

3 Material e método

3.1. Material e reagentes

O padrão de pireno (98%) foi adquirido da Sigma-Aldrich (EUA), o etanol (grau HPLC) os sais de CaCl_2 e NaN_3 foram adquiridos da Merck. No preparo das soluções foi utilizada água destilada. Todas as soluções foram utilizadas em seu pH original, sem nenhum ajuste.

Foram utilizados neste trabalho amostras do horizonte A de sete solos brasileiros, a saber: (i) Argissolo coletado no município de Seropédica (RJ), (ii) Latossolo Amarelo coletado no município de Pinheiral (RJ), (iii) Latossolo Vermelho Acriférico do município de Lagoa Formosa (MG), (iv) Latossolo Vermelho Amarelo distrófico coletado no município de Nova Friburgo (RJ), (v) Neossolo Quartzarênico proveniente do município de Irecê (BA), (vi) Organossolo coletado em Santa Cruz (RJ) e (vii) Vertissolo também de Irecê (BA). Todas as amostras acima citadas foram gentilmente cedidas pela Embrapa solos.

Os solos foram secos ao ar e peneirados em malha de 0,40 mm. Foram realizadas diversas análises físico-químicas dos solos segundo o método de Embrapa, 1999. Destas análises destacam-se em função do presente trabalho o teor de argila, o de carbono orgânico e o pH.

A tabela 1 apresenta os solos e suas principais características físico-químicas acima destacadas. As demais análises realizadas encontram-se descritas em anexo.

Tabela 1 – Características físico-químicas dos solos

	Argila (< 0,002 mm)	Carbono Orgânico	pH	Saturação de Bases
	g kg ⁻¹			%
P	160	7,8	5,2	52
LA	440	1,4	5,1	7
LVwf	720	21,4	5,4	21
LVAAd	260	17,4	4,1	12
RQ	40	1,8	5,4	53
O	400	70,5	4,4	13
V	460	5,6	7,8	100

Argissolo (P), Latossolo Amarelo (LA), Latossolo Vermelho Acriférrico (LVwf), Latossolo Vermelho Amarelo distrófico (LVAAd), Neossolo Quartzarênico (RQ), Organossolo (O) e Vertissolo (V).

Os estudos de adsorção em batelada foram conduzidos usando erlenmeyers âmbar de 150 mL. A separação do sobrenadante e do material disperso foi feita através de centrifugação em tubos de centrífuga de 12 mL de borossilicato usando uma centrífuga Excelsa Baby I da Fanem.

3.2. Espectrofotômetro de fluorescência

Os espectros de fluorescência em modo sincronizado foram obtidos em espectrofotômetro de fluorescência Perkin Elmer modelo LS 45. A determinação do método e da técnica empregada para solubilização do pireno foi feita usando um espectrofotômetro de fluorescência Perkin Elmer modelo LS 55

O equipamento tem como fonte de excitação uma lâmpada pulsátil do tipo descarga de xenônio de 20kW com 8 µs de duração de pulso. O detector é um tubo fotomultiplicador R928 com resposta modificada S5 para detectar radiação até aproximadamente 900 nm. O equipamento é dotado de monocromadores do tipo Monk-Gillieson que cobrem a faixa espectral de excitação e emissão de 200-800 nm.

A diferença entre os modelos LS 45 e LS 55 está no fato que o LS55 permite alteração da banda espectral de passagem, o que lhe confere maior sensibilidade analítica e o LS 45 não.

3.3. Procedimentos

3.3.1. Otimização da técnica de análise para determinação de pireno no solo e figuras de mérito do método.

Para obtenção do espectro de fluorescência de excitação, emissão e modo sincronizado foram realizado diversos espectros de fluorescência de excitação e emissão para determinar o λ de excitação e emissão nas condições químicas do ambiente da solução em que o analito se encontrava. A partir desses λ , obteve-se o $\Delta\lambda$ do modo sincronizado pela subtração do $\lambda_{\text{emissão}} - \lambda_{\text{excitação}}$.

Após o método ter sido otimizado foram obtidas as figuras de mérito do método de determinação de pireno em solo por espectrofotometria de fluorescência em modo sincronizado. O procedimento adotado baseou-se no trabalho de Ribeiro et al., 2008.

3.3.2. Ensaio preliminares - determinação dos efeitos que os sais CaCl_2 e NaN_3 provocam na intensidade do sinal fluorescente do pireno. Determinação do teor de etanol no sistema solvente e da técnica para solubilização do pireno.

