

### 3

## **Resultados e Discussão - Características fosforescentes dos HPA, ajuste de condições experimentais e avaliação da seletividade**

### **3.1. Características fosforescentes dos HPA**

A primeira etapa do processo de desenvolvimento de métodos fosforimétricos seletivos é a prospecção das características espectrais, por meio da escolha de parâmetros experimentais específicos que maximizem o sinal da(s) espécie(s) de interesse enquanto minimizam o sinal de potenciais substâncias interferentes. Sendo assim, um estudo prévio foi realizado para encontrar condições experimentais para indução de fosforescência na temperatura ambiente e viabilizar a determinação de dois HPA (pireno e criseno).

#### **3.1.1.**

#### **Efeito dos diferentes sais de átomos pesados (AP) e do SDS nos sinais fosforescentes dos HPA**

Nesta etapa, as características do pireno e do criseno na presença sais indutores de fosforescência foram comparadas com as características obtidas para outros sete HPA: benzo[a]pireno, antraceno, 1-hidróxi pireno (1-OH pireno), fluoranteno, fenantreno, benzo[ghi]perileno e 1,2 benzoantraceno. As estruturas químicas dos nove HPA são mostradas na Figura 17.

O efeito externo de seis diferentes sais de átomos pesados foram testados em substrato de papel onde os HPA foram imobilizados:  $\text{TlNO}_3$  (333  $\mu\text{g}$ )  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  (662  $\mu\text{g}$ )  $\text{AgNO}_3$  (78  $\mu\text{g}$ )  $\text{Cd}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$  (435  $\mu\text{g}$ ),  $\text{Hg}_2\text{Cl}_2$  (472  $\mu\text{g}$ ) e  $\text{KI}$  (830  $\mu\text{g}$ ). Essa avaliação envolveu o uso de substratos tratados ou não com SDS, que como já mencionado, atua como modificador de superfície do papel. No caso dos substratos modificados, o surfactante proporciona a formação de uma fase estacionária que impede

que o fósforo penetre muito fundo no substrato, ficando sem acesso à radiação de excitação, cria sítios para imobilização do fósforo e organiza o sistema propiciando um melhor contato entre a substância de interesse e o sal de átomo pesado indutor de fosforescência. Os resultados são apresentados a seguir.

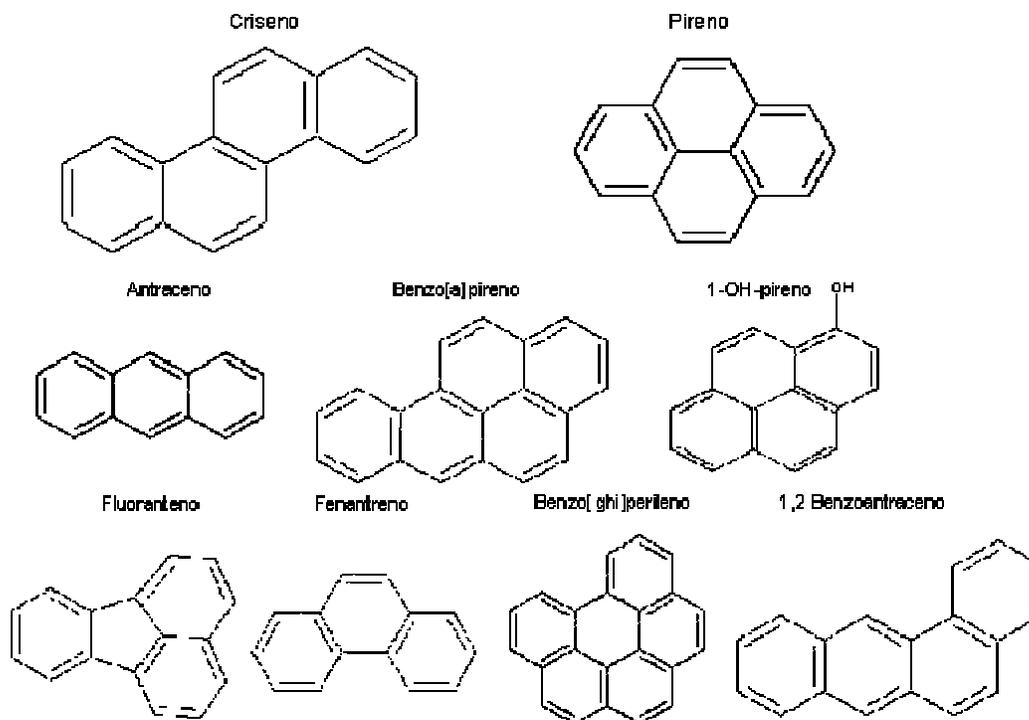


Figura 17: Estrutura química de nove HPA.

### 3.1.1.1. Pireno

O efeito dos sais de átomos pesados (AP) no sinal fosforescente do pireno foi estudado. O pireno ( $5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ) foi preparado em etanol/água, 50/50%, v/v. Observou-se que o pireno apresentou sinal fosforescente com  $\text{TlNO}_3$  e com  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ . Para os demais sais ( $\text{KI}$ ,  $\text{Hg}_2\text{Cl}_2$ ,  $\text{CdCl}_2$  e  $\text{AgNO}_3$ ), nenhuma fosforescência foi observada. Os comprimentos de onda máximos de excitação ( $\lambda_{\text{exc}}$ ) do pireno foram em 335 nm na presença de  $\text{Tl(I)}$  e de  $\text{Pb(II)}$ . O comprimento de onda máximo

de emissão ( $\lambda_{em}$ ) foi praticamente o mesmo: 597 nm na presença de Tl(I) e 598 nm na presença de Pb(II). A adição de 100  $\mu\text{g}$  de SDS (5  $\mu\text{L}$  de solução 0,25 mol  $\text{L}^{-1}$ ) causou um efeito positivo de 50% na indução de sinal fosforescente do pireno em substrato com o sal de Pb(II); enquanto que para o sal de Tl(I), o SDS não causou praticamente nenhum efeito.

Os espectros de emissão e excitação de fosforescência na temperatura ambiente do pireno na presença de nitrato de tálio e nitrato de chumbo são mostrados na Figura 18 e Figura 19, respectivamente que também ilustram o efeito do SDS.

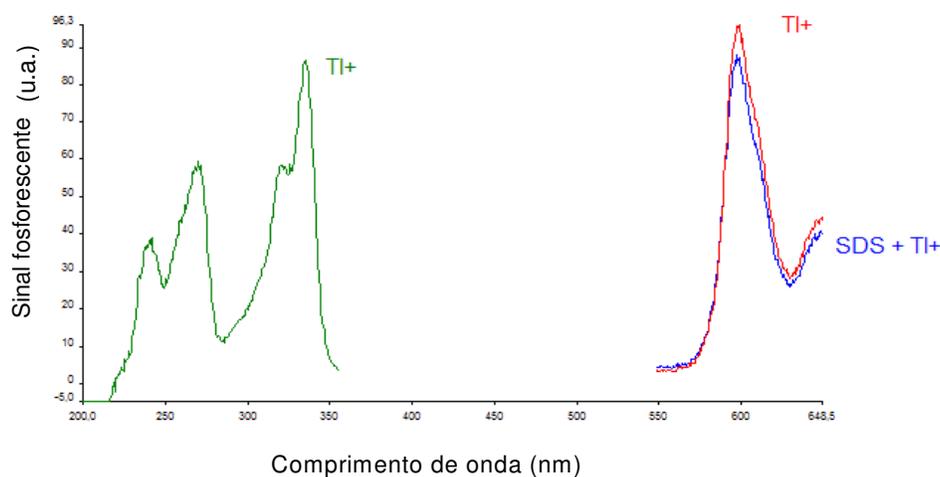


Figura 18: Espectro de excitação e emissão do pireno (51 ng) na presença do nitrato de tálio (indicado acima como o íon de átomo pesado do sal) em substratos de papel contendo ou não 100  $\mu\text{g}$  de SDS.

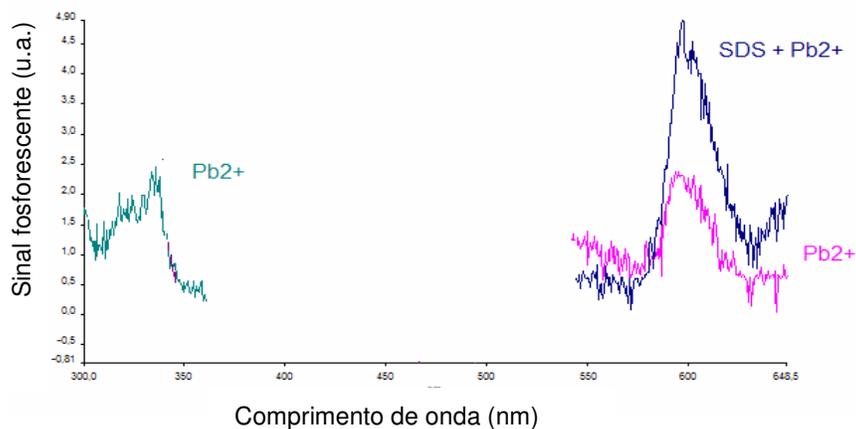


Figura 19: Espectro de excitação e emissão do pireno (51 ng) na presença de nitrato de chumbo (indicado acima como o íon de átomo pesado do sal) em substratos de papel contendo ou não 100 µg de SDS.

### 3.1.1.2. Criseno

Avaliou-se o efeito dos sais de AP no sinal fosforescente do criseno. O analito foi depositado no substrato de papel também a partir de soluções ( $5 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>) preparadas em etanol/água 50/50%, v/v. Alternativamente, soluções de criseno em hexano também foram utilizadas, por melhor solubilizar esse HPA. Assim como no caso do pireno, observou-se que o criseno apresentou fosforescência com nitrato de tálio e com nitrato de chumbo. Além desses, a fosforescência do criseno foi induzida com nitrato de prata. Para os demais sais, nenhuma fosforescência foi observada. Quanto aos comprimentos de onda máximos dos espectros induzidos por Tl(I), Pb(II) e Ag(I), observou-se uma pequena variação em função do tipo do AP empregado ( $\lambda_{exc.}$  entre 264 e 271 nm e  $\lambda_{em.}$  entre 511 e 516 nm). Já a presença do SDS provocou uma amplificação nos sinais do criseno na presença dos três sais de AP, sendo essas amplificações de 2,8 vezes com o sal de tálio, 8 vezes com o sal de prata e 1,9 vezes com o sal de chumbo. Nenhuma modificação significativa foi observada nos comprimentos máximos dos espectros devido à presença do surfactante.

Os espectros de excitação e emissão fosforescente do criseno com os sais de tálio, prata e chumbo em substratos contendo ou não SDS encontram-se nas figuras 20, 21 e 22, respectivamente. O sinal fosforescente do criseno depositado a partir da solução de hexano e a partir da solução de etanol foram estatisticamente semelhantes.

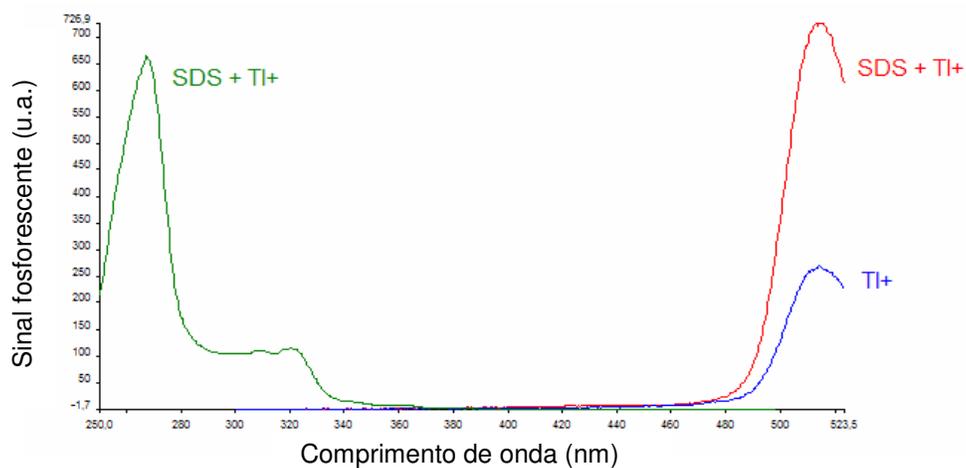


Figura 20 : Espectro de excitação e emissão do criseno (57 ng) na presença de nitrato de tálio (indicado acima como o íon de átomo pesado do sal) em substratos de papel contendo ou não 100  $\mu\text{g}$  de SDS.

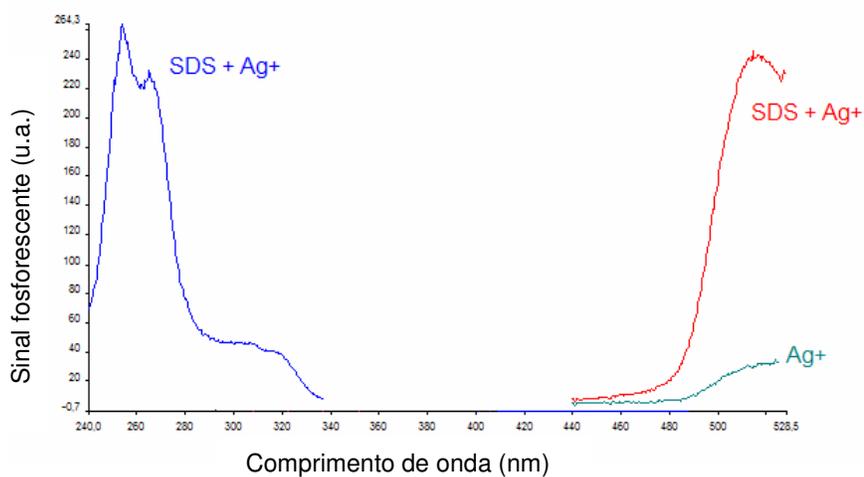


Figura 21: Espectro de excitação e emissão do criseno (57 ng) na presença de nitrato de prata (indicado acima como o íon de átomo pesado do sal) em substratos de papel contendo ou não 100  $\mu\text{g}$  de SDS.

