

**Juliano Passaretti Filho**

**Desenvolvimento de método analítico para determinação de ozônio residual em água utilizando a técnica de fluorescência e estudo da viabilidade da construção de um sensor fluorimétrico em uma gota de solução para determinação de ozônio em ar**

Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.

**Orientador:** Prof. Dr. Arnaldo Alves  
Cardoso

Araraquara

2010

FICHA CATALOGRÁFICA

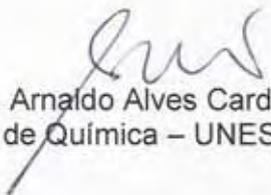
P286d	<p>Passaretti Filho, Juliano</p> <p>Desenvolvimento de método analítico para determinação de ozônio residual em água utilizando a técnica de fluorescência e estudo da viabilidade da construção de um sensor fluorimétrico em uma gota de solução para determinação de ozônio em ar / Juliano Passaretti Filho. – Araraquara : [s.n.], 2010 80 f. : il.</p> <p>Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química Orientador: Arnaldo Alves Cardoso</p> <p>1. Química analítica. 2. Fluorescência. 3. Gota. 4. Ozônio. 5. Índigo. I. Título.</p>
-------	--

## JULIANO PASSARETTI FILHO

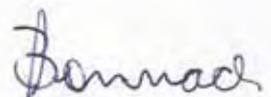
Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.

Araraquara, 17 de dezembro de 2010.

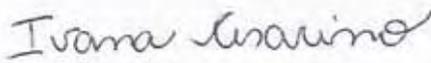
### BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Arnaldo Alves Cardoso  
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Prof. Dr. Gilbert Bannach  
Faculdade de Ciências – UNESP, Bauru



Drª Ivana Cesarino  
Instituto de Química de São Carlos - USP, São Carlos

*“Não podemos ficar esperando que o mundo se transforme. Nós somos a própria força transformadora do mundo”*

***Marilyn Ferguson***

*Dedico esse trabalho a minha família  
pelo apoio nos momentos difíceis, sem  
você todo o esforço e dedicação não  
valeriam de nada e tudo perderia o  
sentido*

## AGRADECIMENTOS

*Nada no mundo acontece por acaso, tudo sempre terá um motivo, mesmo que este seja desconhecido, cada pessoa que passa por nossas vidas tem um significado especial e único, e cabe a nós tentar decifrar esse significado e ao entendê-lo levá-lo por toda a vida. Desta forma em poucas palavras agradeço a esse conjunto de pessoas especiais ensinaram muito nesses quase 2 anos de convívio e amizade.*

*Ao professor **Arnaldo Alves Cardoso**, pela oportunidade de trabalhar em seu grupo, desprendendo uma grande atenção e parte do seu tempo me ajudando e apoiando nos momentos difíceis, um exemplo como profissional e pessoa, no qual tenho muito orgulho de poder trabalhar e conviver.*

*Agradeço a minha irmã **Raquel** por ter cuidado dos meus pais e minha sobrinha durante minha ausência. Sem ela talvez nunca tivesse começado o mestrado.*

*Aos meus pais **Juliano** e **Maria**, por me ensinarem os valores que guiam minha vida. Obrigado!*

*A minha irmã **Renata** e minha sobrinha **Natasha** que nunca saem dos meus pensamentos*

*Agradeço a **Letícia**, não só pela amizade, mas por ter me ajudados de diversas formas desde do dia que cheguei em Araraquara.*

*Ao **João** e **Gabriel**, grandes pessoas, nas quais tenho o prazer de conviver e trabalhar. Obrigado pela amizade!*

*Aos irmãos **Rodrigo** e **Thiago**, pelo prazer de conviver com pessoas tão especiais, obrigado pela amizade*

*Aos amigos do IQ e do futebol **Zé Rufino, Paraíba, Piá, Jardes, Lentilha, Pivato e Zé Renato**.*

*Aos amigos **Murilo** e **Tanabi**, não só pela amizade, mais por serem as primeiras pessoas que abrigaram e me ajudaram assim que eu cheguei na cidade.*

*Aos Amigos da grupo **Vanessa, Vínicius, Eupíredes, Edivaldo, Rafael, Wander, Luciana e Ricardo** obrigado pela amizade.*

*Ao pessoal do **GRESCO: Stephany, Nathalie e Deborah** pelos momentos de alegria*

*Aos meus amigos das antigas **Gabriel, Toninho, Patrik, Jeremias, Paulão, Alexandre, Luis Fernando, Zé Caraguá, Pedro, Julião, David, Baris e Du**.*

*Ao **Lima Neto**, pela amizade, apoio e pelo prazer de conviver com essa figura.*

*Ao **Gerardo Magela** pela amizade e convivência.*

*A galera da química **Guilhermina, Douglas, Simone, Pará, Denise, Dani, Juliana, Carol, Pedro, Angela, Jorge Raposo, Rafael e Andreia** obrigado pela amizade*

*A minha amiga **Cibele**, pelos anos de amizade.*

*A turma do tereré, **Michele, Juzinha e Néia** pela amizade e risadas*

*Aos professores **Júlio** e **Ademir**, pelo apoio e convivência*

*Ao professor **Luiz Antônio** pelos conhecimentos, ensinamentos e paciência. Muito obrigado. Sua colaboração foi extremamente importante para o meu desenvolvimento pessoal e profissional.*

*Ao professor **Massao Ionashiro**, pela ajuda e conselhos com o trabalho*

*Ao professor **Manoel Menezes** por sempre me ajudar e ser um grande amigo me ensinando muito sobre química e a vida. Hoje muito do que sou devo a ele, pelos ensinamentos e a amizade.*

*Ao **Instituto de Química** pela oportunidade em desenvolver o trabalho.*

*Às **funcionárias da Seção de Pós-Graduação e Biblioteca**, pela dedicação e suporte fornecidos.*

*Ao **CNPq**, pela bolsa de estudo.*

## RESUMO

O ozônio é o principal gás envolvido nas reações de oxidação que ocorrem na atmosfera. Esse gás pelo alto poder oxidante vem sendo utilizado em diversos processos que demandam a ação de um oxidante forte, como o processo de desinfecção de água potável e de uso para recreação.

A fluorescência foi estudada como técnica de medida para o ozônio residual em água. O procedimento é baseado na reação de ozonólise que ocorre entre o ozônio e o corante índigo trissulfonado, gerando como produto uma molécula fluorescente que exibe emissão em 410 nm quando excitada em 260 nm. O procedimento utilizado é idêntico ao previamente descrito para absorvância. As vantagens são que o sinal analítico de fluorescência é resultado de uma medida de um produto da reação enquanto que na absorvância o sinal analítico é obtido do descoramento e requer a diferença entre a medida da concentração do reagente antes e após a reação. Para medidas de ozônio de concentração entre 0 a  $5,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$  o método desenvolvido possui um limite de detecção de  $0,014 \mu\text{mol.L}^{-1}$  e quando comparado com o método colorimétrico é 100 vezes mais baixo. Em condições otimizadas de reação a intensidade de fluorescência é linear na faixa de zero a  $5,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , com uma precisão de 3,66% e exatidão entre 87,2-112,8%. O método é 1000 vezes mais sensível do que o colorimétrico e não difere significativamente em um intervalo de confiança de 95%.

A mesma reação foi estudada para ser aplicada em uma gota suspensa para determinar ozônio no ar ambiente. Inicialmente foi estudado o comportamento espectroscópico da espécie fluorescente buscando outros comprimentos de onda de excitação da molécula. Foi observado que a mesma pode ser excitada em 220, 260, 325 e 340 nm resultando em uma intensidade de fluorescência maior para 220 nm e menor para 325 nm.

Para o desenvolvimento do método para o ozônio atmosférico utilizamos um laser de He-Cd com emissão 325 nm, que apesar de resultar em um menor sinal analítico de emissão, foi a fonte mais fácil a disposição no laboratório. Outras vantagens é que esta fonte é contínua e promove uma menor quantidade do efeito de espalhamento de luz pela gota.

Os experimentos mostraram que é possível determinar ozônio em ar com concentrações de unidades de ppb com amostragens feitas com um tempo de 2 minutos.

O estudo mostrou que é possível utilizar a gota de solução índigo trissulfonado para a determinação de ozônio em concentrações usualmente encontradas no ambiente. É possível também utilizar outras fontes como led's para promover a excitação, o que possibilita a construção de equipamentos portáteis para a determinação de ozônio, fazendo medidas *in situ* e próximas do tempo real.

Palavras Chaves: Fluorescência, Ozônio, Gota, Índigo

## ABSTRACT

Ozone is the main gas involved in the oxidation reactions that occur in the atmosphere. This gas by the high oxidizing power has been used in several processes that require the action of a strong oxidant, as the process of disinfecting drinking water and recreational use.

Fluorescence was studied as a technique for measuring residual ozone in water. The procedure is based on the ozonolysis reaction that occurs between ozone and indigo trisulfonate, generating product as a fluorescent molecule that exhibits emission at 410 nm when excited at 260 nm

The procedure is identical to that previously described for absorbance. The advantages are that the analytical signal of fluorescence is a result of a measure of the reaction product while the absorbance at the analytical signal is obtained from the bleaching and requires the difference between the measured concentration of the reagent before and after reaction.

To measure ozone concentrations from 0 to 5,5  $\mu\text{molL}^{-1}$ , the developed method has a detection limit of 0,014  $\mu\text{molL}^{-1}$  and compared with the colorimetric method is 100 times lower. Under optimized reaction conditions the fluorescence intensity is linear in the range of zero to 5,5  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  with an accuracy of 3.66% and accuracy between 87.2 to 112.8%. The method is 1000 times more sensitive than colorimetric and does not differ significantly in a range of 95%.The same reaction was studied to be applied in a hanging drop to determine ozone in ambient air. Initially we study the spectroscopic behavior of fluorescent species looking for other wavelengths of excitation of the molecule.

It was observed that one can be excited at 220, 260, 325 and 340 nm resulting in a higher fluorescence intensity for 220 nm to 325 nm and smaller. To develop the method for atmospheric ozone used a He-Cd laser with 325 nm emission, although that result in a lower emission analytical signal was the source easier to provision in the laboratory. Other advantages is that it is still a source and promotes a smaller amount of the effect of light scattering by the drop.

The experiments showed that it is possible to determine ozone concentrations in air in units of ppb as samples taken with a time of 2 minutes. The study showed that it is possible to use a drop of indigo trisulfonate solution for determining the ozone concentrations usually found in the environment. You can also use other sources like LED's to promote excitement, which allows the construction of portable equipment for determining the ozone, making in situ measurements and near real time.

**Keywords:** *Fluorescence, Ozone, Indigo, drop.*

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representação da fórmula estrutural do híbrido de ressonância do ozônio e representação do mapa da energia potencial de sua densidade eletrônica (Fonte: SOLOMONS, 2005). .....	1
Figura 2. Rota das reações envolvidas na hidrólise do ozônio em água, com as respectivas constantes de velocidades de cada reação resultando na decomposição de ozônio a oxigênio e a dissolução de parte do ozônio em água (Fonte: STAEHEILN e HOLGNÉ, 1985).....	3
Figura 3. Rota reacional de uma Molécula M que reage com ozônio na presença de água (Fonte: STAEHEILN e HOLGNÉ, 1985). .....	4
Figura 4. Camadas da atmosfera e algumas propriedades físicas (Fonte: BAIRD, 2002).....	5
Figura 5. Esquema ilustrando a química do ozônio troposférico, acoplando os ciclos químicos dos, $\text{NO}_x$ , e $\text{HO}_x$ ( $\text{RO}_2^\circ$ =radicais peroxi orgânicos) (Fonte: JACOB, 2000).....	7
Figura 6. Diagrama do ciclo oxidante fotoquímico. R representa H, $\text{CH}_3$ ou fragmentos com número superior de carbonos. (Fonte: CRUTZEN E GOLDAMMER 1992; O'NEILL 1993).....	8
Figura 7. Efeito Smog observado na cidade de Nova York, EUA. (Fonte: LARASFRIENDS.COM) .....	9
Figura 8. Folha de planta apresentando necrose devido aos altos índices de ozônio (Fonte: BIODIVERSIDADE TESES E DISSERTAÇÕES 2007 ).	10
Figura 9. Equipamentos comerciais de geração de ozônio para purificação de água e ar. (a) Ozonizador de água doméstico (Fonte RICOZON 2010); (b) Banheira com ozonizador para limpeza de água(Fonte TRAT' BEM 2010); (c) e (d) ozonizadores domésticos de ar (Fonte RICOZON 2010, MINIATLÂNTICO 2010). .....	11
Figura 10. Reação entre ITS e ozônio formando duas moléculas de isatina sulfonadas.....	13

Figura 11 Mecanismo de reação proposto para a degradação corante índigo após a reação com O <sub>3</sub> . A substância fluorescente formada é o ácido 2-aminobenzóico (ácido antranílico) (Fonte: CLAYDEN, et al; 2008).....	15
Figura 12. Produto fluorescente obtido durante a hidrólise básica da isatina (Fonte: BERCI FILHO et al, 1995). .....	16
Figura 13. Modelo para absorção de CO <sub>2</sub> em uma gota de água de chuva (Fonte: CARDOSO; PEREIRA; ROCHA, 1998).....	18
Figura 14. Esquema representando as etapas de análise do método proposto (Variação da intensidade de fluorescência comparada com a concentração de ozônio obtida pelo método do Índigo trissulfonado).....	24
Figura 15. Amostrador Impingir ligado a um ozonizador de ar (gasozon) .	25
Figura 16. Representação do sistema montado para determinação de ozônio em uma gota suspensa de ITS. 1) Fonte de excitação que poderá ser usada, 2). Controle de formação da gota, 3) Fotodiodo e filtro para aquisição de fluorescência, 4).Válvula Solenóide , 5). Aquisição de dados do foto diodo computador para tratamento dos dados, 6). Formação e de ozônio, 7).Solução de ITS. ....	26
Figura 17. Espectro de excitação para o produto da reação entre ITS e ozônio. ....	27
Figura 18. Espectro de emissão para o produto da reação entre ITS e ozônio com excitação em 260 e 330 nm. ....	28
Figura 19. Espectro de emissão com excitação em 260 nm de uma solução de ITS na ausência e na presença de ozônio. ....	29
Figura 20. Possíveis produtos esperados após a reação entre ITS e ozônio. Modelo da reação baseado em proposta de GROEJEAN et al, 1988; KETTLE, 2004, FELIX 2006 e CLAYDEN, et al, 2008. ....	30
Figura 21. Espectro de (a) emissão e (b) excitação (Ex. 260 nm) do ácido 2-aminobenzóico.....	31
Figura 22. Espectro de (a) emissão e (b) excitação (Ex. 260 nm) do produto da reação entre ITS e ozônio. ....	31

Figura 23. Formula estrutural plana do ácido 2-aminobenzóico (AAB) (luminóforo). .....	32
Figura 24. Formula estrutural plana das moléculas de ácidos sulfanoaminobenzóicos (ASAB's) (a) ácido 5-sulfano 2-aminobenzóico e (b) 2,5-dissulfano 2-aminobenzóico. No luminóforo estão ligados grupos sulfano que diminuem a energia de conjugação do anel aromático modificando ligeiramente o espectro de fluorescência apresentado pela molécula de AAB. ....	32
Figura 25. Avaliação da eficiência da reação entre ITS e ozônio pelas medidas de sinal analítico da variação de absorbância (300 e 600nm) e fluorescência ( $\lambda_{Ex}$ . 260 nm e $\lambda_{Ex}$ . 413 nm) produzido por uma solução de ozônio $2,0 \mu\text{molL}^{-1}$ em diferentes pH's (a variação de absorbância foi multiplicada por 1000 para comparação com o sinal de fluorescência.....	33
Figura 26. Variação da luminescência do produto de reação para diferentes concentrações de ITS. ....	34
Figura 27. Variação da luminescência do produto da reação entre Ozônio e ITS em função do tempo pós reação ( $n = 16$ ).....	35
Figura 28. Curva Analítica obtida para o método proposto utilizando ITS e medida de fluorescência do produto de reação. A concentração de ozônio varia de zero a $7 \mu\text{mol.L}^{-1}$ .....	37
Figura 29. Curva Analítica para diferentes concentrações AAB em meio de ITS $2 \times 10^{-4} \text{molL}^{-1}$ . ....	38
Figura 30. Representação da reação entre a insaturação do corante índigo com ozônio e a formação de radicais peróxido que podem dar origem as substanciais fluorescentes (ASAB's).....	39
Figura 31. Espectro de absorção para as diferentes concentrações de ozônio residual geradas .....	44
Figura 32. Espectros de emissão e excitação para o produto de reação entre ITS e ozônio.....	46
Figura 33. Espectros de excitação obtidos para diferentes quantidades de ozônio, medidos após a reação entre ITS e ozônio. ....	46