A literatura apresenta em diversos trabalhos o uso de cloreto de cálcio e azida de sódio nos estudos de adsorção. O primeiro é adicionado em estudos de adsorção em batelada para mimetizar a força iônica da solução de solo. Em consequência, provoca a diminuição do espaço interlamelar de algumas argilas que pode servir como sítio adicional de sorção (Wolt, 1994). O segundo inibe a atividade microbológica solo que poderia degradar o pireno (Liang et al., 2006; Wang et al., 2007). Consta na literatura que a solubilidade do pireno em água pura está em torno de $130 \mu\text{g L}^{-1}$ (Yalkowsky, 2003; Verschueren, 2001). Na mesma linha, um importante empecilho para fazer soluções onde o analito é pouco solúvel é a presença de sais na solução, que diminuem ainda mais a solubilidade daqueles. Uma estratégia é a adição de um solvente orgânico miscível em água, etanol, por exemplo.

Para determinar qual seria a concentração de etanol no sistema solvente para o pireno e a influência dos sais no comportamento espectral do pireno foram feitas as seguintes soluções:

- (i) Pireno em sistema água deionizada:etanol (05% v/v);
- (ii) Pireno em sistema água deionizada:etanol (05% v/v), CaCl_2 0,01 mol L⁻¹ e NaN_3 0,01 mol L⁻¹;
- (iii) Pireno em sistema água deionizada:etanol (05% v/v), em meio básico (pH = 11) sem adição dos sais;
- (iv) Pireno em sistema água deionizada:etanol (05% v/v), em meio ácido (pH = 05) sem adição dos sais;
- (v) Pireno em sistema água deionizada:etanol (10% v/v) sem adição dos sais;
- (vi) Pireno em sistema água deionizada:etanol (20% v/v) sem adição dos sais.

Em seguida, para determinação da técnica usada para solubilização do pireno foram executados os seguintes testes:

- (i) Foram pesadas massas que variavam em torno de 7,0 mg de pireno.
- (ii) Três dessas amostras foram submetidas a ultrassom por três minutos na presença de etanol. Em seguida, adicionados os sais, foram feitas soluções de 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ pireno em água deionizada:etanol (20% v/v), CaCl_2 0,01 mol L⁻¹ e NaN_3 0,01 mol L⁻¹.
- (iii) Outras três dessas amostras foram submetidas à ultrassom por oito minutos. Em seguida, adicionados os sais, foram feitas soluções de 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ pireno em água deionizada:etanol (20% v/v), CaCl_2 0,01 mol L⁻¹ e NaN_3 0,01 mol L⁻¹.
- (iv) Mais uma triplicata de amostras foi solubilizada em diclorometano. Em seguida, o solvente foi evaporado a frio até a secura com fluxo de ar comprimido e o pireno ressuspenso em etanol. Preparou-se posteriormente soluções de 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ pireno em água deionizada:etanol (20% v/v), CaCl_2 0,01 mol L⁻¹ e NaN_3 0,01 mol L⁻¹.
- (v) E por fim, uma triplicata de amostras foi solubilizada em hexano. Em seguida, o solvente foi evaporado a frio até a secura com fluxo de ar comprimido e o pireno ressuspenso em etanol. Preparou-se posteriormente soluções de 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ pireno em água deionizada:etanol (20% v/v), CaCl_2 0,01 mol L⁻¹ e NaN_3 0,01 mol L⁻¹.

Para a comparação estatística dos resultados obtidos, aplicou-se o teste F nos resultados obtidos.

3.3.3.

Ensaio preliminares – determinação do efeito do sistema solvente na solubilização do carbono orgânico presente no solo e necessidade de *clean up*.

Para testar a interferência do sinal de fluorescência do carbono orgânico dissolvido do solo no sinal de fluorescência do pireno, realizaram-se dois ensaios distintos, o primeiro usando 2,5 g e outro, 5,0 g dos solos utilizados nesse trabalho. As amostras de solo foram submetidas à agitação mecânica, em um *shake* com movimento orbital, com 50 mL de um sistema água deionizada:etanol (20% v/v), CaCl_2 0,01 mol L⁻¹ e NaN_3 0,01 mol L⁻¹ pelos tempos de 10, 20, 40, 80, 160, 320, 640 e 1280 minutos, sendo cada ensaio conduzido em cinco replicatas. Uma alíquota de 10 mL foi recolhida em cada tempo, centrifugada em 3000 rpm e então analisada.