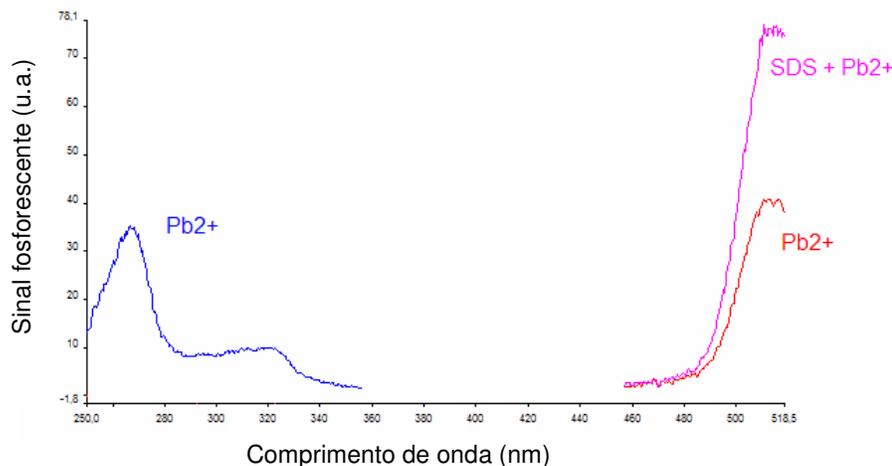


Figura 22: Espectro de excitação e emissão do criseno (57 ng) na presença de nitrato de chumbo (indicado acima como o íon de átomo pesado do sal) em substratos de papel contendo ou não 100  $\mu\text{g}$  de SDS.

### 3.1.1.3. Outros HPA

Um estudo sistemático semelhante foi realizado para as substâncias benzo[a]pireno, antraceno, 1-OH pireno, fluoranteno, fenantreno, benzo[ghi]perileno e 1,2 benzo antraceno. Deste estudo inicial, verificou-se que o nitrato de prata é potencialmente o sal de átomo pesado seletivo para o criseno em relação ao pireno. Outros quatro dos nove HPA testados apresentaram fosforescência com  $\text{Ag(I)}$ , no entanto, os comprimentos de onda máximos de excitação e de emissão do fluoranteno, benzoperileno e benzoantraceno são significativamente diferentes dos do criseno, facilitando a discriminação entre estes componentes pela resolução espectral. Já o fenantreno e o criseno possuem  $\lambda_{\text{exc}}/\lambda_{\text{em}}$  muito próximos, necessitando que estudos mais cuidadosos sejam feitos para eliminar potencial interferência espectral no criseno.

Para o pireno, seus dois AP indutores de fosforescência ( $\text{TINO}_3$  e  $\text{Pb(NO}_3)_2$ ) induzem sinal para todos os outros HPA exceto antraceno e benzo[a]pireno. Mas em todos os casos, a resolução espectral é possível por causa das significantes diferenças nos máximos espectrais do pireno

em relação aos outros HPA, inclusive o 1-OH pireno. Nesses casos, o uso da varredura sincronizada pode ser útil na viabilização da determinação seletiva.

O resumo dos resultados encontrados para o pireno, criseno e demais HPA na presença de sais dos seis AP encontra-se na tabela 4.

Tabela 4: Resultados dos estudos preliminares de FTA na presença de AP.

HPA (massa depositada no substrato em ng)	$\lambda_{exc}/\lambda_{em}$	Sais de AP (massa em 5 $\mu$ L)					
		TiNO <sub>3</sub> (333 $\mu$ g)	Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (662 $\mu$ g)	AgNO <sub>3</sub> (78 $\mu$ g)	Cd(C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> (435 $\mu$ g)	Hg <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (472 $\mu$ g)	KI (830 $\mu$ g)
Pireno (51 ng)	335/598	x	x				
Criseno (57 ng)	264-271 /511-516	x	x	x			
Antraceno							
Benzo[a]pireno							
1-OH pireno (54 ng)	261-262 / 517-522	x	x				
Fluoranteno (51 ng)	286-287 / 549-551	x	x	x			x
Fenatreno (44 ng)	257-262 / 504-509	x	x	x	x		x
Benzo[ghi]perileno (69 ng)	304-307 / 521-524	x	x	x			x
1,2 Benzoantraceno (57 ng)	290-291 / 605-607	x	x	x	x		x

"x": presença de sinal fosforescente

A tabela 5 mostra os resultados encontrados para o pireno, criseno e demais HPA na presença de sais dos seis sais de AP e SDS. Podem-se observar os valores reportados em amplificação de sinal fosforescente quando comparados com as intensidades de sinal na ausência de SDS como é o caso utilizando o tálio como AP indutor de fosforescência, o 1-OH pireno teve uma amplificação de 3,3 vezes no sinal fosforescente ao contrário do 1,2 benzo antraceno que na presença do AP prata o sinal fosforescente foi praticamente eliminado.

Tabela 5: Resultados dos estudos preliminares de FTA na presença de AP e 100 µg de SDS (valores reportados em amplificação de sinal fosforescente comparados com os sinais na ausência de SDS)

HPA (massa depositada no substrato em ng)	Sais de AP (massa em 5 µL)						
	$\lambda_{exc.}/\lambda_{em.}$	TiNO <sub>3</sub> (333µg)	Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (662 µg)	AgNO <sub>3</sub> (78 µg)	Cd(C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> (435 µg)	Hg <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (472 µg)	KI (830µg)
Pireno (51 ng)	335/598	-	2x				
Criseno (57 ng)	264-271 /511-516	2,8x	1,9x	8x			
Antraceno							
Benzo[a]pireno							
1-OH pireno (54 ng)	261-262 / 517-522	3,3x	-				
Fluoranteno (51 ng)	286-287 / 549-551	1,3x	↓	-			↓
Fenatreno (44 ng)	257-262 / 504-509	↓	↓	↓	↓		↓
Benzo[ghi]perileno (69 ng)	304-307 / 521-524	↓	1,4x	1,2x			↓
1,2 Benzoantraceno (57 ng)	290-291 / 605-607	-	-	↓ <sub>0</sub>	-		-

"x" n° de vezes (amplificação); "↓" decréscimo; "-" não causou efeito; "↓<sub>0</sub>" eliminou o sinal fosforescente.

Em seguida mais estudos, agora específicos para criseno e pireno, foram realizados visando alternativas para melhorar a discriminação destes dois HPA em relação aos outros compostos em estudo e de componentes das matrizes envolvidas nesse trabalho. Posteriormente, os demais HPA estarão presentes nos estudos de seletividade.

### 3.1.2.

#### Estudo da influência do tratamento fotoquímico (radiação UV) no pireno e criseno

Como os HPA são, em geral, sensíveis a fotodegradação/fotoderivação, testou-se o efeito da irradiação prévia das soluções de HPA com radiação UV antes da deposição da solução no substrato. Como o tratamento das soluções de analitos com radiação UV pode gerar derivados fotoquímicos com características fosforescentes

distintas das dos compostos originais, pode ser vantajoso do ponto de vista analítico, aumentando a intensidade de sinal e/ou modificando as posições das bandas espectrais. Assim, um estudo similar aos anteriormente descritos foi realizado. Os HPA foram submetidos à radiação com UV por aproximadamente 30 minutos antes de serem depositados nos substratos de celulose previamente tratados com os sais de átomos pesados e, quando fosse o caso, de acordo com resultados encontrados anteriormente, com o surfactante SDS.

#### **3.1.2.1. Pireno**

Como foi observado anteriormente para soluções não irradiadas, o pireno previamente irradiado apresentou intensidade de sinal fosforescente somente com os AP de tálio e de chumbo. Quanto à variação das características espectrais, observa-se que não houve modificação significativa nas bandas espectrais de excitação e de emissão quando comparadas ao composto não-irradiado. Além disso, os sinais fosforescentes observados são praticamente semelhantes considerando o desvio padrão relativo inerente a técnica (9% menor em altura de pico equivalente ao  $\lambda_{em}$  na presença do tálio e 2% menor na presença de chumbo) do que os observados antes da irradiação, mostrando que não ocorreu nenhuma alteração com o composto. Os resultados obtidos com o SDS não mostraram vantagens em relação aos já observados anteriormente, assim não justificando, a princípio, o uso do tratamento UV.

#### **3.1.2.2. Criseno**

Para o criseno irradiado observou-se que a exposição ao UV provocou um decréscimo na intensidade de sinal fosforescente, algo em torno de 60% na presença da prata e de 40% na presença de tálio, comparando-os com o sinal observado sem irradiação prévia. Isso indica a possibilidade de formação de um derivado do criseno com menor

eficiência quântica fosforescente e/ou a degradação de fração das moléculas de criseno formando produtos não fosforescentes. Na presença de Pb(II), a fosforescência previamente observada foi eliminada. Quanto à variação das características de energia do espectro, observa-se que não houve significativa alteração no  $\lambda_{em}$  e no  $\lambda_{exc}$ . no caso da fosforescência induzida por Ti(I) e por Pb(II).

Na presença do surfactante SDS, os sais de tálio e de prata provocaram aumento de sinal, semelhantes ao observado para o criseno não irradiado. Vale destacar que o criseno irradiado não havia apresentado fosforescência na presença do nitrato de chumbo em substratos sem SDS, porém, na presença de SDS apresentou um sinal relativo de 107 unidades arbitrárias de luminescência (u.a.) como é mostrado na Figura 23. Não existiu grande alteração no par  $\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ , em relação ao espectro observado sem SDS nos casos do sinal induzido por Ti(I) e Ag(I).

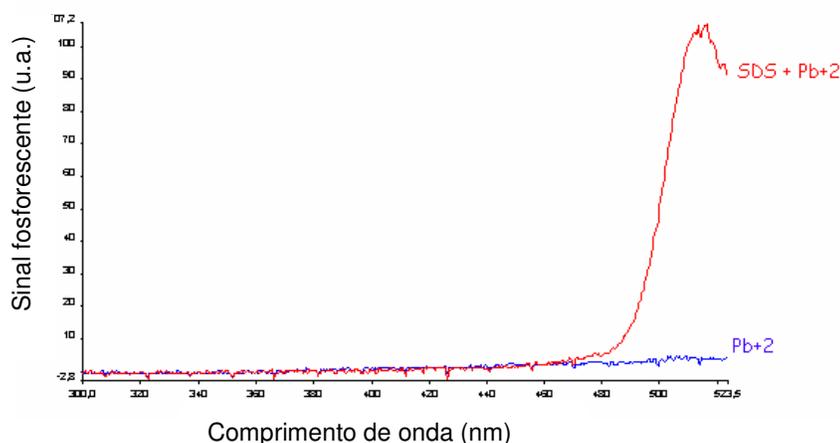


Figura 23: Espectro de emissão do criseno (57 ng) irradiado (30 min UV) na presença de nitrato de chumbo (indicado acima como o íon de átomo pesado do sal) em substratos de papel contendo ou não 100  $\mu$ g de SDS. (Espectro indicado é atenuado para 25% do valor original).

Esse resultado pode ser interessante do ponto de vista seletivo na determinação de pireno.

### 3.1.3.

#### **Estudo da influência da variação da acidez e basicidade da solução carreadora de pireno e de criseno**

A composição da solução carreadora de um potencial fósforo (substância fosforescente) pode influir significativamente no sinal observado em substrato sólido. As razões para isto podem ser divididas em: (i) mudanças da estrutura do analito em solução formando espécies com maior eficiência quântica fosforescente, (ii) formação de espécies com cargas que têm maior probabilidade de apresentar sinais mais intensos no papel por causa da melhor interação e maior rigidez molecular depois de absorvidas no papel, e (iii) efeito do solvente no substrato sólido atuando na compatibilidade entre analito e o substrato utilizado.

Com objetivo de verificar se ocorreriam mudanças nas características fosforescentes dos compostos pireno e criseno, programou-se um estudo similar ao anteriormente descrito, porém, mudando a concentração hidrogeniônica do meio, ou seja, comparação do sinal dos analitos preparados em etanol/água 50/50% v/v (pH 5,5 - não ajustado). Para tal, soluções carreadoras em meio ácido (etanol/ solução aquosa de HNO<sub>3</sub> 50/50% v/v) e em meio básico (etanol/solução aquosa de NaOH 50/50% v/v). As concentrações finais de NaOH e de HNO<sub>3</sub> nesses meios foi de 0,2 mol L<sup>-1</sup>. Esse estudo foi realizado somente com aqueles sais indutores de fosforescência que já haviam indicado resultados positivos para pireno e criseno.

#### **3.1.3.1.**

##### **Pireno**

Estudou-se o efeito apenas em substratos contendo sais dos átomos pesados tálio e chumbo. Os sinais relativos em pH original das soluções etanólicas foram incluídos com o propósito de comparação. Observou-se que a variação de pH influencia no sinal e que a melhor intensidade ocorre em pH não ajustado da solução no caso do nitrato de tálio e em pH básico na presença do nitrato de chumbo. Nesse último caso, um aumento significativo de sinal foi observado. Não se observou mudança no par  $\lambda_{exc.}/\lambda_{em.}$  ao se variar a concentração hidrogeniônica do meio onde

os analitos foram preparados. Isso indica que esse efeito provavelmente é proveniente de uma interação solução-substrato e não uma modificação no pireno, mesmo por que, reações ácido-base são muito pouco prováveis nessas moléculas, nas condições experimentais utilizadas.

Gráficos de barras de sinal fosforescente em função da concentração hidrogeniônica das soluções carreadoras (meios utilizados) mostram esse efeito em substratos na presença e na ausência de SDS para nitrato de tálio (Figura 24) e para nitrato de chumbo (Figura 25). Observa-se que a intensidade de sinal fosforescente em substratos contendo SDS decresce para o pireno na presença de sal de tálio independente do meio. Na presença de sal de chumbo a concentração hidrogeniônica do meio é de extrema importância em substratos não contendo SDS. O estudo, na presença de SDS e de chumbo não foi apresentado, pois quando realizado anteriormente a intensidade de sinal foi muito baixa. No entanto, pretendem-se incluir essa situação no planejamento experimental, estudos multivariado, para validar os resultados anteriores.

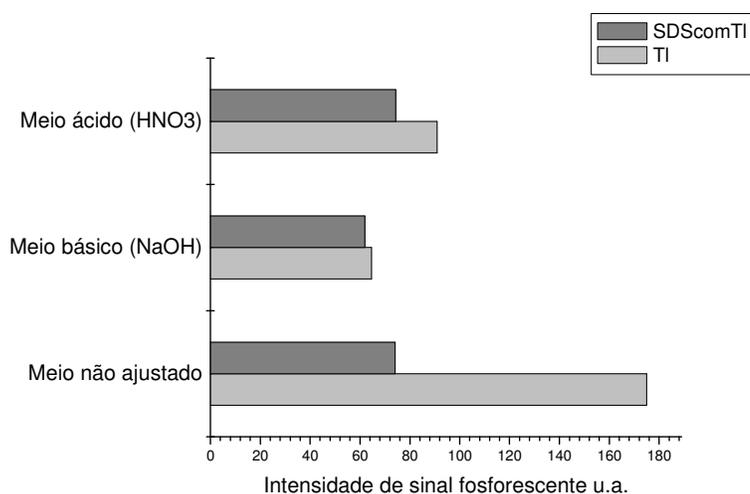


Figura 24: Gráfico de barras do pireno (51 ng) na presença de nitrato de tálio (indicado acima como o íon de átomo pesado do sal) em substratos de papel na presença e ausência de SDS e em função da concentração hidrogeniônica da solução carreadora de analito.

