

2 Materiais e métodos

2.1. Reagentes, materiais e soluções

2.1.1. Reagentes e materiais

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos: pireno, pureza 98%; criseno, pureza 98%; antraceno, pureza 98,9%; benzo[a]pireno, pureza 98,4%; 1-OH pireno, pureza 98,9%; fenantreno, pureza 99,5%; fluoranteno, pureza 99%; benzo[ghi]perileno, pureza 98% e 1,2 benzoantraceno, pureza 99% foram adquiridos da Aldrich (EUA).

As soluções dos sais inorgânicos utilizados no preparo de átomos pesados foram de várias procedências, entre elas: nitrato de tálio (I) e acetato de cádmio dihidratado, Acros Organics (EUA); nitrato de prata, nitrato de chumbo (II) e cloreto de mercúrio (II) da Vetec (Brasil); iodeto de potássio da Merck (Brasil).

O surfactante utilizado como modificador de superfície foi o dodecil sulfato de sódio (SDS) 99% proveniente da Merck (Brasil).

O material de referência certificado utilizado (MRC), Priority Pollutant Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in acetonitrile (SRM 1647d) foi proveniente do NIST, conforme certificado no anexo I.

Os solventes usados foram etanol absoluto e acetonitrila grau UV/HPLC da Merck (Brasil) e água ultrapurificada (resistividade abaixo de 18 MΩ cm⁻¹) obtida de um Ultra Purificador de água Master System 1000 – GEHAKA. Quando foi necessário tornar o meio ácido ou básico, utilizou-se ácido clorídrico P.A. e hidróxido de sódio P.A., ambos da Merck (Brasil).

Uma micropipeta regulável de 1 a 10 µL de fabricação da Wheaton Socorex (Suíça) foi utilizada para a aplicação das soluções de amostras de padrões de analitos, de sais de átomos pesados e de surfactantes no

substrato de celulose. Para o preparo de soluções foi utilizada micropipeta regulável de 100 a 1000 μL da Brand (EUA) e balões volumétricos de 10 mL da Pirex (Brasil). As micropipetas e os balões foram calibrados por um laboratório acreditado integrante da Rede Brasileira de Calibração (Laboratório de caracterização de fluidos – LCF/PUC-Rio), conforme certificados nos anexos III, IV e V.

Para os testes com bÍlis, utilizaram-se colunas (cartuchos) de sílica e C-18 (Varian HF) e sulfato de amônio da Vetec para forçar a precipitação de proteínas (Brasil).

O substrato sólido utilizado para indução de fosforescência foi o papel Whatman 42 da Whatman Ltda (Inglaterra), sendo previamente tratado para a redução do sinal de fundo.

O nitrogênio (99,9% da AGA) foi utilizado para purga da atmosfera ao redor dos substratos contendo as amostras. A eliminação de resíduos de oxigênio desse nitrogênio comercial foi realizada pela passagem do gás por dois frascos lavadores que continham soluções de metavanadato de amônio e de ácido clorídrico (Merck), e no fundo de cada um, pequena massa de amalgama feita com zinco em pó (Vetec) e mercúrio metálico (F. Maia, Brasil). A seguir, o gás foi carregado para ser seco pela passagem do fluxo de gás por duas colunas contendo sílica (Figura 4).

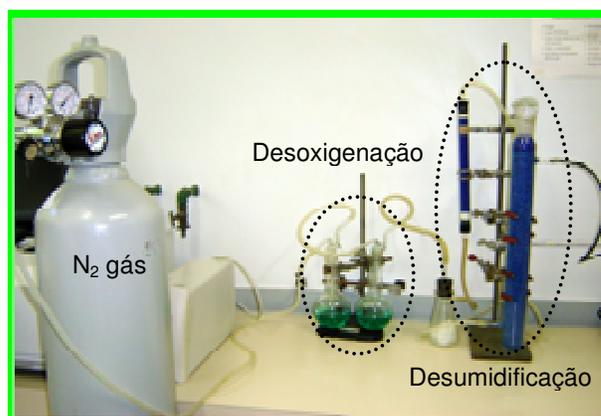


Figura 4: Sistema de purga com nitrogênio, composta por unidade de desoxigenação e de desumidificação do gás.

