

## ANÁLISE DE FLUORESCÊNCIA DE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS EXTRAÍDAS DA ÁGUA, SOLO E SEDIMENTO DA LAGOA DOS PATOS - MS

Júlio César Rodrigues de Azevedo\*

Departamento Acadêmico de Química e Biologia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Av. Sete de Setembro, 3165, 87020-901 Curitiba - PR, Brasil

Jorge Nozaki†

Núcleo de Pesquisa em Limnologia Ictiologia e Aqüicultura, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, 87020-900 Maringá - PR, Brasil

Recebido em 7/5/07; aceito em 11/1/08; publicado na web em 31/7/08

FLUORESCENCE ANALYSIS OF HUMIC SUBSTANCES EXTRACTED FROM WATER, SOIL AND SEDIMENT OF THE PATOS LAGOON - MS. The humic substances were extracted from sediments, water and soil close to the Lagoa dos Patos-MS. The characterization was performed through fluorescence emission. In the HSs it is possible to see strong indications of incorporation of compounds originating from lignin degradation, confirmed by fluorescence emission (EEM and synchronous spectra). These differences observed in HSs may be due to tropical regions displaying a great variety of vascular plants and aquatic macrophytes that contribute natural organic matter. The seasonality effect also causes the entrance of pedogenic material and the suspension of sediments by the action of winds.

Keywords: fluorescence; humic acid; fulvic acid.

## INTRODUÇÃO

A matéria orgânica natural (MON) é amplamente distribuída nos solos, águas naturais e sedimentos. Mudanças hidrológicas e da composição do solo influenciam na quantidade de matéria orgânica em ambientes aquáticos e na sua natureza química, podendo provocar diferentes efeitos biogeoquímicos no ecossistema.<sup>1</sup> A MON é constituída por compostos orgânicos aquagênicos e pedogênicos.<sup>2</sup> Proteínas, peptídeos e polissacarídeos ocorrem na proporção de 20 a 30% da MON dissolvida e os compostos refratários (aquagênicos e pedogênicos), principalmente as substâncias húmicas, correspondem de 70 a 80%, sendo o ácido fúlvico, normalmente, o predominante em ambientes aquáticos.<sup>3</sup>

As substâncias húmicas (SHs) podem ser definidas operacionalmente de acordo com sua solubilidade em água. O ácido húmico (AH) é insolúvel em condições ácidas (pH < 2); o ácido fúlvico (AF) é solúvel em toda a faixa de pH e a humina é insolúvel em qualquer valor de pH.<sup>4</sup> As SHs são de ocorrência natural (biogênicas), heterogêneas, apresentam coloração escura,<sup>5</sup> são refratárias e com elevada massa molecular.<sup>6</sup> As SHs são macro-moléculas complexas, constituídas de diferentes estruturas aromáticas e alifáticas, ricas em grupos funcionais, contendo oxigênio.<sup>1,4</sup> Estas estruturas estão ligadas a peptídeos e a outros compostos contendo nitrogênio e carboidratos em pequenas quantidades.<sup>7</sup>

Atualmente, é proposto por Piccolo<sup>8</sup> que as SHs são associações supramoleculares de moléculas heterogêneas relativamente pequenas. Este agregado não está associado por ligações covalentes, mas por interações mais fracas como as de Van der Waals,  $\pi$ - $\pi$ , CH- $\pi$  e pontes de hidrogênio. Segundo o autor, os AFs são originados, principalmente, pela associação de pequenas moléculas hidrofílicas que apresentam grupos funcionais ácidos, os quais mantêm seus constituintes solúveis em qualquer faixa de pH. Já os AHs são originados, principalmente,

pela associação de compostos hidrofóbicos, que são estáveis em pH neutro devido às forças dispersivas hidrofóbicas (Van der Waals,  $\pi$ - $\pi$  e CH- $\pi$ ). Com a diminuição do pH, ocorre aumento progressivo da estrutura molecular dos AHs, através das interações por pontes de hidrogênio, até ocorrer sua floculação em baixos valores de pH.

Por sua estrutura complexa e variável, as SHs apresentam importante papel ambiental na biodisponibilidade de metais; no transporte, acúmulo e concentração de espécies metálicas;<sup>9</sup> na interação com compostos orgânicos antropogênicos; na cadeia alimentar planctônica, através da alteração da turbidez e da interação com nutrientes, modificando a produção primária; como fonte de carbono para a cadeia alimentar e, também, na alteração da zona fótica.<sup>3,5,10</sup>

Normalmente, as SHs em lagos são de origem terrestre, mas podem ser provenientes de plantas aquáticas da região litorânea (macrófitas aquáticas) ou do fitoplâncton.<sup>5</sup> A principal diferença é a presença de lignina modificada existente nas SHs derivadas do solo, apresentando grande quantidade de anéis aromáticos e grupos contendo oxigênio. Já as SHs derivadas das algas apresentam maior quantidade de carbono alifático.<sup>1</sup> Estas diferenças estruturais são as principais responsáveis pelas diferenças nas análises espectroscópicas na região do ultravioleta e visível e na emissão de fluorescência.

As técnicas espectroscópicas de absorvância (UV-Vis) e de emissão de fluorescência têm sido aplicadas, nas últimas décadas, para caracterizar, diferenciar e classificar a matéria orgânica natural. Para caracterizar a MON ou as SHs, são empregadas relações entre as absorvâncias em diferentes comprimentos de ondas, como o quociente  $E_{250}/E_{365}$  (250/365 nm) que é inversamente proporcional ao tamanho molecular e à aromaticidade.<sup>11</sup> Artinger *et al.*<sup>6</sup> determinaram os valores da razão  $E_{300}/E_{400}$  ( $L\ g^{-1}\ cm^{-1}$ ) das SHs, obtendo para AH < 3,5 e AF > 3,5, onde os AHs apresentam maior absorvância específica e menor valor da razão de  $E_{300}/E_{400}$ , indicando aumento do grau de humificação, aromaticidade e massa molecular.

Quando as SHs são fracionadas, de acordo com sua massa molecular, diferenças na absorvância e fluorescência são observadas. As frações de menor massa molecular apresentam maior intensidade

\*e-mail: jrcrazevedo@utfpr.edu.br

†In memoriam

de fluorescência (IF) e menor absorvância que as frações de maior massa molecular.<sup>12,13</sup> Uma possível explicação para este fenômeno é o fechamento da posição das subunidades hidrofóbicas, dentro da estrutura supramolecular, mascaradas pelos grupos hidrofílicos.<sup>14,15</sup> Embora as razões deste fato não sejam bem claras, podem ser usadas para compreender as mudanças espectrais nas frações das SHs. Quando a amostra apresenta fluorescência com baixa intensidade em comprimento de onda mais longo, normalmente refere-se aos ácidos húmicos.<sup>14</sup>

Chen *et al.*<sup>16</sup> estudaram as subfrações da matéria orgânica natural dissolvida e do ácido húmico extraído do solo, onde observaram: o AH apresenta um comprimento de onda máximo de emissão acima de 450 nm e as frações da MON rica em carboidratos (MON-CH) e em polifenóis (MON-PP) apresentam emissão entre 435 e 450 nm. A baixa intensidade de fluorescência do AH indica a presença de anéis aromáticos condensados e estruturas insaturadas, com alto grau de conjugação. Para a MON-CH e MON-PP, a intensidade máxima em menor comprimento de onda é associada ao baixo conteúdo aromático e menor massa molecular. Já Rivero *et al.*<sup>17</sup> consideram que o deslocamento da intensidade máxima de fluorescência, para comprimentos de onda mais longos, é atribuído aos substituintes nos anéis aromáticos.