Figura 34. Curvas analíticas com valores de intensidade de absorção nos comprimentos de onda de excitação de 260 nm e 337 nm exibida pela degradação do corante ITS. ....	47
Figura 35. Espectro de emissão para diferentes quantidades de ozônio, medidos após a reação entre ITS e ozônio ( $\lambda$ Ex. 220 nm) .....	48
Figura 36. Espectro de emissão para diferentes quantidades de ozônio, medidos após a reação entre ITS e ozônio ( $\lambda$ Ex. 260 nm) .....	49
Figura 37. Espectro de emissão para diferentes quantidades de ozônio, medidos após a reação entre ITS e ozônio ( $\lambda$ Ex. 325 nm). ....	49
Figura 38. Espectro de emissão para diferentes quantidades de ozônio, medidos após a reação entre ITS e ozônio ( $\lambda$ Ex. 340 nm). ....	50
Figura 39. Curvas analíticas com valores de intensidade de fluorescência medidas em 413 nm com excitações em 220, 260, 325 e 340 nm. Comparação com a variação de absorbância exibida pela degradação do corante ITS em 600 nm. ....	51
Figura 40. Medidas Fluorimétricas (a) Fluorescência Lateral para uma amostra sem absorção de luz por corantes (b) Fluorescência Lateral para uma amostra com absorção de luz por corantes (c) Fluorescência Frontal de uma amostra mesurando a luminescência da alíquota fora da região de reflexão. ....	54
Figura 41. Espectro de fluorescência lateral $\lambda$ Ex. 325 nm.....	56
Figura 42. Espectro de fluorescência lateral $\lambda$ Ex. 340 nm.....	56
Figura 43. Espectro de fluorescência frontal $\lambda$ Ex. 325 nm. ....	57
Figura 44. Espectro de fluorescência frontal $\lambda$ Ex. 325 nm .....	57
Figura 45. Gota Fluorescendo .....	58
Figura 46. Gota fluorescendo a) antes da passagem de ozônio, após a passagem de ozônio .....	58
Figura 47. Porcentagem de transmitância observada para o vidro de cobalto e o vidro semiconductor de gálio .....	60

Figura 48. Sinal de fluorescência (mV) em função da distância do detector em relação à gota formada.....	60
Figura 49. Comportamento do sinal analítico de uma solução de ITS em gotejamento constante na presença de ozônio.....	61
Figura 50. Configuração final do sistema proposto para análise fluorimétrica em gota. 1). Fonte de Excitação (Laser He-Cd 325nm) com um filtro de Transmitância 60%, 2). Formador de gota, 3). Fotodetector com filtro colocado a 1 cm da gota, 4). Válvula solenóide para controle do volume da gota, 5). Sistema de aquisição de dados, 6). Fonte de Ozônio gerado por lâmpada germicida,7) Solução de corante ITS $2,0 \times 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$ .	62
Figura 51. Foto do sistema montado para medidas fluorimétricas em uma gota de solução .....	63
Figura 52. Foto do sistema montado para medidas fluorimétricas em uma gota de solução mostrando o laser utilizando para a excitação.....	64
Figura 53. Variação da intensidade de fluorescência em função da vazão do ar.....	65
Figura 54. Montagem e Calibração do sistema para gerar uma atmosfera de ozônio em ar. 1) Compressor, 2) Câmara do compressor, 3) Coluna com KI, 4) Coluna com carvão ativado, 5) Controlador de Vazão, 6) Controlador de vazão para diluição do gás, 7) Lâmpada de ultravioleta germicida 4 watts, 8) Válvula, 9) Controlador de Vazão, 10) Bomba e 11) Controlador de pressão.....	66
Figura 55. Amostrador Impingir ligado ao sistema de geração de uma atmosfera de ozônio.....	66
Figura 56. Calibração da atmosfera padrão de ozônio utilizando o método de borbulhamento em solução de ITS.....	67
Figura 57. Fluorescência observada após a reação entre ITS e ozônio nas alíquotas usadas para calibrar a atmosfera padrão de ozônio. ....	68
Figura 58. Tempo de amostragem para a gota suspensa em uma concentração 29 ppb de $\text{O}_3$ .....	69

Figura 59. Gráfico da 1ª Derivada do tempo de amostragem para a gota suspensa em uma concentração 29 ppb de O <sub>3</sub> mostrando a variação de luminescência da gota.....	71
Figura 60. Sinal analítico medido para uma gota suspensa em um período de 2 minutos de amostragem para diferentes concentrações de ozônio. ...	72
Figura 61. Gráfico da 1ª Derivada do tempo de amostragem para a gota suspensa diferentes concentrações de ozônio mostrando a variação de luminescência da gota e a homogeneidade da amostragem. ....	73

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Volumes de corante e água adicionados aos balões volumétricos para a quantificação do ozônio residual por fluorescência .....	23
Tabela 2. Correlação da concentração das moléculas fluorescentes formadas e da concentração de índigo degradada. ....	40
Tabela 3. Características principais do método (comparação com o método padrão).....	41
Tabela 4. Variação da intensidade do sinal analítico de fluorescência (excitação 260 nm, emissão 413 nm) comparado com a adição dos possíveis interferentes do método (média de 3 leituras). ....	42
Tabela 5. Configuração da montagem do método em uma gota suspensa ...	73

## ÍNDICE DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ITS - Índigo trissulfonado

PBS - Solução tampão fosfato

SE - Solução estoque

I.F. - Intensidade de fluorescência

ABS - Absorbância

ABSE - Absorção

$\lambda$  - Comprimento de onda

Ex. - Excitação

Em. - Emissão

$h\nu$  - Luz do ultravioleta

AAB - ácido 2-aminobenzóico

ASAB - ácido sulfano 2-aminobenzóico

$[O_3]$  - Concentração de ozônio

## SUMÁRIO

1. Introdução .....	01
1.1. Considerações iniciais sobre o ozônio .....	01
1.2. O papel do ozônio na atmosfera .....	05
1.3. Os riscos do ozônio aos seres vivos .....	10
1.4. O uso do Ozônio no tratamento de água .....	11
1.5. Considerações sobre os métodos de análise de ozônio .....	12
1.6. A reação entre Ozônio e índigo.....	14
1.7. A química analítica em uma gota suspensa e absorção de gases por gotas de soluções .....	17
2. Objetivos .....	20
3. Materiais de métodos .....	21
3.1. Preparo das Soluções .....	21
3.1.1. Solução estoque (SE) .....	21
3.1.2. Solução tampão fosfato (PBS) .....	21
3.1.3. Reagente I ITS (índigo trissulfonado).....	21
3.1.4.Reagente II ITS .....	22
3.1.5.Solução de isatina .....	22
3.2. Geração de ozônio residual em água .....	22
3.2.1. Procedimentos para medidas de ozônio residual em água .....	22
3.3. Reavaliação sobre o comportamento do produto luminescente reação entre ITS e O <sub>3</sub> e efeito da concentração do corante na reação .....	25

3.4. Estudo da viabilidade do método analítico fluorimétrico em uma gota de solução de ITS para determinação de ozônio em ar .....	26
4. Resultados e discussões .....	27
4.1. Método para a determinação de ozônio residual em água pela técnica de fluorescência.....	27
4.1.1. Fluorescência do produto da reação do índigo trissulfonado (ITS) com ozônio .....	27
4.1.2. Medidas de ozônio residual .....	36
4.1.3. Estudos Quantitativos sobre a formação de moléculas fluorescentes .....	37
4.1.4. Considerações sobre o método proposto.....	40
4.1.5. Teste de interferentes.....	41
4.2. Estudo da viabilidade do método analítico fluorimétrico em uma gota de solução de ITS para determinação de ozônio em ar .....	43
4.2.1. Reavaliação sobre o comportamento do produto luminescente reação entre ITS e O <sub>3</sub> .....	43
4.2.2. Efeito da concentração do ITS na fluorescência do ASAB's .....	53
4.2.3. Montagem e avaliação do sistema fluorimétrico para determinação de ozônio em ar utilizando uma gota de solução como sensor analítico .....	59
Conclusões.....	75
Referências .....	76

## 1. Introdução

### 1.1. Considerações iniciais sobre o ozônio

Em meados de 1840, o químico Christian Friedrich Schönbein, ao perceber um odor peculiar nas vizinhanças de um equipamento elétrico do laboratório no qual trabalhava, associou esse cheiro à formação de uma nova substância, a qual deu o nome de ozônio, que provem do grego ózo, que significa cheiro (SOUZA et al, 2004; NOVAIS, 1998). O ozônio é uma molécula triatômica formada exclusivamente por átomos de oxigênio com duas ligações equivalentes com um comprimento de 1,28 Å (LEE 1999). O ângulo da ligação é igual a 116°48' e possui ligações  $\pi$  (pi) deslocalizadas e um momento de dipolo diferente de zero (LEE, 1999, SOLOMONS, 2005; WAYNE, 2000) como representado na Figura 1.



Figura 1. Representação da fórmula estrutural do híbrido de ressonância do ozônio e representação do mapa da energia potencial de sua densidade eletrônica (Fonte: SOLOMONS, 2005).

Quando isolado o ozônio é um gás instável, diamagnético, com ponto de ebulição em -112°C, de cor azul intensa, devido à absorção de luz na região de 557 e 602 nm, absorvendo também na região dos 255 nm. Esta molécula é termodinamicamente instável, decompondo-se a oxigênio facilmente (LEE 1999 e WAYNE, 2000).

O ozônio é uma molécula com um potencial de oxidação de 2,07 volts, esse valor é maior do que os potenciais associados ao cloro, ao permanganato de potássio ou até mesmo o peróxido de hidrogênio (LEE 1999, FAUST, 1998; SALMON et al, 2000). Isso faz do ozônio uma molécula extremamente reativa, dando a esta molécula a capacidade de combinar-se com diferentes substâncias.

Na água pura esta molécula instável poderá ser dissociada em oxigênio em diferentes etapas singulares durante sua hidrólise (Figura 2). Durante esta hidrólise a molécula poderá reagir no meio aquoso com íons hidroxila presente no equilíbrio da água (rota de reação 1a), sendo convertido em  $O_2^-$  ou radical peróxido, e posteriormente em oxigênio. Entretanto a cinética da reação é mais favorável em meio ácido (rota de reação 2), com reações seguintes que resultam na decomposição em oxigênio, porém dissolvendo uma grande parte deste ozônio em água, antes de sua decomposição a oxigênio, como pode ser representado pela rota reacional na Figura 2 (STAEHEILN e HOLGNÉ, 1985).

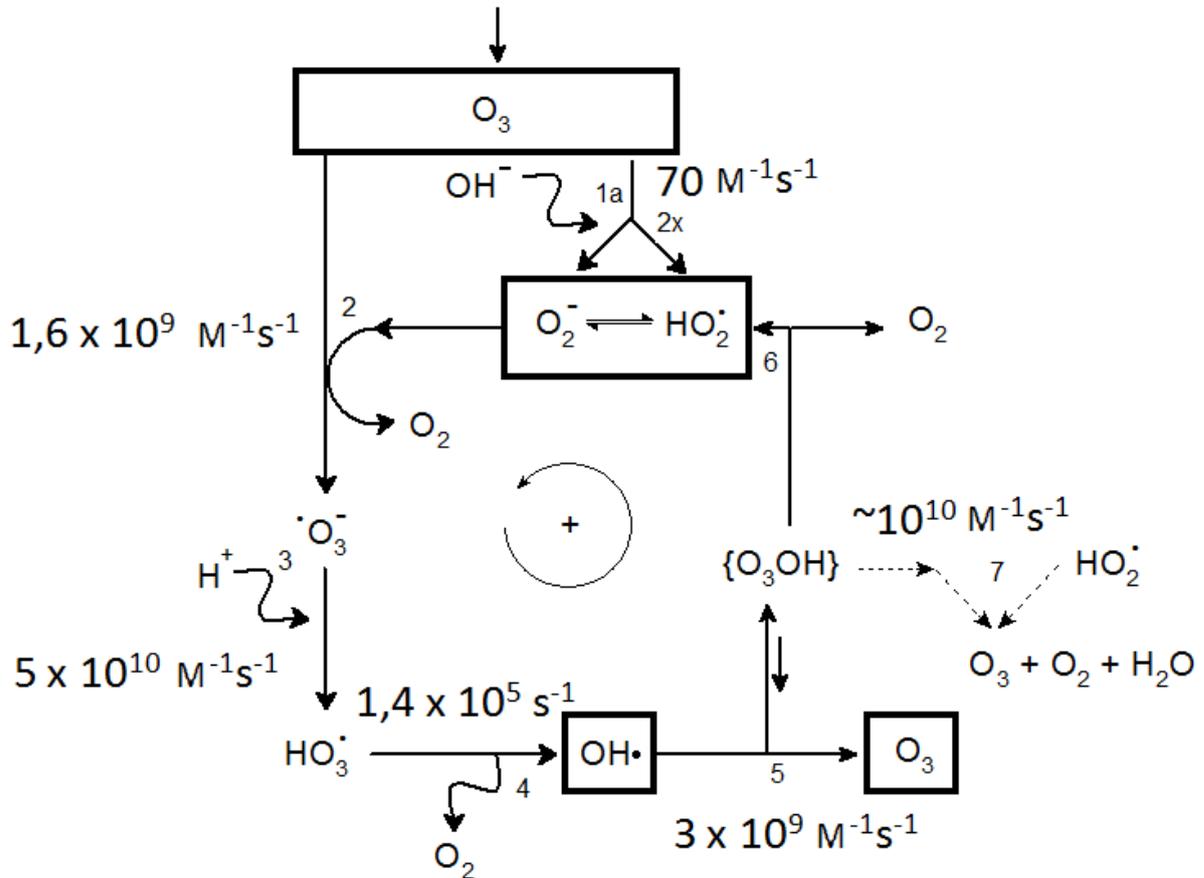


Figura 2. Rota das reações envolvidas na hidrólise do ozônio em água, com as respectivas constantes de velocidades de cada reação resultando na decomposição de ozônio a oxigênio e a dissolução de parte do ozônio em água (Fonte: STAEHEILN e HOLGNÉ, 1985).

Na presença de outra molécula neste meio reacional, além das reações esperadas entre água e ozônio, é possível observar as reações entre o ozônio e a molécula adicionada ao meio como representado na rota reacional da Figura 3. Esta reação pode acontecer de duas formas distintas. A primeira forma desta molécula M reagir com ozônio é por meio da oxidação ou reação de ozonólise direta do ozônio sobre molécula em uma reação controlada apenas por difusão (rota d), que ocorrerá de maneira muito rápida aumento significativamente a quantidade do produto  $M_{oxid}$  em relação aos demais produtos gerados. A segunda rota prevista para a reação será representada por d' poderá ocorrer em etapas distintas, formando um produto diferente do que aquele esperado para a reação controlada por difusão. Se a molécula M apresentar um potencial de oxidação maior que do ozônio a

molécula sofrerá uma ionização. Os demais produtos formados durante de oxidação serão formados pelas reações com os radicais peróxido, sendo adicionado a molécula (etapa 8) ou oxidando diretamente a molécula M (STAEHEILN e HOLGNÉ,1985).