2.1.2. Soluções

Soluções-estoque aquosas de sais inorgânicos de átomos pesados foram preparadas volumetricamente e utilizadas na obtenção de soluções de menor concentração por diluição com água ultra-purificada. As soluções e suas respectivas concentrações foram: nitrato de tálio $0,25 \text{ mol L}^{-1}$; nitrato de chumbo $1,0 \text{ mol L}^{-1}$; nitrato de prata $0,25 \text{ mol L}^{-1}$; cloreto de mercúrio $0,2 \text{ mol L}^{-1}$; nitrato de cádmio $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ e iodeto de potássio $0,2 \text{ mol L}^{-1}$. Estudos de estabilidade indicaram que essas soluções de trabalho deveriam ser trocadas a cada mês. Solução aquosa estoque do surfactante, dodecil sulfato de sódio (SDS) $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ também foi substituída mensalmente.

Na construção das curvas de influência do pH utilizaram-se soluções-tampão Britton-Robinson no intervalo de pH de 2 a 12 que foram preparadas pela mistura de ácido bórico, ácido acético glacial e ácido fosfórico em solução aquosa, de modo que todos esses ácidos estivessem na concentração final de $0,04 \text{ mol L}^{-1}$. O ajuste do pH do tampão foi feito pela adição de solução aquosa de hidróxido de sódio 10% m/v. Essas soluções puderam ser armazenadas em geladeira por no máximo seis meses.

As soluções-estoque ($1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) de criseno, pireno e demais HPA foram preparadas em etanol absoluto e utilizadas para obter soluções de menor concentração com a mistura etanol:água 1:1 v/v. Essas soluções foram preparadas diariamente.

2.2. Instrumentação

2.2.1. Reator fotoquímico

O reator utilizado para tratamento de substrato de celulose e irradiação de amostras foi montado no laboratório utilizando a carcaça de uma estufa. Na parte interna superior da estufa foi instalado um conjunto de seis lâmpadas de esterilização de vapor de mercúrio de (6 W cada),

como mostrado na Figura 5. A emissão máxima das lâmpadas é em torno de 300 nm. Para a irradiação de soluções, se fez uso de tubos de quartzo (14 cm de altura e 2 cm de diâmetro) com tampa esmerilhada de vidro. O tempo de irradiação foi controlado por meio de um cronômetro digital com alarme.



Figura 5: Reator fotoquímico com seis lâmpadas de mercúrio (potência teórica total de 24 W).

2.2.2. Espectrofotômetro de luminescência

O espectrofotômetro de luminescência utilizado foi o Perkin Elmer modelo LS 55, EUA (Figura 6), cujas especificações estão descritas a seguir:

Fonte de excitação: lâmpada pulsátil, tipo descarga de xenônio de 20kW e 8 μ s de duração de pulso.

Detector: tubo fotomultiplicador R928, capaz de detectar radiação até em torno de 900 nm. O sistema de detecção é ajustável eletronicamente para se obter tempo de atraso e janela de detecções desejáveis.

Monocromadores: dois monocromadores do tipo Monk – Gillieson cujas redes de difração e outros componentes ópticos permitem trabalhar nas faixas espectrais de 200 – 800 nm (excitação) e 200 – 900 nm (emissão). As bandas espectrais de passagem de entrada e de saída são ajustáveis no intervalo de 1 a 15 nm (utilizou-se banda de 10 nm). Um esquema simplificado do sistema óptico do equipamento é mostrado na Figura 7.



Figura 6 : Espectrofotômetro de luminescência Perkin-Elmer LS 55.