Alguns picos obtidos nos espectros de varredura sincronizada também são empregados nos estudos das SHs. O pico entre 270-310 nm é considerado como semelhante a proteínas (triptofano e tirosina)<sup>16,18</sup> ou proveniente da emissão de fluorescência de compostos monoaromáticos.<sup>18</sup> Peuravuori *et al.*<sup>16</sup> consideram este pico (270-310 nm) proveniente da emissão de fluorescência de aminoácidos aromáticos ou ácidos voláteis, contendo estruturas alifáticas com ligações conjugadas. Para Ferrari e Mingazzini,<sup>18</sup> o pico de 310-370 nm está relacionado a dois anéis aromáticos; de 370-400 nm, ao ácido fúlvico; de 470 nm ou mais, ao ácido húmico. Já Peuravuori *et al.*<sup>16</sup> dividem o espectro de varredura sincronizado ( $\Delta\lambda = 18$  nm) em: 330/348 nm (excitação/emissão) característico de compostos com 2 anéis aromáticos (semelhantes aos naftalenos); 355/373 nm policíclicos aromáticos com 3 ou 4 anéis; 400/418 policíclicos aromáticos com 5 anéis; 460/478 policíclicos aromáticos com 7 ou mais anéis, ou de lignina que emitem fluorescência nesta região.

Os espectros de emissão em vários comprimentos de onda de excitação resultam na matriz excitação-emissão (MEE), fornecendo informações que podem ser usadas para identificar os compostos fluorescentes presentes na mistura complexa.<sup>19,20</sup>

No presente trabalho, foram utilizadas as técnicas espectroscópicas na região do UV-Vis e de emissão de fluorescência, para verificar possíveis diferenças entre as substâncias húmicas (AFs e AHs) extraídas da água, solo e sedimento da Lagoa dos Patos – MS. Também foram extraídas as SHs (AF e AH), em jan/03 e jul/03, com a finalidade de verificar possíveis alterações provenientes da sazonalidade (águas altas e baixas).

## PARTE EXPERIMENTAL

### Área de estudo

A planície de inundação do alto Rio Paraná é composta por um grande número de ambientes aquáticos, podendo-se destacar canais secundários, ressacos, distributários com características de *habitats* semi-lóticos, lagoas temporárias e permanentes.<sup>21</sup> Estes ambientes apresentam uma considerável variabilidade quanto às características limnológicas, que estão associadas ao grau de conexão (ou isolamento) com os rios, ao potencial de ação do vento (*fetch*), profundidade e, primariamente, ao regime hidrológico dos Rios Paraná e Ivinheima.<sup>22</sup>

A coleta de água foi realizada no ponto P1 em jan/03 e as amostras de solo (S1) e sedimentos foram coletadas, em jan/03 (P2, P3, P4 e P5) e jul/03 (P3, P5), na Lagoa dos Patos/MS, localizada a 22°43' 12"S e 53°17' 37"W, pertencente à planície de inundação do alto Rio Paraná. Trata-se de uma lagoa pequena (1,14 km<sup>2</sup>), com profundidade média de 3,50 m e que apresenta conexão permanente, por um canal com 8 m de largura, com o Rio Ivinheima. Sua margem é composta por vegetação arbórea, herbácea e macrófitas aquáticas, especialmente *Eichhornia crassipes* e *Eichhornia azurea*. Como o Rio Ivinheima não se encontra represado, comporta-se como um sistema de transporte e distribuição de material particulado, influenciando, assim, nas características do carbono orgânico alóctone e autóctone.<sup>21,23</sup> O valor da razão entre  $A_{285}/\text{COD}$  ( $32.11 \pm 10.04 \text{ L g}^{-1}$ ) e a de fluorescência com excitação em 370 nm ( $\text{FR} = 450/500 = 1.49 \pm 0.02$ ,  $\text{PW} > 452.5 \pm 1.8$ ) indica que o carbono orgânico dissolvido (COD), na Lagoa dos Patos, apresenta grande quantidade de substâncias húmicas dissolvidas, principalmente, ácido fúlvico de fonte alóctone.<sup>23</sup>

### Coleta e preparo das amostras

As amostras de sedimentos foram coletadas na profundidade de 20 cm com draga de Petersen modificada, homogeneizadas e transferidas para os sacos de amostragem Whirl Pack, que foram vedados e preservados a  $-20$  °C. A amostra de solo (S2) foi coletada na área que separa o Rio Ivinheima da Lagoa dos Patos – MS, na camada superficial do solo (20 cm). Do sedimento e do solo, as substâncias húmicas foram extraídas de acordo com o método da Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas (IHSS), sendo extraídos os ácidos fúlvico e húmico nas amostras de jan/03 (P2 ao P5, S1) e jul/03 (P3, P5 e S1).

Os ácidos fúlvico e húmico da água (P1) foram extraídos segundo o método de Thurman e Malcolm,<sup>24</sup> de 150 L de água filtrada (0,45 µm), acidificada (pH 2,0) com HCl. As substâncias húmicas extraídas da água receberam a sigla AF-LP (ácido fúlvico extraído da água da Lagoa dos Patos) e AH-LP (ácido húmico extraído da água da Lagoa dos Patos).

As análises espectroscópicas de fluorescência e de absorvância na região do UV-Vis foram realizadas nas amostras de AF (10 mg L<sup>-1</sup> em termos de COD) e AH (20 mg L<sup>-1</sup> em termos de COD) em pH próximo de 7,0. Os espectros da absorvância foram obtidos no equipamento Cary 50 da Varian e as análises de fluorescência no Fluorescence Spectrophotometer F-4500 Hitachi. Foram obtidos espectros de emissão (excitação em 314 e 370 nm); de excitação (emissão em 520 nm); de varredura sincronizada ( $\Delta\lambda = 18$  nm) e os de matriz excitação-emissão, com varredura de 200 a 500 nm de excitação e de 300 a 600 nm de emissão. Todos os espectros de fluorescência foram obtidos aplicando-se 240 nm min<sup>-1</sup>, fenda de 5 nm, cubeta de quartzo de 1 cm e água Milli-Q como branco. A intensidade do pico Raman da água Milli-Q foi usada para verificar mudanças no sinal da IF. Os espectros das amostras foram subtraídos do espectro da água Milli-Q (branco) e normalizados pelo carbono orgânico dissolvido (mg L<sup>-1</sup>).

As análises de RMN foram realizadas com o espectrômetro Varian, modelo Mercury plus BB, 300 MHz, utilizando a técnica de polarização cruzada e rotação no ângulo mágico CP/MAS de <sup>13</sup>C, empregando uma sonda para sólido da Varian CP/MAS, 7 mm. A frequência de ressonância foi 75,457 MHz (<sup>13</sup>C), tempo de contato para polarização cruzada de 1 ms e tempo de repetição de 2,5 s, obtendo-se 10000 pontos. Os deslocamentos químicos foram medidos em relação ao tetrametilsilano (TMS) via hexametil-benzeno (HMB) como referência secundária (pico da metila em 17,3 ppm), acumulando-se 8000-12000 repetições. As amostras foram medidas em rotor de nitreto de silício (Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub>) de 7 mm de diâmetro e tampa de Torlon, com frequência de rotação em torno de 5 kHz.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Espectroscopia de absorção na região do ultravioleta e visível

Os resultados dos espectros da absorvância na região ultravioleta e visível das amostras dos ácidos fúlvicos e dos ácidos húmicos foram semelhantes aos obtidos por Artinger *et al.*<sup>6</sup> As amostras de AHs apresentaram maior absorvância específica e menor razão ( $E_{300}/E_{400}$ ), ao comparar com as amostras de AFs, indicando maior grau de humificação, aromaticidade e massa molecular dos AHs em relação aos AFs. Estes resultados também mostram diferenças existentes entre os AHs e AFs extraídos, de acordo com o ponto amostrado. Entre os AHs, o do ponto da várzea (AH-P3) foi o que apresentou maior absorvância específica, provavelmente, devido à grande quantidade de lignina na sua composição ou à incorporação recente de substâncias hidrofóbicas que absorvem nesta região. O AH de menor absorvância foi o extraído da água (AH-LP), indicando assim uma menor quantidade de grupos aromáticos condensados, ou seja, menos hidrofóbico.