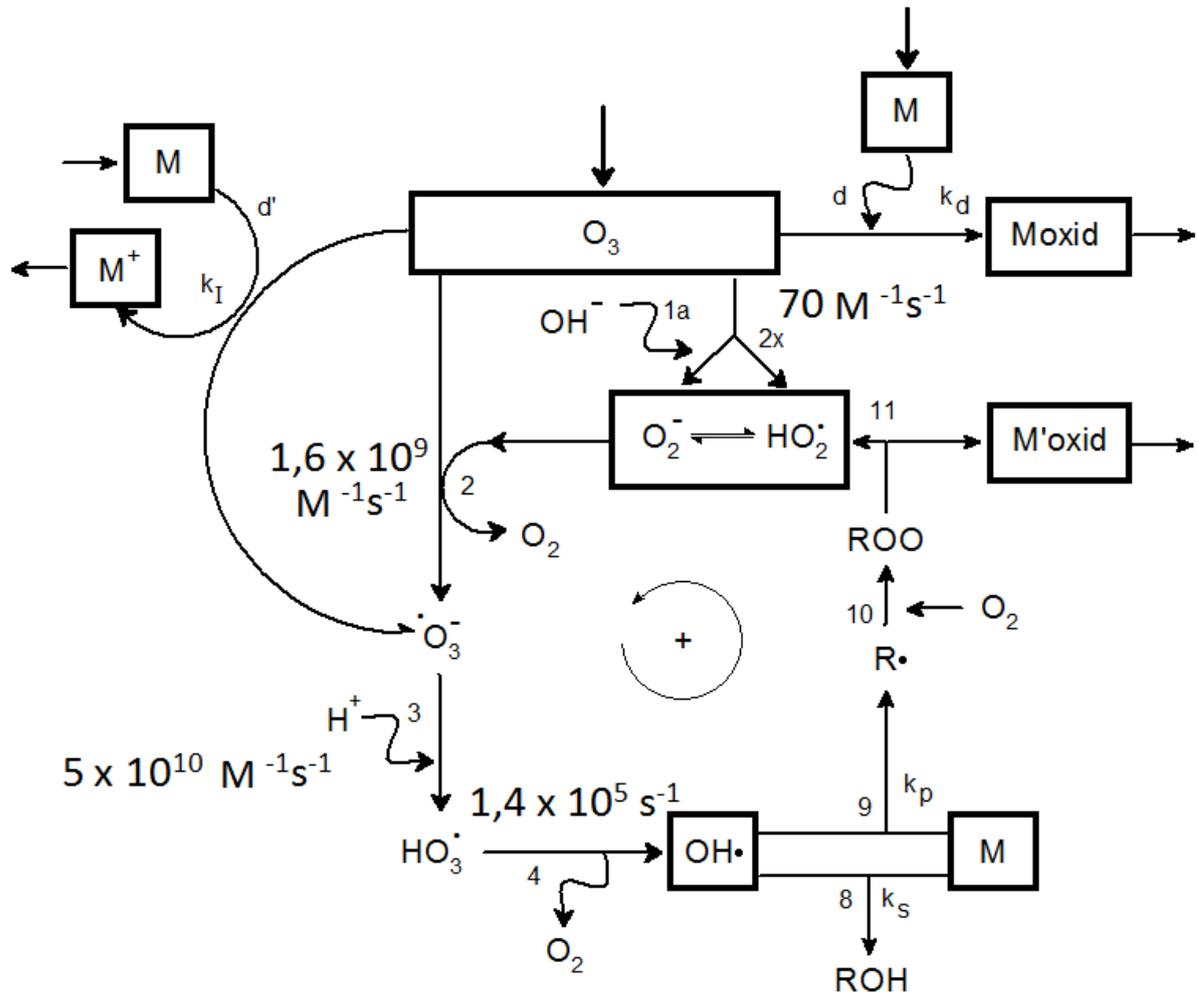


Figura 3. Rota reacional de uma Molécula M que reage com ozônio na presença de água (Fonte: STAEHEILN e HOLGNÉ, 1985).

Com estas propriedades únicas o ozônio pode ser usado para diferentes fins pelo homem como na oxidação de matéria orgânica para a desinfecção e tratamento de águas. O ozônio também poderá ser utilizado para a limpeza do ar em ambientes fechados com um alto teor de substâncias voláteis responsáveis pelo odor nestes locais. Na síntese de compostos por meio de reações químicas ozonólise com moléculas orgânicas ou na formação de óxidos inorgânicos.

Outro papel importante do ozônio é a sua presença no ambiente, presente na troposfera oxidando diversas substâncias presentes no ar, ou na absorção de luz ultravioleta na estratosfera absorvendo parte da radiação ultravioleta proveniente do sol (WAYNE, 2000).

## 1.2. O papel do ozônio na atmosfera

A atmosfera pode ser dividida em camadas com propriedades físicas e químicas distintas que influenciam diretamente nas tendências de mudanças de temperatura na atmosfera.

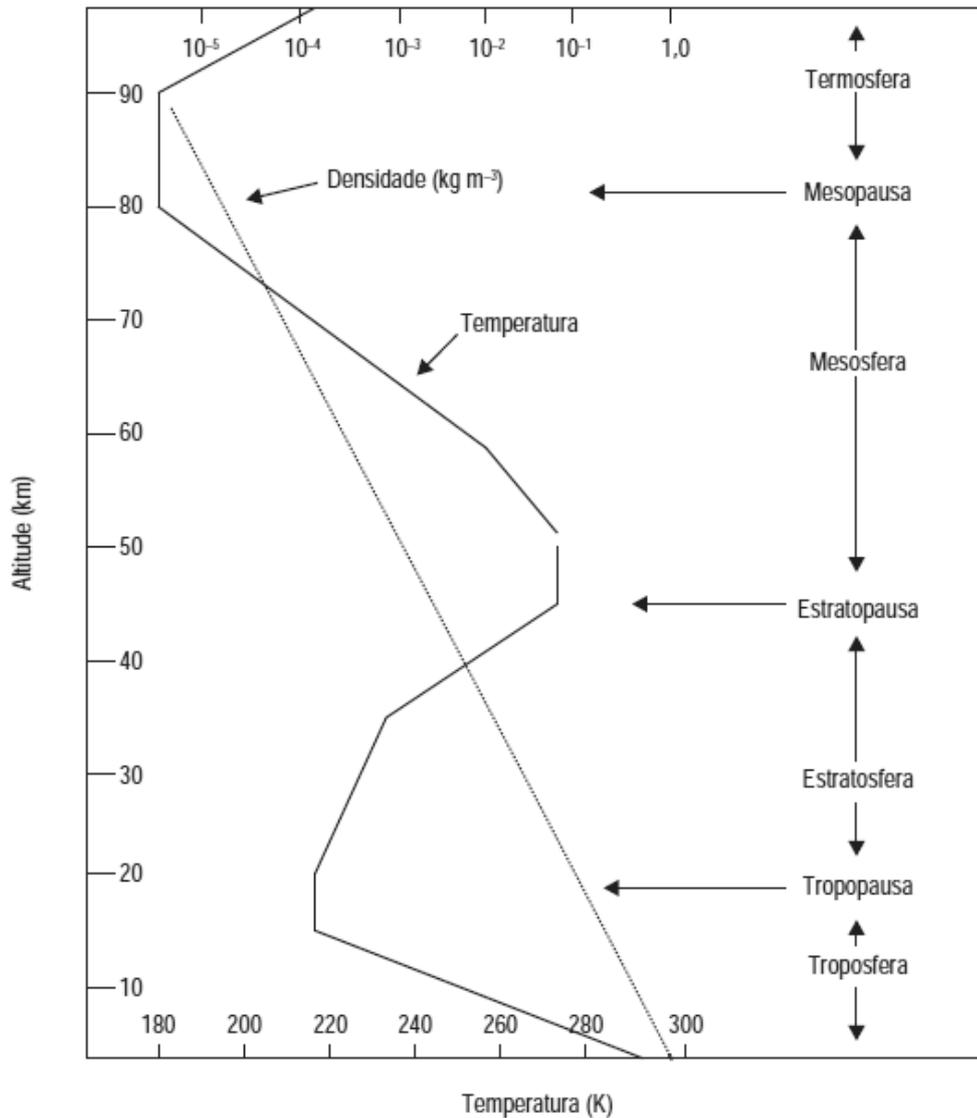


Figura 4. Camadas da atmosfera e algumas propriedades físicas (Fonte: BAIRD, 2002).

Nessas camadas conhecidas como troposfera, tropopausa, estratosfera, estratopausa, mesosfera, mesopausa e termosfera a influencia do ozônio é mais considerada na troposfera e na estratosfera (Figura 4).

A troposfera se estende do nível do mar até cerca de 16 km de altitude. Nela, a temperatura diminui com o aumento de altitude, resultado do calor emanado da superfície do solo gerado principalmente radiação solar que incide sobre a crosta terrestre, dissipando-se ao longo da atmosfera (BAIRD, 2002).

Após a troposfera, existe uma camada conhecida como tropopausa e partir dela inicia-se a estratosfera, camada na qual a temperatura se eleva com o aumento da altitude. O fenômeno é causado pelas moléculas de ozônio que absorvem radiação no ultravioleta devido as suas ligações pi deslocalizadas, convertendo essa energia em vibrações ou seja aumento da temperatura (FINLAYSON-PITTS, 1986).

Já na troposfera, que matem contato direto com a crosta terrestre e com os seres vivos, proporciona um ambiente básico para a sobrevivência dos organismos aeróbicos, que utilizam oxigênio livre em sua respiração. Ela é constituída por gases e material sólido disperso nela, porem sua constituição em massa é predominantemente gasosa, onde uma porção gasosa de ar é composta aproximadamente de 78% de Nitrogênio, 21% de oxigênio e 1% é formado por uma mistura infimamente pequena de outros gases como dióxido de enxofre, dióxido de carbono, metano, hidrogênio, dióxido de nitrogênio, ozônio e gases nobres. Esses gases estão em constantes trocas em diversos ciclos químicos e bioquímicos que regulam seu equilíbrio no ar, porem a quantidade de nitrogênio ( $N_2$ ) e oxigênio ( $O_2$ ) não mudou significativamente ao longo da história da humanidade, entretanto os gases minoritários, sofreram uma alteração considerável entre eles podemos destacar o dióxido de carbono, os compostos nitrogenados e o ozônio (ROCHA, ROSA, e CARDOSO, 2004 e GEROSA et al, 2007).

Os aspectos levantados seriam primordiais visto que o ozônio na estratosfera é extremamente importante para a manutenção da vida do planeta pelo efeito de filtragem dos raios ultravioletas emitidos pelo sol devido a sua característica de absorver na região de 250 nm. Porém a função do ozônio estende-se além dessa característica de proteção atuando na

troposfera como um agente detergente oxidando diversas moléculas presente no ar (DERWENT et al, 2002) (Figura 5).

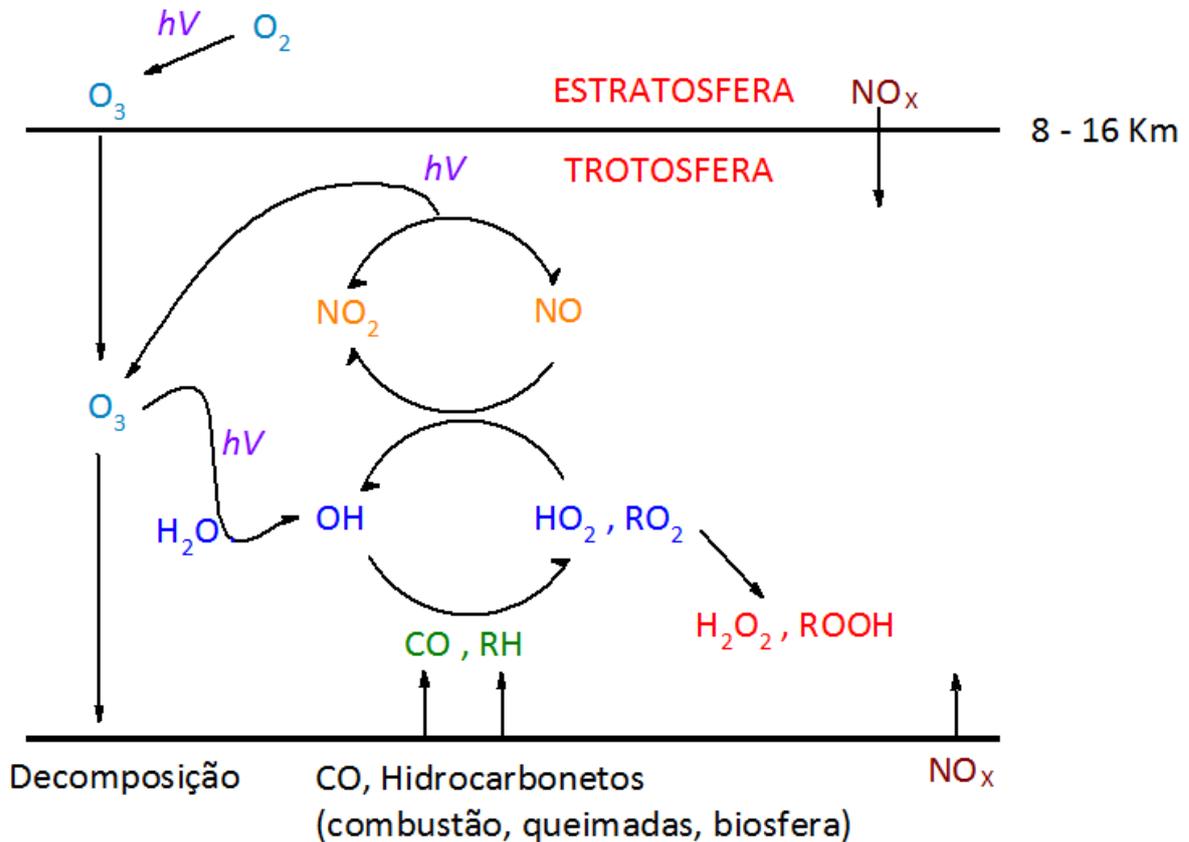


Figura 5. Esquema ilustrando a química do ozônio troposférico, acoplando os ciclos químicos dos,  $NO_x$ , e  $HO_x$  ( $RO_2^\bullet$ =radicais peroxi orgânicos) (Fonte: JACOB, 2000)

Em um equilíbrio sutil o ozônio é responsável pela limpeza do ar porque em contato com outras moléculas na atmosfera promoverá reações de oxidação tornando essas moléculas mais solúveis e passíveis a serem solúveis pela água da chuva (JACOB, 2000). O ozônio é formado na troposfera como resultado da fotoxidação de compostos orgânicos voláteis na presença de óxidos de nitrogênio ( $NO_x$ ) (EINFELD e PANDIS, 1998). O ozônio está envolvido em uma série de reações atmosféricas formando diversos óxidos solúveis bem como a formação de radicais  $OH$  envolvidos na oxidação de substâncias orgânicas presentes no ar (Figura 6).

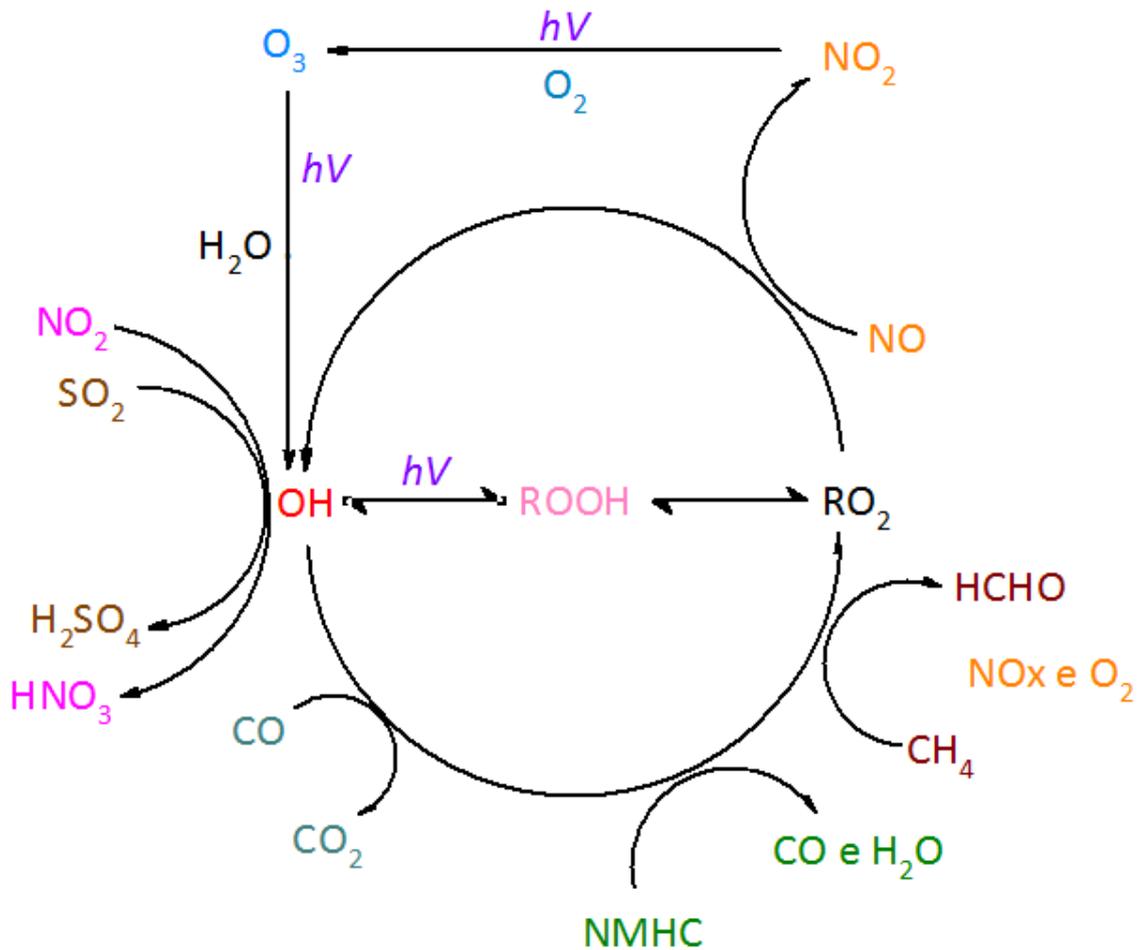


Figura 6. Diagrama do ciclo oxidante fotoquímico. R representa H, CH<sub>3</sub> ou fragmentos com número superior de carbonos. (Fonte: CRUTZEN E GOLDAMMER 1992; O'NEILL 1993).