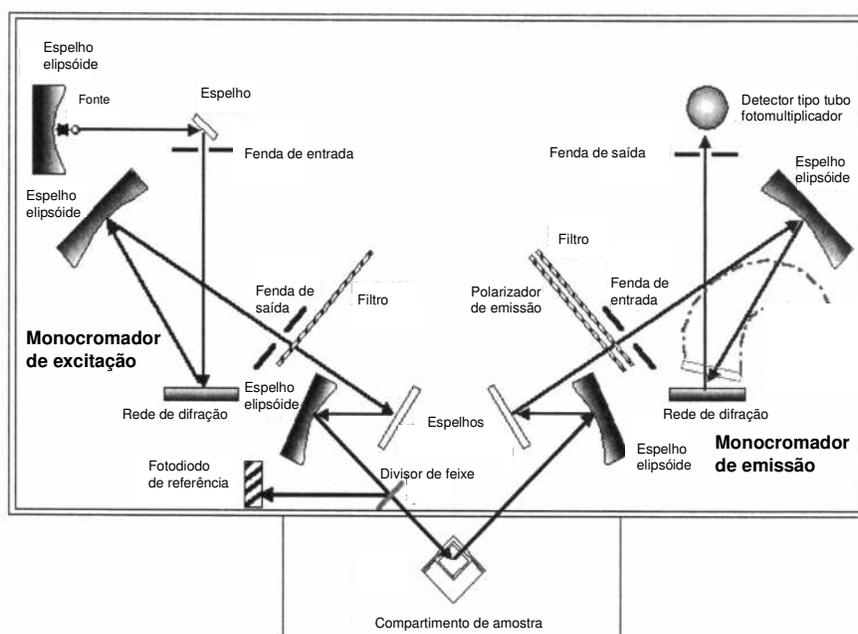


Figura 7: Esquema óptico do espectrofosforímetro LS 55 – Perkin Elmer (fonte: manual do equipamento).

O aparato de medição em superfície sólida, que é acoplado no compartimento de amostra do espectrofotômetro de luminescência, foi utilizado para medição de fosforescência em substrato de celulose. Acessório para leitura em substrato sólido com cela de trabalho é mostrado na Figura 8a. Esse acessório é acoplável ao compartimento de leitura do equipamento (Figura 8b). Vale salientar que o acessório foi modificado no laboratório para proporcionar a purga da atmosfera ao redor da cela do substrato.⁴³

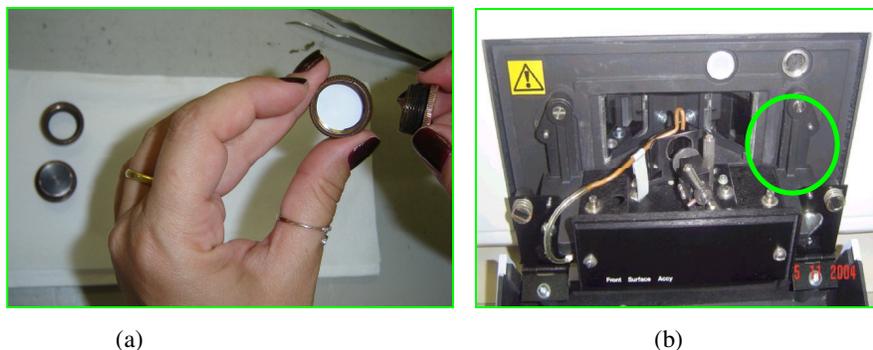


Figura 8: Acessório para realizar a medição - (a) colocação do substrato de papel no suporte que é acoplado ao (b) aparato de medição em superfície sólida.

2.2.3. Espectrofotômetro de absorção UV/VIS/NIR

O espectrofotômetro de absorção da Perkin Elmer, modelo Lâmbda 19 UV/VIS/NIR, foi utilizado para alguns experimentos específicos. Esse equipamento faz uso de um conjunto de lâmpadas, uma de deutério e uma incandescente de tungstênio, e de dois monocromadores em série na configuração Littrow. A banda espectral de passagem foi ajustada para 2 nm. As absorvâncias das amostras foram medidas em cubetas de quartzo de 10 cm de caminho óptico usando compensação de sinal com solução apropriada no feixe de referência.