### Espectroscopia de fluorescência

Os espectros de emissão das substâncias húmicas foram semelhantes aos encontrados na literatura.<sup>12,14,16</sup> Dos espectros de emissão dos AFs, o extraído da água da lagoa (AF-LP) apresentou menor IF com excitação em 314 e em 370 nm, devido ao menor número de fluoróforos que emitem fluorescência nestes comprimentos de excitação. Esta alteração da IF indica que o AF-LP apresenta estrutura orgânica menos complexa (menor quantidade de anéis aromáticos condensados na sua composição), a qual pode ser confirmada pelos resultados da razão  $E_{300}/E_{400}$  e pela análise de RMN <sup>13</sup>C, onde o AF-LP apresentou 23,2% de carbono aromático (Tabela 1).

O pico da intensidade máxima de emissão ( $\lambda_{\text{ex}} = 370$  nm) dos AFs ocorreu próximo de 450 nm e dos AHs, próximo de 500 nm. O deslocamento do pico de emissão máxima, obtido nos AHs, indica maior conteúdo aromático que nos AFs, o qual está de acordo com resultados obtidos por outros autores.<sup>12,14,25</sup> Apesar dos AHs apresentarem maior quantidade de anéis aromáticos, sua baixa IF pode ser, em parte, atribuída ao grande número de substituintes nas estruturas aromáticas, às ligações intra e intermoleculares e à aproximação dos cromóforos aromáticos.<sup>12,13,16</sup> Outra possível explicação para este fenômeno é o fechamento da posição das subunidades hidrofóbicas, dentro do esqueleto estrutural, mascaradas pelos grupos hidrofílicos. Embora as razões deste fato não sejam bem claras, podem ser usadas para compreender as mudanças espectrais nas frações das SHs. Quando a amostra apresenta fluorescência com baixa intensidade e em comprimento de onda ( $\lambda$ ) mais longo, normalmente são referentes aos ácidos húmicos.<sup>14,15</sup> Chen *et al.*<sup>16</sup> consideram também que a intensidade máxima de emissão depende do comprimento de onda de excitação, o que foi observado para o AF-S1 e AH-S1.

Para distinguir AF derivado da atividade microbiana dos derivados terrestres, tem-se proposto a determinação do indexador FR, que é a razão da IF emitida nos comprimentos de onda de 450 e 500 nm ( $Em_{450}/Em_{500}$ ).<sup>1,16</sup> Os AFs provenientes da atividade microbiana, geralmente, contêm menor quantidade de anéis aromáticos e maior razão FR (próxima de 1,9) e os de origem terrestre apresentam maior conteúdo aromático e menor razão FR (próxima de 1,4). Os valores de FR (Tabela 1) indicam que os AFs apresentam características de origem terrestre, com exceção do AF-P3, que apresentou valor superior a 1,4, indicando mistura de AF alóctone-autóctone, provavelmente devido à influência da várzea, onde ocorre decomposição de plantas aquáticas ou terrestres de menor porte (gramíneas e arbustos), indicando assim incorporação recente de compostos na sua estrutura

**Tabela 1.** Valores das razões entre a absorvância específica ( $E_{250}/E_{365}$ ;  $E_{300}/E_{400}$ ;  $E_{253}/E_{203}$ ), grau de aromaticidade percentual ( $\alpha$ ), da intensidade de fluorescência ( $IF/A_{285}$ ), FR e dos principais picos dos espectros MEE, das amostras de jan/03 e jul/03 (a)

Amostra	$E_{250}/E_{365}$	$E_{300}/E_{400}$	$E_{253}/E_{203}$	* $\alpha_{\text{arom.}}$	FR	Pico A	Pico C	Pico L
AF-LP	4,9	5,5	0,43	23,2	1,30	5,3	20,6	-
AF-P2	4,0	4,6	0,54	31,8	1,29	12,7	18,0	-
AF-P3	5,1	5,0	0,34	25,8	1,53	4,4	19,4	-
AF-P4	4,3	4,4	0,53	30,7	1,30	5,2	16,2	-
AF-P5	4,6	4,5	0,50	27,6	1,18	3,8	18,0	-
AF-S1	4,7	5,0	0,42	24,5	1,44	4,2	21,3	-
AH-LP	3,0	3,2	0,44	28,0	0,96	1,9	3,0	2,9
AH-P2	2,5	2,7	0,49	29,8	0,72	1,4	3,0	3,8
AH-P3	2,7	3,0	0,67	26,1	0,73	0,8	5,7	8,7
AH-P3 <sup>(a)</sup>	2,8	3,1	0,58	26,4	0,79	0,9	2,9	4,0
AH-P4	2,6	2,8	0,58	30,0	0,78	4,1	4,4	2,7
AH-P5	2,7	2,8	0,68	27,5	0,95	1,7	3,0	3,5
AH-P5 <sup>(a)</sup>	2,6	2,6	0,56	30,7	0,91	-	-	-
AH-S1	2,4	2,5	0,54	30,9	0,82	1,0	1,8	2,2
AH-S1 <sup>(a)</sup>	2,6	2,7	0,50	31,1	0,87	1,1	1,4	1,4

Pico A =  $Ex_{260-270}/Em_{390-410}$ ; Pico C =  $Ex_{310-320}/Em_{440-500}$ ; Pico L =  $Ex_{435-450}/Em_{500-510}$ ; FR: razão das IF com  $Em_{450}/Em_{500}$  e excitação de 370 nm; \*% das estruturas aromáticas determinadas por RMN <sup>13</sup>C. (a) indica ácido húmico extraído das amostras de jul/03.

supramolecular.

Foram observadas diferenças distintas entre os espectros de excitação dos AHs em relação aos AFs. Os espectros de excitação dos ácidos húmicos apresentaram dois picos, um próximo de 320 nm e o mais intenso próximo de 460 nm. A emissão em comprimentos de onda de excitação mais curtos (360 nm) pode ser interpretada, principalmente, como presença de anéis aromáticos com estruturas mais simples na sua composição. Já os picos em comprimentos de onda mais longos (400 nm), podem ser provenientes da emissão de fluoróforos formados por anéis aromáticos condensados e/ou conjugação de anéis aromáticos simples.<sup>26</sup>

Segundo Senesi,<sup>14</sup> os espectros de excitação dos AFs de origem terrestre (pedogênicos) apresentam, somente, banda próximo de 390 nm; da água de rio ocorre entre 360-375 ou entre 325-350 nm e, os de solos, da atividade microbiana, exibem dois picos, um em 336 e outro em 417 nm. Através das características dos espectros é possível verificar que o AF-P2 (sedimento, margem do barranco) apresenta fluoróforos semelhantes ao do AF-S1 (solo) e os demais AFs apresentam deslocamento para o azul. Assim, os AFs apresentam espectros com características de mistura de substâncias pedogênicas e aquagênicas (atividade microbiana na várzea ou no sedimento), principalmente os AF-P3 e AF-P5, provavelmente, incorporando substâncias originadas da decomposição da matéria orgânica autóctone. O AF-P5 foi extraído de material coletado no local que apresenta maior influência das macrófitas aquáticas, alterando assim sua estrutura supramolecular. O AF-P3 foi extraído de material coletado no local que sofre influência da várzea, a qual pode estar afetando a sua estrutura supramolecular, através da incorporação de matéria orgânica recentemente decomposta, o que estaria de acordo com a teoria de Piccolo.<sup>8</sup>

Nas Figuras 1 e 2, constam os espectros de varredura sincronizada dos ácidos fúlvicos (Figura 1) e húmicos (Figura 2) extraídos da água da lagoa (LP), do solo (S1) e do sedimento (P2 ao P5). Os espectros dos AHs apresentaram a mesma forma (pico próximo de 475 nm), mas com IF emitidas diferentemente, sendo o AH-S1 o que apresentou menor IF, confirmando que este ácido húmico apresenta maior quantidade de anéis aromáticos que os demais ácidos húmicos (Tabela 1). O espectro



do AF-P3 apresenta o máximo de emissão em 386 nm, indicando, assim, que sua estrutura é formada por fluoróforos mais simples. Os demais AFs apresentaram bandas espectrais semelhantes aos do AF-S1, indicando a presença de fluoróforos similares. Apesar dos espectros dos ácidos fúlvicos apresentarem bandas largas, a IF próxima de 440 nm pode ser atribuída a polifenóis, e a banda de 440 a 480 nm indica a presença de compostos de maior massa molecular e com anéis aromáticos policondensados.<sup>16</sup>