O sobrenadante foi submetido a espectrometria de fluorescência em um fluorímetro da Perkim Elmer, modelo LS 45 Luminescence Spectrometer. Foram usadas bandas espectrais de passagem de 10 nm para excitação e emissão e cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico em todas as determinações. A análise foi feita em comprimento de onda de excitação de 333 nm e emissão variando de 360 a 420 nm. Já o comprimento de onda de emissão foi de 374 nm e excitação variando de 220 a 340 nm. Pela diferença dos comprimentos de onda de excitação e emissão calcula-se um $\Delta\lambda$ de 41 nm. Com isso, procedeu-se a análise pelo método sincronizado com este $\Delta\lambda$ e uma varredura de 300 a 380 nm.

3.3.4.

Determinação do tempo de equilíbrio em processos de adsorção

Para determinar o tempo de equilíbrio do sistema solo pireno, preparou-se uma solução de 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ obtida com um padrão Aldrich de 98% de pureza solubilizado em um sistema água deionizada:etanol (20% v/v), CaCl_2 0,01 mol L⁻¹ e NaN_3 0,01 mol L⁻¹. Foram conduzidos dois grupos distintos de experimentos, o primeiro usando 2,5 g e outro, 5,0 g dos solos utilizados nesse trabalho (An et al., 2005). Estes foram conduzidos em erlermeyers âmbaros contendo a massa de solo e 50 mL da solução de pireno. A suspensão foi mantida em rotação de

250 rpm, em um agitador mecânico, por 10, 20, 40, 80, 160, 320 (primeiro experimento), 640 e 1280 minutos (segundo experimento), sendo que cada tempo de ensaio foi conduzido com cinco replicatas. Uma alíquota de 10 mL foi recolhida de cada replicata em seu tempo, centrifugada em 3000 rpm e então analisada da mesma forma que na etapa anterior.

O sobrenadante foi submetido a espectrometria de fluorescência em um espectrofluorímetro da Perkim Elmer, modelo LS 45 Luminescence Spectrometer. Foram usadas bandas espectrais de passagem de 10 nm para excitação e emissão e cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico em todas as determinações. A análise foi feita em comprimento de onda de excitação de 333 nm e emissão variando de 360 a 420 nm. Já o comprimento de onda de emissão foi de 374 nm e excitação variando de 220 a 340 nm. Pela diferença dos comprimentos de onda de excitação e emissão calcula-se um $\Delta\lambda$ de 41 nm. Com isso, procedeu-se a análise pelo método sincronizado com este $\Delta\lambda$ e uma varredura de 300 a 380 nm.

Para calibração do espectrofluorímetro e obtenção dos espectros de modo sincronizado foram preparadas soluções de pireno nas concentrações de 2, 5, 8, 10, 15 e 20 $\mu\text{g L}^{-1}$. Essas soluções foram usadas como curva analítica. As determinações usando essa curva analítica foram feitas antes e depois de cada experimento para verificar possíveis efeitos de variação no instrumento.

Para a análise estatística empregou-se a análise de variância em delineamento inteiramente casualizado. Quando o teste F indicou a existência de diferenças significativas, aplicou-se o teste de médias. No caso, escolheu-se o teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Utilizaram-se os softwares Minitab (versão 10,0), Origin (versão 6,0 e versão 7,0) e SAS (versão 9,0).

3.3.5.

Determinação das curvas de adsorção e das constantes de partição

Para determinar o perfil das curvas de adsorção e as constantes de partição do sistema solo/pireno, foram preparadas soluções de 15, 30, 45, 60, 75 e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ de pireno obtida com um padrão Aldrich de 98% de pureza solúvel em um sistema água deionizada:etanol (20% v/v), CaCl_2 0,01 mol L^{-1} e NaN_3 0,01 mol L^{-1} . Foram conduzidos ensaios usando 2,5 g de cada solos utilizados nesse trabalho. Os ensaios foram conduzidos em erlermeyers âmbar contendo a massa de solo e 50 mL da solução de pireno. A suspensão foi mantida em rotação de 250 rpm, em um agitador mecânico 1280 minutos (21 horas e 20

minutos), sendo cada ensaio conduzido em cinco replicatas. Uma alíquota de 10 mL de cada replicata foi recolhida em no final do tempo de ensaio, centrifugada em 3000 rpm e então analisada da mesma forma que na etapa anterior.

Com o auxílio do software IsoFit, realizaram-se análises estatísticas para verificar qual o modelo encontrado na literatura melhor descrevesse a adsorção de pireno no solo dentro das condições estudadas. O uso do software IsoFit (versão 1.2) foi gentilmente cedido pelo Prof. L. S. Matott, da Universidade do Estado de Nova York (SUNY).