição (Tr) ocorreu um acúmulo de carbono em subsuperfície e a infiltração destes nos horizontes de caulim K1 (peneira molecular) e K2 (acúmulo de carbono mais humificado). Estes resultados corroboram com os resultados obtidos pela combinação de MEE e PARAFAC para os AH extraídos do Espodossolo Humilúvico.

4. Conclusões

A espectroscopia de FIL foi uma técnica útil para avaliar a humificação da matéria orgânica do solo nas amostras de solos estudadas. A combinação de MEE e PARAFAC permitiu caracterizar os AH, identificando dois fluoróforos com CORCONDIA de 84,2%. Portanto, a utilização de FIL, fluorescência 3D combinada com PARAFAC pode fornecer informações sobre os processos de transformação das substâncias húmicas (SHs) no solo, e tornar-se métodos analíticos interessantes para o estudo das SHs em diferentes solos.

Agradecimentos

Os autores agradecem a FAPESP (CEPOF, proc. 2013/07276-1), CNPq (proc. 403405/2013 e 479994/2013-7), CAPES e EMBRAPA (projetos 03.11.09.013.00.00 e 04.11.10.004.00.06.02) pelo apoio financeiro deste estudo.

Referências

- LUCAS, Y.; MONTES, C. R.; MOUNIER, S.; CAZALET, M. L.; ISHIDA, D.; ACHARD, R.; GARNIER, C.; MELFI, A. J. Biogeochemistry of an Amazonian podzol-ferralsol soil system with white kaolin. *Biogeosciences*, v. 9, p. 3705-3720, 2012.
- LUCIANI, X.; MOUNIER, S.; PARAQUETTI, H. H. M.; REDON, R.; LUCAS, Y.; BOIS, A.; LACERDA, L. D.; RAYNAUD, A.; RIPERT, A. Tracing of dissolved organic matter from the SEPETIBA Bay (Brazil) by PARAFAC analysis of total luminescence matrices. *Marine Environmental Research*, v. 2, p. 148-157, 2008.
- MILORI, D. M. B. P.; MARTIN-NETO, L.; BAYER, C.; MIELNICZUK, J.; BAGNATO, V. S. Humification degree of soil humic acids determined by fluorescence spectroscopy. *Soil Science*, v. 167, p. 739-749, 2002.
- MILORI, D.M.B.P.; GALETI, H.V.A.; MARTIN-NETO, L.; DIECKOW, J.; GONZÁLEZ-PÉREZ, M.; BAYER, C.; SALTON, J. "Organic matter study of whole soil samples using laser-induced fluorescence spectroscopy". *Soil Science Society of America Journal*, v. 70, p. 57-63, 2006.
- PICCOLO, A. The supramolecular structure of humic substances. *Soil Science*, v. 166, n. 11, p. 810-832, 2001.
- STEVENSON, F. J. *Humus chemistry: genesis, composition, reaction*. New York: Wiley Interscience, 1994, P. 443.