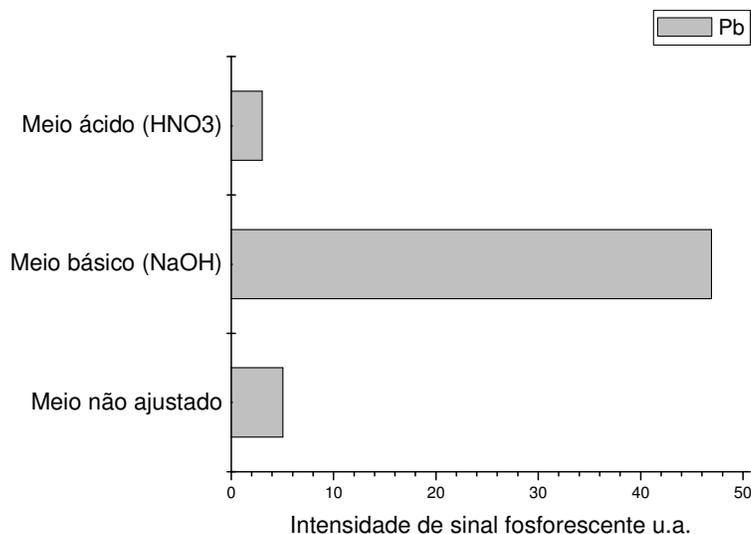


Figura 25: Gráfico de barras do pireno (51 ng) na presença de nitrato de chumbo (indicado acima como o íon de átomo pesado do sal) em substratos de papel e em função da concentração hidrogeniônica da solução carreadora de analito.

### 3.1.3.2. Criseno

A seguir, para o criseno, estudou-se o efeito da concentração hidrogeniônica usando sais de tálio, de prata e de chumbo. Pelo experimento, constatou-se que a variação de concentração hidrogeniônica do meio não influencia grandemente no sinal. Um estudo na presença de SDS também foi realizado e o resultado, se comparado com o obtido anteriormente, existe apenas um aumento relativo de sinal do criseno em meio básico ou ácido em substrato contendo nitrato de chumbo, quando comparado com o obtido em etanol/água. Observa-se que em presença de prata e SDS um aumento significativo na intensidade de sinal fosforescente, principalmente em meio etanol/água.

Gráfico de barras de sinal fosforescente em função do meio para os sais de tálio, de prata e de chumbo na presença e ausência de SDS encontra-se nas figuras 26, 27 e 28, respectivamente.

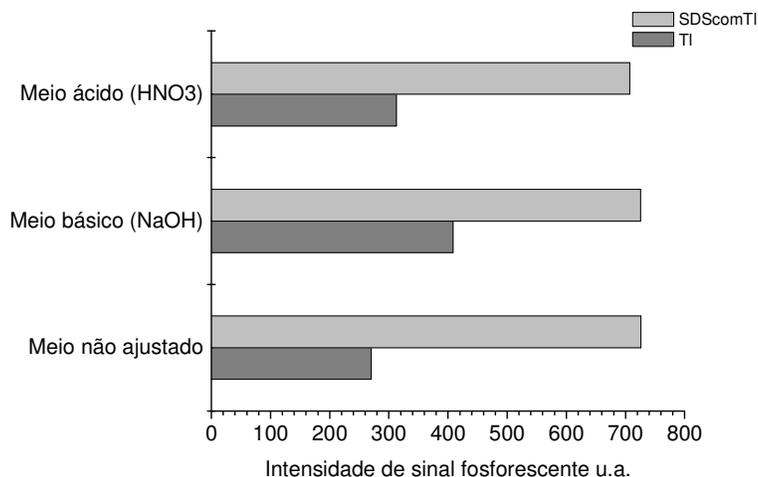


Figura 26: Gráfico de barras do crisenol (57 ng) na presença de nitrato de tálio (indicado acima como o íon de átomo pesado do sal) em substratos de papel na presença e ausência de 100 µg de SDS e em função da concentração hidrogeniônica da solução carreadora de analito.

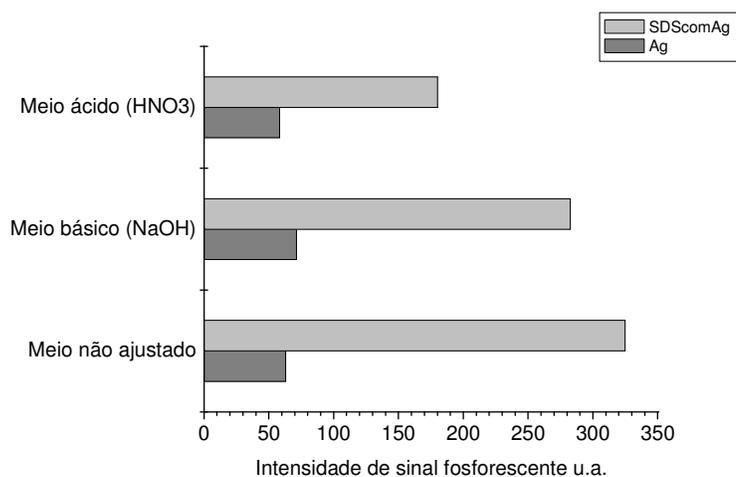


Figura 27: Gráfico de barras do crisenol (57 ng) na presença de nitrato de prata (indicado acima como o íon de átomo pesado do sal) em substratos de papel na presença e ausência de 100 µg de SDS e em função da concentração hidrogeniônica da solução carreadora de analito.

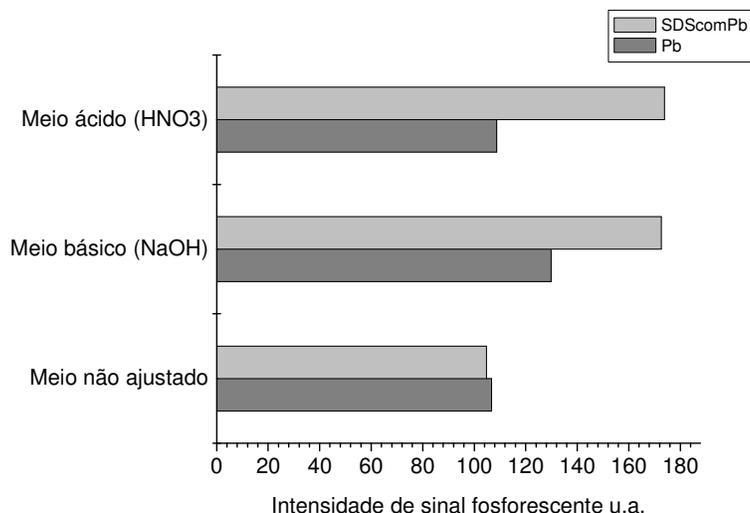


Figura 28: Gráfico de barras de emissão do criseno (57 ng) na presença de nitrato de chumbo (indicado acima como o íon de átomo pesado do sal) em substratos de papel na presença e ausência de 100 µg de SDS e em função da concentração hidrogeniônica da solução carreadora de analito.

### 3.1.4. Estudo da influência da variação do pH no pireno e criseno irradiados com UV

Um estudo semelhante foi realizado com soluções de pireno e de criseno previamente irradiadas. Para o pireno irradiado, observou-se amplificação de 2,2 vezes na presença de Tl(I) tanto em substratos na presença de SDS quanto na ausência de SDS. Para o chumbo não se obteve diferenças significativas, não justificando, a princípio, a utilização de SDS com radiação UV. Da mesma forma como para o pireno os mesmos estudos foram realizados para o criseno. A variação da concentração hidrogeniônica do meio das amostras irradiadas não acarretou em vantagens do ponto de vista das mudanças de características espectrais do criseno (intensidade de sinal e máximos de excitação e de emissão).

### 3.2. Ajuste de condições experimentais

Após a avaliação das características fosforescentes que potencialmente viabilizariam a determinação de criseno e de pireno, as

condições experimentais mais promissoras, do ponto de vista seletivo, foram selecionadas para um ajuste mais refinado por meio de otimização univariada e multivariada. Em princípio muitas das condições experimentais têm potencial para a determinação seletiva, tomando como referência o comportamento e as características espectrais dos outros sete HPA, por isso as condições selecionadas se basearam conjuntamente no efeito seletivo do sal de átomo pesado e nas características espectrais obtidas. Na etapa de prospecção, pouca atenção foi dada para a comparação entre as intensidades relativas dos sinais observados com diferentes sais de átomos pesados, pois a magnitude da fosforescência de uma substância em substrato de papel depende substancialmente das quantidades relativas de coadjuvantes no substrato (sal de AP e SDS) assim como o ajuste adequado das condições da solução carreadora. Assim, uma situação que aparentemente havia induzido um maior sinal fosforescente na etapa de prospecção não será necessariamente a que produzirá o sinal mais intenso quando as condições experimentais forem ajustadas. No presente capítulo, o estabelecimento das condições para a o aumento do sinal fosforescente foi realizado. O estudo com o pireno envolveu as condições de indução de fosforescência com  $\text{TINO}_3$  e com  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ . Em ambos os casos, as características espectrais indicam que a determinação seletiva pode ser alcançada na presença dos outros HPA estudados, principalmente o criseno. Para o caso envolvendo  $\text{TINO}_3$  foi realizado um estudo univariado, seguido por um estudo multivariado (planejamento fatorial em dois níveis) para o refinamento final do ajuste. Nesse caso, com base no estudo univariado os dois níveis foram escolhidos para cada variável (fator) estudada. Este estudo multivariado teve três objetivos: (i) refinar o ajuste para aumento do sinal; (ii) identificar eventuais interações importantes entre os fatores e (iii) avaliar, ainda que preliminarmente, a robustez para cada uma das variáveis. Para o pireno induzido por  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ , o ajuste de condições se iniciou com o planejamento fatorial para que fosse feita uma comparação entre os dois processos. No caso do criseno, o  $\text{AgNO}_3$  foi escolhido como indutor de

fosforescência baseado no efeito externo seletivo alcançado em relação ao pireno.

### **3.2.1.**

#### **Otimização da fosforescência do pireno induzida por $\text{TINO}_3$**

No caso da fosforescência induzida por  $\text{TI(I)}$  os estudos indicaram que a irradiação prévia de amostra com UV era prejudicial em termos de decréscimo de sinal fosforescente, por isso esse artifício não foi incluído nessa etapa de ajuste. Os resultados preliminares indicaram também etanol/água deveria ser o solvente de escolha. No entanto, a variação da concentração hidrogeniônica do meio foi incluído nesse estudo de refinamento (planejamento fatorial).

#### **3.2.1.1.**

##### **Estudo univariado dos parâmetros**

Um estudo univariado foi realizado para se conhecer o comportamento do sinal fosforescente do pireno em função dos seguintes parâmetros: concentração das soluções de sais de átomos pesados e da solução de SDS usadas para adição no substrato, concentração hidrogeniônica da solução carreadora de analito e tempo de irradiação com UV.

##### **3.2.1.1.1.**

##### **Influência da quantidade de $\text{TINO}_3$ no sinal fosforescente do pireno**

O efeito externo do átomo pesado resulta no aumento da velocidade do cruzamento entre os estados excitados singleto e tripleto e velocidade da transição entre os estados excitados tripleto e fundamental, de forma a aumentar o sinal fosforescente. Os estudos preliminares conduzidos demonstraram o efeito benéfico do sal de tálio e do sal de chumbo para o pireno, porém, sabe-se que a magnitude da amplificação do sinal fosforescente é dependente da quantidade depositada do sal AP no substrato sólido, diante disso um estudo desse parâmetro foi necessário. Vale ressaltar que quantidades muito altas do sal de AP podem acarretar

decréscimo de fosforescência devido, entre outras possibilidades, ao efeito filtro de radiação de excitação. Assim, para este teste foram depositadas no substrato soluções de  $\text{TlNO}_3$  em diversas concentrações (5  $\mu\text{l}$  de solução entre 0,01 a 0,25  $\text{mol L}^{-1}$ ) para que nessas condições se monitorasse o sinal fosforescente do pireno. Em termos de massa do sal, a faixa estudada foi entre 13 e 333  $\mu\text{g}$ . Desde que apenas uma adição em substrato foi utilizada nessa etapa, a massa final foi limitada pela concentração máxima de solução.

Os espectros de emissão fosforescente do pireno em função da concentração de solução de  $\text{TlNO}_3$  encontram-se ilustrados na Figura 29, permitindo observar que o sinal fosforescente cresce à medida que a quantidade de  $\text{Tl(I)}$  aumenta no substrato. Esse resultado indica que potencialmente existiria crescimento de sinal se a massa de sal for aumentada por meio de adições múltiplas da solução de nitrato de tálio. Quanto à variação das características espectrais, observa-se que os  $\lambda_{\text{exc}}$  e o  $\lambda_{\text{em}}$  do pireno não variam significativamente com a quantidade de nitrato de tálio no substrato.

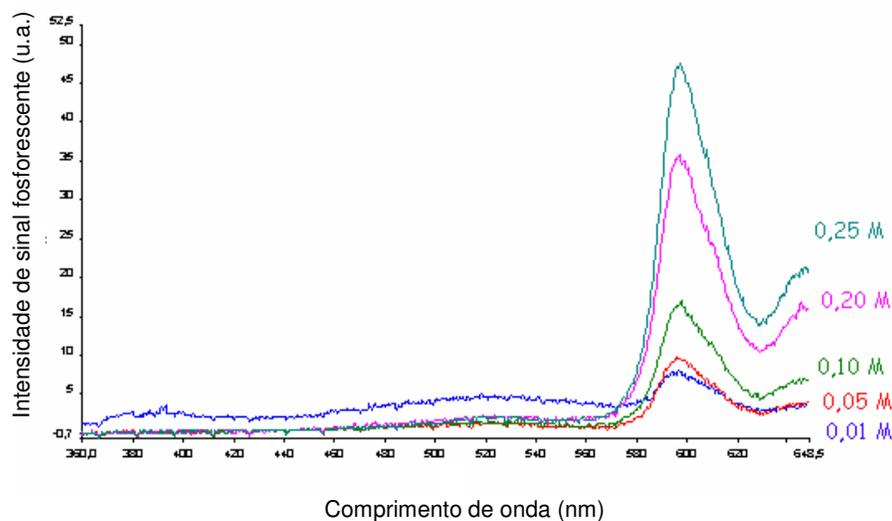


Figura 29: Espectro de emissão de fosforescência de 5 ng de pireno em função da concentração de solução de  $\text{TlNO}_3$  depositada no substrato. Excitação em 335 nm.