O ozônio, por seu caráter oxidante, na troposfera exerce diversos efeitos nocivos à saúde humana e ao ecossistema terrestre. Além disso, há suspeitas de que o aumento do ozônio troposférico pode ter um significativo impacto na qualidade do ar e nas mudanças climáticas locais, uma vez que em centros urbanos onde a concentração de ozônio é elevada, esse gás é responsável pelo aumento da temperatura nestas regiões poluídas por possuir um elevado poder calorífico, tanto que o calor absorvido por uma molécula de ozônio equivale a 12 moléculas de monóxido de carbono (ROCHA, ROSA e CARDOSO 2004, CRUTZEN e GOLDAMMER 1992; O'NEILL 1993, BAIRD, 2002 e WAYNE, 2000).

Um dos efeitos associados aos altos índices de ozônio na atmosfera é a produção de um efeito climático conhecido como smog. O

smog (do inglês 'smoke', fumo e 'fog', nevoeiro) é um fenômeno cada vez mais visível nas grandes áreas urbanas, em particular no Verão (Figura 7) (EUROPEAN ENVIRONMENT AGENCY, 1998) com a formação de um nevoeiro formado por oxidantes fotoquímicos, como o ozônio troposférico e os peroxi-acetil-nitratos (PAN). O smog formado nessas cidades com altos índices de poluição gera doenças respiratórias como a asma, sendo por isso os portadores deste tipo de doenças e as crianças mais vulneráveis (NIOSH, 2005, PARRISH et al, 1999; SCHEEREN e ADEMA, 1996).



Figura 7. Efeito Smog observado na cidade de Nova York, EUA. (Fonte: LARASFRIENDS.COM 2007)

### 1.3. Os riscos do ozônio aos seres vivos

O ozônio é extremamente tóxico, em ambientes fechados a quantidade máxima permitida é de 0,1 ppm (NIOSH, 2005). Em estudos realizados com animais foi observado que animais como ratos e frangos expostos por longos períodos a uma atmosfera de ozônio apresentaram alguns tipos de câncer.

Em ambiente aberto a quantidade ideal de ozônio é de 10-20 ppb, podendo em algumas situações chegar a 60-70 ppb, causando vários problemas como a formação do smog fotoquímico, que é prejudicial ao seres vivos (WAYNE 2000, ROCHA, ROSA e CARDOSO 2004).

Em plantas o efeito deste poluente é muito mais visível, promovendo necroses nas superfícies das folhas devido ao elevado poder oxidante do ozônio (ASHMORE et al, 2004; GUERRA et al, 2004; GRAVANO et al, 2004) como representado na Figura 8.



Figura 8. Folha de planta apresentando necrose devido aos altos índices de ozônio (Fonte: BIODIVERSIDADE TESES E DISSERTAÇÕES 2007 )

#### 1.4. O uso do Ozônio no tratamento de água

A água é um bem valioso para a manutenção da vida, ela está envolvida na maioria dos ciclos bioquímicos que regulam a vida em nosso planeta. O crescimento do processo de industrialização e a expansão das cidades contribuíram para contaminação de grande parte das águas superficiais. Um processo utilizado para desinfecção de águas em larga escala é o baseado na cloração, porém um dos problemas da adição de cloreto ou dióxido de cloro em água é a possibilidade da formação de substâncias organocloradas de elevada toxicidade. O uso do ozônio, substância de alto potencial oxidante ( $E^0 = 2,07$  volts) é uma alternativa ao cloro. Além do seu potencial germicida, ele pode destruir compostos orgânicos responsáveis por dar cor ou odor a água potável (BELTRÁN, 2004; CLESCERI et al, 1989; LODGE, 1989).



Figura 9. Equipamentos comerciais de geração de ozônio para purificação de água e ar. (a) Ozonizador de água doméstico (Fonte RICOZON ARUJÁ 2010); (b) Banheira com ozonizador para limpeza de água (Fonte TRAT' BEM 2010); (c) e (d) ozonizadores domésticos de ar (Fonte RICOZON DESEDORA 2010, MINIATLÂNTICO 2010).

Um grave problema é que muitas empresas que comercializam estes equipamentos, não sabem ao certo a quantidade de ozônio gerada por eles não se sabe ao certo se é seguro utilizar esses equipamentos para o tratamento de água e ar por ozonólise (Figura 9). No Brasil não existe uma legislação específica para o controle da quantidade deste poluente, tanto nas quantidades de ozônio para a desinfecção do ar em ambientes fechados, como na construção e comercialização de equipamentos que fazem a limpeza da água com ozônio (SOUZA et al, 2004).

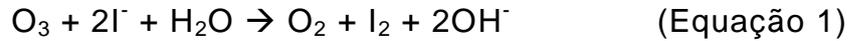
Um inconveniente do ozônio é sua ação sobre a saúde dos seres vivos superiores (BOUBEL et al, 1994) . Para um tratamento da água com ozônio eficaz e seguro é importante o acompanhamento do ozônio residual presente na água, pois devido à elevada toxicidade o ozônio excedente do processo de descontaminação da água será destrutivo a plantas e animais próximos as fontes de geração desta substância oxidante.

### **1.5. Considerações sobre os métodos de análise de ozônio**

Existem alguns métodos químicos para a determinação de ozônio em ar e águas (SACHDEV et al, 1972; RIDLEY et al, 1992; PLAISANCE et al 2007; PARRISH e FEHSENFELD 2000; SCHURATH et al, 1991), porem poucos destes são seletivos e sensíveis para a determinação deste analito em tempo real. A principal dificuldade está na etapa de amostragem, pois o ozônio possui um elevado potencial de oxidação reagindo com diferentes moléculas o pode interferir em sua quantificação. Em medidas diretas do analito por espectrometria no ultravioleta, além do agravante da reatividade do ozônio, existe a possibilidade de outras moléculas orgânicas presentes no ar absorvem na mesma região no espectro de ultravioleta, dificultando desta forma sua quantificação (DELGADO et al 2007; BY et al, 1995; GRØNTOFT et al 2004).

Dentre os métodos químicos mais utilizados dois métodos se destacam o iodométrico (BIKDSALL, 1952) reconhecido por muito tempo como método padrão para a determinação de ozônio e seu sucessor atual o método colorimétrico do Índigo. O método iodométrico para a reação com ozônio está baseado na reação de redução iodeto a iodo (Equação 1), este

método sofre interferência de todas as moléculas que interagem com o iodeto.



O método colorimétrico do Índigo é muito mais específico porque depende de uma reação de ozonólise que produz produtos incolores e por muito tempo acreditava-se que eram formadas moléculas de isatina após a reação (Figura 10) (BADER e HOIGNE, 1981).

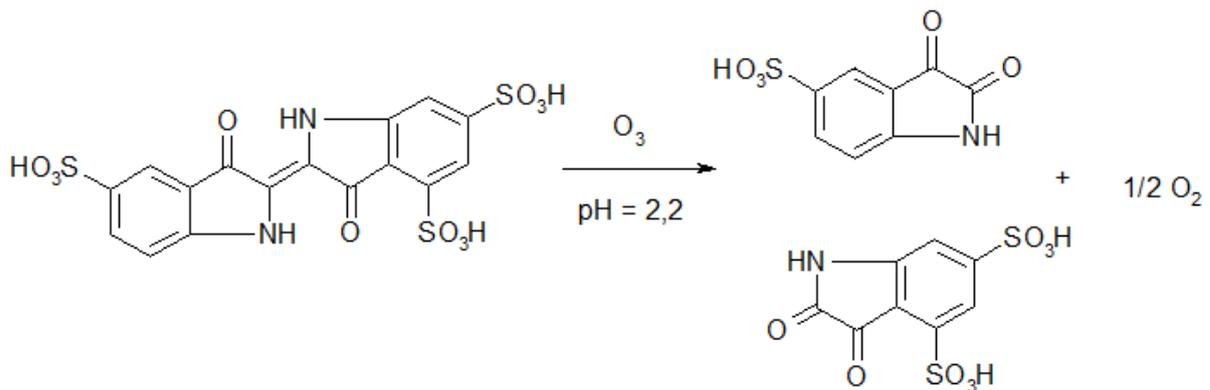


Figura 10. Reação entre ITS e ozônio formando duas moléculas de isatina sulfonadas

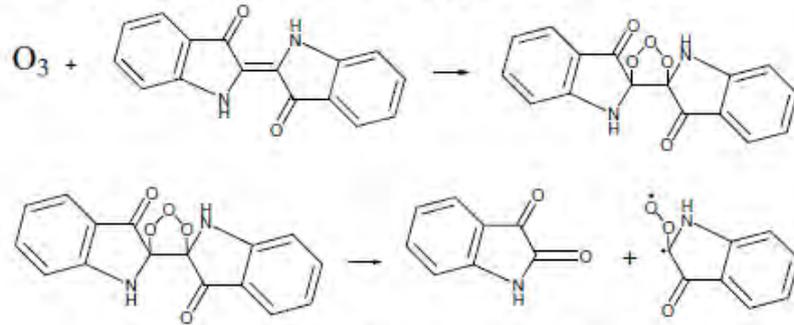
Entre os principais inconvenientes das medidas estão o descoloramento do corante pela ação de substâncias oxidantes como o hipoclorito, atuando sobre o cromóforo do corante. Outro inconveniente encontrado para mensurar o ozônio pelo método colorimétrico do índigo é a necessidade da realização de duas medidas para determinação do analito. O ozônio após a reação com o corante índigo gera produtos incolores, assim durante a análise é necessário uma medida de absorvância de uma solução sem ozônio, e em seguida é medida a absorvância de uma solução na qual pretende-se mensurar o ozônio. A diferença de cor entre as duas medidas é proporcional a quantidade de ozônio dissolvido ou em contato com a água.

## 1.6. A reação entre Ozônio e Índigo

A ação do ozônio sobre duplas ligações entre átomos de carbono resulta em reações conhecidas desde o início do século XX. Na Química Orgânica, essas reações têm sido usadas na identificação de compostos contendo duplas ligações e na formação de compostos carbonílicos. Na Química Atmosférica, essas reações são amplamente estudadas, devido à grande quantidade de compostos orgânicos contendo duplas ligações, presentes na atmosfera, que reagem com o ozônio. A reação do ozônio com a molécula de índigo, corante contendo duplas ligações, possui grande importância analítica, sendo base de método utilizado para determinar ozônio dissolvido na água e presente no ar. A reação é descrita na literatura como processo de quebra da dupla ligação e formação de duas moléculas de isatina (BERGSHOEFF et al, 1984; KETTLE et al, 2004; FELIX et al, 2006).

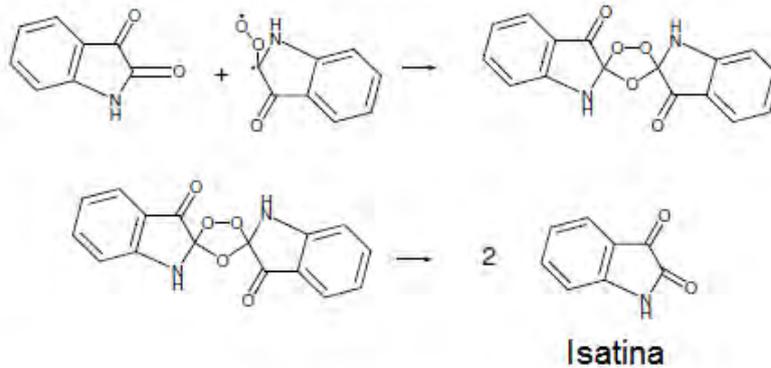
Em estudos mais detalhados sobre a degradação do corante utilizando espectrometria de massas em moléculas similares ao índigo sugerem a formação de moléculas de ácido antranílico (DALMÁZIO et al, 2007; GROSJEAN et al, 1988). Conforme representado na Figura 11 (a) o ozônio reage com a ligação dupla carbono-carbono da molécula de corante formando uma molécula de isatina e um radical peróxido orgânico. (b) O radical rearranja-se formando um ozônio que dá origem a uma nova molécula de isatina. (c) O mesmo radical peróxido formará uma molécula de ácido antranílico.

a) Reação entre ozônio e a ligação dupla C=C

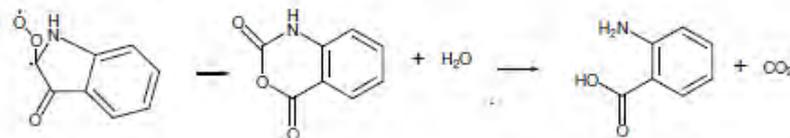


Formação da isatina e de um radical peróxido orgânico

b) Reação entre o radical peróxido e a molécula de isatina



c) Rearranjo do radical peróxido



Ácido 2-amino benzóico  
(Molécula Fluorescente)

Figura 11 Mecanismo de reação proposto para a degradação corante índigo após a reação com  $O_3$ . A substância fluorescente formada é o ácido 2-aminobenzóico (ácido antranílico) (Fonte: CLAYDEN, et al; 2008)

O ácido antranílico poderá ser formado também pela hidrólise básica das moléculas de isatina, porém esta reação só acontecerá em meio básico como representado na Figura 12 (BERCI FILHO et al, 1995; HAUCKE et al, 1987; KLEY et al, 1999).

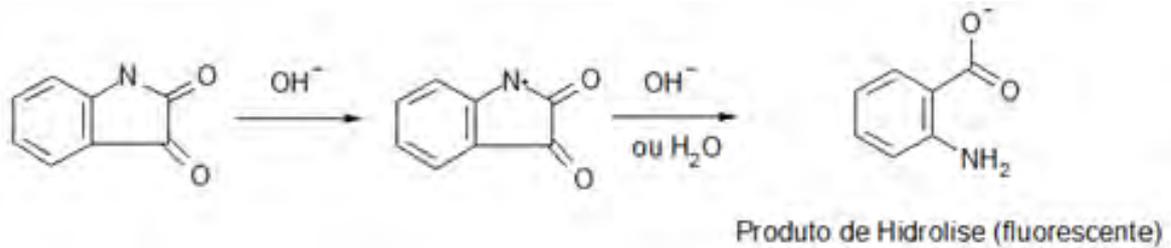


Figura 12. Produto fluorescente obtido durante a hidrólise básica da isatina (Fonte: BERCI FILHO et al, 1995).

Assim a reação a formação do ácido antranílico acontecerá tanto em meio ácido ou neutro pelo rearranjo do radical peróxido, como em básico pela conversão da isatina em ácido antranílico, porém vale salientar, que o ozônio será dissolvido em uma maior quantidade em pH ácido. Assim a adição de uma solução tampão no meio controla a reação fazendo com que ela ocorra preferencialmente pela rota representada na Figura 11.

Moléculas derivadas do ácido aminobenzóico possuem propriedades fluorescentes (com  $\lambda_{Ex}$  = 260 nm e  $\lambda_{Em}$  = 413 nm) (MAWATARI et al, 2001; KETTLE et al, 2004), e estas propriedades foram pouco estudadas sob o aspecto quantitativo para medidas de ozônio. Neste trabalho, buscamos avaliar a possibilidade de fazer medidas de ozônio residual em água utilizando o índigo trissulfonado como reagente, porém utilizando o sinal de fluorescência gerado após a reação entre o corante e a molécula de ozônio. A quantificação do ozônio residual é similar ao método colorimétrico, porém após esta reação ocorre a formação de uma substância fluorescente, esta reação é conhecida na literatura, porém nunca foi estudada no âmbito quantitativo para a determinação de ozônio residual em água.

### 1.7. A química analítica em uma gota suspensa e a absorção de gases por gotas de soluções

É de senso comum que a água da chuva limpa a atmosfera, sendo este um dos processos mais importantes de remoção de poluentes da atmosfera. Esta propriedade que é responsável pelo efeito conhecido como "chuva ácida", é também amplamente utilizada para reconhecer indiretamente a presença de diferentes espécies químicas na atmosfera (CARDOSO; PEREIRA; ROCHA, 1998). Neste caso, a facilidade da amostragem da água de chuva permite a avaliação de alguns componentes traços da atmosfera, o que é uma grande vantagem sobre outros métodos de amostragens destes componentes na atmosfera.

