



ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA EM MATRIZ EXCITAÇÃO-EMISSION APLICADA A ÁCIDOS HÚMICOS EXTRAÍDOS DE HORIZONTES ESPÓDICOS DA FLORESTA AMAZÔNICA

B.S. de Paula^{1,2}, D.M.B.P. Milori², C.R. Montes³, W.T.L. da Silva²

- (1) Instituto de Química de São Carlos, IQSC/USP, Avenida Trabalhador São-Carlense, 400, 13560-970, São Carlos, SP, brunodepaula@usp.br
(2) Embrapa Instrumentação, Rua XV de Novembro, 1452, 13560-970, São Carlos, SP, débora.milori@embrapa.br, wilson.lope-silva@embrapa.br
(3) Centro de Energia Nuclear na Agricultura, CENA/USP, Avenida Centenário, 303, 13400-970, Piracicaba, SP, crmlauar@usp.br

Resumo: Estudos recentes mostraram que os Espodosolos da Floresta Amazônica têm capacidade de armazenar carbono além do previsto em estudos anteriores e por isso, pesquisas têm se desenvolvido para entender a dinâmica e caracterizar física e quimicamente esta matéria orgânica que se acumula em profundidade. Para tanto, este trabalho utilizou a combinação da técnica de Espectroscopia de Fluorescência em Matriz de Excitação-Emissão (EEM) com a ferramenta estatística Análise de Fatores Paralelos (PARAFAC), afim de se obter informações sobre o padrão de evolução dos cromóforos e a origem química dos ácidos húmicos extraídos de diferentes profundidades de Espodosolos da bacia do Rio Negro, no estado da Amazônia. Através da análise dos componentes e dos *scores* encontrados para cada profundidade, foi possível diferenciar as amostras superficiais, intermediárias e profundas quanto à degradação microbiana da matéria orgânica, sua humificação e ainda condições redox evidenciadas pela presença de quinonas oxidadas e reduzidas nos diferentes perfis. Constatou-se que a atividade microbiana se relaciona positivamente com a humificação e que este processo ocorre em maior escala entre as profundidades de 1 a 4 metros, neste tipo de solo.

Palavras-chave: fluorescência em matriz excitação-emissão (MEE), PARAFAC, espodosolos, floresta amazônica.

EXCITATION-EMISSION MATRIX FLUORESCENCE SPECTROSCOPY APPLIED TO HUMIC ACIDS EXTRACTED FROM SPODIC HORIZONS FROM AMAZON FOREST

Abstract: Recent studies have shown that the Amazon rainforest Spodosols, have carbon storage capacity beyond that provided in previous studies and therefore research has been developed to understand the dynamics and characterize physical and chemically this organic matter that accumulates in depth. Therefore, this study has used the combination of the technique Excitation-Emission Matrix Fluorescence Spectroscopy (EEM) with the statistical tool Parallel Factors Analysis (PARAFAC), in order to obtain information about the evolution pattern of chromophores and the chemical origin of the of humic acids extracted from different depths from the Black River basin Spodosols. Through the analysis of components and scores found for each depth, it was possible to differentiate among the superficial, intermediate and deep samples, regarding to microbial degradation of organic matter, humification and redox conditions. We observed that microbial activity is positively related to humification and this process occurs on a larger scale in depths of 1 to 4 meters, for this type of soil.

Keywords: excitation-emission matrix fluorescence spectroscopy (EEM), PARAFAC, spodosol, Amazon rainforest.

1. Introdução

Os Espodosolos, conhecidos também como podzóis, ocorrem amplamente em regiões úmidas frias ou em regiões quentes tropicais úmidas (LUNDSTRÖM et al, 2000). Em ambos os casos, podem ser caracterizados pelos seguintes horizontes: um horizonte A superficial com material vegetal em decomposição, um horizonte E eluvial, formado principalmente por areia quartzosa ou minerais originais pouco intemperizados e horizontes B espódicos, enriquecidos com substâncias húmicas que se acumulam (Bh) ou com óxidos de ferro e alumínio (Bs). A especificidade dos podzóis se dá pela lixiviação completa dos elementos do horizonte E, incluindo Al e Fe. Esses elementos são pouco solúveis nas condições de solução do solo, e supõe-se que a matéria orgânica desempenhe um papel chave no seu transporte (MELFI et al., 2007).

A diferença entre o aporte de matéria orgânica e sua decomposição é o principal fator de acúmulo da matéria orgânica nos Espodosolos (LUNDSTRÖM et al, 2000). Trabalho realizado recentemente chegou a resultados surpreendentes no sentido de que os Espodosolos são capazes de armazenar em média $86,8 \pm 7,1 \text{ kg C m}^{-2}$

no horizonte superficial (10 a 115 cm), $3,1 \pm 0,9$ kg C m⁻² em horizontes arenosos (115 a 220 cm) e $66,7 \pm 5,8$ kg C m⁻² em horizontes espódicos profundos (Bh), nas áreas com drenagem deficiente (MONTES et al., 2011). Nesse sentido, estudos vêm sendo realizados para entender melhor a dinâmica e as características físico-químicas desta matéria orgânica acumulada em horizontes espódicos profundos.