### 3.2.1.1.2.

#### **Influência da quantidade de SDS no sinal fosforescente do pireno**

Os surfactantes vêm sendo utilizados para melhorar as interações entre o analito, sal de átomo pesado e substrato sólido. O surfactante pode atuar aumentando rigidez do analito no substrato ou melhorando o contato do sal de AP com o analito. O efeito no sinal fosforescente causado pela quantidade depositada de surfactante no substrato sólido tem se mostrado importante já que o aumento de sinal é observado muitas vezes somente para uma faixa de massa de modificador presente no substrato. Já o excesso de SDS pode ocasionar efeito filtro ou mesmo atuar de maneira contrária, separando por demais o sal de átomo pesado e molécula de interesse.

De acordo com os estudos experimentais a intensidade de sinal do pireno induzido por nitrato de tálio não foi alterado na presença de 100  $\mu\text{g}$  de SDS. Decidiu-se, no entanto realizar estudo do sinal fosforescente do pireno em função da concentração de solução de SDS depositada no substrato. Para tal, quantidades fixas de nitrato de tálio (5  $\mu\text{L}$  de solução 0,25 mol  $\text{L}^{-1}$  ou 333  $\mu\text{g}$  do sal no substrato) foram usadas enquanto a massa de SDS foi variada entre 14 e 360  $\mu\text{g}$  (5  $\mu\text{L}$  de solução entre 0,01 e 0,25 mol  $\text{L}^{-1}$ ). Pode-se verificar na Figura 30 que o sinal fosforescente do pireno sofreu uma amplificação considerável apenas em substratos contendo 360  $\mu\text{g}$  de SDS. Para as massas menores, não se detectou diferença significativa entre os resultados obtidos em substratos sem ou com SDS, confirmando o que foi visto no estudo preliminar. A amplificação de sinal do pireno na presença de 360  $\mu\text{g}$  de SDS foi de 60 vezes. Este resultado indica uma importante relação entre o efeito do tálio e o surfactante.

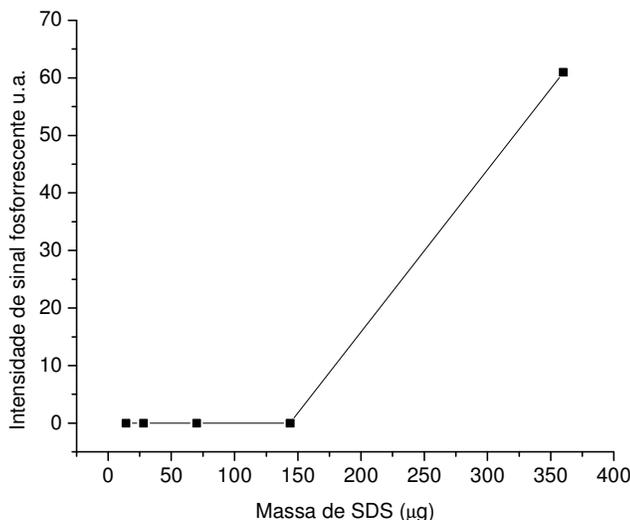


Figura 30: Estudo da influência da variação da massa de SDS no substrato de papel no sinal fosforescente do pireno induzido por  $\text{TINO}_3$ .

### 3.2.1.2.

#### **Estudo multivariado (planejamento fatorial) da fosforescência do pireno induzida por $\text{TINO}_3$**

Grande parte dos experimentos envolve mais de uma variável (fator) a ser ajustada. Quando se têm vários fatores de interesse no experimento, o planejamento fatorial (PF) em dois níveis pode ser usado, visando principalmente verificar a existência de interação mútua entre os efeitos de diferentes variáveis experimentais e, conseqüentemente, escolha da condição experimental ótima.<sup>46, 47</sup> No processo, os fatores são variados conjuntamente (ao contrário de um experimento univariado) e, normalmente, a análise é realizada em replicatas autênticas (a partir de soluções de analito independentes) e por ordem de aleatória. Nesses casos, ao se contar todas as combinações possíveis (com dois níveis que definem a faixa de estudo para cada fator) tem-se um estudo fatorial de  $2^n$ , n denotando o número de fatores envolvidos.

Neste estudo, foram propostos: a análise experimental estatística (testou-se a significância dos efeitos dos fatores usando a análise de variância, teste F e teste t), o uso do método gráfico (gráfico de Pareto), a interpretação das interações (entre as variáveis) e dos resultados obtidos, assim como o refinamento do modelo, se necessário, excluindo-se as

variáveis irrelevantes no experimento. Visando ainda a confiabilidade dos resultados e minimização de tempo do processo, optou-se por realizar o planejamento fatorial, fazendo o uso do software Statística 6.0, utilizado como ferramenta de apoio.<sup>47</sup>

Com base nos resultados obtidos e, conseqüentemente nas variáveis referentes ao pireno na presença de sal de tálio, optou-se por realizar um PF com um total de variáveis igual a três (fatorial de  $2^3$ ). Para tal, as variáveis e as faixas para o estudo foram escolhidas com base no estudo univariado e no conhecimento prévio do comportamento de cada fator. O nível mais baixo foi indicado por (-) enquanto (+) indicou o nível mais alto. As variáveis e os dois níveis para cada uma foram: (i) a quantidade de  $TiNO_3$  depositada no substrato, sendo  $133 \mu g$  (-) e  $466 \mu g$  (+), no qual a maior massa foi obtida pela dupla adição de solução de  $TiNO_3$   $0,20 \text{ mol L}^{-1}$ ; (ii) a quantidade de SDS cuja faixa foi entre  $0 \mu g$  (-) e  $720 \mu g$  (+), no qual o último valor foi obtido pela dupla adição de  $5 \mu l$  de solução  $0,25 \text{ mol L}^{-1}$  de SDS; (iii) o valor do pH da solução, sendo pH 5,5 o valor não ajustado da solução de analito em etanol/água (-) e pH 9 (+). Esse último fator não foi avaliado no estudo univariado por causa da indicação do estudo preliminar de que o maior sinal seria obtido com a solução em etanol/água. No entanto, nesse estudo multivariado, uma faixa de estudo avançando levemente na faixa básica de pH foi testada. Os dados foram gerados aleatoriamente pelo programa estatístico baseado como indicado na planilha com 16 experimentos (duas replicatas para cada experimento). Na Tabela 6 encontra-se o planejamento, a ordem de realização dos mesmos e os valores de sinal fosforescência obtidos.

Tabela 6: Resultados obtidos com os experimentos do planejamento fatorial:  $2^3$  usando  $\text{TINO}_3$

Ordem	Experimento	replicata	SDS ( $\mu\text{g}$ )	$\text{TINO}_3$ ( $\mu\text{g}$ )	pH	Resultado <sup>a</sup> (ua)
1	9	2	0	133	5,5	<b>34</b>
2	7	1	720	133	9	<b>32</b>
3	6	1	0	466	9	<b>102</b>
4	14	2	0	466	9	<b>34,3</b>
5	15	2	720	133	9	<b>50,2</b>
6	2	1	0	466	5,5	<b>86,8</b>
7	11	2	720	133	5,5	<b>38,2</b>
8	4	1	720	466	5,5	<b>110</b>
9	3	1	720	133	5,5	<b>26,7</b>
10	1	1	0	133	5,5	<b>19,5</b>
11	5	1	0	133	9	<b>28,8</b>
12	10	2	0	466	5,5	<b>48,3</b>
13	16	2	720	466	9	<b>80,1</b>
14	8	1	720	466	9	<b>124,6</b>
15	13	2	0	133	9	<b>35,7</b>
16	12	2	720	466	5,5	<b>81,7</b>

<sup>a</sup> Fosforescência em unidades arbitrárias (ua).

O gráfico de Pareto (Figura 31) indica os efeitos que são estatisticamente significantes no modelo. Por este gráfico, as barras que por ventura ultrapassam a linha vermelha divisória (nível de confiança  $p = 0,05$ ) são referentes a parâmetros significantes no modelo que ainda precisam ser ajustados para a obtenção da condição ótima. O número à frente de cada barra representa o valor experimental da distribuição t de Student. Pode-se observar que dentro da faixa escolhida, todas as interações entre fatores são insignificantes. Os fatores isolados, com exceção da massa de sal de tálio, parecem também não ter significância considerando os níveis escolhidos, indicando, em princípio, que os parâmetros são robustos dentro das faixas selecionadas.

A Tabelas 7 (estatística ANOVA) e a Tabela 8 (estimativa de efeitos), também gerados pelo sistema, confirmam que a massa de  $\text{TINO}_3$  precisa ainda de ajuste (indicado pelos valores pontilhados, o que significa que o modelo está com valores acima do nível de confiança estabelecido de 95%) No caso do teste F, o valor experimental de  $F_{(0,05;1;9)} = 19,03$  é muito

maior que o valor crítico tabelado ( $F_{\text{tab}(0,05,1,9)} = 5,12$ ). Assim, a faixa de trabalho para a concentração de  $\text{TINO}_3$  precisa ser expandida devido ao sinal positivo indicada nas tabelas e no gráfico de Pareto.

Em termos de pH, o estudo indicou que a faixa de 5,5 a 9,0 está adequada. O resultado influenciou a escolha da solução etanol/água (pH 5,5). Já o resultado para SDS, que em princípio indicou a não influência da presença do SDS, considerando os dois níveis escolhidos, na verdade mostra pela avaliação conjunta com o estudo univariado, que um resultado intermediário deve ser escolhido. Assim uma adição de 5  $\mu\text{L}$  solução 0,25 mol  $\text{L}^{-1}$  foi usada.

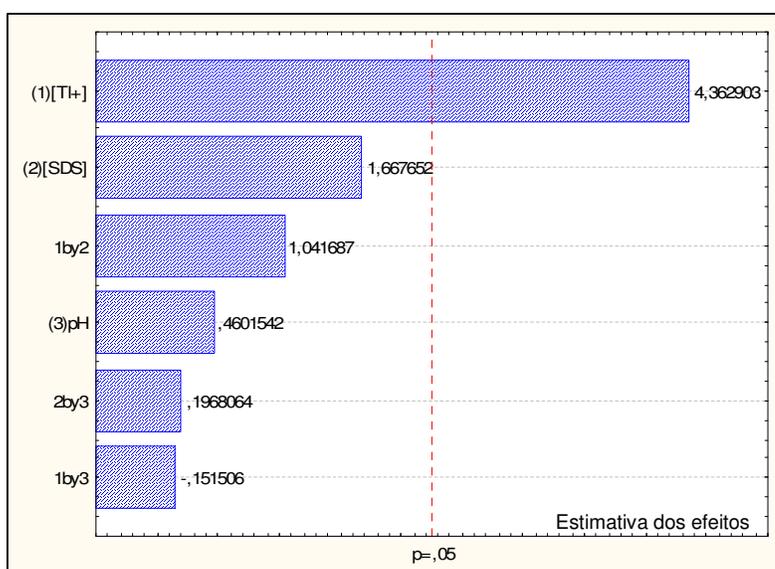


Figura 31: Gráfico de Pareto para fosforescência de pireno induzida por  $\text{TINO}_3$ .

Tabela 7: Estatística ANOVA para fosforescência de pireno induzida por  $\text{TINO}_3$ .

ANOVA; Var.:DV_1; R-quad.=,72028; Adj:.,53379 (PF_TI_Pireno) 2**(3-0) modelo; MQ Residual=532,149 DV: DV_1					
Fator	SQ	df	MQ	F	p
(1)[TI+]	10129,42	1,00	10129,42	19,0349	0,00182
(2)[SDS]	1479,94	1,00	1479,94	2,7811	0,12973
(3)pH	112,68	1,00	112,68	0,2117	0,65632
1 by 2	577,44	1,00	577,44	1,0851	0,32473
1 by 3	12,22	1,00	12,22	0,0230	0,88292
2 by 3	20,61	1,00	20,61	0,0387	0,84835
Erro	4789,34	9,00	532,15		
Total SQ	17121,64	15,00			

Tabela 8: Estimativa de efeitos para fosforescência de pireno induzida por  $\text{TINO}_3$ .

Estimativa de efeitos; Var.:DV_1; R-quad.=,72028; Adj:,53379 (PF_TI_Pireno) 2**(3-0) modelo; MQ Residual=532,149 DV: DV_1										
Fator	Efeito	Erro Padrão	t(9)	p	-95.% Cnf.Limt	+95.% Cnf.Limt	Coef.	Erro padrão Coeff.	-95.% Cnf.Limt	+95.% Cnf.Limt
Média/Interc.	58,31	5,77	10,11	0,000	45,3	71,35	58,31	5,767	45,3	71,35
(1)[TI+]	50,32	11,53	4,36	0,002	24,2	76,41	25,16	5,767	12,1	38,21
(2)[SDS]	19,24	11,53	1,67	0,130	-6,9	45,33	9,62	5,767	-3,4	22,66
(3)pH	5,31	11,53	0,46	0,656	-20,8	31,40	2,65	5,767	-10,4	15,70
1 by 2	12,02	11,53	1,04	0,325	-14,1	38,11	6,01	5,767	-7,0	19,05
1 by 3	-1,75	11,53	-0,15	0,883	-27,8	24,34	-0,87	5,767	-13,9	12,17
2 by 3	2,27	11,53	0,20	0,848	-23,8	28,36	1,14	5,767	-11,9	14,18

Como a massa de sal de  $\text{TI(I)}$  foi indicada como a única variável a ser ajustada, realizou-se novamente um estudo univariado, expandindo-se a massa de nitrato de tálio depositada por meios de adições múltiplas de 5  $\mu\text{L}$  de solução 0,20  $\text{mol L}^{-1}$ . Foram testadas de 1 (266  $\mu\text{g}$ ) a 4 (1064  $\mu\text{g}$ ) adições de solução de sal de tálio. A Figura 32 mostra a média de três medições com respectivos desvios-padrão para a faixa estudada, indicando o uso de duas a três adições de solução de nitrato de tálio (798  $\mu\text{g}$ ).

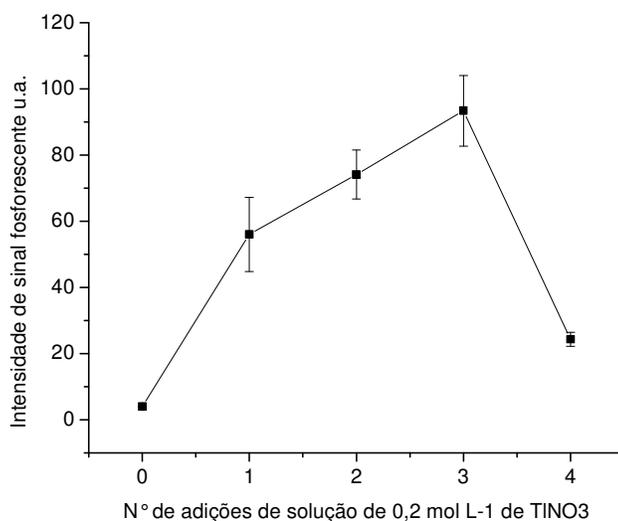


Figura 32: Ajuste final da massa de  $\text{TINO}_3$  (por meio de adições múltiplas de solução 0,20  $\text{mol L}^{-1}$ ) no substrato contendo 360  $\mu\text{g}$  de SDS para indução de fosforescência de 5 ng de pireno.