A dissolução de gases em gotas de água depende de alguns fatores, dentre os quais um dos mais importantes é a afinidade do gás pela água, geralmente relacionado com a sua solubilidade em água. O equilíbrio entre a fase gasosa e a líquida pode ser descrito pela lei de Henry (Equação 2) (CARDOSO; PEREIRA; ROCHA, 1998):

$$[C] = K * P \quad (\text{Equação 2})$$

onde [C] é a concentração do gás dissolvido na fase líquida ( $\text{mol.L}^{-1}$ ); P é a pressão parcial do gás C na fase gasosa (atm); e K é a constante da lei de Henry ( $\text{atm}^{-1}.\text{mol.L}^{-1}$ ). Os valores de concentração estimados pela lei de Henry, nem sempre correspondem aos alcançados no centro da gota, já que reações no interior da gota podem consumir o gás dissolvido. A capacidade de absorção de gás também depende de outros fatores, como a temperatura que afeta diretamente a velocidade de reação e inversamente a solubilidade do gás e de outras substâncias solúveis previamente dissolvidas que podem diminuir a solubilidade do gás (efeito salting out). A Figura 13 mostra um possível modelo para absorção do gás carbônico por uma gota de água de chuva. Discussões mais detalhadas sobre o fenômeno de absorção de gases por gotas são apresentadas por Schwartz e Freiberg e Seinfeld. (CARDOSO; PEREIRA; ROCHA, 1998)

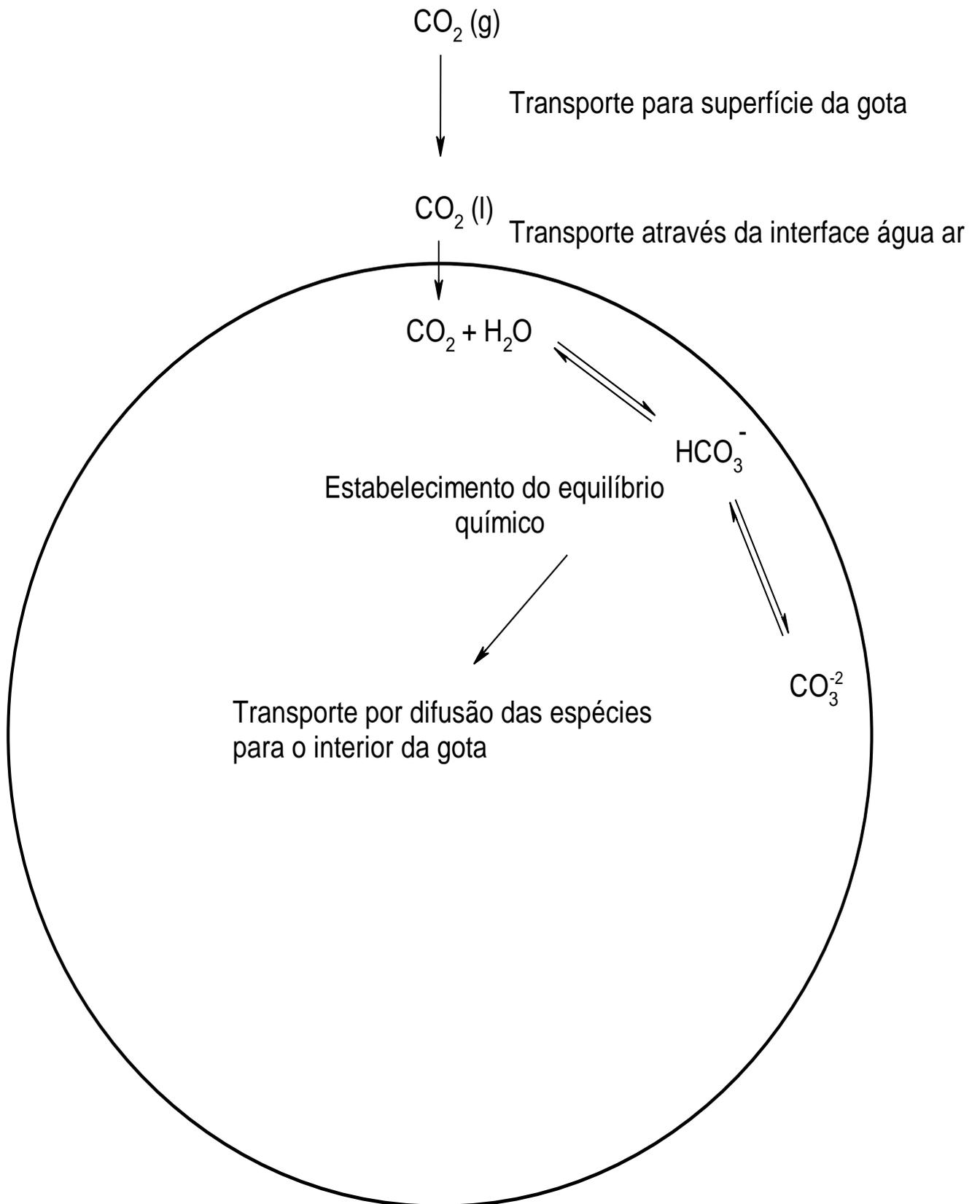


Figura 13. Modelo para absorção de  $\text{CO}_2$  em uma gota de água de chuva (Fonte: CARDOSO; PEREIRA; ROCHA, 1998)

A utilização do sensor analítico em uma gota teve diferentes montagens provando que o sistema é reprodutível e sensível para medidas de absorvância ou fluorescência em uma gota de solução para o ensaio com diferentes analitos presentes no ar (CARDOSO; PEREIRA; ROCHA, 1998).

Em trabalho desenvolvido por FELIX e CARDOSO (2006) uma gota suspensa de corante índigo blue foi utilizada para determinar ozônio em ar. A concentração do analito foi medida usando como referência a descoloração de uma gota suspensa de reagente gota e como conseqüência à perda de absorvância proporcional a quantidade de ozônio presente no ar. Este método apresentou boa sensibilidade, repetibilidade e limites de detecção compatíveis com as quantidades de ozônio encontradas no ar.

A utilização de uma gota para a análise de ozônio em ar mostra-se promissor, pois como foi dito anteriormente o ozônio é extremamente reativo, e a reação direta em uma gota de solução minimiza o efeito de perda de ozônio durante a amostragem. Outro fato que deve ser levado em conta é que o ozônio por ser instável, tem variações bruscas durante curtos espaços de tempo. Assim medidas feitas diretas em gota de solução associado à técnica de fluorescência, poderão fornecer informações mais precisas sobre a quantidade de ozônio no ar em tempo real.

Assim visto a necessidade do monitoramento e quantificação de ozônio, esse trabalho foca o desenvolvimento de uma técnica analítica sensível baseada na degradação do corante ITS formando moléculas fluorescentes para medias indiretas de ozônio residual em água, e a aplicação desta técnica para determinação de ozônio em ar utilizando uma gota suspensa do corante índigo. O desenvolvimento deste método possui grandes vantagens, pois além de se tratar de uma técnica extremamente sensível e seletiva, poderá ser usada para medidas próximas do tempo real e com um consumo mínimo de reagentes.

## 2. Objetivos

Este trabalho foi dividido em duas etapas principais:

- A primeira etapa teve como objetivo desenvolver um método analítico para a determinação de ozônio residual em água medindo a formação da molécula fluorescente formada após a reação entre índigo e ozônio.
- A segunda etapa foi estudar a viabilidade da construção de um sensor de ozônio com uma gota de solução utilizando a técnica de fluorescência.

### **3. Materiais e métodos**

#### **3.1. Preparo das soluções**

##### **3.1.1. Solução estoque (SE)**

Foram pesados  $0,0700 \pm 0,0001$  g de Indigo trisulfonado de potássio (ITS) Sigma Aldrich (99,4%). Essa massa de corante foi transferida quantitativamente para um balão volumétrico de  $100,0 \pm 0,1$  mL, ao balão foram adicionados aproximadamente 50mL de água Millipore ( $18.2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$  Millipore, Bedford, MA) seguido por  $1,00 \pm 0,01$  mL de ácido fosfórico Merck (85%). O volume do balão foi completado com a mesma água.

##### **3.1.2. Solução tampão fostato (PBS)**

Foram pesados  $2,6500 \pm 0,0001$  g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (99,6%) Merck. A essa massa de sal foram adicionados 100 mL de água Millipore e em seguida  $1,80 \pm 0,05$  mL de ácido fosfórico Merck (85%). A solução resultante foi colocada em agitação e seu pH medido e ajustado para  $2,2 \pm 0,1$  ( $25^\circ\text{C}$ ) com a adição de ácido fosfórico. A solução foi transferida para um balão volumétrico de  $250,00 \pm 0,25$  mL completado com água Millipore. (O mesmo procedimento foi utilizado para o preparo de soluções de pH 3,5 e 5,0, porém adicionando quantidades maiores de ácido fosfórico).

##### **3.1.3. Reagente I índigo trisulfonado (ITS)**

Com a pipeta volumétrica foram transferidos  $10,00 \pm 0,05$  mL da SE para um balão volumétrico de  $100,0 \pm 0,1$  mL. O volume do balão foi completado com PBS pH 2,2. (O mesmo procedimento foi utilizado para o preparo de soluções de pH 3,5 e 5,0 do reagente I).

### 3.1.4. Reagente II ITS

Com a pipeta volumétrica foram transferidos  $10,00 \pm 0,05$  mL da solução Reagente I para um balão volumétrico de  $100,0 \pm 0,1$  mL. O volume do balão foi completado com PBS pH 2,2 (O mesmo procedimento foi utilizado para o preparo de soluções de pH 3,5 e 5,0 do reagente I).

### 3.1.5. Solução de isatina

Foram pesados  $0,0500 \pm 0,0001$  g de Isatina Merck (99,8%). Essa massa de corante foi transferida quantitativamente para um balão volumétrico de  $100,0 \pm 0,1$  mL, completado com água Millipore.

## 3.2. Geração de ozônio residual em água

Para a geração de ozônio foi utilizado um ozonizador de tratamento doméstico de água ARUJÁ RICOZON ®. Este equipamento gera uma concentração constante de ozônio dissolvido em água cujos valores vão de  $15 - 200(\pm 5) \mu\text{molL}^{-1}$  à  $25 (\pm 3) ^\circ\text{C}$  medidos pelo método do ITS (CLESCERI et al; 1989) .

### 3.2.1. Procedimentos para medidas de ozônio residual em água

Em 8 balões volumétricos de  $100,0 \pm 0,1$  mL foram adicionados com a pipeta volumétrica  $10,00 \pm 0,05$  mL do Reagente I ITS pH  $2,2 \pm 0,1$  ( $25^\circ\text{C}$ ). A cada balão foram adicionadas alíquotas de água clorada sem ozônio nos volumes de 90, 80, 70, 60, 40, 20, 10 e 0 mL. Os volumes dos balões foram completados com água clorada contendo ozônio residual em uma concentração constante conforme representado na Tabela 1

Tabela 1. Volumes de corante e água adicionados aos balões volumétricos para a quantificação do ozônio residual por fluorescência

Amostra	Volume de água potável	Volume de água potável com Ozônio residual	Volume do reagente I ITS
0	90,00	0,00	10,00
1	80,00	10,00	10,00
2	70,00	20,00	10,00
3	60,00	30,00	10,00
4	50,00	40,00	10,00
5	40,00	50,00	10,00
6	30,00	60,00	10,00
7	20,00	70,00	10,00
8	0	90,00	10,00

As medidas fluorimétricas foram feitas utilizando um espectrofluorímetro Shimadzu RF - 1501 com cubetas de quartzo com 1 cm de caminho óptico, fixando a excitação em 260 nm e emissão 413 nm.

Como o ozônio dissolvido em água é instável não foi possível preparar amostras de padrões com ozônio residual, desta forma foi necessário comparar o método proposto com um método aceito para determinação do ozônio. O método usado como referência é o colorimétrico do corante ITS (BADER; 1981; CLESCERI et al; 1989). Para a realização destas medidas colorimétricas em 600 nm foi utilizado um espectrofotômetro Hitachi U -2000 com cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico (Figura 14).

Os ácidos 5-sulfano 2-aminobenzoico e 2,5-disulfano 2-aminobenzoico gerados após a reação entre ITS e ozônio foram quantificados utilizando como referência o ácido 2-aminobenzoico, pois estas moléculas comportam-se no espectro de emissão e excitação de formas muito semelhantes.

A solução de ácido 2-aminobenzoico (99,6%) foi preparada adicionando  $50 \pm 0,1$  mg de ácido antranílico (Reagen S.A.) em um balão de 100,  $\pm 0,1$  mL. Esta solução foi diluída para preparar padrões nas concentrações de  $2,0 \times 10^{-3}$  a  $2,1 \times 10^{-3}$   $\mu\text{molL}^{-1}$  em meio de uma solução de ITS  $2 \times 10^{-4}$   $\text{molL}^{-1}$  em PBS  $0,05 \text{ molL}^{-1}$ , minimizando desta forma um possível efeito de absorção de luz pelo corante azul.

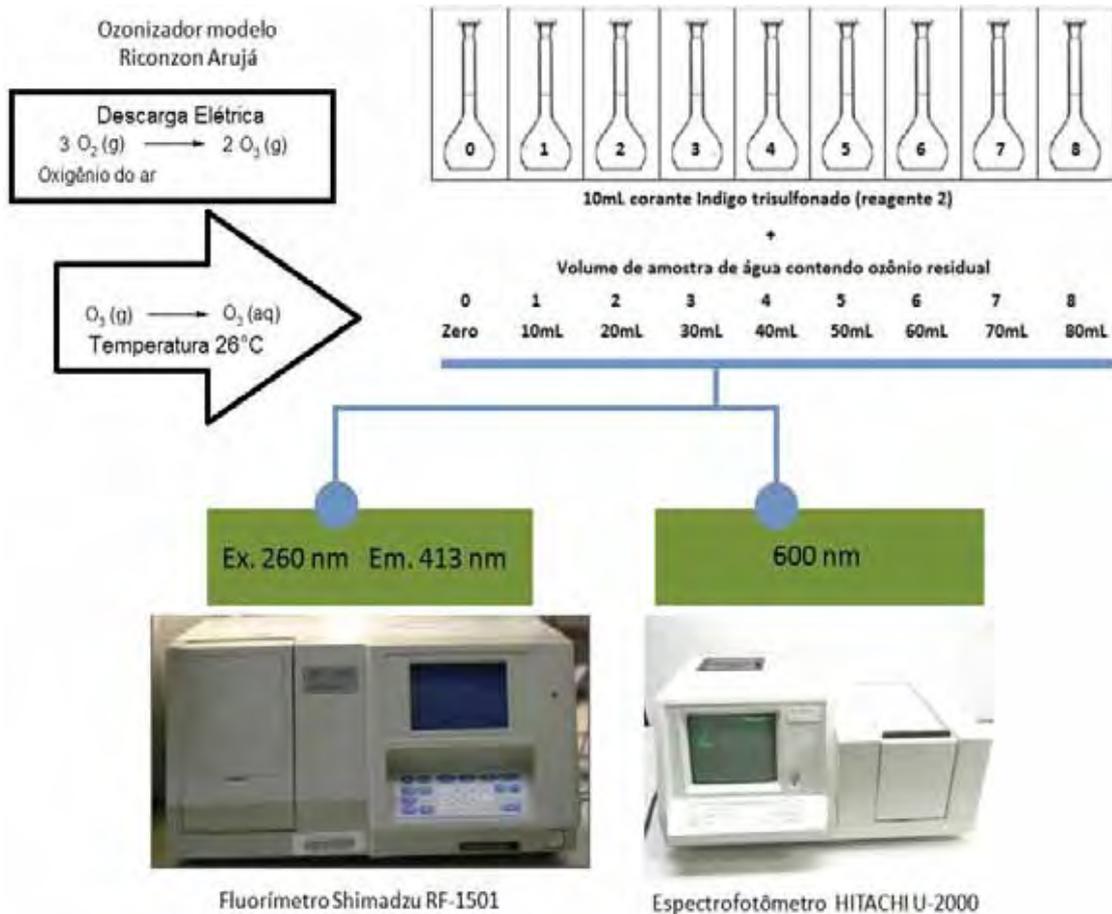


Figura 14. Esquema representando as etapas de análise do método proposto (Variação da intensidade de fluorescência comparada com a concentração de ozônio obtida pelo método do Índigo trisulfonado).

Os interferentes avaliados foram aqueles potencialmente encontrados em águas superficiais. Também foram avaliadas substâncias adicionadas na água para atingir o padrão de potabilidade em processos de tratamento. Foram testadas soluções de  $\text{MnSO}_4$  (Synth P.A.) ,  $\text{NaOCl}$  (Merck P.A.) e  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Dinâmica 30 Vol.) em concentrações iguais, duas e 3 vezes superiores a concentração de ozônio presente na amostra. A amostra avaliada possuía a concentração de ozônio residual de  $3,77 \mu\text{mol.L}^{-1}$ .

