

4 Materiais e Métodos

4.1. Reagentes e soluções

Todos os reagentes usados no desenvolvimento deste trabalho foram de grau analítico não sendo necessárias etapas prévias de purificação. Todas as soluções aquosas foram preparadas utilizando água ultra purificada (Resistividade igual a 18,2 MΩ cm) obtida de um ultra purificador de água modelo Master System 1000 da marca GEHAKA (Brasil).

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos nitrogenados (HPAN) e sulfurado(HPAS), usados como analitos, foram adquiridos de várias empresas. O carbazol (CBZ) da Acröss Organics (EUA), benzo[h]quinolina (B[h]Q) da Fluka (Suíça), dibenz(a,j)acridina (DBA), benzo[b]quinolina (B[b]Q), 9-metilacridina (9MA) e dibenzotiofeno (DBT) da Sigma-Aldrich (EUA).

Solventes orgânicos de várias procedências foram empregados na preparação das microemulsões. Iso-octano, álcool isopropílico e etanol da Merck (Brasil), n-hexadecano, álcool propílico, álcool butílico, álcool sec-butílico, álcool ter-butílico, álcool pentílico, álcool hexílico, cicloexanol e álcool 2,2'oxidietílico foram adquiridos da Vetec (Brasil). Os sais inorgânicos usados foram comprados na Across Organics (nitrato de tálio) e na Vetec (iodeto de potássio). O sulfito de sódio utilizado como seqüestrador de oxigênio nas microemulsões diluídas foi obtido também na Vetec.

Para ajustes de pH das soluções utilizou-se o tampão Britton-Robinson 0,04 mol L⁻¹, em cujo preparo foram usados os ácidos orto-fosfórico e acético glacial da Merck (Brasil) e o ácido bórico da Reagen Quimibrás (Brasil). A adição subsequente de pequenos volumes de solução 0,2 mol L⁻¹ de hidróxido de sódio (Vetec) permitiu obter soluções-tampão de pH compreendidos entre 2,00 ± 0,02 e 11,00 ± 0,02. Soluções tampão de pH 4,00 ± 0,02 e 7,0 ± 0,02 fornecidas pela VETEC (Brasil) foram usadas na calibração prévia do pH-metro.

O ácido nítrico que foi utilizado no preparo da solução de limpeza do material (10 % v/v HNO₃) foi adquirido da Merck (Brasil).

4.2. Instrumentação e software

O equipamento utilizado para a realização das medições fosforimétricas foi um espectrômetro de luminescência da Perkin Elmer modelo LS-45 mostrado na Figura 5. A partir dele foram obtidos os espectros de excitação e emissão e as intensidades dos sinais fluorescentes e fosforescentes dos analitos estudados.



Figura 5. Espectrômetro de luminescência da Perkin Elmer modelo LS-45.

Como fonte de excitação este equipamento possui uma lâmpada pulsátil, tipo descarga de xenônio, que produz pulsos de 8 μ s de duração e 20 kW de potência. O esquema óptico é formado por um conjunto de dois monocromadores montados segundo a geometria Monk-Gillieson que cobrem as faixas espectrais de 200-800 nm para excitação e 200-900 nm para emissão. O detector é um tubo fotomultiplicador sensível para detectar radiação até em torno de 900 nm.

O equipamento é controlado por meio de um computador pessoal marca Dell com as especificações adequadas de hardware e software. A aquisição dos espectros foi feita a partir do software FL WinLab, também da Perkin Elmer, o qual é operado no ambiente MS WindowsTM.

Para as varreduras de fosforescência e fluorescência das diferentes soluções foram utilizadas cubetas de quartzo com caminho óptico de 1 cm adquiridas na Perkin Elmer. O programa utilizado para todo o tratamento estatístico dos dados foi o Statística 6.0 Statsoft. Foram também utilizados alguns equipamentos auxiliares. As medições de pH das soluções foram realizadas em um pH-metro de marca Tecnoyon (Brasil). Para a melhor dissolução de algumas substâncias foi utilizado um banho ultra-sônico, modelo USB124 com potência de 50 W e 40 mHz de frequência (CTA, Brasil). As massas dos reagentes necessárias para o preparo das diferentes soluções foram pesadas em balanças analíticas. A fabricada pela Marte Balanças e Aparelhos de Precisão Ltda (Brasil) foi usada para medição de massas dos padrões analíticos ($\leq 0,1000 \pm 0,0001$ mg). Duas outras balanças, a modelo 210A (para medição de massas de sulfito de sódio e ácido bórico) e a modelo 5000 (para medição de massas de iodeto de potássio) da empresa BEL Equipamentos Analíticos (Brasil) foram usadas na pesagem de massas maiores que 0,1 g. O microscópio óptico marca Zeiss, modelo AZIOVERT 25, com câmara digital da JVC modelo TK-1270 e o programa de visualização de imagens Matrox Intellicam foram utilizados na caracterização física das MED's.