A determinação das propriedades ópticas dos ácidos húmicos através da combinação das técnicas EEM e PARAFAC, constitui-se como poderosa ferramenta para a caracterização de solos e sedimentos devido à sensibilidade, especificidade, rapidez da medida e preparo das amostras e ainda uma melhora na resolução dos espectros, comparados a técnica de Fluorescência-3D isolada (SANTÍN et al., 2009).

Neste trabalho, procurou-se explorar os padrões de fluorescência dos ácidos húmicos extraídos de Espodossolos da floresta Amazônica oriundos de diferentes profundidades, afim de compreender a evolução destes padrões e ainda caracterizá-los sobre sua origem, apoiando-se em outros trabalhos disponíveis na literatura.

2. Materiais e Métodos

2.1. Amostragem e extração dos ácidos húmicos

As amostras foram coletadas na bacia do Rio Negro, na cidade de São Gabriel da Cachoeira, no estado do Amazonas (0° 49' 15,69" S e 67° 25' 43,76" O). O Perfil do local está associado com a transformação do sistema Latossolo-Espodossolo e apresenta características de solo arenoso (perfil franco-arenoso). A vegetação acima do solo é composta por campinarana florestada e a parte mineralógica, composta principalmente pelos minerais: quartzo, caulinita, gibbsita, anatásio e rutilo. As amostras de solo foram devidamente codificadas e congeladas no local para armazenamento e transporte até o local de análise, sendo então liofilizadas e armazenadas.

Para extração dos ácidos húmicos, utilizou-se o método recomendando pela Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas (IHSS). Os perfis selecionados, indicados como P4 e P5, foram previamente analisados por Fluorescência Induzida por Laser (FIL) e dependendo da variação do grau de humificação, combinado com o teor de carbono, os horizontes para extração foram escolhidos. Para o perfil P4, foram escolhidas as profundidades 0-25 cm, 60-90 cm, 185-195 cm, 210-230 cm, 250-280 cm e 450-490 cm. Para o perfil P5, foram escolhidas as profundidades 0-15 cm, 60-85 cm, 100-105 cm, 170-190 cm, 275-330 cm e 340-380 cm.

2.2. Espectroscopia de fluorescência em matriz excitação-emissão (EEM) e PARAFAC

As medições foram realizadas em um espectrômetro de fluorescência modelo LS-50B Perkin Elmer. Os ácidos húmicos foram dissolvidos em uma solução de bicarbonato de sódio (NaHCO₃) 0,05 mol L⁻¹ e ajustados à uma concentração de 10 mg L⁻¹ e pH 8 (MILORI et al., 2002). Seguindo o método proposto por Luciani et al. (2009), para reduzir o efeito de filtro interno nas medidas de Fluorescência-3D, foi utilizado o método da Diluição Controlada (CDA), que consiste em diluir as amostras preparadas até a absorbância em 254 nm tornar-se menor do que 0,1. Para isso, foi utilizado um Espectrofotômetro UV-Visível Shimadzu UV-1601PC. Os espectros de fluorescência no modo matriz excitação-emissão (EEM) foram adquiridos dentro do intervalo de varredura 220-510 nm para excitação e 240-700 nm para emissão, num total de 30 varreduras.

O modelo Parallel Factor Analysis (PARAFAC), decompõe estatisticamente os vetores tridimensionais de dados em componentes individuais de fluorescência (BRO, 1997). A interseção entre a técnica EEM e tratamento PARAFAC tem sido considerada uma ferramenta poderosa para a caracterização da matéria orgânica e vários trabalhos têm sido publicados nesse sentido (SANTÍN, 2009). Neste trabalho, o modelo PARAFAC foi usado para identificar o número de componentes (através do núcleo de consistência de diagnóstico (CORCONDIA)) e quantificar o *score* de cada componente que é diretamente proporcional à concentração de cada fluoróforo na amostra.

3. Resultados e Discussão

A análise de fluorescência 3D com subsequente decomposição por PARAFAC, permitiu a localização de três componentes, nas quais todas apresentaram picos primários e secundários (estes em parênteses). A Figura 1 evidencia as componentes encontradas e a Figura 2, mostra os *scores* dos componentes para cada amostra analisada. Os *scores* não são concentrações reais, porém são considerados proporcionais às concentrações dos diferentes componentes (BRO, 1997).