### 3.3. Reavaliação sobre o comportamento do produto luminescente reação entre ITS e O<sub>3</sub> e efeito da concentração do corante na reação

Esta etapa do trabalho foi desenvolvida em colaboração com o professor Dr. Luiz Antonio de Oliveira Nunes do IF-USP São Carlos, tendo a disposição um espectrofotômetro Perkin-Elmer modelo Lambda 900 e espectrofluorímetro PERKIN-ELMER LS-55 que possibilita uma melhor avaliação das propriedades ópticas das moléculas de ASAB com a luz, optou-se por avaliar diferentes comprimentos de onda de excitação e emissão para o produto luminescente da reação entre ITS e ozônio. Neste procedimento foi utilizado um volume de 10 mL de solução de ITS contendo  $2 \times 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$  (reagente II) que foi introduzido em um amostrador impinger e borbulhando ozônio gerado por um ozonizador de ar gasozon® ( $0,010 \pm 0,005\% \text{ O}_3/\text{L}$ ) (Figura 15). com vazão constante de  $400 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ . Os sinais analíticos de fluorescência e absorbância da solução foram medidos para diferentes tempos de amostragem de ozônio em cada solução submetida ao ensaio.

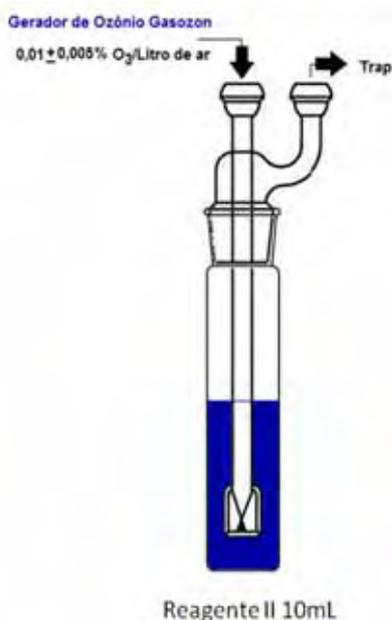


Figura 15. Amostrador Impinger ligado a um ozonizador de ar (gasozon)

Para os ensaios de fluorescência lateral e frontal o mesmo procedimento foi adotado, utilizando concentrações de corante de  $2,0 \times 10^{-3}$  e  $2,0 \times 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$

### 3.4. Estudo da viabilidade do método analítico fluorimétrico em uma gota de solução de ITS para determinação de ozônio em ar

A construção do método partiu de uma proposta inicial representada na Figura 16. Uma gota suspensa de ITS foi formada envolta por uma câmara de vidro, onde ocorre a passagem de ar simulando uma atmosfera com ozônio com uma concentração e vazão constante desconhecida durante o período de amostragem, que também precisa ser estimado experimentalmente. A gota pode ser excitada em diferentes comprimentos de onda, dependendo do tipo de fonte de excitação que poderá ser utilizada, fazendo-se necessário desta forma avaliar o comportamento luminescente do produto da reação entre ITS e ozônio.

#### Problemas iniciais para este tipo de montagem

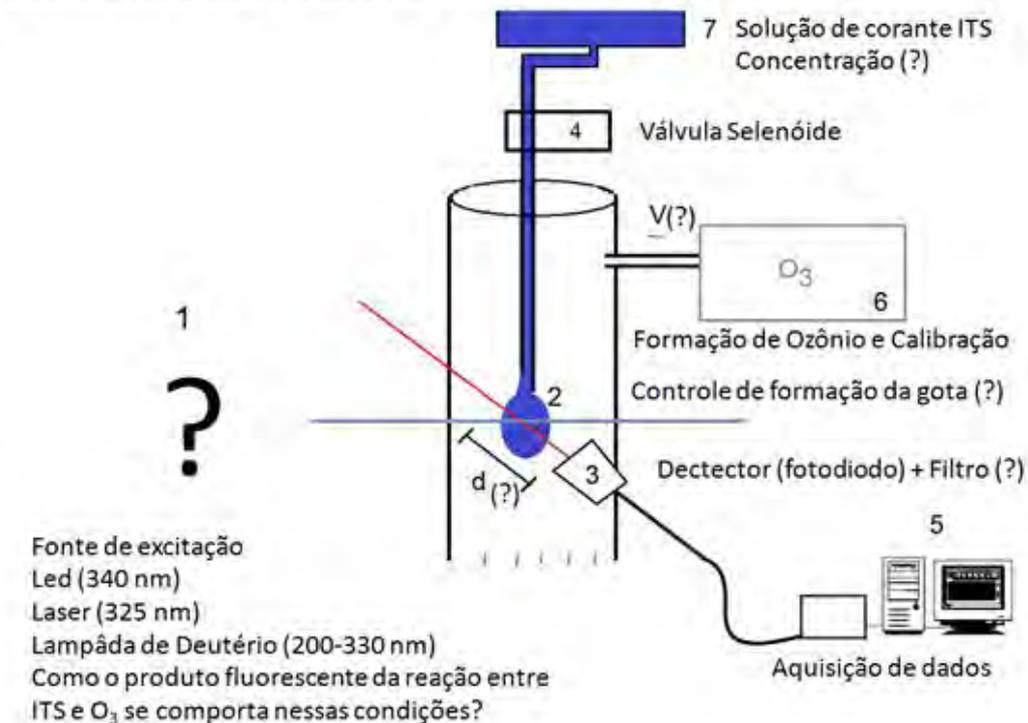


Figura 16. Representação do sistema montado para determinação de ozônio em uma gota suspensa de ITS. 1) Fonte de excitação que poderá ser usada, 2). Controle de formação da gota, 3) Fotodiodo e filtro para aquisição de fluorescência, 4).Válvula Solenóide , 5). Aquisição de dados do foto diodo computador para tratamento dos dados, 6). Formação e de ozônio, 7).Solução de ITS.

## 4. Resultados e discussões

### 4.1. Método para a determinação de ozônio residual em água pela técnica de fluorescência

#### 4.1.1. Fluorescência do produto da reação do índigo trissulfonado (ITS) com ozônio

Inicialmente foi realizado um estudo para avaliar a emissão e excitação do produto da reação entre ITS e ozônio. Para o produto gerado após a reação foi traçado um espectro de excitação (Figura 17), onde os comprimentos de onda de excitação (Ex.) em 260 e 330 nm apresentam uma resposta máxima de emissão (Em.) em 413 nm (Figura 18). A excitação em 260 nm apresentou maior sinal de emissão em 413 nm. A excitação fixada para os experimentos com o produto luminescente formado após a reação foi fixada em 260 nm, pois este comprimento de onda apresenta um sinal de emissão mais intenso.

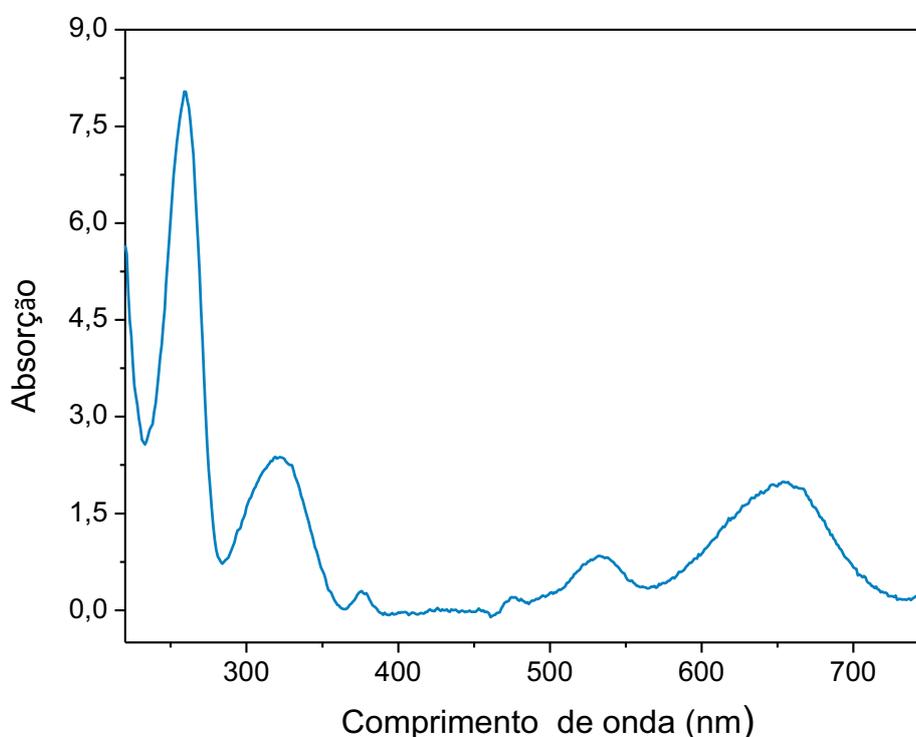


Figura 17. Espectro de excitação para o produto da reação entre ITS e ozônio.

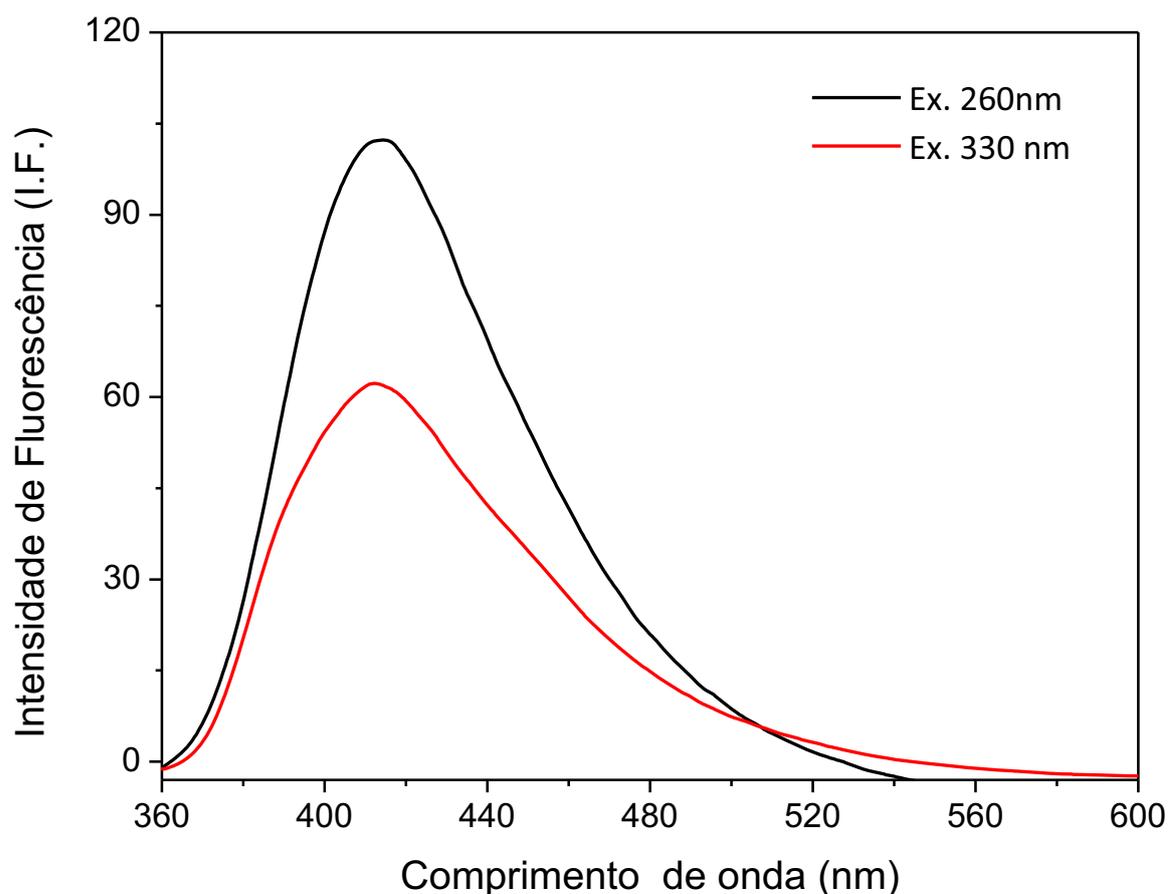


Figura 18. Espectro de emissão para o produto da reação entre ITS e ozônio com excitação em 260 e 330 nm.

Para verificar a formação da molécula fluorescente após a reação entre ITS e ozônio foram traçados espectros de emissão com excitação fixa em 260 nm, antes e após a presença de ozônio. Nessas condições foi observado um acréscimo na fluorescência na amostra (Figura 19) caracterizando a formação de um produto fluorescente. Esta propriedade faz da molécula de ITS um reagente em potencial para quantificar ozônio por fluorescência. O efeito observado, portanto, poderá ser usado como uma alternativa para quantificar ozônio utilizando a luminescência do produto formado.

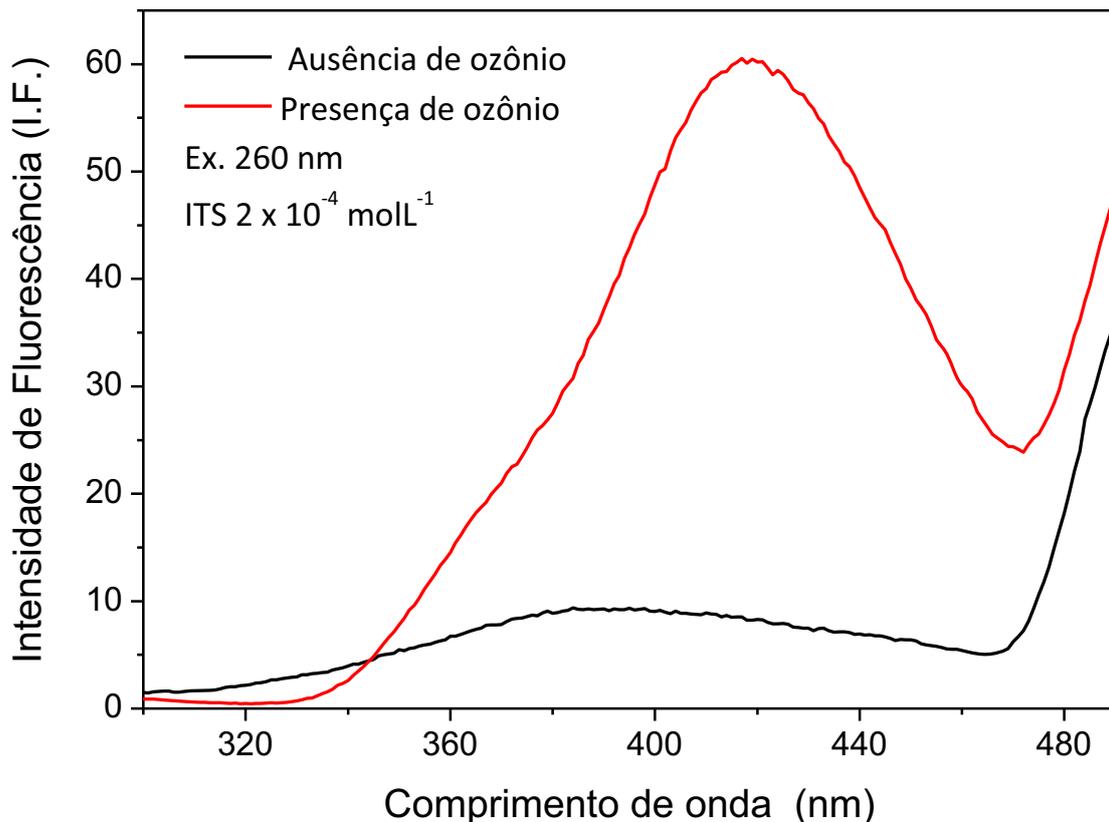


Figura 19. Espectro de emissão com excitação em 260 nm de uma solução de ITS na ausência e na presença de ozônio.

Segundo a literatura, o principal produto da reação entre índigo trissulfonato e o ozônio é a isatina (GROSJEAN, 1988; DALMÁZIO et al, 2007). Testes realizados em nosso laboratório com solução de isatina mostram que a molécula não apresenta o mesmo comportamento luminescente exibido pelo produto de reação entre ozônio e ITS. Um experimento similar foi realizado para o corante ITS utilizando uma solução de isatina que foi colocada para reagir com ozônio e também não apresentou luminescência no produto da reação, mostrando que a isatina ou produtos da sua reação com ozônio não conferem a fluorescência característica observada. Este experimento demonstra que a isatina não contribui para a formação do produto fluorescente entre ITS e ozônio, e que a origem desta substância luminescente é provavelmente de outro produto obtido durante a degradação do corante.

Trabalhos publicados (GROEJEAN et al, 1988; DALMÁZIO et al, 2007; KETTLE, 2004; FELIX et al 2006.) sobre a reação de ozônio com moléculas de índigo sugerem que o outro possível produto formado na reação é o ácido 2-aminobenzoico AAB. Para o corante ITS, são previstos a formação de ácidos sulfanoaminobenzoicos (ASAB's)(Figura 20).