4.3. Procedimentos Gerais

4.3.1. Lavagem do material

A limpeza do material usado em todos os experimentos foi feita com o enxágüe abundante com água corrente e subsequente imersão em solução de ácido nítrico 10 % v/v por um período mínimo de 24 horas. Posteriormente, todo o material foi enxaguado com água destilada e com água ultra purificada, deixando secar na temperatura ambiente e conservando o material seco em recipientes plásticos fechados. Esta etapa foi crucial na obtenção de fosforescência dos analitos, pois foi detectado que um enxaguado com água destilada e com água ultra purificada não abundante atenua o sinal dramaticamente.

4.3.2. Preparação das soluções

Soluções-estoque de HPAN's e HPAS's nas concentrações de 1×10^{-2} mol L^{-1} e 1×10^{-3} mol L^{-1} foram preparadas a partir da dissolução dos diferentes analitos em etanol (Merck, Brasil).

As soluções aquosas de nitrato de tálio ($0,25$ mol L^{-1}) e iodeto de potássio (5 mol L^{-1}) assim como as do sulfito de sódio ($0,2$ mol L^{-1}) foram preparadas diariamente em água ultra purificada e estocadas em frascos de vidro de cor âmbar.

A solução tampão Britton-Robinson $0,04$ mol L^{-1} foi preparada com a adição de $1,14$ mL de ácido acético glacial, $1,35$ mL de ácido orto-fosfórico e $1,24$ g de ácido bórico. Os diferentes tampões, com pH compreendidos entre $2,00$ e $11,00$ foram preparados a partir da subsequente adição de volumes de solução $0,2$ mol L^{-1} de NaOH.

4.3.3. Preparação das microemulsões (ME's)

No estudo envolvendo a preparação de microemulsões (ME's), foram usados o iso-octano e o n-hexadecano. Solventes orgânicos diferentes e em distintas proporções foram testados para obtenção de ME's desses dois líquidos. Quantidades apropriadas dos componentes foram misturadas até obter microemulsões transparentes e estáveis. As regiões de formação da microemulsão óleo/água (O/A) foram definidas a partir de diagramas de fases pseudoternário.

A composição final escolhida para a microemulsão, designada de microemulsão - mãe (MEM), foi 78 % em volume de uma mistura alcoólica, 10 % em volume de iso-octano ou de n-hexadecano e 12 % em volume de água ultra purificada. A mistura alcoólica indicada acima é composta por dois álcoois na proporção $55:23$ % v/v de surfactante:co-surfactante. O surfactante escolhido foi o etanol, já que com ele foram preparadas as soluções dos analitos de interesse. Os álcoois testados como co-surfactantes foram: álcool propílico, álcool isopropílico, álcool butílico, álcool sec-butílico, álcool ter-butílico, álcool pentílico, álcool hexílico, cicloexanol e álcool 2'2-oxidietílico. ME's estáveis foram obtidas para a maioria dos álcoois, embora em termos práticos, não puderam ser usadas por

causa da atenuação do sinal fosforescente do analito, assim, sua diluição foi necessária.

As microemulsões-diluídas (MED's) foram preparadas em balão volumétrico de 10 mL, pela adição de uma alíquota de 100 μL da MEM do analito (volume otimizado experimentalmente), juntamente com volumes apropriados de solução aquosa de iodeto de potássio (5 mol L^{-1}) e de sulfito de sódio ($0,2 \text{ mol L}^{-1}$). No caso do analito DBT, o pH dessa solução foi mantido constante pelo uso do tampão Britton-Robinson (pH = 6,00). Nesse caso um volume de 5 mL do tampão foi usado. O volume final de 10 mL foi obtido com a adição de água ultra purificada.