Na Figura 3, consta o espectro da matriz excitação-emissão (MEE) do ácido fúlvico extraído da água da lagoa (AF-LP), sendo que os demais AFs exibiram praticamente a mesma forma, alterando somente o valor da IF emitida. Na Figura 4, consta o espectro do ácido húmico extraído do sedimento no ponto P3, o qual foi semelhante aos espectros dos AHs dos pontos P2, P5 e S1. Na Figura 5, consta o espectro do ácido húmico extraído da água (AH-LP), o qual foi semelhante ao do sedimento no ponto P4 (várzea). Os principais picos, nos espectros MEE, dos AFs (Figura 3) são o pico C ou  $\alpha$  ( $\lambda_{Em}/\lambda_{Ex} = 440/315$ ) e o pico A ou  $\alpha'$  com menor intensidade (Tabela 1), os quais já são bastante estudados e discutidos na literatura em detalhes.<sup>16,19</sup> Os AHs apresentaram o principal pico em  $\lambda_{Em}/\lambda_{Ex} = 445/510$  que, de acordo com Matthews *et al.*,<sup>20</sup> são típicos de AHs terrestres derivados da lignina (denominados de pico L neste estudo). Os AHs exibiram também o pico C ( $\lambda_{Em}/\lambda_{Ex} = 500/320$ ) e o pico A ( $\lambda_{Em}/\lambda_{Ex} = 270/410$ ), normalmente com menor IF, com exceção do AH-P4 e AH-LP (Figura 4), que apresentam o pico C com maior IF.

Pelos espectros de MEE, observa-se grande diferença entre os cromóforos que emitem fluorescência nos AFs e AHs, confirmando as diferenças no grau de humificação e aromaticidade das SHs. Estes espectros também mostram que os AHs apresentam grande quantidade

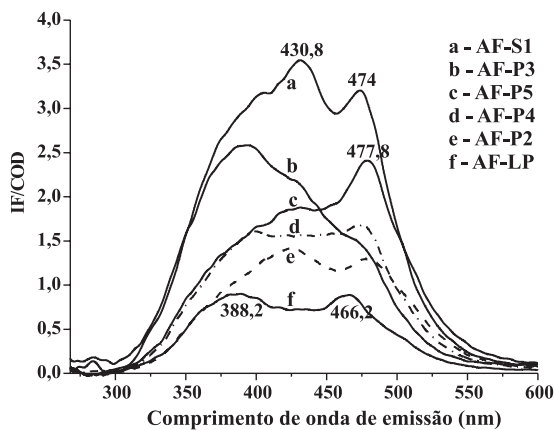


Figura 1. Espectros sincronizados ( $\Delta\lambda = 18$  nm) dos ácidos fúlvicos

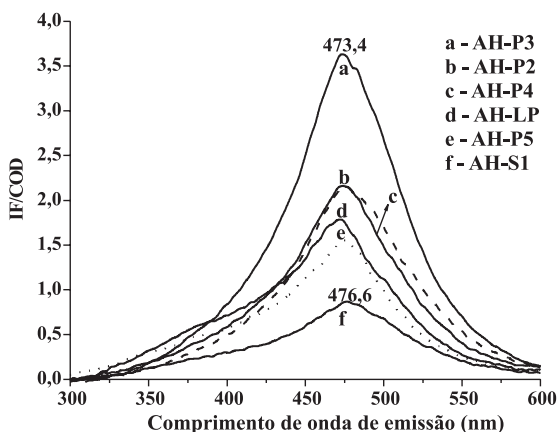


Figura 2. Espectros sincronizados ( $\Delta\lambda = 18$  nm) dos ácidos húmicos (B)

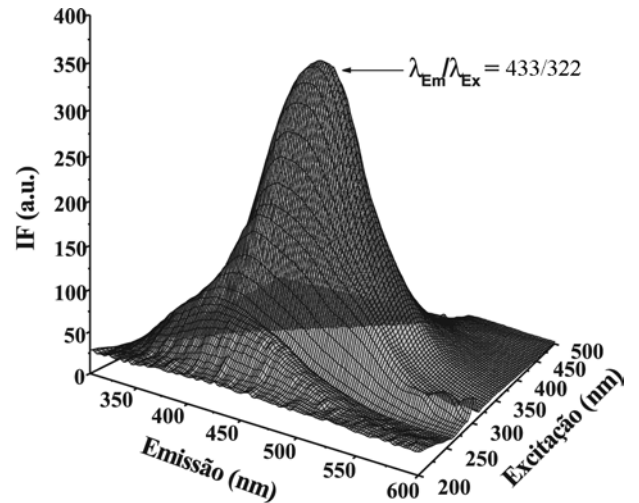


Figura 3. Espectro 3D da amostra de ácido fúlvico extraído da água (AF-LP)

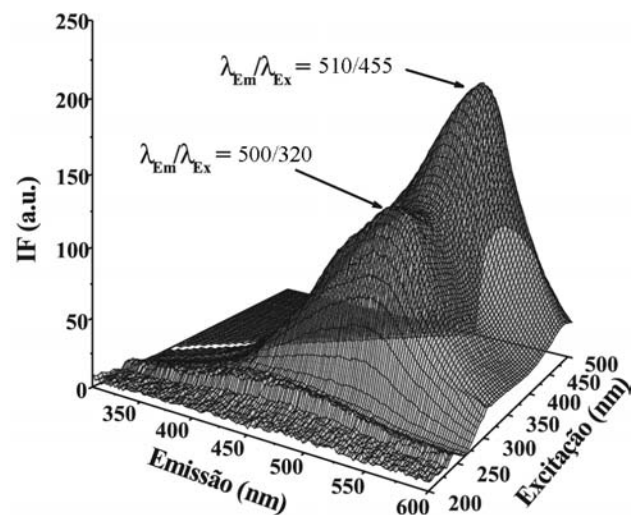


Figura 4. Espectro 3D da amostra de ácido húmico extraído do sedimento do ponto P3

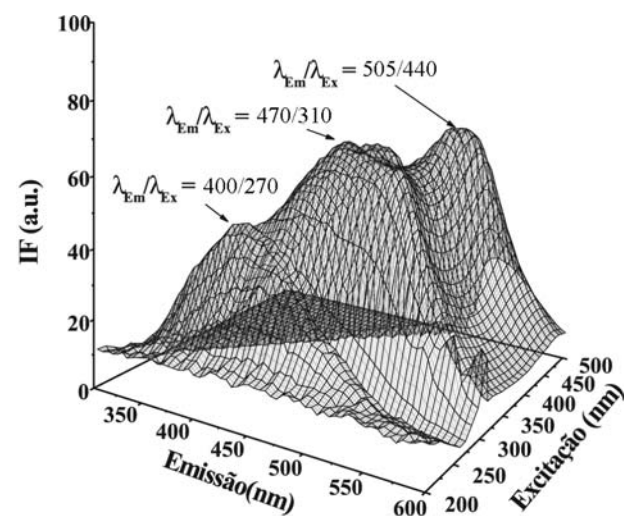


Figura 5. Espectro 3D da amostra de ácido húmico extraído da água (AH-LP)

de material proveniente da lignina indicando, assim, que o material húmico foi depositado recentemente e está, provavelmente, em fase de humificação.