Estudo similar foi feito usando substratos sem SDS. Nesse caso, a curva indicou tendência contrária, com diminuição de sinal a partir da primeira adição de nitrato de tálio. Isso mostra que efetivamente existe

uma ação sinérgica entre o efeito externo exercido pelo tálio e a presença do SDS. Os dados da Tabela 9 resumem as condições experimentais escolhidas para o composto pireno na presença de nitrato de tálio.

Tabela 9: Resumo das condições experimentais para indução de fosforescência do pireno na presença de nitrato de tálio.

<b>Sistema de solventes</b>	Água/etanol 50/50%, v/v
<b>Massa de TINO<sub>3</sub></b>	532 - 798 µg
<b>pH (faixa)</b>	5,5 -9
<b>Massa de SDS</b>	360 µg
<b>λ<sub>exc</sub>/λ<sub>em</sub></b>	335/597 nm

### 3.2.2.

#### Otimização da fosforescência do pireno induzida por Pb(II)

Para o ajuste de condições experimentais de fosforescência de pireno na presença de nitrato de chumbo, uma estratégia diferente foi usada. Nesse caso, um estudo multivariado fatorial de dois níveis foi realizado antes do estudo univariado.

### 3.2.3.

#### Estudo multivariado (Planejamento Fatorial) da fosforescência do pireno induzida por Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>

Com base nos resultados obtidos nos testes preliminares de fosforescência induzida por nitrato de chumbo, optou-se em realizar um planejamento fatorial com quatro variáveis experimentais (fatorial de 2<sup>4</sup>). Para tal, as variáveis (fatores) e as faixas para o estudo foram escolhidas baseando-se na experiência do grupo de pesquisa em relação ao ajuste de condições experimentais em SSRTP e nos estudos preliminares apresentados anteriormente. As variáveis e os dois níveis escolhidos para cada variável foram: (i) massa de Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> no substrato de 331 µg (-) ou 5 µL de solução 0,20 mol L<sup>-1</sup> e 662 µg (+) ou 5 µL de solução 0,40 mol L<sup>-1</sup>; (ii) massa de SDS de 0 µg (-) e 720 µg (+) ou duas adições de 5 µL de solução de SDS 0,25 mol L<sup>-1</sup>; (iii) tempo de exposição da solução de analito a radiação UV de 0 min (-) e 90 min (+); e (iv) pH de 6,5 e 11. Os valores de pH foram escolhidos de acordo com o indicado pelo estudo

preliminar, que indicou um melhor resultado para o pireno a partir de soluções em meio básico. Assim, um valor um pouco acima do pH não ajustado foi usado como nível inferior e um valor na faixa básica como nível superior. Nesse caso, se o sinal for favorecido em meios mais básicos, o resultado desse primeiro planejamento fatorial indicaria a expansão da faixa de trabalho.

A Figura 33, o gráfico de Pareto gerado pelo sistema, mostra quais são as variáveis e as faixas de trabalho que necessitam ser reavaliada, ou seja, se o modelo precisa de refinamento. Os dados das Tabelas 10 (ANOVA) e 11 (estimativa de efeitos) confirmam a necessidade de ajuste.

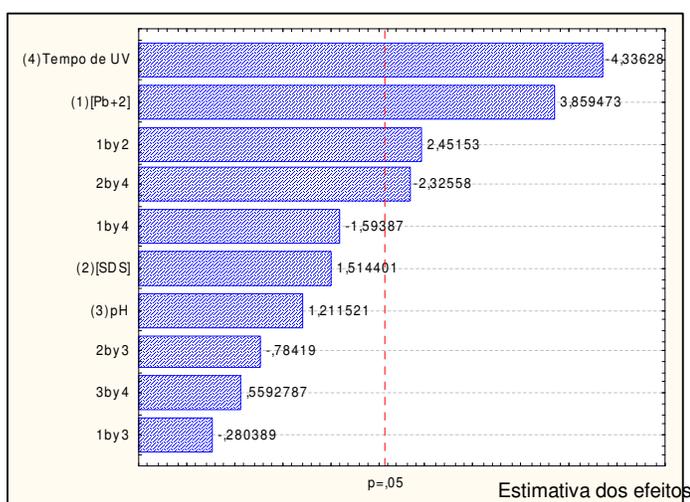


Figura 33: Gráfico de Pareto para fosforescência de pireno induzida por  $Pb(NO_3)_2$ .

Tabela 10 : Estatística ANOVA para fosforescência de pireno induzida por  $Pb(NO_3)_2$ .

Fator	ANOVA; Var.:DV_1; R-quad.=,71399; Adj:.,5778 (PF_Pb_Pireno) 2**(4-0) modelo; MQ Residual=5,559953 DV: DV_1				
	SQ	df	MQ	F	p
(1)[Pb+2]	82,82	1,0	82,82	14,896	0,0009
(2)[SDS]	12,75	1,0	12,75	2,293	0,1448
(3)pH	8,16	1,0	8,16	1,468	0,2392
(4)Tempo de UV	104,55	1,0	104,55	18,803	0,0003
1 by 2	33,42	1,0	33,42	6,010	0,0231
1 by 3	0,44	1,0	0,44	0,079	0,7819
1 by 4	14,12	1,0	14,12	2,540	0,1259
2 by 3	3,42	1,0	3,42	0,615	0,4417
2 by 4	30,07	1,0	30,07	5,408	0,0301
3 by 4	1,74	1,0	1,74	0,313	0,5819
Erro	116,76	21	5,56		
Total SQ	408,24	31			

Tabela 11 : Estimativa de efeitos para fosforescência de pireno induzida por  $Pb(NO_3)_2$ .

Estimativa de efeitos; Var.:DV_1; R-quad.=,71399; Adj:,5778 (PF_Pb_Pireno) 2**(4-0) modelo; MQ Residual=5,559953 DV: DV_1										
Fator	Efeito	Erro padrão	t(21)	p	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt	Coef.	Erro padrão	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt
Média/Interc.	4,77	0,417	11,44	0,000	3,90	5,64	4,77	0,417	3,90	5,637
(1)[Pb+2]	3,22	0,834	3,86	0,001	1,48	4,95	1,61	0,417	0,74	2,476
(2)[SDS]	1,26	0,834	1,51	0,145	-0,47	3,00	0,63	0,417	-0,24	1,498
(3)pH	1,01	0,834	1,21	0,239	-0,72	2,74	0,51	0,417	-0,36	1,372
(4)Tempo de UV	-3,62	0,834	-4,34	0,000	-5,35	-1,88	-1,81	0,417	-2,67	-0,941
1 by 2	2,04	0,834	2,45	0,023	0,31	3,78	1,02	0,417	0,16	1,889
1 by 3	-0,23	0,834	-0,28	0,782	-1,97	1,50	-0,12	0,417	-0,98	0,750
1 by 4	-1,33	0,834	-1,59	0,126	-3,06	0,40	-0,66	0,417	-1,53	0,202
2 by 3	-0,65	0,834	-0,78	0,442	-2,39	1,08	-0,33	0,417	-1,19	0,540
2 by 4	-1,94	0,834	-2,33	0,030	-3,67	-0,21	-0,97	0,417	-1,84	-0,103
3 by 4	0,47	0,834	0,56	0,582	-1,27	2,20	0,23	0,417	-0,63	1,100

Por meio desse tratamento estatístico conclui-se que o modelo em estudo necessita de um refinamento. A quantidade de  $Pb(NO_3)_2$  no substrato e o tempo UV precisam ser reavaliados. Como o sinal foi positivo para a massa de  $Pb(NO_3)_2$ , deve-se expandir a faixa trabalhada. Já para o tempo UV, o sinal apresentado foi negativo, devendo-se, assim, diminuir à faixa estudada. Os resultados indicaram que (i) interações entre o efeito externo do átomo pesado e a presença de SDS, (ii) a presença de SDS e o tratamento com UV precisam ser também verificadas.

Com base nessas informações, uma curva univariada foi realizada expandindo a concentração de solução de nitrato de chumbo depositada no substrato até  $1,0 \text{ mol L}^{-1}$  ( $1655 \mu\text{g}$ ) assim como outra curva univariada estreitando o tempo UV para 60 minutos. Após obter os resultados dessas curvas, constatou-se que os valores referentes às intensidades de sinais tanto para curva de sal de átomo pesado quanto para a de tempo UV estavam baixos e constantes. Uma nova verificação do pH das soluções de trabalho indicaram que o valor real de pH da solução era 5,3 ao invés do teoricamente ajustado para 6,5, o que poderia, em princípio, explicar o decréscimo na intensidade de sinal fosforescente. Assim, o estudo univariado foi refeito, dessa vez em pH 11, valor de pH na faixa superior ao utilizado no PF. No entanto, constatou-se novamente que os valores referentes às intensidades de sinais das duas curvas univariadas continuavam baixos e muito semelhantes. Assim, a necessidade de se realizar um estudo específico com a variável pH, na presença do átomo pesado chumbo ficou evidente. Baseado no estudo preliminar, onde o pireno irradiado (tempo UV de 30 min), na presença do átomo pesado

chumbo (331  $\mu\text{g}$  de nitrato de chumbo), apresentava intensidade de sinal fosforescente em pH básico (em meio de hidróxido de sódio na concentração final da solução carreadora de  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ ), decidiu-se realizar um estudo do efeito da concentração final de NaOH no sinal fosforescente. Os resultados obtidos indicaram que a faixa de maior intensidade de sinal fosforescente encontrava-se entre  $0,10$  e  $0,30 \text{ mol L}^{-1}$  de concentração de NaOH na solução carreadora. Na escala de pH, a faixa de valores dessas soluções etanólicas foi superior a 12 indicando o uso de um meio mais básico que o do valor superior da faixa anteriormente escolhida.

Após essa reavaliação, percebeu-se que a faixa anteriormente usada no PF estava equivocada, ou seja, o composto pireno na presença do nitrato de chumbo apresenta melhor sinal em pH extremamente básico e não na faixa anteriormente indicada. Isso pode ter ocorrido por que, ao contrário do esperado, o aumento de sinal do pireno só deva ocorrer para valores de pH acima de 11. Nesse caso, os sinais obtidos para 6,5 e 11 foram semelhantes (provavelmente nessa faixa inteira de pH) e logo o resultado do planejamento fatorial não poderia indicar a amplificação da faixa de trabalho.

A curva univariada de nitrato de chumbo foi refeita utilizando tempo UV de 30 min. Verificou-se um aumento de sinal até 331  $\mu\text{g}$  (5  $\mu\text{L}$  de solução  $0,40 \text{ mol L}^{-1}$ ) permanecendo estável até a presença de 1655  $\mu\text{g}$  (5  $\mu\text{L}$  de solução  $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ ) que foi o maior valor testado nesse experimento.

Diante das novas condições, o planejamento fatorial na presença do átomo pesado chumbo foi refeito com os dois níveis indicados: (i) massa de  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  no substrato de 662  $\mu\text{g}$  (-) ou 5  $\mu\text{L}$  de solução  $0,40 \text{ mol L}^{-1}$  e 1655  $\mu\text{g}$  (+) ou 5  $\mu\text{L}$  de solução  $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ ; (ii) massa de SDS de 0  $\mu\text{g}$  (-) e 720  $\mu\text{g}$  (+) ou duas adições de 5  $\mu\text{L}$  de solução de SDS  $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ ; (iii) tempo de exposição da solução de analito a radiação UV de 15 min (-) e 60 min (+); e (iv) concentração final de NaOH na solução etanólica de  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$  (-) e  $0,20 \text{ mol L}^{-1}$  (+). A Figura 34, gráfico de Pareto mostrando as variáveis que ainda necessitam de ajuste.

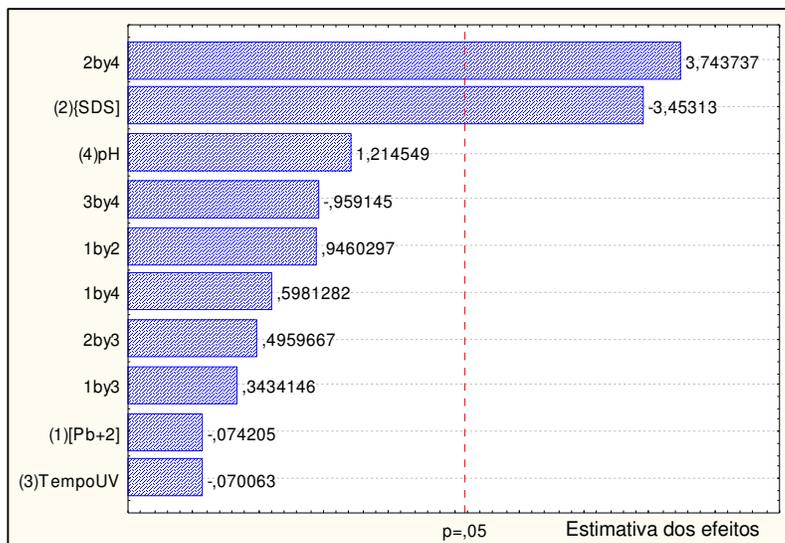


Figura 34 : Gráfico de Pareto para fosforescência de pireno induzida por  $Pb(NO_3)_2$  – Reavaliação I.

Por meio desse novo tratamento estatístico pôde-se concluir que o modelo em estudo ainda necessitava de um refinamento. A faixa de concentração SDS precisou ser reavaliada, assim como as interações entre o SDS e a concentração hidrogeniônica do meio. Como nos estudos preliminares, a presença de SDS (1 adição) era irrelevante e mesmo assim optou-se em incluí-lo no estudo multivariado (na forma de 2 adições), decidiu-se em retirá-lo dos testes por causa do menor valor indicado para adição dupla de SDS em relação a ausência de SDS. Nesse caso, ficou claro que um estudo univariado prévio teria sido importante para avaliação do comportamento do sinal fosforescente na presença de SDS e escolha da faixa de estudos. Com isso, o total de variáveis para o PF na presença de  $Pb(II)$  passou a ser três (fatorial de  $2^3$ ).

Na Tabela 12 encontram-se os dados desse experimento e os respectivos valores de intensidade de sinal obtidos. O gráfico de Pareto (Figura 35) e as Tabelas dos dados estatísticos (Tabela 13 e Tabela 14) mostram o planejamento após tratamento estatístico.