2.2.4. Cromatógrafo em fase líquida de alta eficiência

Um cromatógrafo em fase líquida de alta eficiência (HPLC) com detecção por fluorescência (Waters, EUA) foi utilizado nos testes de comparação. O detector de fluorescência possui uma grade de excitação e de emissão e lâmpada de xenônio de fonte contínua, o qual foi ajustado para leituras em até dois canais A e B, cujos parâmetros otimizados para o criseno, para o pireno e para o 1-OHP foram inseridos na programação do mesmo. Como os comprimentos de onda de emissão e de excitação do pireno e 1-OHP são bastante semelhantes, utilizou-se um único canal para essas duas substâncias e outro canal foi escolhido para o criseno. O modo de utilização da bomba foi binário, com mistura de dois solventes, na forma de gradiente. A injeção foi feita manualmente por meio de um

sistema “Reodyne” e alça de amostragem. O tratamento dos dados, integração dos picos e resultado final foi processado pelo software Breeze (Waters, EUA).

2.2.5. Equipamentos auxiliares

Todas as soluções de HPA foram preparadas a partir das massas das substâncias que foram pesadas em balança analítica Mettler Toledo AT 261 com resolução de 0,01mg pertencente ao Laboratório Estudos Ambientais e Marinhos. A balança foi calibrada conforme certificado no anexo VI. Soluções de SDS e de sais de átomos pesados foram preparadas a partir das pesagens de massa das respectivas substâncias em uma balança de quatro casas decimais (fabricante: Marte balanças; modelo AM200).

Um banho de ultra-som, modelo USB 124, de 40W de potência (fabricante: CTA do Brasil), foi utilizado para melhor dissolução dos HPA. Para ajuste de pH das soluções utilizou-se o pHmetro Tecnoyon, versão 2.3, modelo mpA 210 com eletrodo de vidro selado e conjugado com eletrodo de referência de Ag/AgCl. Soluções tampão pH 4,00, pH 7,00 e pH 10,00, fornecidas pela Merck, rastreáveis ao NIST e dentro do prazo de validade, foram sempre utilizadas para ajuste do equipamento antes do uso.

Um sistema de vácuo (Figura 9) foi utilizado para a secagem dos substratos de papel contendo amostras, padrões de analito ou branco. O sistema consiste em um dessecador de polietileno coberto por papel alumínio, de modo a impedir que os papéis fiquem expostos à luz ambiente, acoplado a uma bomba de vácuo modelo 820 da Fisatom. Uma armadilha (frasco Erlenmeyer) foi instalada entre o dessecador e a bomba. O vácuo foi medido por meio de um manômetro, sendo a pressão interna mais baixa ou igual a 25 Pol Hg.



Figura 9: Sistema de secagem a vácuo para substratos de papel.

2.3. Procedimentos

2.3.1. Coleta, extração e preparo de amostras de bÍlis

Uma das aplicações propostas nessa dissertação com a técnica SS RTP foi a de quantificação de pireno e criseno em amostras de bÍlis extraÍdas de peixes da espÍcie *Mugil liza* (Tainha), das regiÍes da Baía da Guanabara, Área supostamente “contaminada” (Figura 10). Essas amostras foram coletadas de peixes criados em currais, ou seja, paus de eucalipto fincados na baía na forma de labirinto em uma profundidade de 3 a 5 metros (conforme É mostrado na Figura 11 e na Figura 12). Peixes da praia de Itaipu foram usados como referÊncia de uma Área supostamente “controle” (Figura 13) e cuja coleta foi realizada por arraste de superfÍcie pelos barcos pesqueiros.



Figura 10: Visão da Baía da Guanabara no local da coleta (MagÉ).



Figura 11: Detalhes do curral de peixes – Baía da Guanabara, Magé.



Figura 12: Detalhes do momento da coleta no curral em Magé.



Figura 13 : Praia de Itaipu com detalhe do barco pesqueiro utilizado para coleta.