A menor IF emitida pelas substâncias húmicas (AF e AH) pode estar relacionada a alguns fatores: maior massa molecular com maior quantidade de anéis aromáticos condensados (AH-S1); menor quantidade de fluoróforos e maior quantidade de grupos substituintes doadores de elétrons existentes nos anéis aromáticos (AH-P5). A correlação positiva ( $r = 0,9514$ ,  $p < 0,001$ ) entre a razão  $E_{300}/E_{400}$  e FR (razão da IF emitida  $Em_{450}/Em_{500}$ , excitação em 370 nm) confirma que a IF emitida está relacionada com o grau de humificação da substância húmica (tamanho molecular e conteúdo aromático). Também foi observada correlação negativa ( $r = -0,6995$ ,  $p < 0,005$ ) entre o valor de FR com a relação  $E_{254}/E_{203}$ , que segundo Korshin *et al.*,<sup>27</sup> a razão  $E_{254}/E_{203}$  é pequena para o benzeno e aumenta quando os anéis aromáticos apresentam substituições indicando, assim, que o valor de FR também está relacionado com a substituição existente no anel aromático. Neste caso, provavelmente, as SHs contêm estruturas aromáticas com substituintes de grupos funcionais que apresentam pares de elétrons doadores ( $-OH$ ,  $-NH_2$ ,  $-OCH_3$ ), os quais provocam o deslocamento de máxima emissão para comprimentos de onda mais longos.

Neste estudo, foi observado que o conteúdo aromático apresentou correlação positiva ( $r = 0,8071$ ,  $p < 0,05$ ) com a IF emitida (excitação em 314 nm, emissão 450 nm) e com excitação em 370 nm ( $r = 0,8052$ ,  $p < 0,05$ ) para os ácidos fúlvicos extraídos (Figura 6) e para os ácidos húmicos a correlação foi negativa ( $r = -0,9219$ ,  $p < 0,05$ ). Ao correlacionar o conteúdo aromático com os valores de intensidade máxima emitida nos espectros da matriz excitação-emissão, foi observada correlação negativa para os AFs ( $r = -0,8634$ ,  $p < 0,05$ ) e para os AHs ( $r = -0,8366$ ,  $p < 0,05$ ). Neste caso, a afirmação que as intensidades de fluorescência diminuem em função do tamanho molecular ou do conteúdo aromático pode levar a um erro de interpretação, pois no caso dos ácidos fúlvicos aqui estudados (Figura 6), esta afirmação só pode ser considerada quando é relacionada com o comprimento de onda de excitação que fornece a máxima emissão. Já este efeito não foi observado na correlação entre o conteúdo aromático e a razão  $E_{300}/E_{400}$ , a qual foi negativa tanto para os AFs ( $r = -0,8530$ ,  $p < 0,05$ ) como para AHs ( $r = -0,7712$ ,  $p < 0,05$ ).

O efeito da sazonalidade na composição da SHs pode ser observado na Tabela 1, onde constam os resultados dos AH extraídos em duas datas (jan/03 e jul/03) de alguns pontos (AH-P3, AH-P5 e

AH-S1). Através dos resultados desta tabela, foi possível constatar: os valores das razões das absorvâncias do AH-P3 (jan/04) indicam que este AH apresenta menor grau de humificação que o AH-P3a (jul/03), confirmado pelo menor conteúdo aromático ( $^{\circ}\alpha_{arom}$ ) e maior intensidade do Pico L (espectro MEE). Este resultado caracteriza a influência do período de águas altas na composição da SH. Esta alteração ocorreu, provavelmente, devido à incorporação de compostos provenientes da decomposição da várzea, que foram incorporadas na sua estrutura supramolecular; para o AH extraído no P5, este efeito é mais evidente. Observa-se que o AH-P3a (jul/03) apresenta um maior conteúdo aromático (30,7%) em relação ao AH-P5 da amostra de jan/07 (27,5%) indicando, assim, que no período de decomposição (jan/03), o AH-P5 apresenta maior conteúdo de compostos de cadeia alifática na sua estrutura supramolecular, incorporando substâncias decompostas da produtividade primária (macrófitas aquáticas), a qual possui maior quantidade de estruturas alifáticas.

Foi observada também a influência do local amostrado, considerando a mesma data de coleta. As SHs extraídas (AF e AH) do P2 (influenciado pelo barranco que separa o Rio Ivinheima da Lagoa dos Patos) e P4 (influenciado pela várzea) apresentaram maior conteúdo aromático que as SHs do P5 (ponto com grandes quantidades de macrófitas aquáticas), indicando que, no local onde ocorre maior decomposição de resíduos de macrófitas aquáticas, as SHs apresentaram maior cadeia alifática e alterações nas análises espectroscópicas.

## CONCLUSÕES

As diferenças entre os ácidos fúlvicos e húmicos foram evidentes pelas análises espectroscópicas aplicadas neste estudo. Os ácidos húmicos apresentaram maiores conteúdos aromáticos e massa molecular. Entre os ácidos fúlvicos obtidos, as principais características foram observadas para o AF-LP, o qual apresentou maior quantidade de carbono alifático (63%) e cadeia carbônica mais longa (RMN  $^{13}C$ ), que foi comprovada pela menor intensidade de fluorescência emitida com excitação em 314 e 370 nm, indicando que o mesmo apresenta menor quantidade de fluoróforos e menor quantidade de compostos hidrofóbicos incorporados na sua estrutura supramolecular. Todos os AHs apresentaram bandas semelhantes nos espectros de emissão, de excitação e sincronizados, variando somente a intensidade de fluorescência. Já os espectros MEE apresentaram diferenças, principalmente provenientes das suas massas moleculares e da quantidade de fluoróforos. Este tipo de espectro (MEE) também indicou que todos os AHs apresentam compostos provenientes da degradação de lignina.

Estas diferenças observadas nas substâncias húmicas extraídas da Lagoa dos Patos podem ser, em parte, explicadas pela influência do meio ambiente, principalmente pelo fato de que lagoas em regiões de clima tropical apresentam grande variedade de vegetais vasculares e macrófitas aquáticas que contribuem com a MON aquática e, conseqüentemente, com as substâncias húmicas, comprovado pelas diferenças observadas nos AFs e AHs extraídos nos pontos P3 (influência da várzea) e P5 (influência de macrófitas aquáticas). A sazonalidade também pode afetar, pois nos períodos de chuvas ocorre o arraste de material pedogênico da bacia hidrográfica e a entrada de material proveniente da decomposição que ocorre na várzea. Nos períodos de águas baixas, ocorre a influência do aumento da produtividade primária e a ressuspensão do sedimento pela ação de ventos, alterando, assim, a quantidade de material alóctone e autóctone incorporado na estrutura supramolecular das substâncias húmicas.

## MATERIAL SUPLEMENTAR

No material suplementar, disponível gratuitamente em <http://quimicanova.sbq.org.br> na forma de arquivo PDF, encontram-se

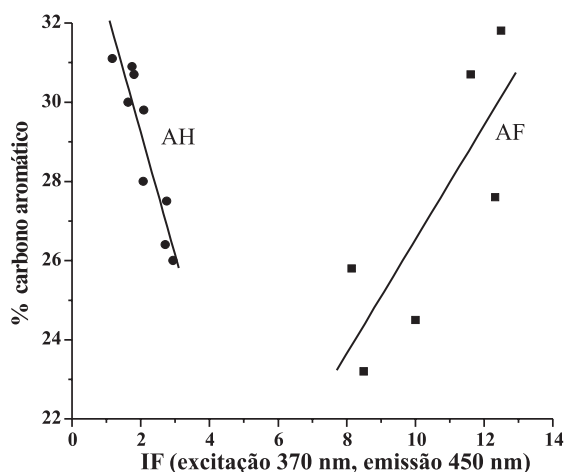


Figura 6. Relação entre o conteúdo aromático (%) com a intensidade de fluorescência emitida em 470 nm com excitação 370 nm

os seguintes dados: mapa da localização da Lagoa dos Patos/MS (Figura 1S); gráfico da absorvibilidade específica em 300 nm das SHs extraídas (Figura 2S); espectros de emissão dos AFs (Figura 3S) e dos AHs (Figura 4S) com excitação em 314 e 370 nm; espectros de excitação (emissão em 520 nm) dos AFs e AHs (Figura 5S); espectro 3D (MEE) da amostra de AH extraído do solo (Figura 6S) e relações do conteúdo aromático (%) com a IF dos espectros MEE das SHs e com a razão  $E_{300}/E_{400}$  (Figura 7S).

## AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq) e à Fundação Araucária pelo suporte financeiro. Ao Prof. Dr J. Nozaki (1940-2006) pela amizade e orientação.

## REFERÊNCIAS

- Aiken, G.; Cotsaris, E.; *J. Am. Water Works Assoc.* **1995**, *1*, 36; Westerhoff, P.; Anning, D.; *J. Hydrol.* **2000**, *236*, 202.
- Buflé, J.; Zali, O.; Zumstein, J.; Vitre, R.; *Sci. Total Environ.* **2000**, *64*, 41.
- Zumstein, J.; Buflé, J.; *Water Res.* **1989**, *23*, 229; Rocha, J. C.; Rosa, A. H.; *Substâncias húmicas aquáticas: interações com espécies metálicas*, UNESP: São Paulo, 2003.
- Mobed, J. J.; Hemmingsen, S. L.; Autry, J. L.; McGown, L. B.; *Environ. Sci. Technol.* **1996**, *30*, 3061.
- Jones, R. I.; *J. Hydrobiol.* **1992**, *229*, 73.
- Artinger, R.; Buckau, G.; Geyer, S.; Fritz, P.; Wolf, M.; Kim, J. I.; *Appl. Geochem.* **2000**, *15*, 97.
- Hayes, M. H. B.; Clapp, C. E.; *Soil Sci.* **2001**, *166*, 723.
- Piccolo, A.; *Adv. Agronomy* **2002**, *75*, 57; Conte, P.; Spaccini, R.; Smejkalová, D.; Nebbioso, A.; Piccolo, A.; *Chemosphere* **2007**, *69*, 1032 doi:10.1016/j.chemosphere.2007.04.043.
- Sargentini, E.; Rocha, J. C.; Rosa, A. H.; Zara, L. F.; Santos, A.; *Quim. Nova* **2001**, *24*, 339; Rosa, A. H.; Goveia D.; Bellin, I. C.; Tonello, P. S.; Antunes M. L. P.; Dias Filho, N. L.; Rodrigues Filho, U. P.; *Quim. Nova* **2007**, *30*, 59.
- Rosa, A. H.; Rocha, J. C.; Furlan, M.; *Quim. Nova* **2000**, *23*, 472.
- Chen, J.; Gu, B.; Leboeuf, E. J.; Pan, H.; Dai, S.; *Chemosphere* **2002**, *48*, 59.
- Miano, T. M.; Sposito, G.; Martin, J. P.; *Soil Sci. Soc. Am. J.* **1988**, *52*, 1016.
- Stewart, A. J.; Wetzel, R. G.; *Limnol. Oceanogr.* **1980**, *25*, 559; Wang, Z. D.; Pant, B. C.; Langford, C. H.; *Anal. Chim. Acta* **1990**, *232*, 43.
- Senesi, N.; *Anal. Chim. Acta* **1990**, *232*, 77.
- Miano, T. M.; Senesi, M.; *Sci. Total Environ.* **1992**, *117/118*, 41; Hautala, K.; Peuravuori, J.; Pihlaja, K.; *Water Res.* **2000**, *34*, 246.
- Peuravuori, J.; Koivikko, R.; Pihlaja, K.; *Water Res.* **2002**, *36*, 4552; Chen, J.; LeBoeuf, E. J.; Daí, S.; Gu, B.; *Chemosphere* **2003**, *50*, 639.
- Rivero, C.; Senesi, N.; Paolini, J.; D'orazio, V.; *Geoderma* **1998**, *81*, 227.
- Ferrari, G.; Mingazzini, M.; *Mar. Ecol.: Prog. Ser.* **1995**, *125*, 305.
- Coble, P. G.; *Mar. Chem.* **1996**, *51*, 325; Parlanti, E.; Wörz, K.; Geoffroy, L.; Lamotte, M.; *Org. Geochem.* **2000**, *31*, 1765; Sierra, M. M. D.; Giovanela, M.; Parlanti, E.; Soriano-Sierra, E. J.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2006**, *17*, 113.
- Matthews, B. J. H.; Jones, A. C.; Theodorou, N. K.; Tudhope, A. W.; *Mar. Chem.* **1996**, *55*, 317.
- Thomaz, S. M.; Roberto, M. C.; Bini, L. M. Em *Caracterização limnológica dos ambientes aquáticos e influência dos níveis fluviométrico*; Vazzoler, A. E. A. M.; Agostinho, A. A.; Hahn, N.S., eds.; EDUEM: Maringá, 1997, 3.
- Thomaz, S. M.; Rocha, R. R. A.; Pagioro, T. A.; Roberto, M. C.; Carvalho, S. B.; Nakamura, A. K. S.; Carvalho, P.; Barcel, P. S. C.; Taka, M. Em *Varição espacial e temporal de fatores limnológicos*; Agostinho, A. A.; Thomaz, S. M.; Nakatani, K., eds.; Nupélia, PEA: Maringá, 2001.
- Oliveira, J. L.; Boroski, M.; Azevedo, J. C. R.; Nozaki, J.; *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* **2006**, *34*, 608.
- Thurman, E. M.; Malcolm, R. L.; *Environ. Sci. Technol.* **1981**, *4*, 463.
- Sierra, M. M. D.; Donard, O. F. X.; Lamotte, M.; Ewald, M.; *Mar. Chem.* **1994**, *47*, 127.
- Kang, K.; Shin, H. S.; Park, H.; *Water Res.* **2002**, *36*, 4023.
- Korshin, G.V.; Li, C. W.; Benjamin, M. M.; *Water Res.* **1997**, *31*, 1787.

## ANÁLISE DE FLUORESCÊNCIA DE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS EXTRAÍDAS DA ÁGUA, SOLO E SEDIMENTO DA LAGOA DOS PATOS - MS

Júlio César Rodrigues de Azevedo\*

Departamento Acadêmico de Química e Biologia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Av. Sete de Setembro, 3165, 87020-901 Curitiba - PR, Brasil

Jorge Nozaki†

Núcleo de Pesquisa em Limnologia Ictologia e Aqüicultura, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, 87020-900 Maringá - PR, Brasil

Na Figura 1S, consta a localização dos pontos onde foram realizadas as amostragens de água, solo e sedimento. Na Figura 2S, observa-se que os AHs apresentam maior absorvidade específica (300 nm) e menor razão  $E_{300}/E_{400}$ , indicando maior grau de humificação. Nos espectros de emissão (Figura 3S e 4S) e excitação (Figura 5S), observam-se diferenças entre os ácidos fúlvicos e húmicos extraídos. O espectro do ácido húmico extraído do solo (Figura 6S) foi semelhante ao dos AHs extraídos do sedimento dos pontos P2, P3 e P5, indicando que, provavelmente, estes AHs são pedogênicos. Na Figura 7S, constam as relações do conteúdo aromático (%) com a IF dos espectros da MEE das SHs e com a razão  $E_{300}/E_{400}$ .