Tabela 12 : Resultados obtidos com os experimentos do planejamento fatorial  $2^3$  usando  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  como sal indutor de fosforescência – reavaliação II.

Ordem	Experimento	replicata	$\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ( $\mu\text{g}$ )	$\text{NaOH}$ ( $\text{mol L}^{-1}$ )	UV (min)	Resultado <sup>a</sup> (ua)
1	1	1	662	0,05	15	45,3
2	6	1	1655	0,05	60	17,1
3	15	2	662	0,20	60	8,3
4	3	1	662	0,20	15	35,8
5	9	2	662	0,05	15	22,1
6	13	2	662	0,05	60	17,5
7	11	2	662	0,20	15	19,1
8	5	1	662	0,05	60	39,8
9	7	1	662	0,20	60	22,7
10	10	2	1655	0,05	15	23,1
11	8	1	1655	0,20	60	10,4
12	12	2	1655	0,20	15	9
13	14	2	1655	0,05	60	11,6
14	16	2	1655	0,20	60	6,2
15	2	1	1655	0,05	15	22,1
16	4	1	1655	0,20	15	14,2

<sup>a</sup> Fosforescência em unidades arbitrárias (ua)

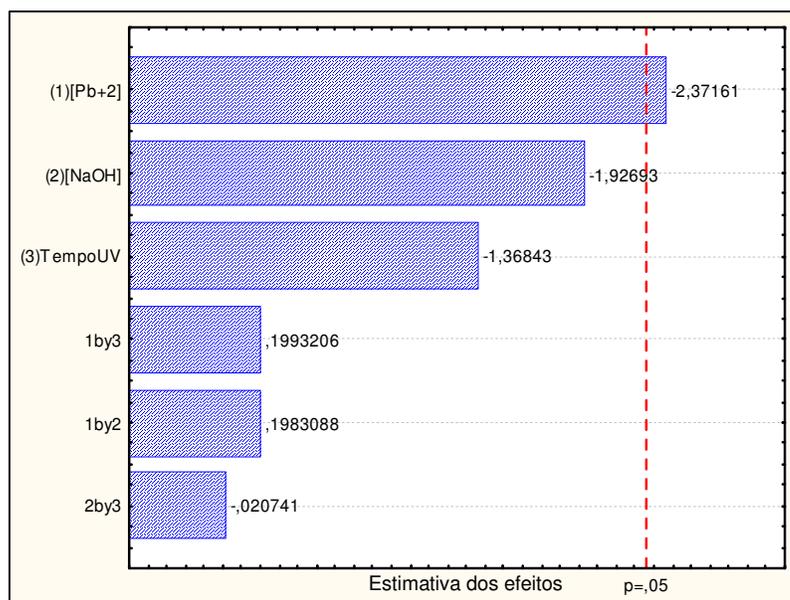


Figura 35 : Gráfico de Pareto para fosforescência de pireno induzida por  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  – Reavaliação II.

Tabela 13 : Estatística ANOVA para fosforescência de pireno induzida por  $Pb(NO_3)_2$  – Reavaliação II.

ANOVA; Var.:DV_1; R-quad.=,55643; Adj:,26071 (PFII_Pb_Pireno 2**(3-0) modelo; MQ Residual=97,68509 DV: DV_1					
Fator	SQ	df	MQ	F	p
(1)[Pb+2]	549,434	1	549,4336	5,624539	0,041798
(2)[NaOH]	362,712	1	362,7120	3,713075	0,086095
(3)TempoUV	182,926	1	182,9256	1,872605	0,204362
1 by 2	3,842	1	3,8416	0,039326	0,847211
1 by 3	3,881	1	3,8809	0,039729	0,846442
2 by 3	0,042	1	0,0420	0,000430	0,983904
Erro	879,166	9	97,6851		
Total SQ	1982,002	15			

Tabela 14 : Estimativa de efeitos para fosforescência de pireno induzida por  $Pb(NO_3)_2$  – Reavaliação II.

Estimativa de efeitos; Var.:DV_1; R-quad.=,55643; Adj:,26071 (PFII_Pb_Pireno) 2**(3-0) modelo; MQ Residual=97,68509 DV: DV_1										
Fator	Efeito	Erro padrão	t(9)	p	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt	Coef.	Erro padrão	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt
Média/Interc.	20,0612	2,470894	8,11902	0,000020	14,4717	25,65080	20,06125	2,470894	14,4717	25,65080
(1)[Pb+2]	-11,7200	4,941788	-2,37161	0,041798	-22,8991	-0,54090	-5,86000	2,470894	-11,4496	-0,27045
(2)[NaOH]	-9,5225	4,941788	-1,92693	0,086095	-20,7016	1,65660	-4,76125	2,470894	-10,3508	0,82830
(3)TempoUV	-6,7625	4,941788	-1,36843	0,204362	-17,9416	4,41660	-3,38125	2,470894	-8,9708	2,20830
1 by 2	0,9800	4,941788	0,19831	0,847211	-10,1991	12,15910	0,49000	2,470894	-5,0996	6,07955
1 by 3	0,9850	4,941788	0,19932	0,846442	-10,1941	12,16410	0,49250	2,470894	-5,0971	6,08205
2 by 3	-0,1025	4,941788	-0,02074	0,983904	-11,2816	11,07660	-0,05125	2,470894	-5,6408	5,53830

Com base nesse novo tratamento estatístico pôde-se concluir que o modelo em estudo ainda necessitava de um refinamento final para corrigir a massa de nitrato de chumbo. Assim, realizou-se uma curva univariada de fosforescência de pireno em função da massa de nitrato de chumbo no substrato. A Figura 36 mostra o resultado indicando a faixa entre 993 e 1655  $\mu g$  de  $Pb(NO_3)_2$  como a adequada ao uso.

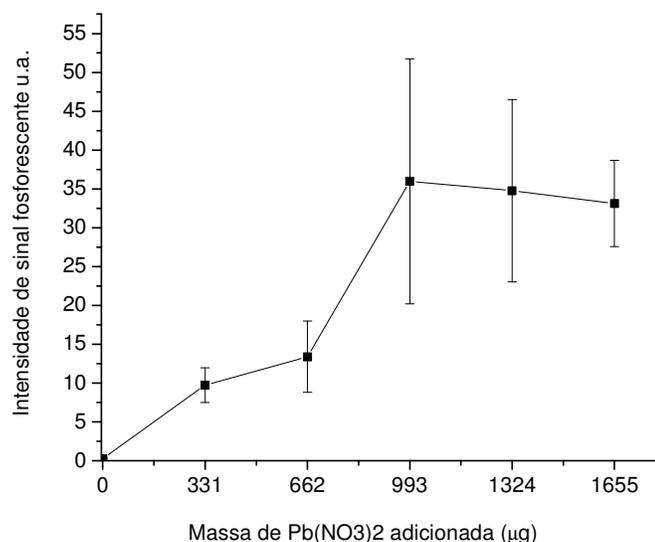


Figura 36 : Fosforescência do pireno (5 ng) em função da massa de Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> depositada no substrato. Solução previamente irradiada com UV por 30 min. (média das medições  $\pm$  1 desvio padrão).

Decidiu-se também realizar uma curva univariada para o tempo UV, para a faixa ideal fornecida pelo sistema (15 a 60 minutos), com o intuito de minimizar o tempo de preparação de amostra. O gráfico do tempo UV de irradiação da solução carreadora de pireno em função da intensidade de sinal fosforescente encontra-se na Figura 37. Observa-se que existe uma tendência de queda de sinal em função do aumento do tempo de irradiação, porém todos os valores estão dentro da variação estatística. Os dados da Tabela 15 resumem as condições experimentais escolhidas para o composto pireno na presença de chumbo.

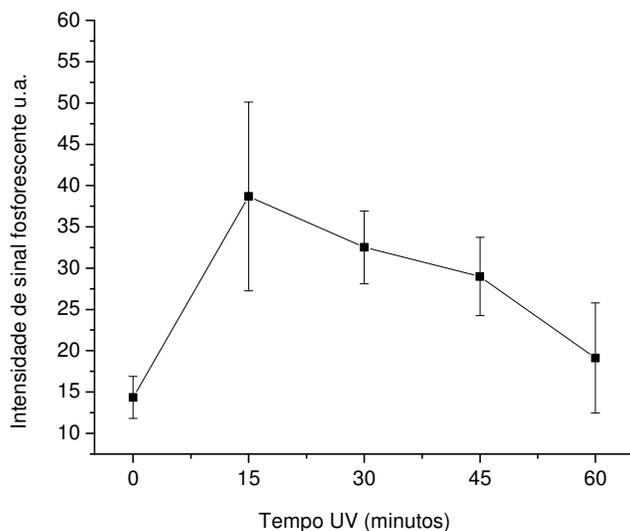


Figura 37 : Estudo da fosforescência de 5 ng pireno induzida por  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  em função do tratamento da solução carreadora de analito com radiação UV (média das medições  $\pm 1$  desvio padrão).

Tabela 15 : Resumo das condições experimentais para indução de fosforescência do pireno na presença de nitrato de chumbo.

<b>Sistema de solventes</b>	Etanol/solução aquosa NaOH 50/50%, v/v
<b>Concentração de NaOH da solução carreadora</b>	0,10 mol L <sup>-1</sup>
<b>Massa de <math>\text{Pb}(\text{NO}_3)_2</math></b>	993 – 1655 $\mu\text{g}^a$
<b>Tempo de UV</b>	15 – 45 min
<b><math>\lambda_{\text{exc}}/\lambda_{\text{em}}</math></b>	341/600 nm

<sup>a</sup>considerando apenas uma adição de 5  $\mu\text{L}$ .

### 3.2.4.

#### Otimização da fosforescência do criseno induzida por $\text{AgNO}_3$

Baseado nos estudos preliminares para o criseno, a condição de indução seletiva de fosforescência foi a que utiliza  $\text{Ag}(\text{I})$  como átomo pesado indutor, principalmente em relação a ausência de sinal para o pireno nas mesmas condições. Assim, para o criseno, o ajuste das condições experimentais foi apenas relacionado ao uso do nitrato de prata no substrato de celulose.

### **3.2.4.1. Estudo univariado dos parâmetros**

Para a escolha da estratégia de ajuste de condições experimentais fez-se uma avaliação crítica dos estudos realizados para o pireno e decidiu-se por realizar para o criseno, um estudo univariado de fatores seguido do ajuste final com o planejamento fatorial. Essa estratégia pareceu ser mais criteriosa na obtenção das condições de obtenção de fosforescência máxima, requerendo um menor número de tentativas de planejamento fatorial de dois níveis, caso as faixas de trabalho não fossem escolhidas corretamente. O estudo multivariado para o pireno com o átomo pesado chumbo mostrou a necessidade de se conhecer de antemão o comportamento de cada variável para que as faixas do planejamento fatorial fossem escolhidas adequadamente para a execução.

#### **3.2.4.1.1. Variação do sinal fosforescente do criseno em função da quantidade de $\text{AgNO}_3$ adicionada ao substrato**

Como feito anteriormente para o pireno, foram depositadas soluções de  $\text{AgNO}_3$  em diversas concentrações (de 0,01 a 0,06 mol L<sup>-1</sup>) no substrato para que nessas condições se monitorasse o sinal fosforescente do criseno. Em termos de massa, essa variação foi de 5 a 30 µg de nitrato de prata. Se essa faixa de massa for comparada com as faixas usadas para outros indutores de fosforescência (vide faixas de massa de  $\text{TlNO}_3$  e de  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  usadas para o pireno), verifica-se que é relativamente bem menor. A razão para isso é a fácil formação de filme de óxido de prata que escurece o substrato formando um filme que filtra a radiação de excitação. Como resultado, substratos contendo grandes quantidades de prata produzem quase sempre sinais fosforescentes significativamente mais baixos do que os observados com menores quantidades desse sal. Outro fato a se considerar é que devido esse processo, os desvios-padrão observados aumentam consideravelmente com a massa de sal de prata no substrato. Esse efeito pode ser observado na Figura 38, que mostra o resultado do estudo da variação do sinal fosforescente em função da

massa de  $\text{AgNO}_3$ . Embora exista uma leve tendência de aumento de sinal fosforescente com massas a partir de 10  $\mu\text{g}$  do sal, a comparação dos resultados obtidos com 10 e 30  $\mu\text{g}$  de nitrato de prata são estatisticamente semelhantes, por causa das variâncias maiores do ponto mais alto da curva. Quanto à variação das características espectrais, observa-se que os  $\lambda_{\text{exc}}$  e o  $\lambda_{\text{em}}$  do criseno não variam significativamente com a concentração de nitrato de prata.

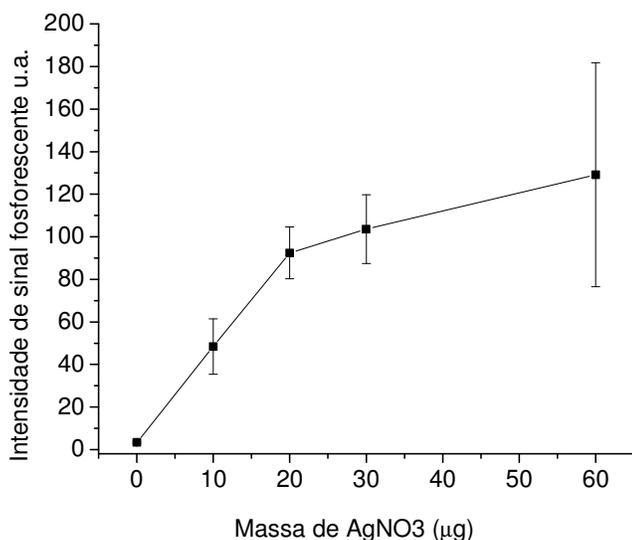


Figura 38 : Estudo da variação da fosforescência de 5 ng de criseno em função da massa de  $\text{AgNO}_3$  depositado no substrato de celulose. Solução carreadora usada foi etanol/água 50/50% v/v.

#### 3.2.4.1.2.

##### **Variação do sinal fosforescente do criseno em função da concentração da solução de SDS adicionada ao substrato**

A fosforescência do criseno induzida por  $\text{Ag(I)}$  foi estudada em função da massa de SDS no substrato. Uma única adição de soluções de SDS entre 0,01 e 0,25  $\text{mol L}^{-1}$  foi utilizada. Em termos de massa, essa variação foi de 18 a 360  $\mu\text{g}$  depositados no centro do substrato.

O resultado mostra que o sinal máximo é atingido com a maior massa de SDS, sendo que uma tendência de crescimento é indicada para adição múltipla desse coadjuvante (Figura 39). Quanto à variação das características espectrais, observa-se que os  $\lambda_{\text{exc}}$  e o  $\lambda_{\text{em}}$  do criseno não variam significativamente com a massa de SDS. Assim como observado

para o efeito externo do átomo pesado, a tendência da resposta fosforescente indica a tendência de aumento caso adições múltiplas de SDS fossem utilizadas.