A componente 1 apresentou $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 250, (355) / 450$ nm. Este par de picos já foi reconhecido em diversos trabalhos (CORY, MCKNIGHT, 2005; SANTÍN et al., 2009) como picos A (250/450) e C (350/450), sendo estes pertencentes a uma componente húmica terrestre. Cory e McKnight (2005) sugeriram que o pico A têm origem alóctone e refere-se a grupamentos quinona oxidadas. De acordo com Senesi et al. (1991), a intensidade da emissão do pico C, tem relação direta com aumento no número de núcleos aromáticos altamente substituídos e sistemas insaturados conjugados em amostras de solo. Através da Figura 2, é possível ver que este par de sinais aparece com intensidade relativamente semelhante para todas as amostras, aumentando em horizontes mais profundos, o que confirma que o processo de humificação ocorre evoluindo com a profundidade.

A componente 2, apresentou $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 220-240, (290-300) / 390-405$ nm. Singh et al. (2010), encontraram esta componente e atribuíram-na como material não-húmico, de características lábeis e resultantes de produ-

ção biológica em coluna de água. Stedmon e Bro (2003) atribuíram este componente como uma combinação entre o pico-N com o pico-T. Acredita-se que o pico-N representa o material lábil produzido em colunas d'água devido a fitoplanctons. Já o Pico T tem propriedades de fluorescência similares à estrutura do anel de indol do triptofano e assim a fluorescência deste aminoácido, também tem sido associada com a produção biológica em águas de superfície. Assumindo-se que a componente 2 evidencia compostos referentes à atividade microbiana, em análise da Figura 2, é possível que a atividade microbiana seja maior para o P4 do que a para o P5. Em geral, a componente 2 é mais intensa para os horizontes intermediários, seguido pelo horizonte superficial. Ambos os perfis, apresentaram uma queda de atividade para o horizonte mais profundo. A componente também sugere que os horizontes minerais (P4 60-90cm e P5 60-85cm) apresentaram a menor atividade microbiana, o que é esperado, visto que este horizonte tem pouca capacidade de acumular matéria orgânica e portanto, de acumular compostos oriundos da degradação microbiana.

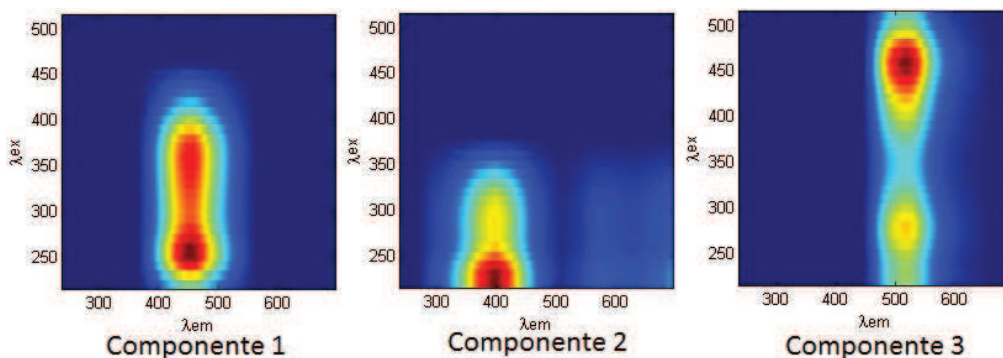


Figura 1. Componentes de fluorescência encontradas após aplicação do PARAFAC.

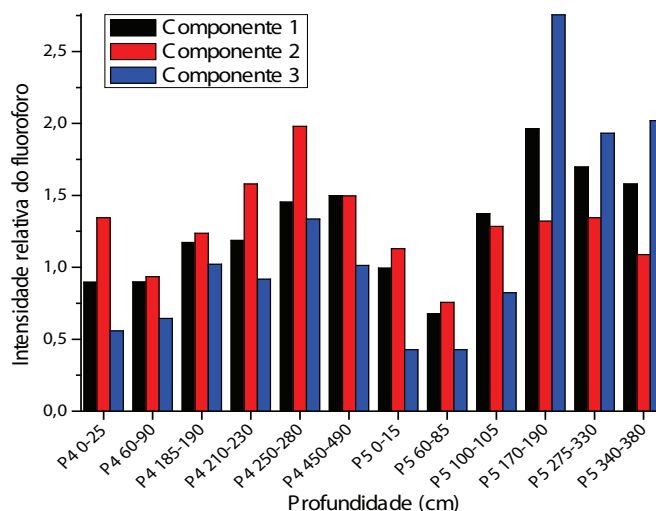


Figura 2. Scores para cada componente e profundidade.