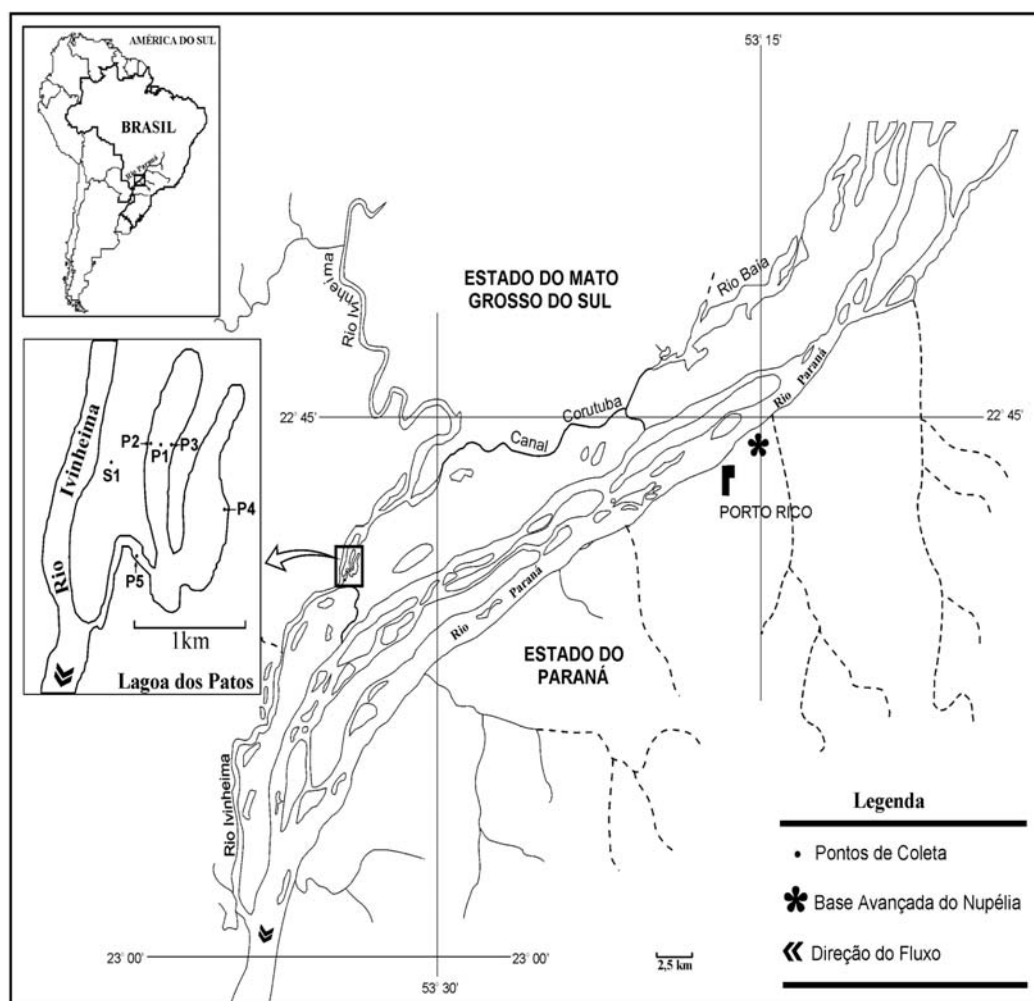


Figura 1S. Localização da Lagoa dos Patos-MS e respectivos pontos de coleta. O número 1 representa o ponto de água amostrado (P1), os números 2, 3, 4 e 5 representam os pontos P2, P3, P4 e P5 de sedimento e o S1 a amostra de solo

\*e-mail: jcrazevedo@utfpr.edu.br

†In memoriam



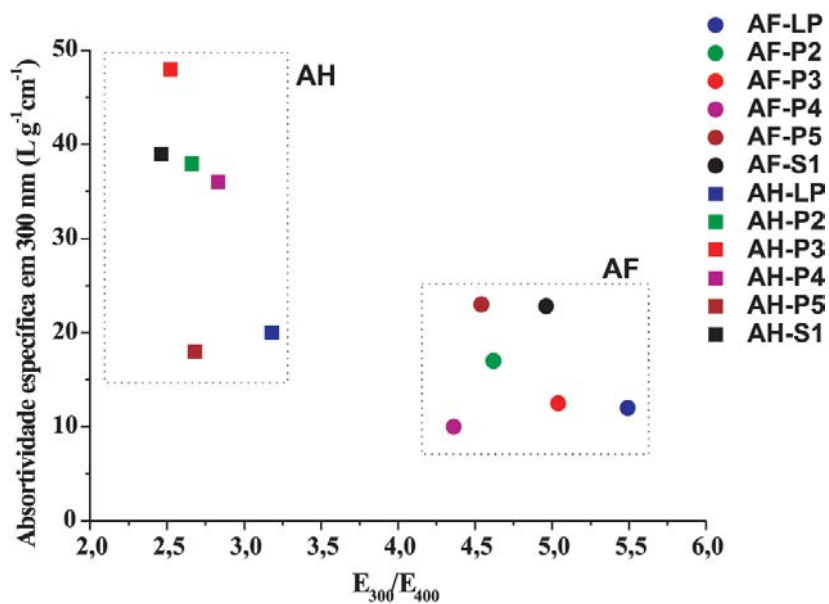


Figura 2S. Absortividade específica em 300 nm em função da razão  $E_{300}/E_{400}$  para caracterizar os ácidos fúlvicos (AF) e húmicos (AH) extraídos da Lagoa dos Patos – MS

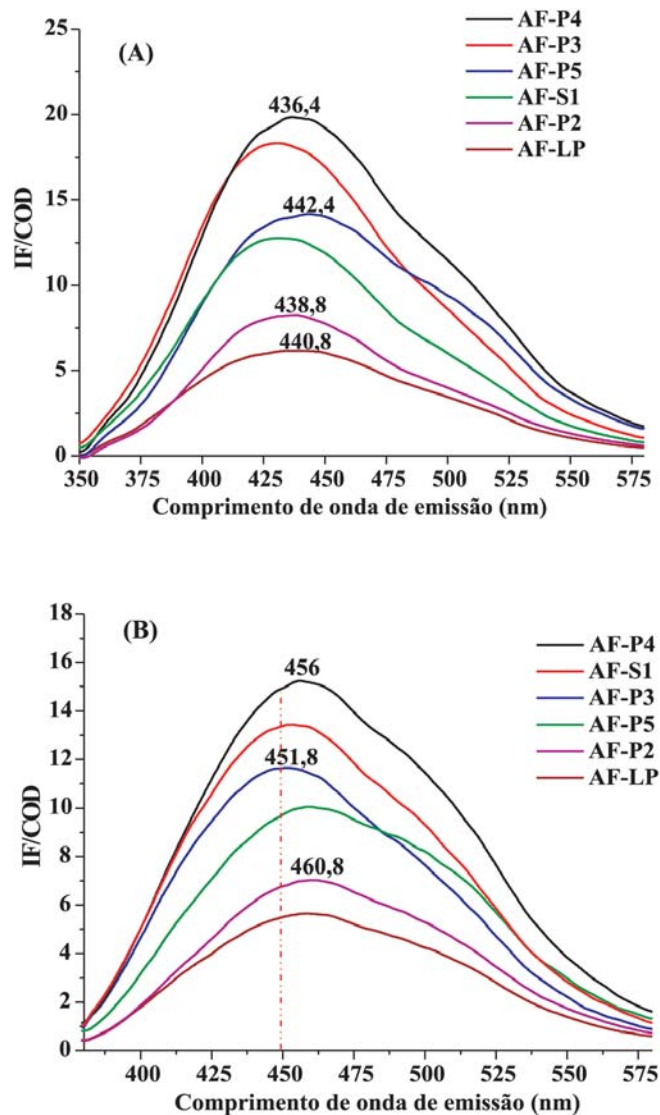


Figura 3S. Espectros de emissão (u.a.) dos ácidos fúlvicos com excitação em 314 (A) e 370 nm (B) normalizados pelo COD ( $\text{mg L}^{-1}$ )