A partir desses estudos univariados pôde-se fazer a escolha das faixas de estudo do planejamento fatorial para a fosforescência do criseno.

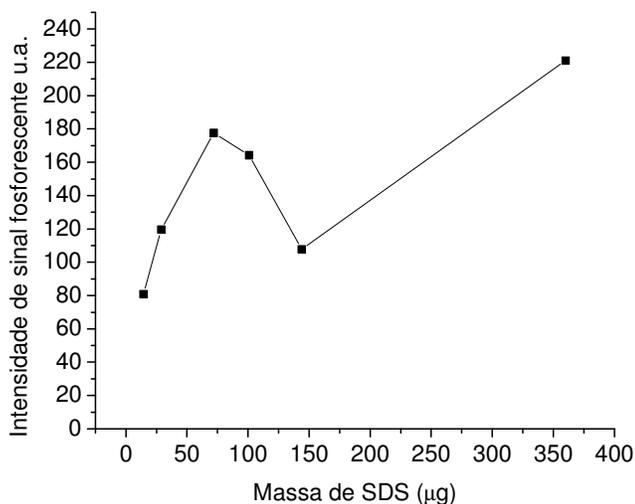


Figura 39: Estudo da variação da fosforescência de 5 ng de criseno induzida por 20 µg de  $\text{AgNO}_3$  em função da massa de SDS depositado no substrato de celulose. Solução carreadora usada foi etanol/água 50/50% v/v.

#### 3.2.4.2.

#### Estudo multivariado (Planejamento Fatorial) da fosforescência do criseno induzida por $\text{AgNO}_3$

Com base nos resultados referentes à fosforescência do criseno na presença de  $\text{AgNO}_3$ , optou-se em realizar um PF com um total de variáveis igual a três (fatorial de  $2^3$ ). Para tal, as variáveis e as faixas para o estudo foram escolhidas com base nos estudos preliminares, estudo univariado e conhecimento técnico do comportamento de cada fator. As variáveis e os dois níveis para cada uma delas foram: (i) massa de  $\text{AgNO}_3$  depositada no substrato de 30 µg (-) e 50 µg (+), respectivamente obtidas por uma única adição de solução 0,03 e 0,05 mol L<sup>-1</sup> de nitrato de prata; (ii) pH da solução carreadora igual a 5,5 (-), o natural da solução de analito em etanol/água e pH 9 (+). O valor do nível alto foi ajustado com gotas de NaOH 0,002 mol L<sup>-1</sup> (11 gotas) adicionadas no balão de 10 mL; e

(iii) a massa de SDS de 360  $\mu\text{g}$  (-) e 720  $\mu\text{g}$  (+), o equivalente a uma e duas adições de solução de SDS 0,25 mol L<sup>-1</sup> respectivamente.

Na Tabela 16 encontram-se listados os dados do experimento realizado e os valores de intensidade de sinal obtidos. A seguir, são mostrados, na Figura 40, o gráfico de Pareto e nas Tabelas 17 e 18 os dados estatísticos.

Com base no tratamento estatístico pôde-se concluir que o modelo em estudo necessita de um refinamento em relação ao pH da solução carreadora. Para a massa de prata é confirmada a robustez da faixa escolhida para a operação. No caso do SDS, desde que foi decidido que as adições múltiplas seriam apenas feitas com as soluções mais concentradas de SDS, o problema ficou restringido em escolher uma ou duas adições no substrato, o que nesse caso, a escolha lógica foi por uma única adição. Para o ajuste do modelo, realizou-se novamente uma curva univariada para o fator pH.

Tabela 16: Resultados obtidos com os experimentos do planejamento fatorial 2<sup>3</sup> usando AgNO<sub>3</sub> como sal indutor de fosforescência.

<b>Ordem</b>	<b>Experimento</b>	<b>replicata</b>	<b>AgNO<sub>3</sub> (<math>\mu\text{g}</math>)</b>	<b>SDS (<math>\mu\text{g}</math>)</b>	<b>pH</b>	<b>Resultado<sup>a</sup> (ua)</b>
1	14	2	30	720	9	<b>269,14</b>
2	9	2	30	360	5,5	<b>440,57</b>
3	13	2	30	720	5,5	<b>460,76</b>
4	6	1	30	720	9	<b>433,7</b>
5	15	2	50	720	5,5	<b>503,09</b>
6	11	2	50	360	5,5	<b>408,92</b>
7	10	2	30	360	9	<b>318,92</b>
8	1	1	30	360	5,5	<b>408,23</b>
9	8	1	50	720	9	<b>400,85</b>
10	5	1	30	720	5,5	<b>398,99</b>
11	4	1	50	360	9	<b>269,00</b>
12	3	1	50	360	5,5	<b>423,44</b>
13	7	1	50	720	5,5	<b>428,63</b>
14	16	2	50	720	9	<b>289,51</b>
15	2	1	30	360	9	<b>107,93</b>
16	12	2	50	360	9	<b>321,03</b>

<sup>a</sup> Fosforescência em unidades arbitrárias (ua)

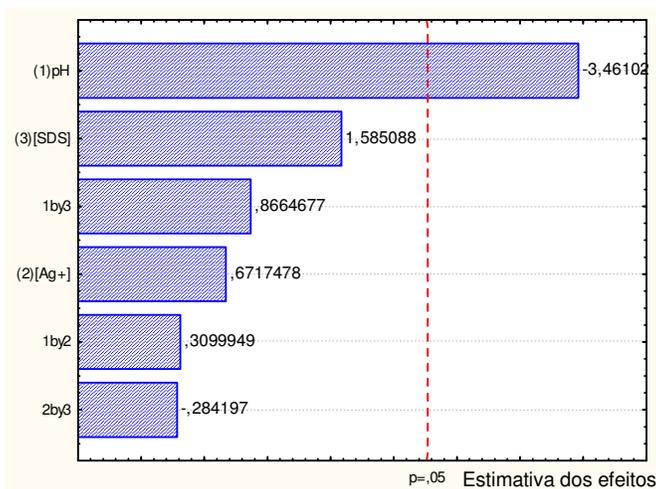


Figura 40: Gráfico de Pareto para fosforescência de criseno induzida por  $\text{AgNO}_3$ .

Tabela 17: Estatística ANOVA para fosforescência de pireno induzida por  $\text{AgNO}_3$ .

ANOVA; Var.:DV_1; R-quad.=,63812; Adj:.,39686 (PF_Ag_Crisenc 2**(3-0) modelo; MQ Residual=5890,758 DV: DV_1					
Fator	SQ	df	MQ	F	p
(1)pH	70563,3	1	70563,28	11,97864	0,007149
(2)[Ag+]	2658,2	1	2658,18	0,45125	0,518614
(3)[SDS]	14800,5	1	14800,55	2,51250	0,147407
1 by 2	566,1	1	566,08	0,09610	0,763623
1 by 3	4422,6	1	4422,58	0,75077	0,408739
2 by 3	475,8	1	475,79	0,08077	0,782689
Erro	53016,8	9	5890,76		
Total SQ	146503,3	15			

Tabela 18: Estimativa de efeitos para fosforescência de pireno induzida por  $\text{AgNO}_3$ .

Estimativa de efeitos; Var.:DV_1; R-quad.=,63812; Adj:.,39686 (PF_Ag_Criseno) 2**(3-0) modelo; MQ Residual=5890,758 DV: DV_1										
Fator	Efeito	Erro padrão	t(9)	p	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt	Coef.	Std.Err. Coeff.	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt
Média/Interc.	367,669	19,18782	19,16160	0,000000	324,264	411,0752	367,6694	19,18782	324,264	411,0752
(1)pH	-132,819	38,37564	-3,46102	0,007149	-219,630	-46,0070	-66,4094	19,18782	-109,815	-23,0035
(2)[Ag+]	25,779	38,37564	0,67175	0,518614	-61,033	112,5905	12,8894	19,18782	-30,516	56,2952
(3)[SDS]	60,829	38,37564	1,58509	0,147407	-25,983	147,6405	30,4144	19,18782	-12,991	73,8202
1 by 2	11,896	38,37564	0,30999	0,763623	-74,915	98,7080	5,9481	19,18782	-37,458	49,3540
1 by 3	33,251	38,37564	0,86647	0,408739	-53,560	120,0630	16,6256	19,18782	-26,780	60,0315
2 by 3	-10,906	38,37564	-0,28420	0,782689	-97,718	75,9055	-5,4531	19,18782	-48,859	37,9527

Antes da realização da curva, optou-se por realizar um experimento para descobrir a relação entre o pH e o número de gotas de NaOH de concentração de  $0,002 \text{ mol L}^{-1}$  a serem adicionadas em balão volumétrico de 10 mL, onde a solução carreadora de analito foi preparada. Da mesma

forma realizou-se outro teste, dessa vez comparando-se o pH do sistema de solventes e o pH da solução de pireno preparada nesse meio. Verificou-se que os resultados obtidos foram os mesmos na presença e na ausência do analito adicionado. O estudo de ajuste de pH pela adição de gotas de NaOH 0,002 mol L<sup>-1</sup> mostrou que não existe diferença estatística no sinal fosforescente do criseno a partir de soluções carreadoras do pH natural até o pH 8. Essa semelhança estatística se deve em grande parte a grande dispersão nos desvios-padrão em substratos contendo prata onde foram depositadas soluções carreadoras em pH básico. Por causa desse aumento no desvio-padrão, foi decidido utilizar soluções de criseno simplesmente dissolvidos em etanol/água 50/50% v/v (pH 5,5). Na Tabela 19, encontra-se o resumo das condições ajustadas para a determinação de criseno utilizado o efeito externo da prata.

Tabela 19 : Resumo das condições experimentais para indução de fosforescência do criseno na presença de nitrato de prata.

<b>Sistema de solventes</b>	Etano/água 50/50%, v/v em pH não ajustado
<b>Massa de AgNO<sub>3</sub></b>	30 a 50 µg <sup>a</sup>
<b>Massa de SDS<sup>a</sup></b>	360 µg
<b>λ<sub>exc</sub>/λ<sub>em</sub></b>	271/515 nm

<sup>a</sup>considerando apenas uma adição de 5 µL.

### 3.3.

#### **Avaliação de seletividade na determinação do criseno e do pireno**

A seletividade de um método analítico é a capacidade deste em mensurar, de forma inequívoca, as substâncias em exame na presença de outros componentes, por exemplo, em uma amostra complexa. A seletividade avalia o grau de interferência de espécies químicas semelhantes, impurezas na amostra, produtos de degradação, bem como outras substâncias que possam estar presentes na matriz em análise.

A determinação seletiva de uma substância na presença de outras é possível desde que se conheça a condição experimental adequada para tal, sendo que não necessariamente essa condição é a que produz o sinal

analítico mais intenso, mas sim a que minimize as interferências de outra(s) substância(s) concomitante(s) na medição da espécie química de interesse. Caso seja observada interferência espectral, essa só poderá ser eliminada por meio da separação prévia do analito da matriz interferente. Uma interferência não-espectral que produza diminuição da resposta analítica em relação ao esperado, pode ser corrigida por meio de procedimento de adição de analito. Esse procedimento é válido apenas nos casos onde o sinal do analito não seja atenuado a ponto de impedir que esse seja mensurado.

A fosforescência é um fenômeno muito atrativo do ponto de vista espectroanalítico por ser intrinsecamente seletivo. A seletividade, assim como a sensibilidade do sinal, pode ser amplificada por meio de ajustes experimentais simples. De fato, as técnicas fosforimétricas têm a capacidade de permitir a determinação seletiva de substâncias muito semelhantes, explorando pequenas diferenças nas características fosforescentes das mesmas.<sup>48</sup> O principal recurso seletivo é o efeito externo seletivo do átomo pesado que pode induzir ou amplificar fosforescência específica de um analito ou classe de analitos na presença de outras substâncias concomitantes. Paralelamente, esse efeito pode eliminar sinal fosforescente de potenciais interferentes. Isso ocorre, pois a eficiência do acoplamento spin-orbital e a variação das taxas de desativação radiativa ou não-radiativa são dependentes do tipo de analito e do átomo pesado utilizado. Outros parâmetros são fundamentais como coadjuvantes no aumento da capacidade seletiva da fosforimetria. Como visto nos estudos, o ajuste de pH, os usos de SDS e de irradiação prévia com UV podem ser relevantes. Por meio da combinação desses fatores e pela exploração das características espectrais com uso de varredura espectral de modo sincronizado pode-se criar ambiente muito favorável para, no caso desse trabalho, determinar criseno e pireno em amostras contendo outros HPA e outros componentes potencialmente interferentes inerentes às matrizes escolhidas para esse trabalho (cachaça e bÍlis de peixe).

Nessa seção, foi realizada uma rápida avaliação da capacidade seletiva da SS RTP usando as condições escolhidas para pireno e criseno.

Testes mais específicos de recuperação em material de referência certificado (MRC) e em amostras de bÍlis e de cachaça, assim como, a comparação de resultados para essas amostras usando método de referência baseada na separação prévia de componentes (HPLC), são apresentados mais à frente nessa tese.

A primeira etapa dessa avaliação foi à comparação das características espectrais obtidas com os sais indutores de fosforescência. No caso do criseno, essa avaliação se iniciou pelos resultados contidos na Tabela 20.

A utilização do  $\text{AgNO}_3$ , em princípio, já elimina a interferência espectral de pireno, 1-OH pireno, antraceno e benzo[a]pireno por causa da ausência de sinal destes nessa condição. Já a relativamente grande diferença no espectro de excitação do criseno em relação aos outros HPA aliado ao uso de  $\Delta\lambda$  de varredura sincronizada de 244 nm (diferente do valor de  $\Delta\lambda$  de qualquer um dos HPA testados) produziria, no modo de varredura sincronizada, um espectro bastante característico do criseno em ambiente de baixo sinal dos outros HPA concomitantes. A comparação dos espectros de criseno induzido por nitrato de prata obtido na ausência com o obtido na presença de 8 HPA (em quantidades molares equivalentes ao do criseno), indicou essa minimização de interferência espectral (Figura 41).

A diminuição relativa de sinal observada no experimento pode ser proveniente de um efeito filtro causado pelos HPA, reduzindo a intensidade de excitação recebida pelo criseno no substrato. Um experimento para avaliar a possibilidade de efeito filtro foi feito com misturas de criseno e de pireno. O pireno foi escolhido por não apresentar fosforescência relevante podendo, por causa disso, ser introduzido nas misturas em quantidades muito maiores que a de criseno sem provocar interferência espectral.

Tabela 20: Características espectrais dos HPA na presença de  $\text{AgNO}_3$ .