Os peixes coletados foram levados ao laboratório em caixas de isopor contendo gelo, mantendo assim a sua integridade e frescura. No laboratório, os mesmos foram lavados, a fim de retirar eventuais resíduos seguido do processo de identificação e classificação dos peixes para posterior abertura.

Os peixes foram abertos com cautela, com auxílio de tesoura, entre a abertura urogenital e a cabeça, pois nesta etapa, o intestino e/ou outro(s) órgão(s) podem “estourar”. A tesoura foi introduzida superficialmente no tecido, pois do contrário ocorre grande probabilidade de contaminar a bÍlis no momento da sua extração.

Em seguida, foi localizada a vesícula biliar logo abaixo do fígado e, com auxílio de uma seringa e agulha, perfurada a película da vesícula sem que a mesma se rompesse; a bÍlis então foi extraída com o auxílio de uma seringa. Esse volume foi transferido para tubo de ensaio e armazenado em geladeira (temperatura de 6 a 10°C) até o momento da análise.

A diluição da bÍlis com etanol:água 1:1 v/v foi realizada em uma proporção de 1:50 em volume de bÍlis:solventes. Normalmente, 0,2 mL de bÍlis em 10 mL de mistura etanol:água 1:1 v/v (determinação de criseno) e 0,2 mL de bÍlis, 0,5 mL de solução de NaOH 2 mol L⁻¹ em 10 mL de mistura etanol:água 1:1 v/v (determinação de pireno). Curvas de adição de analito foram realizadas, a fim de minimizar as interferências da matriz. Alíquotas da solução estoque de analito foram adicionadas às soluções anteriormente preparadas, substituindo, caso aplicável, por bÍlis de peixes de áreas, em princípio, livres de contaminação (“controle”). Para minimizar a turvação proveniente do material em suspensão precipitado (proteínas, por exemplo) e parte da coloração típica de amostras de bÍlis (amarela, verde ou marrom) houve a necessidade da utilização da passagem da amostra por uma coluna de sílica. Isso foi feito a fim de minimizar o grande efeito de matriz. Após essa etapa, as soluções foram utilizadas para determinação de pireno e criseno por SSRTP.

A Figura 14 mostra de forma resumida o processo de extração e tratamento da bÍlis do peixe até a determinação por SSRTP.



Figura 14: Resumo do processo de extração e tratamento da bÍlis do peixe para determinação por SS RTP.

2.3.2. Substratos de celulose

O papel filtro Whatman 42 foi utilizado como substrato sÓlido para indução de fosforescência. Como o substrato possui sinal fosforescente de fundo natural relativamente alto, um tratamento foi realizado para minimizÁ-lo. O procedimento utilizado foi desenvolvido por CampÍglia e de Lima⁴⁴ e adaptado por Cardoso e Marques^{43, 45} consistindo das trÊs etapas a seguir descritas: (i) lavagem da folha de papel filtro com Água em extrator do tipo Soxhlet por 2 h (ii) secagem da folha sob lâmpada infravermelha (IR) e (iii) tratamento fotoquímico por 2 h utilizando o reator fotoquímico jÁ descrito. Esse tratamento fotoquímico foi realizado apÓs o corte dos papeis em cÍrculos de aproximadamente 18 mm de diÂmetro, conforme ilustrado na Figura 15.