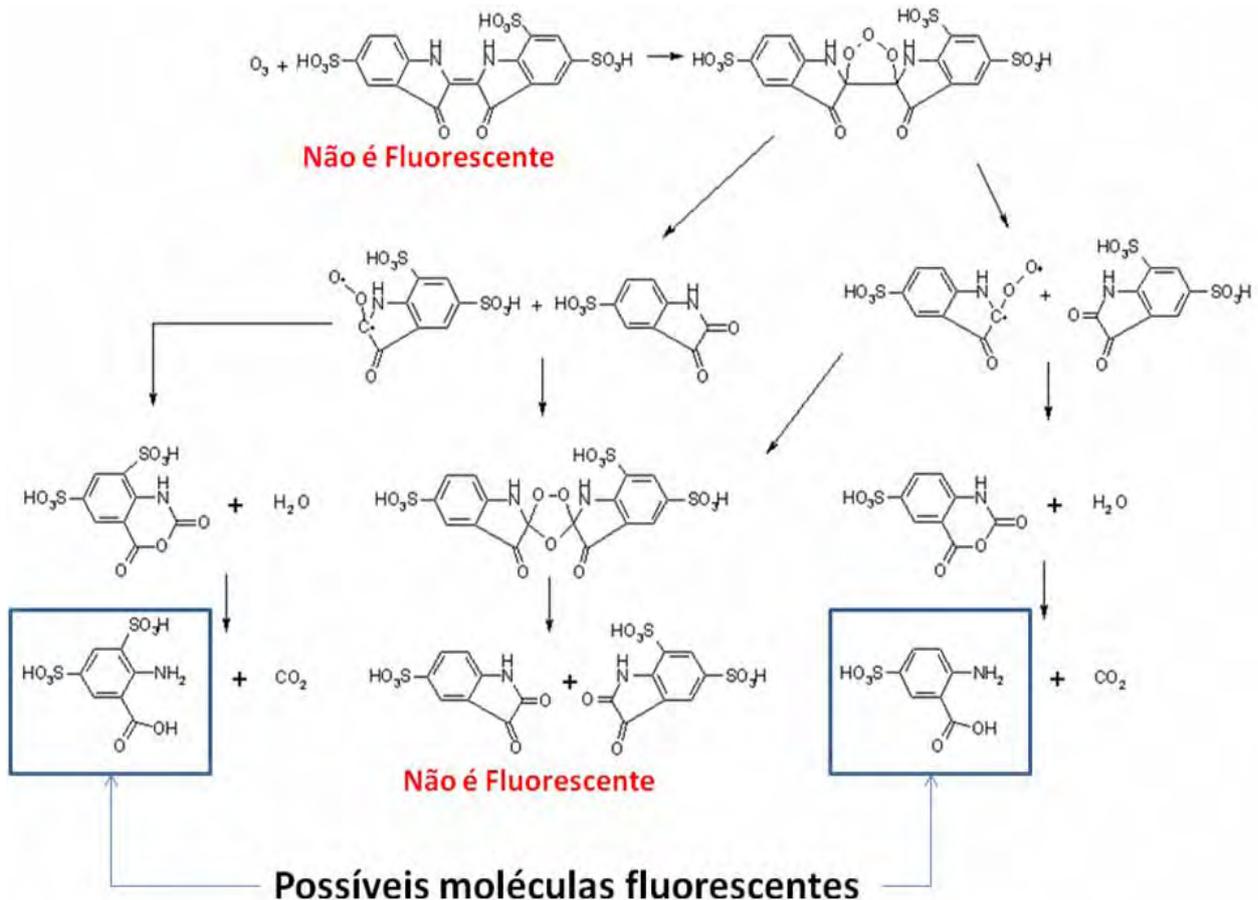


Figura 20. Possíveis produtos esperados após a reação entre ITS e ozônio. Modelo da reação baseado em proposta de GROEJEAN et al, 1988; KETTLE, 2004, FELIX 2006 e CLAYDEN, et al, 2008.

Para verificar indícios da formação das moléculas de derivados dos ácidos sulfano 2-aminobenzoicos após a reação entre ITS e ozônio, foi preparada uma solução de  $0,4 \mu\text{mol.L}^{-1}$  de ácido antranílico em meio de uma solução de ITS  $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$  e PBS  $5,0 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ .

A solução de ácido 2-aminobenzoico (Figura 21) apresentou espectro de absorção e emissão similar a da solução resultante da reação do ozônio com o ITS.

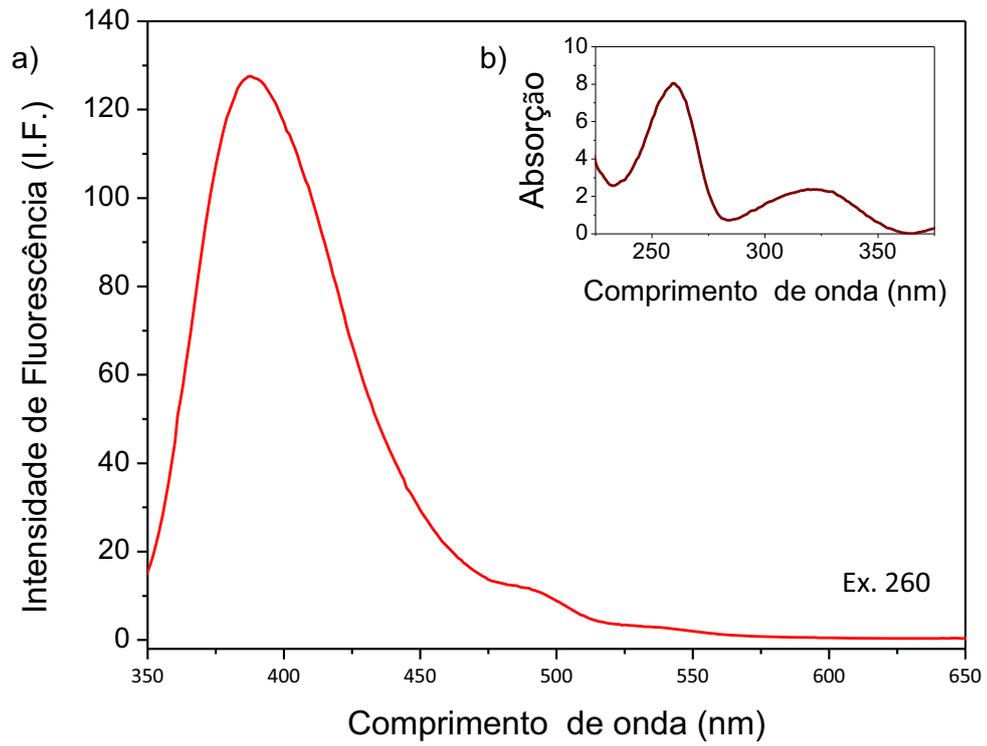


Figura 21. Espectro de (a) emissão e (b) excitação (Ex. 260 nm) do ácido 2-aminobenzóico.

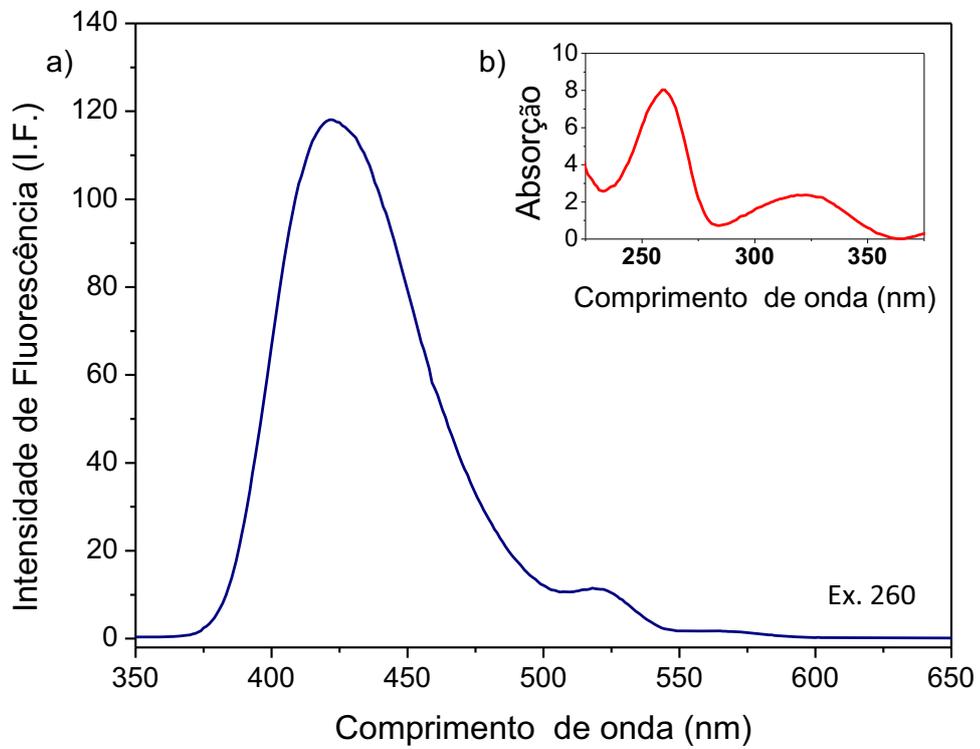


Figura 22. Espectro de (a) emissão e (b) excitação (Ex. 260 nm) do produto da reação entre ITS e ozônio.

O espectro apresentado na Figura 22 é um forte indicio que ligado ao luminóforo (ácido 2-aminobenzóico (Figura 23)) estão ligados grupos eletroatraentes que por efeitos de indução e ressonância atraem os elétrons do anel aromático diminuindo a energia de total conjugação e como conseqüência apresenta um espectro de emissão um pouco deslocado para direita em relação ao espectro de emissão da Figura 21. Isto sugere que a fluorescência observada na solução resultante da reação entre ozônio e ITS poderá ser devido a formação dos ácidos 5-sulfano 2-aminobenzóico e 2,5-dissulfano 2-aminobenzóico (Figura 24).

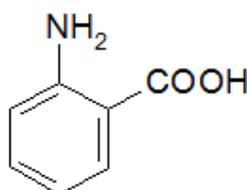


Figura 23. Formula estrutural plana do ácido 2-aminobenzóico (AAB) (luminóforo).

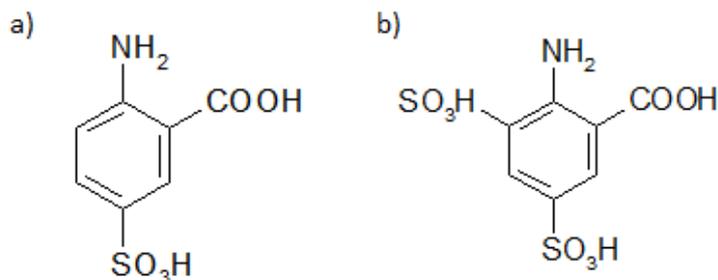


Figura 24. Formula estrutural plana das moléculas de ácidos sulfanoaminobenzóicos (ASAB's) (a) ácido 5-sulfano 2-aminobenzóico e (b) 2,5-dissulfano 2-aminobenzóico. No luminóforo estão ligados grupos sulfano que diminuem a energia de conjugação do anel aromático modificando ligeiramente o espectro de fluorescência apresentado pela molécula de AAB.

Determinada a possível molécula formada pela reação ITS e ozônio, passou-se a estudar melhor as condições da reação. A eficiência da reação foi avaliada nos pH 2,2, 3,5 e 5,0 (Figura 25). Os estudos mostraram que em pH mais ácido (2,2) a eficiência da reação é maior pois os sinais obtidos tanto para os métodos colorimétrico como fluorimétricos são

máximos. À medida que ocorre aumento do pH da solução ocorre o decréscimo do sinal obtido para uma mesma concentração de ozônio, caracterizando desta forma perda de eficiência da reação.

Esse comportamento observado é devido ao ozônio ser dissolvido mais facilmente em meio ácido aumentando a quantidade disponível desta molécula para reagir com o corante ITS. Outro motivo da causa da eficiência da reação se deve também ao fato da molécula de índigo possuir grupos sulfano que em meio ácido são protonados aumentando as interações do tipo ligações de hidrogênio com a água e como consequência ocorre um aumento de sua solubilidade e estabilidade, facilitando desta forma a sua reação com o ozônio.

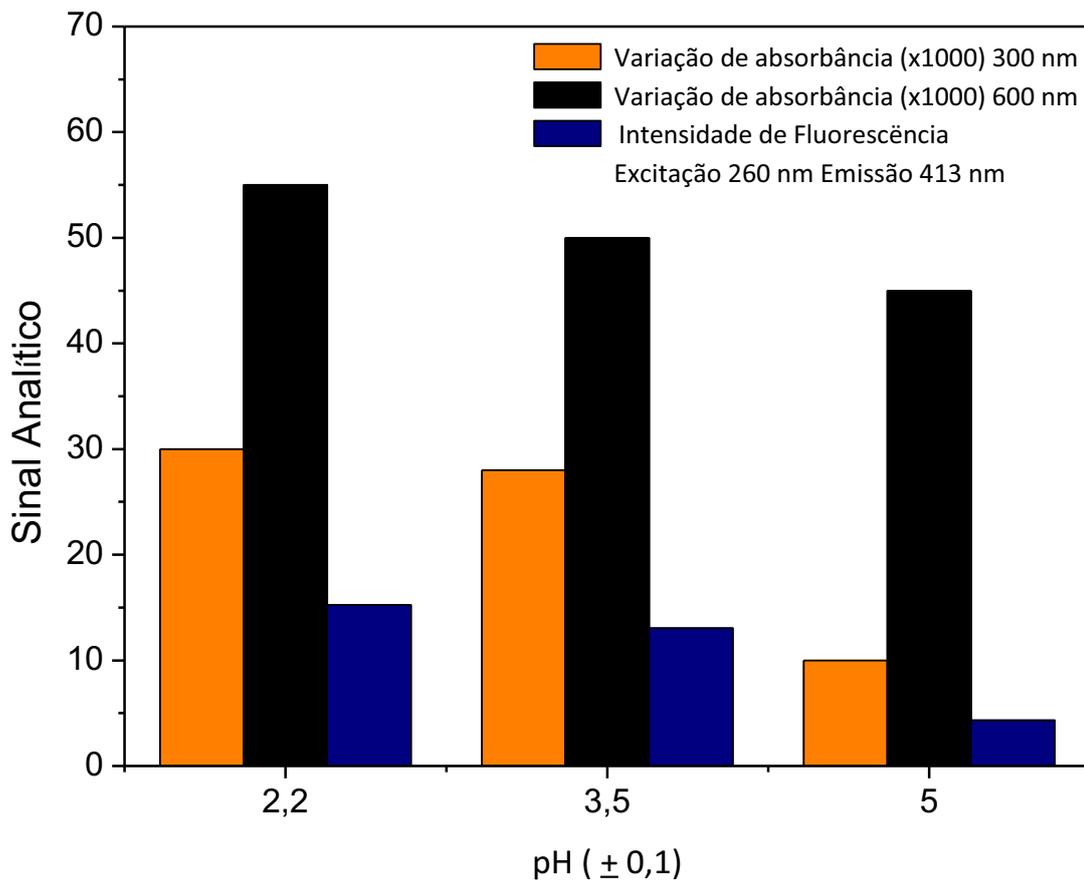


Figura 25. Avaliação da eficiência da reação entre ITS e ozônio pelas medidas de sinal analítico da variação de absorvância (300 e 600nm) e fluorescência ( $\lambda_{Ex}$ . 260 nm e  $\lambda_{Ex}$ . 413 nm) produzido por uma solução de ozônio  $2,0 \mu\text{molL}^{-1}$  em diferentes pH's (a variação de absorvância foi multiplicada por 1000 para comparação com o sinal de fluorescência).

Para buscar a melhor concentração da solução de ITS como reagente para determinar ozônio residual em água foram feitos testes com diferentes concentrações de ITS na reação com uma concentração de ozônio constante de  $2,0 \mu\text{molL}^{-1}$  (Figura 26). Os ensaios mostraram que para concentrações do corante na ordem de  $1,0 \times 10^{-3}$  e  $1,0 \times 10^{-2} \text{ molL}^{-1}$ , ocorre uma diminuição nos sinais de fluorescência. Isso se deve ao fato do corante estar em uma concentração elevada em relação às moléculas fluorescentes no meio, pois a quantidade de núcleos que absorvem luz estão em maior quantidade e como resultado ocorrerá uma absorção de luz atenuando o feixe responsável por provocar a luminescência nas moléculas da amostra. Assim em concentrações mais elevadas do corante ocorrerá uma supressão do sinal de fluorescência devido à absorção da luz de excitação e emissão pelas moléculas de ITS presentes no meio.