HPA	$\lambda_{\text{exc}}$ (nm)	$\lambda_{\text{em}}$ (nm)	$\Delta\lambda$ (nm)
Criseno	271	515 e 551	244 e 280
Pireno	-	-	
Antraceno	-	-	
Benzo[a]pireno	-	-	
1-OH pireno	-	-	
Fluoranteno	287	576	287
Fenantreno	257	472 e 504	215 e 247
Benzo[ghi]perileno	255 e 307	524	269 e 217
1,2 Benzoantraceno	290	607	317

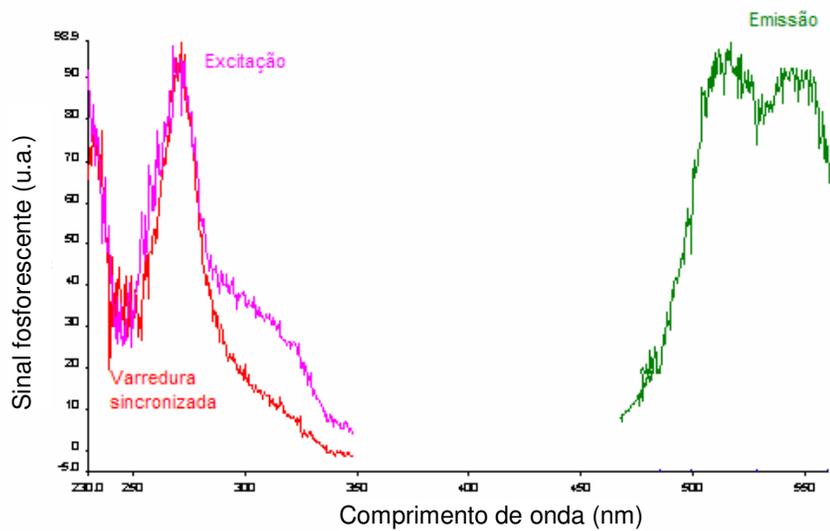
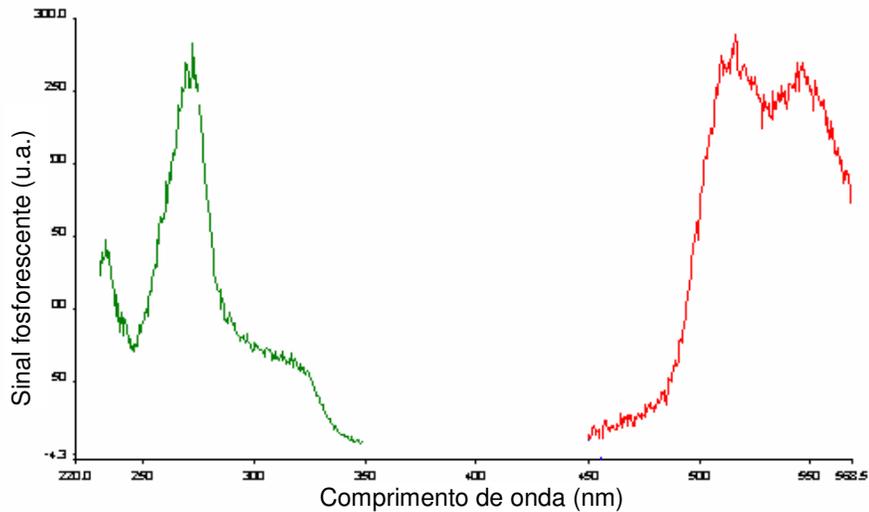


Figura 41: Espectros obtidos pela técnica SS RTP para criseno na presença de  $\text{AgNO}_3$ : (a) criseno; (b) criseno em mistura equimolar com 8 HPA.

Soluções contendo até 25 vezes mais pireno (em termos de concentração em quantidade de matéria) foram varridas no modo sincronizado usando  $\Delta\lambda$  igual a 244 nm. Os resultados indicaram (Figura 42) que para misturas equimolares, o sinal observado era estatisticamente semelhante ao observado a partir de uma solução padrão de criseno com concentração equivalente ao da mistura equimolar pireno/criseno. Para as misturas contendo 10 e 25 vezes mais pireno, um decréscimo significativo de sinal foi observado, indicando que efeito filtro pode estar ocorrendo na medida em que as quantidades do pireno aumentam. Esse efeito filtro pode ser explicado ao se observar os espectros de absorção eletrônica do pireno e do criseno (Figura 43), onde existe uma sobreposição de bandas de absorção, que quase que invariavelmente são muito semelhantes às bandas de excitação dos compostos. No entanto, como já dito anteriormente, esse tipo de interferência é passível de correção ao se escolher à estratégia adequada de quantificação. Na Figura 44, os espectros de absorção para os 9 HPA mostram a complexidade do problema em relação ao espectro de absorção eletrônico.

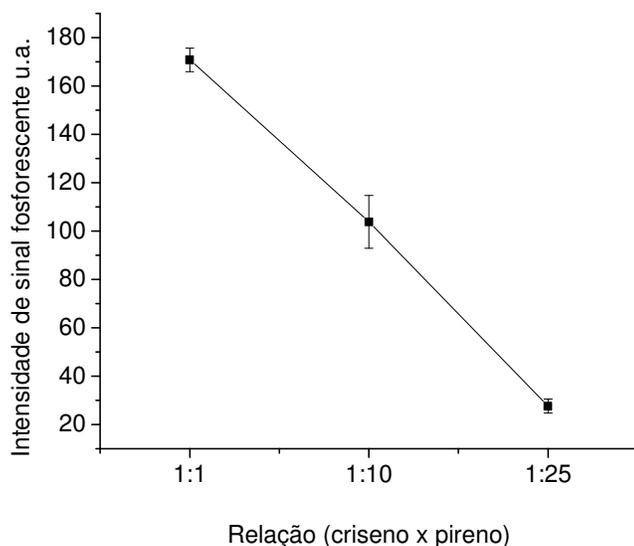


Figura 42: Sinais fosforescentes de criseno induzido por  $\text{AgNO}_3$  em substratos de papel onde foram depositadas soluções contendo criseno e pireno em três proporções molares. Varredura sincronizada com  $\Delta\lambda$  igual a 244 nm.

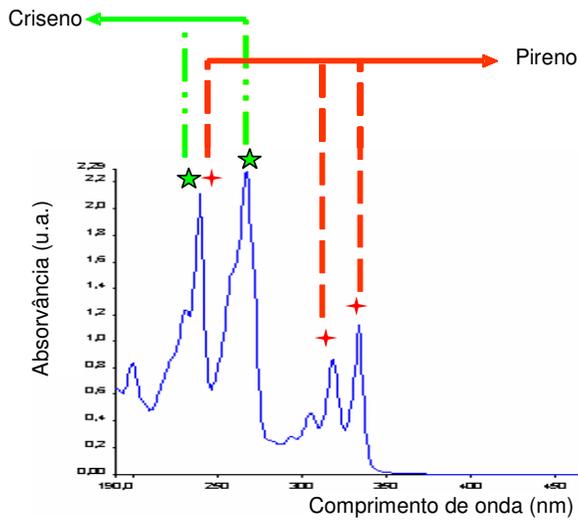


Figura 43: Espectro de absorção do criseno e pireno.

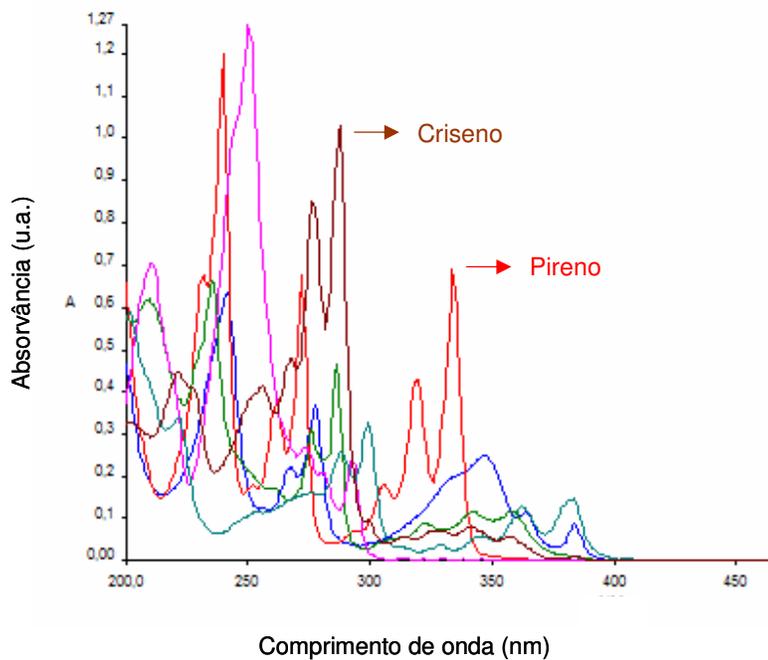


Figura 44: Espectros de absorção do pireno, criseno e demais HPA (antraceno, benzo[a]pireno, 1-OH pireno, fenatreno, fluoranteno, benzo[ghj]perileno e 1,2 benzo antraceno).

No caso do pireno, todos os HPA, com exceção do antraceno e do benzo[a]pireno apresentam fosforescência na presença de nitrato de tálio

e de nitrato de chumbo. Embora o comprimento máximo de uma das três bandas de excitação (a em torno de 335 nm) e o máximo de emissão em 599 nm sejam praticamente característicos do pireno, existe forte indício de interferência espectral ao se observar os resultados do estudo preliminar. Assim sendo, decidiu-se por tentar uma condição experimental em meio básico (induzido por nitrato de chumbo), na esperança de que nesse meio os outros HPA tenham sua fosforescência minimizada. A tentativa de fazer uma avaliação de interferências nessa condição experimental torna-se difícil, pois não se têm as características fosforescentes dos outros HPA em meio básico na presença de nitrato de chumbo, porém um espectro de varredura SS RTP nessas condições e na presença dos outros HPA indicou potencial para a realização de determinação seletiva. Muito provavelmente, a escolha do pH básico eliminou potenciais interferências de muitos dos outros HPA. Os testes de recuperação e as análises das amostras reais e simuladas apresentadas nos capítulos seguintes podem mostrar a viabilidade dessa afirmação.

Para se ter uma idéia da viabilidade da determinação por SS RTP usando essa condição experimental, um HPA similar ao pireno foi escolhido (1-OH pireno). A complexidade do problema analítico pode ser vislumbrada por meio dos espectros eletrônicos desses dois HPA, que são praticamente coincidentes (Figura 45).

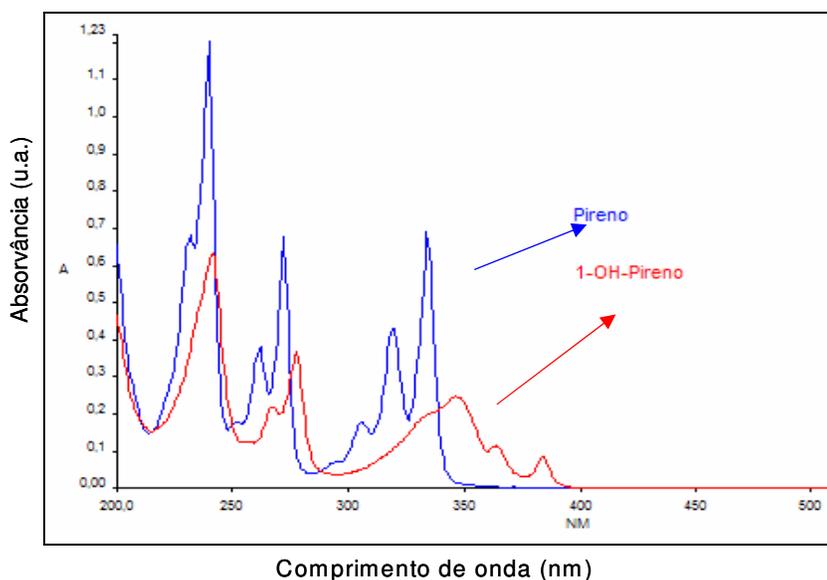


Figura 45: Espectro de absorção do pireno e do 1-OH pireno.

Um estudo preliminar de varredura SS RTP induzido por nitrato de chumbo a partir de solução carreadora em meio básico mostram que os espectros característicos do pireno e do 1-OH pireno podem ser obtidos em misturas com os outros HPA (Figura 46). Essa resolução espectral pode ser ainda mais refinada com o uso de varredura sincronizada, que produziria o espectro equivalente ao de excitação do pireno, minimizando a influência da asa da banda de excitação do 1-OH pireno. Assim, essa condição experimental foi escolhida para a determinação de pireno a ser realizada nos próximos capítulos.

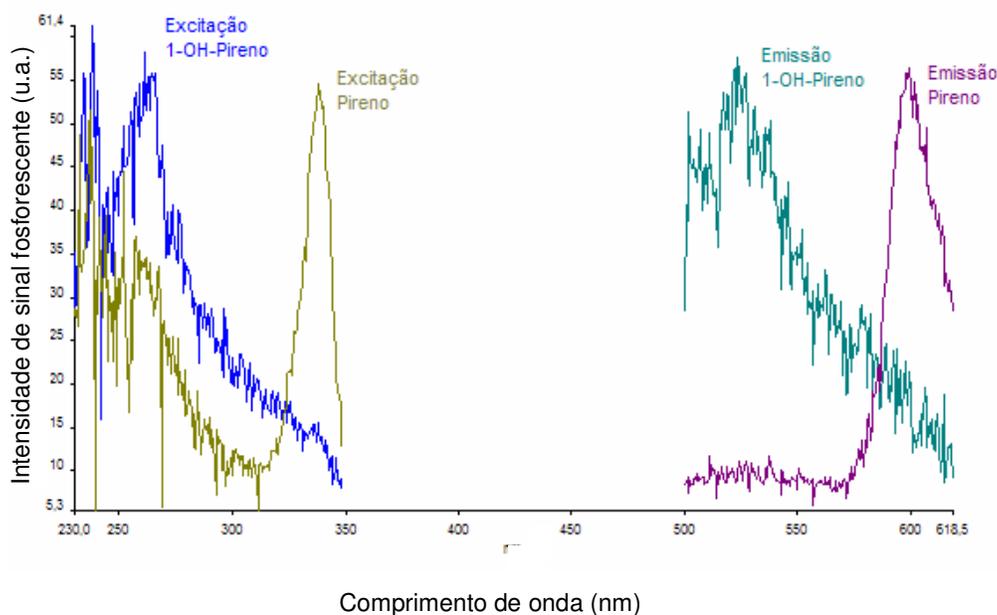


Figura 46: Espectro de fosforescência do pireno e do 1-OH pireno na presença dos demais HPA usando efeito externo com  $Pb(NO_3)_2$  e solução carreadora em pH 12.