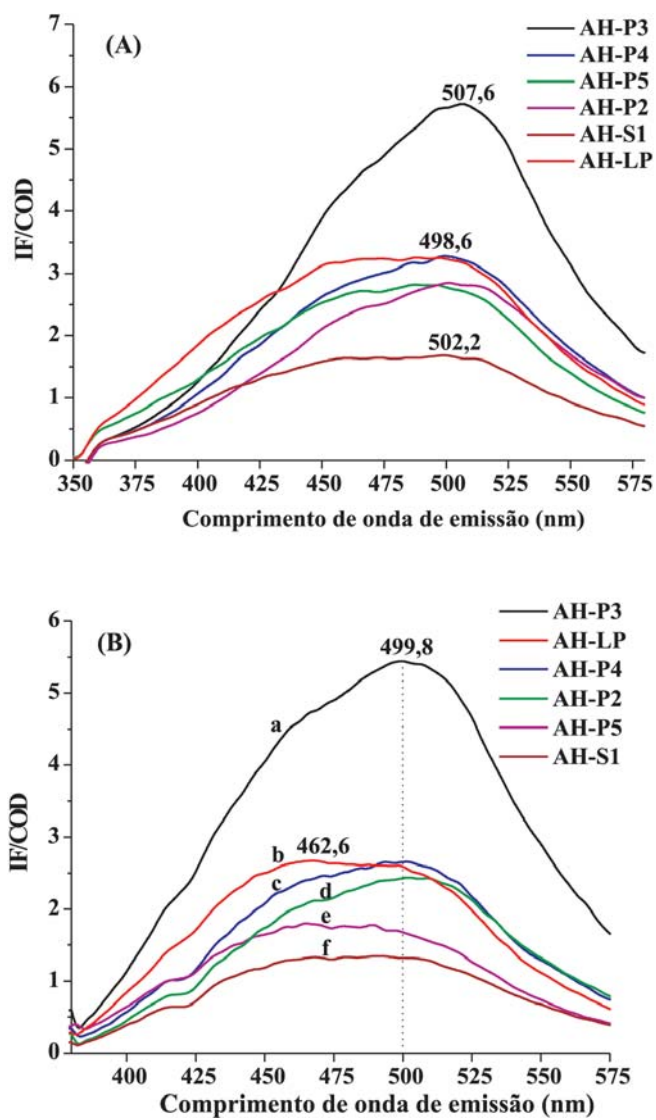


Figura 4S. Espectros de emissão (u.a.) dos ácidos húmicos com excitação em 314 (A) e 370 nm (B) normalizados pelo COD ( $\text{mg L}^{-1}$ )

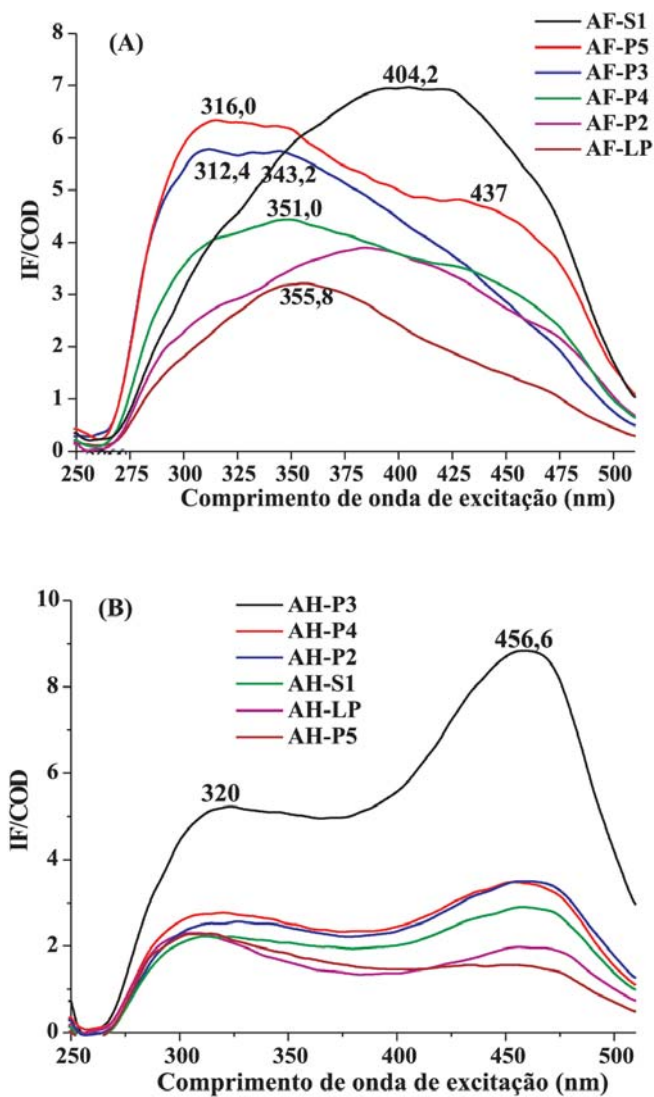


Figura 5S. Espectros de excitação (emissão em 520 nm) dos ácidos fúlvicos (A) e húmicos (B)

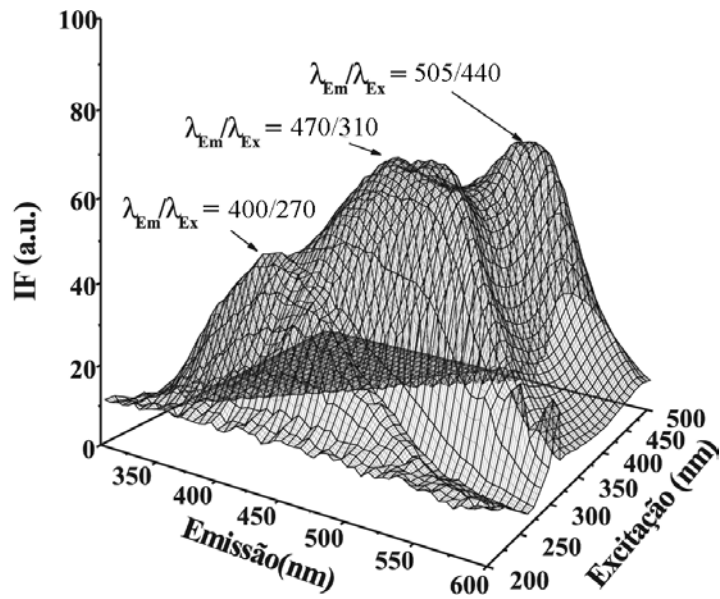


Figura 6S. Espectro 3D da amostra de ácido húmico extraído do solo (AH-S1)

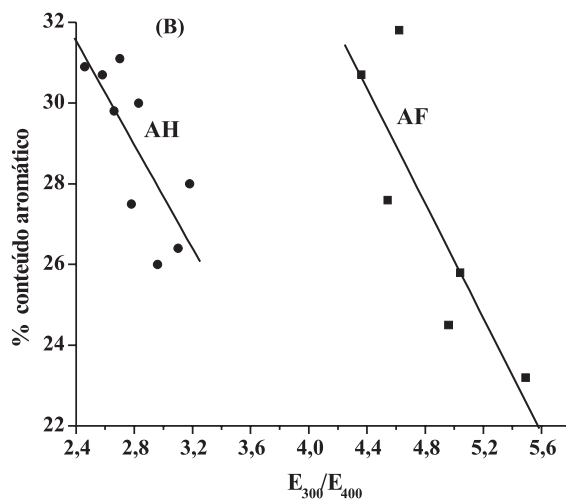
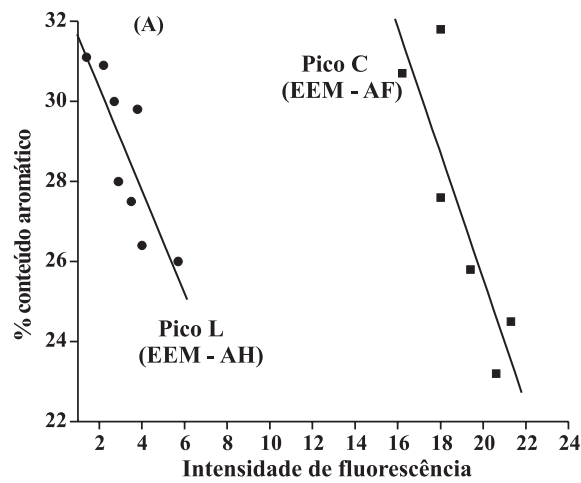


Figura 7S. Relações entre o conteúdo aromático (%) com (A) intensidade de fluorescência dos espectros da matriz excitação-emissão das SHs e (B) com a razão  $E_{300}/E_{400}$