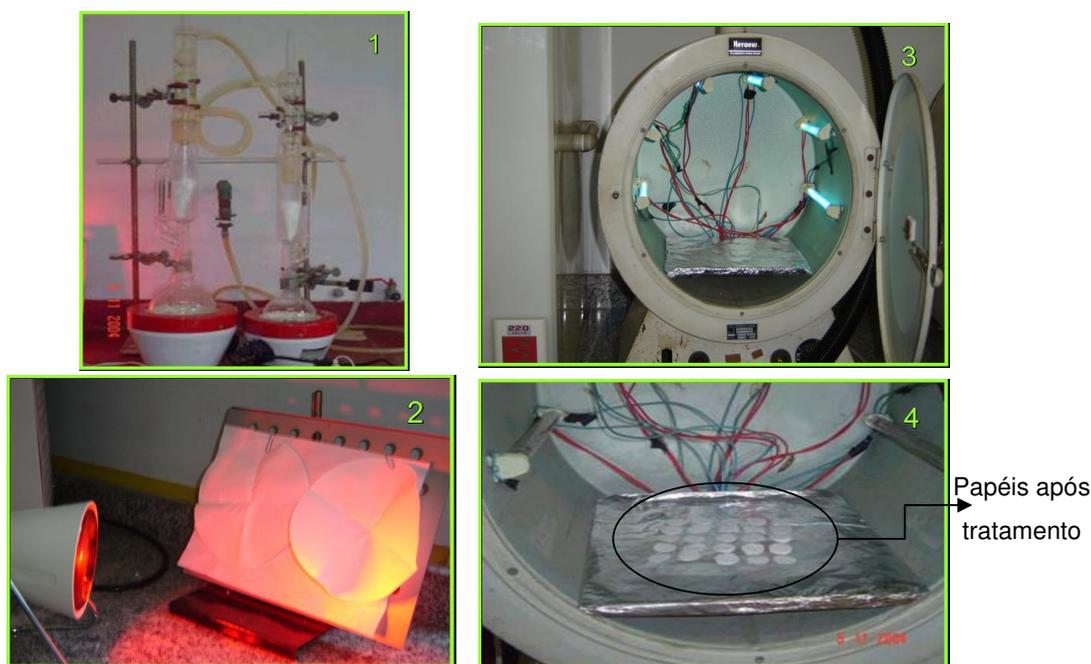


Figura 15: Etapas de tratamento do papel de filtro para minimizar o sinal de fundo (1- lavagem; 2- secagem com lâmpada IR; 3- tratamento com irradiação UV e 4- papéis após tratamento).

2.3.3.

Limpeza do material a ser utilizado nas determinações de HPA

O tratamento (limpeza) da vidraria consistiu na lavagem com água corrente para retirada de qualquer resíduo existente. Em seguida, o material foi imerso em banho de ácido nítrico 10% por no mínimo 12 h. Após esse tempo, a vidraria foi lavada com água destilada e com água ultrapurificada.

2.3.4.

Procedimento de medição por SS RTP

A técnica SS RTP se baseia na medição de sinal das substâncias de interesse após a adição das soluções das mesmas em substrato sólido (no caso, o papel filtro tratado para a redução de sinal de fundo). As adições no substrato de papel seguiram a seguinte ordem: 5 μL solução de surfactante (quando necessário), 5 μL de solução de átomo pesado (quando necessário, adições múltiplas dessas soluções foram realizadas após secagem sob lâmpada infravermelha) e 5 μL de solução padrão do

analito, amostra ou branco. Essas adições foram realizadas no centro do papel (local de incidência do feixe de excitação). Quando necessário, as soluções padrões dos analitos, amostras e brancos foram irradiadas em reator com luz ultravioleta antes da colocação no substrato. Em seguida, esses papéis foram colocados no dessecador a vácuo por um período mínimo de 2 horas.

Para a realização das medições no espectrofotômetro de luminescência, os papéis foram colocados em um suporte específico (cela), o qual foi acoplado ao aparato de medição em superfície sólida dentro do compartimento de amostra do instrumento. Previamente a cada medição, o substrato foi purgado com um fluxo de nitrogênio seco direcionado na posição central dos papéis (onde foram depositadas as soluções) por no mínimo 2 minutos conforme mostrado na Figura 16.

Os seguintes parâmetros instrumentais foram escolhidos para SS RTP: velocidade da varredura de 800 nm min^{-1} , bandas espectrais de passagem de 10 nm (ajustável pela abertura das fendas de entrada e saída), tempos de abertura e de retardo do detector de $3,0 \text{ ms}$ cada.