A componente 3 foi encontrada em $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 460, (270) / 510$ nm. Matthews et al. (1996) indicaram que o pico com $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ em 455/510 nm seria ocasionado por ácidos húmicos terrestres derivados de lignina, nomeando-o como "pico L". Existe grande consenso na literatura a respeito de fluoróforos que exibem comprimento de onda de emissão largo e mais longo, na qual essas características são associadas com matéria orgânica terrestre de elevada massa molar e alta quantidade de aromáticos. Cory e McKnight (2005) afirmaram que esta componente é, na verdade, originada pela fluorescência de grupamentos quinona reduzidos. A distribuição dos scores (Figura 2) para a componente 3, segue o mesmo padrão que para as componentes anteriores, em que a intensidade é menor para os dois horizontes superficiais e maior para as amostras em profundidade, variando entre estas amostras. Através desta componente, é possível averiguar que os grupos funcionais referentes a anéis condensados e quinonas reduzidas ocorrem em maior número nas amostras do perfil P5 do que no P4 e majoritariamente para as amostras profundas, evidenciando novamente que o processo de humificação ocorre em maior intensidade nos perfis profundos e ainda com uma maior frequência nos horizontes intermediários dos perfis espodossólicos, onde a atividade microbiana é também mais intensa. Esta componente também aponta que os horizontes superficiais e minerais de ambos os perfis, apresentam baixo grau de humificação.

4. Conclusões

A técnica empregada se mostrou rápida e eficaz para a caracterização da origem dos ácidos húmicos. Através da análise conjunta dos dados obtidos, é possível concluir que os perfis de Espodosolos Amazônicos apresentam uma alta taxa de degradação microbiana em horizontes de 1 a 4 metros de profundidade, onde a matéria orgânica se acumula após passar pelo perfil mineral característico de um Espodosolo. Devido a essa alta atividade, as componentes 1 e 3 mostraram, que os compostos mais recalcitrantes também se acumulam nestas profundidades. Os resultados também indicaram que existe maior acúmulo de quinonas oxidadas no perfil 4 e de quinonas reduzidas no perfil 5, por razões que necessitariam estudos mais precisos acerca das condições redox e microbiológicas daquele ambiente.

Agradecimentos

Ao IQSC-USP, à CAPES pela bolsa, à FAPESP pelo suporte ao projeto de pesquisa, à Embrapa Instrumentação por toda estrutura de suporte para o desenvolvimento da pesquisa e ao Laboratório PROTEE - Processus de Transferts et d'Echanges dans l'Environnement da Universidade de Toulon, pela concessão do software programme para aplicação do PARAFAC.

Referências

- BRO, R. PARAFAC. Tutorial and applications. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 38, 149-171, 1997.
- CORY R.M., MCKNIGHT D.M. Fluorescence spectroscopy reveals ubiquitous presence of oxidized and reduced quinones in dissolved organic matter. *Environmental Science and Technology* 39, 8142–8149, 2005.
- LUCIANI, X. MOUNIER, S. REDON, R. BOIS, A. A simple correction method of inner filter effects affecting FEEM and its application to the PARAFAC decomposition, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 96 (2), 227–238, 2009.
- LUNDSTRÖM, U.S., VAN BREEMEN, N., BAIN, D., 2000. The podzolization process. A review. *Geoderma* 94 (2–4), 91–107.
- MATTHEWS, B.J.H., JONES, A.C., THEODOROU, N.K., TUDHOPE, A.W. Excitation-emission-matrix fluorescence spectroscopy applied to humic acid bands in coral reefs. *Marine Chemistry* 55, 317-332, 1996.
- MELFI, A.J.; PATEL-SORRENTINO, N.; LUCAS, Y.; EYROLLE, F. Fe, Al and Si species and organic matter leached off a ferrallitic and podzolic soil system from Central Amazonia. *Geoderma* 137 (2007) 444–454, 2007.
- 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* 167, 739–749, 2002.
- MONTES, C. R.; LUCAS, Y.; PEREIRA, O. J. R.; ACHARD, R.; GRIMALDI, M.; MELFI, A. J. Deep plant-derived carbon storage in Amazonian podzols. *Biogeosciences* 8, p. 113-120, 2011.
- SANTÍN, C., YAMASHITA, Y., OTERO, X.L., ÁLVAREZ, M.A., JAFFÉ, R. Characterizing humic substances from estuarine soils and sediments by excitation–emission matrix spectroscopy and parallel factor analysis. *Biogeochemistry* 96, 131–147, 2009.
- SENESE, N., MIANO, T.M., PROVENZANO, M.R., BRUNETTI, G. Characterization, differentiation and classification of humic substances by fluorescence spectroscopy. *Soil Science* 152, 259–271, 1991.
- SINGH, S., D'SA E. J., SWENSON, E. M. Chromophoric dissolved organic matter (CDOM) variability in Barataria Basin using excitation–emission matrix (EEM) fluorescence and parallel factor analysis (PARAFAC). *Science of the Total Environment* 408, 3211-3222, 2010.