Com o objetivo de verificar a influência da matriz orgânica na resposta analítica, de modo a inferir o procedimento de calibração apropriado para a determinação do CBZ e DBT em amostras orgânicas líquidas, foram comparadas as inclinações das curvas analíticas obtidas a partir de padrões onde foram considerados os componentes da MEM e de padrões feitos diretamente em solução aquosa. Os primeiros foram obtidos por diluições das MEM's $5,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e $5,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ do CBZ e DBT, respectivamente. Os segundos a partir da diluição de soluções etanólicas do CBZ e do DBT nas mesmas concentrações. Os pontos da curva analítica do CBZ correspondem às concentrações de 20, 60, 200, 600, 800 e 1000 ng L^{-1} . No caso do DBT, a curva analítica foi definida a partir dos pontos 100, 300, 600, 800, 1000 e 1400 ng L^{-1} .

Na avaliação da determinação do CBZ e DBT em amostras reais, amostras (50 mL) de gasolina comum e aditivada foram coletadas dos postos da empresa Ipiranga no Leblon-RJ. Assim como também foram usadas duas marcas de querosene, água contaminada da Baía de Guanabara fornecida pelo Laboratório de Estudos Ambientais da PUC-Rio (LEA) e sedimento referenciado de Veneza, Itália de código IAEA-417 de maio de 2002 cedido pelo Laboratório de Estudos Marinhos e Ambientais também da PUC-Rio (LABMAM).

No caso das curvas de adição de analito, adições apropriadas e inferiores a 50 μL das soluções etanólicas $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ do CBZ e $1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ do DBT foram adicionados às MEM's (CBZ ($1,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) e DBT ($1,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$)). MED's foram obtidas pela mistura de 100 μL das MEM's com quantidades

apropriadas de soluções de KI (5 mol L^{-1}) e Na_2SO_3 ($0,2 \text{ mol L}^{-1}$). Nas MED's do DBT foram adicionados 5 mL do tampão pH = 6,00.

4.3.4. Preparação dos padrões e amostras para a medição da fosforescência

Para a medição da fosforescência, as MED's foram colocadas em cubetas de quartzo. Antes de cada medição, as cubetas eram limpas com HNO_3 10 % v/v, e rinsadas, primeiramente, com volume abundante de água ultra purificada e depois com a MED a ser analisada. As medições da intensidade fosforescente de cada MED's foram tomadas após de 10 segundos de exposição à radiação, com o objetivo de compensar qualquer flutuação do sinal. Os valores tabelados ou plotados foram expressos como a média de três determinações diminuídas do branco.

4.3.5. Preparação de extratos amostras ambientais

Esses extratos foram fornecidos pelo Laboratório de Estudos Ambientais (LEA) e pelo Laboratório de Estudos Marinhos e Ambientais (LABMAM) da PUC-Rio.

No caso da amostra de água da Baía de Guanabara, a mesma foi coletada usando uma garrafa coletora de acrílico de 1 L e posteriormente foi transferida para uma garrafa de vidro previamente limpa. As amostras foram conservadas em gelo para posterior extração dos HPA's totais, uma vez atingida a temperatura ambiente.

A extração dos HPAs foi feita segundo a metodologia adaptada de IOC-UNESCO⁷⁵. Foi realizada a filtração de parte das amostras devido a grande quantidade de plâncton presente nas mesmas. Um litro da amostra de água filtrada foi transferido para funil de separação de 2 L, onde foram adicionados 50 mL de Diclorometano, sendo a extração dos HPAs feita por agitação manual durante 5 minutos. Após a separação das fases, a fase orgânica foi recolhida em balão de vidro de fundo chato e armazenada em local abrigado de luz.

Em seguida, realizou-se nova extração adicionando-se mais 50 mL de diclorometano que foi recolhida no mesmo frasco que o primeiro extrato. O

extrato obtido foi centrifugado durante 3 minutos para separar a emulsão formada durante a agitação, devido a grande quantidade de matéria orgânica presente na amostra. Foi adicionado sulfato de sódio para a quebra da emulsão e a mistura foi centrifugada novamente.

O extrato final foi concentrado em evaporador rotatório, à pressão reduzida de 200 mmHg e temperatura de aproximadamente 36 °C. O concentrado foi transferido para balão volumétrico de 10 mL e avolumado com diclorometano.

A amostra de sedimento referenciado número IAEA-417 foi submetida a tratamentos prévios de separação no LABMAM da PUC-Rio⁷⁶. No extrato final, o solvente usado foi o diclorometano. O tratamento esteve de acordo com procedimentos desenvolvidos no LABMAM da PUC-Rio⁷⁷.