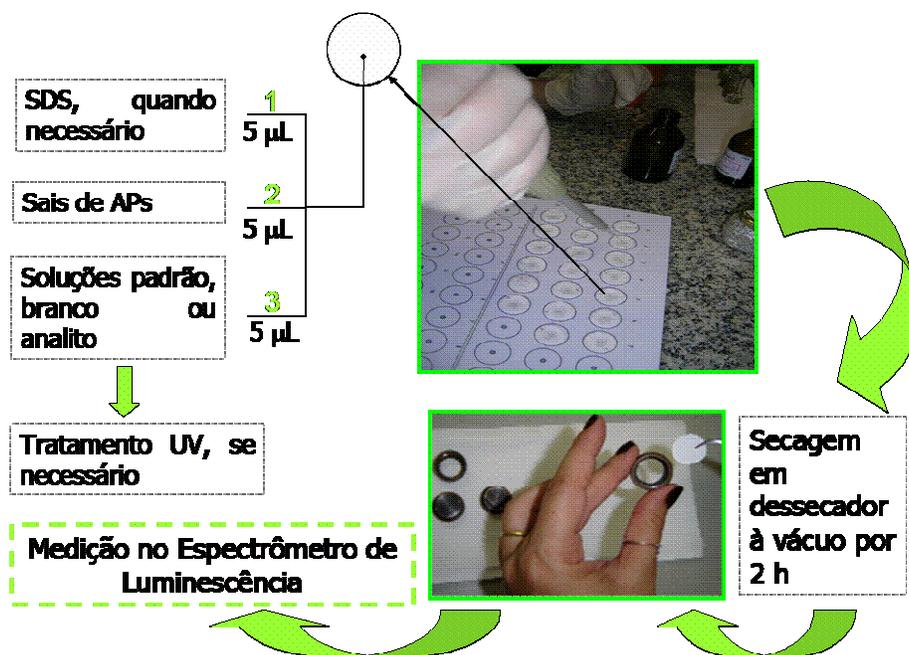


Figura 16: Esquema descrevendo o procedimento geral da técnica SS RTP, onde a ordem a ser seguida é sempre surfactante, átomo pesado e analito.

2.3.5. Procedimento de medição por HPLC

Como técnica para comparação de resultados foi utilizada HPLC com detecção fluorimétrica. As condições instrumentais selecionadas foram detecção fluorimétrica em dois canais (canal 1 ajustado em 274/383 nm para criseno e canal 2 ajustado em 346/384 nm para pireno e 1-OH pireno). Os parâmetros foram ajustados para determinação simultânea de pireno, 1-OH pireno e criseno, em tempo total de corrida de 6 minutos, sendo que a coluna de fase reversa utilizada foi uma C18 X-Terra com 150 mm de comprimento e fase estacionária com partículas de 4,6 μm . A atenuação do detector de fluorescência foi de 100.000 (EUFS), o ganho ajustado em 1 e o fator de sensibilidade: 5000,00 (canal 1) e 9000,0 (canal 2) podendo variar de acordo com a concentração dos analitos na amostra a ser analisada. A alça de amostragem utilizada foi de 20 μL e o volume de injeção de no mínimo 100 μL (5 vezes o volume da alça). O vazão da fase móvel foi de 1 mL min^{-1} utilizando como gradiente, a mistura de dois solventes, mostrado na Tabela 3. A temperatura do forno da coluna foi ajustada em 35°C.

Os solventes (água ultrapurificada e acetonitrila) foram previamente filtrados em membrana de 0,45 μm e desgaseificados em banho de ultrassom por no mínimo 20 minutos. As soluções padrões em meio de etanol:água 1:1 v/v foram preparadas e injetadas e curvas analíticas foram traçadas. Nas condições acima relatadas, os tempos de retenção de criseno, pireno e 1-OH pireno foram respectivamente 5,5; 5 e 4 minutos.

Tabela 3: Gradiente para determinação de pireno, 1-OH pireno e criseno por HPLC com detecção por fluorescência utilizando coluna com temperatura estabilizada em 35 °C.

Tempo (min.)	Vazão (mL min^{-1})	% Acetonitrila	% água ultrapurificada
0,00	1,00	65,0	35,0
4,00	1,00	80,0	20,0
6,00	1,00	65,0	35,0