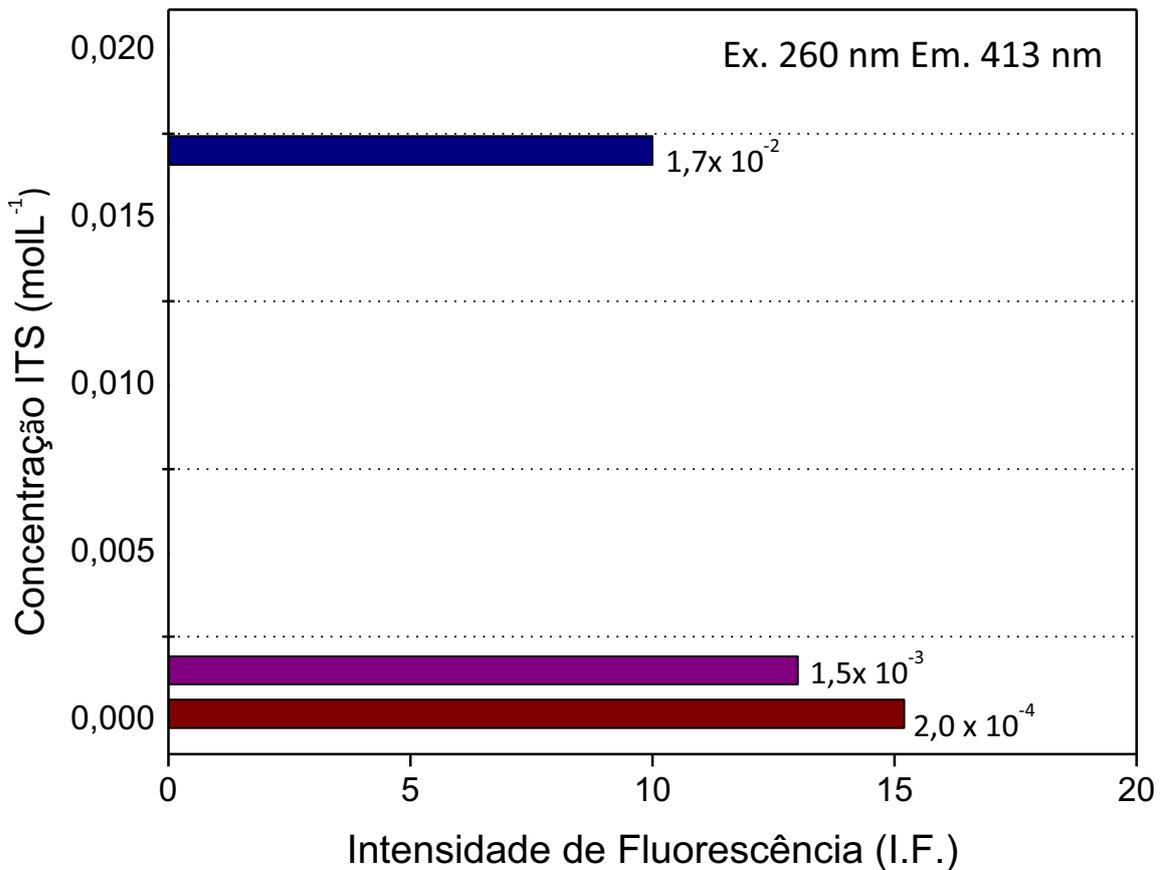


Figura 26. Variação da luminescência do produto de reação para diferentes concentrações de ITS.

Outro parâmetro importante estudado foi a estabilidade do produto de reação entre ITS e Ozônio. Neste caso utilizou-se em uma solução com ITS  $2 \times 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$  contendo  $0,6 \mu\text{molL}^{-1}$  de ozônio residual em água. Essa concentração de ozônio residual foi obtida utilizando um ozonizador de água comercial Ricozon Arujá®, e a concentração de ozônio determinada pelo método colorimétrico do ITS, que é o método reconhecido e recomendado pelo manual de análises de águas Standard Methods (CLESCERI et al; 1989).

Verificou-se que a intensidade de fluorescência da solução é estável por cerca de 70 minutos, permitindo que a medida de fluorescência seja feita durante este espaço de tempo após a reação (Figura 27).

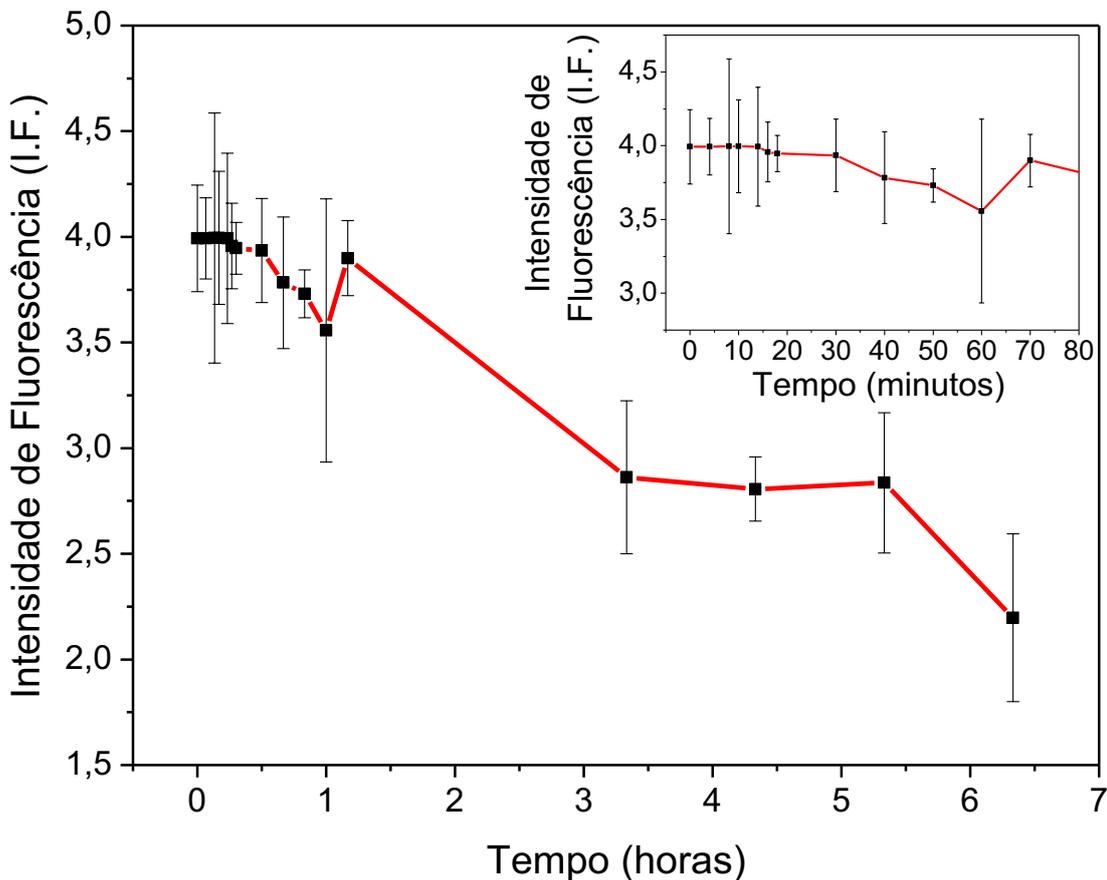


Figura 27. Variação da luminescência do produto da reação entre Ozônio e ITS em função do tempo pós reação (n =16).

#### 4.1.2. Medidas de ozônio residual

Para avaliar se a reação entre o ITS e o ozônio produz de forma quantitativa as moléculas responsáveis pela luminescência observada para o produto da reação foram preparadas soluções contendo concentrações de ozônio residual entre zero e  $7,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$ .

O procedimento seguido para determinação das concentrações de ozônio nas amostras água seguiu o procedimento descrito no por CLESCERI et al; 1989. A concentração de ozônio determinada, seguindo este procedimento, foi estabelecida como padrão de referência. Estas soluções foram utilizadas para associar o sinal analítico de fluorescência obtido com as concentrações de ozônio de cada solução. Neste procedimento experimental a mesma solução utilizada para quantificar o ozônio pelo método colorimétrico era na seqüência utilizado para a medida de luminescência da amostra com excitação em 260 nm e emissão em 413 nm. Com esse procedimento foi construída uma curva analítica utilizando a concentração de referência de ozônio e o sinal analítico de fluorescência medido no produto da reação (Figura 28).

Para este procedimento, cada amostra foi determinada usando 3 diferentes alíquotas da mesma solução e fazendo-se medidas de absorbância e fluorescência. Os resultado mostram que existe uma correlação linear para concentrações de ozônio residual entre zero e  $5,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$  ( $0,26 \text{ mg.L}^{-1}$ ).

A Equação 3, apresenta o sinal analítico de fluorescência I.F. em relação a concentração de ozônio residual  $[\text{O}_3]$  em  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ :

$$\begin{aligned} I.F. &= 16,574(\pm 0,841)[\text{O}_3] + 0,822 (\pm 0.036) \\ R &= 0.98473 \quad (\text{Equação 3}) \end{aligned}$$

Onde  $[\text{O}_3]$  é concentração de ozônio residual é em  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  e I.F. intensidade de fluorescência. Para concentrações variando entre zero e  $7,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$  o ajuste dos pontos da curva é melhor representado por uma equação quadrática (Equação 4):

$$I.F. = -1,577(\pm 0,057)[O_3]^2 + 20,403(\pm 0,315)[O_3] + 0,823(\pm 0,008)$$

$$R = 0,9939 \quad (\text{Equação 4})$$

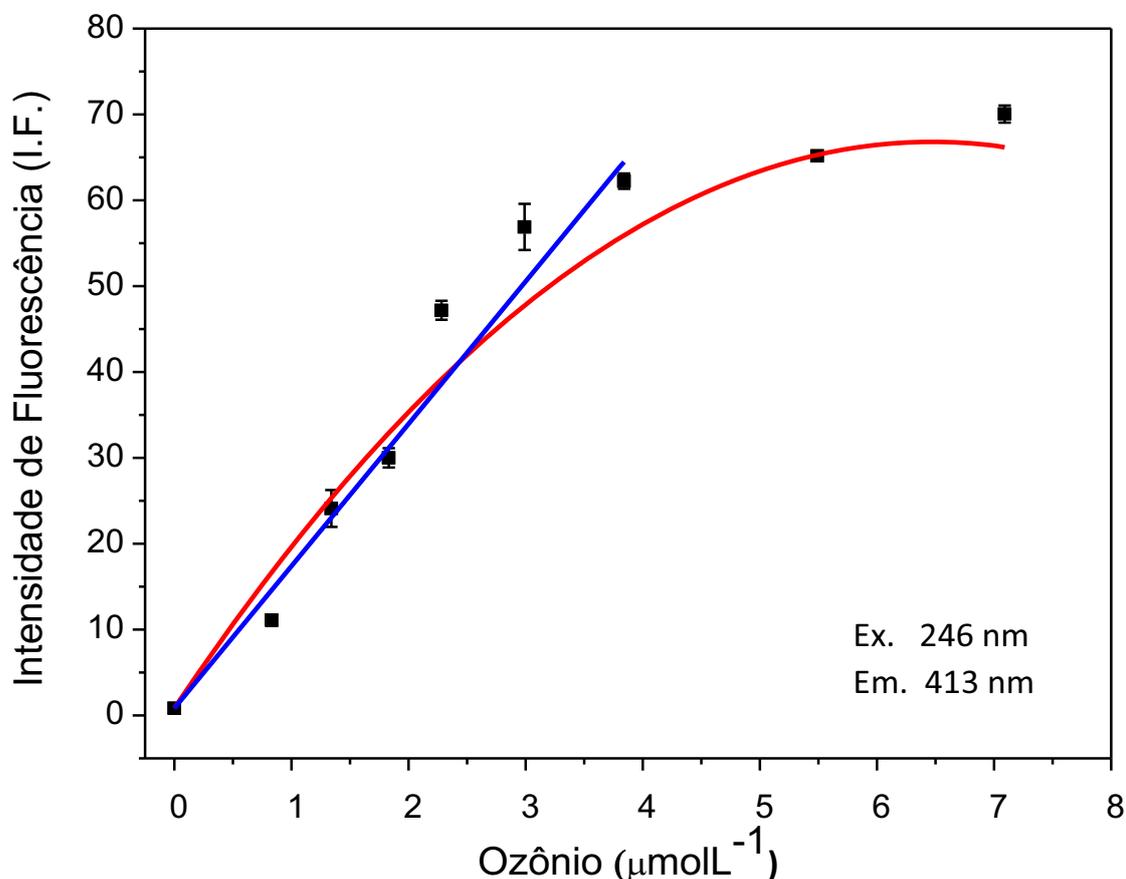


Figura 28. Curva Analítica obtida para o método proposto utilizando ITS e medida de fluorescência do produto de reação. A concentração de ozônio varia de zero a  $7 \mu\text{mol.L}^{-1}$ .

#### 4.1.3. Estudos Quantitativos sobre a formação de moléculas fluorescentes

Para buscar conhecer a quantidade de produto fluorescente formado na reação entre ITS e ozônio o seguinte procedimento foi adotado, conhecendo-se que a molécula luminescente possui o mesmo grupo luminóforo da AAB, foram preparadas amostras de soluções de concentrações conhecidas de AAB. Na seqüência foi realizada a medida do sinal de fluorescência destas e construída uma curva analítica (Figura 29). A Equação 5 é a que melhor representa o ajuste linear dos pontos obtidos.

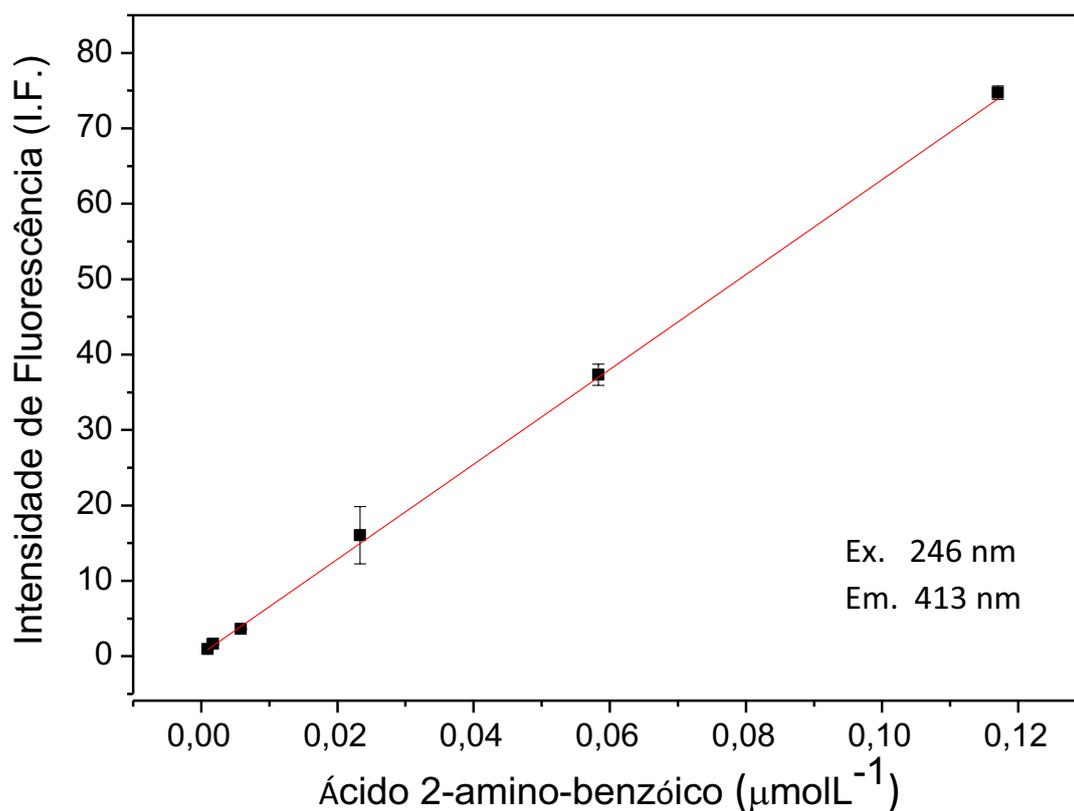


Figura 29. Curva Analítica para diferentes concentrações AAB em meio de ITS  $2 \times 10^{-4} \text{molL}^{-1}$ .

$$I.F. = 629440,00(\pm 425,70)[AAB] + 0,2656(\pm 0,0252)$$

$$R=0.9999 \quad (\text{Equação 5})$$

Onde [AAB] é concentração de ácido 2-aminobenzóico em  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  e I.F. intensidade de fluorescência. Comparando as curvas analíticas de quantificação de ozônio (Figura 28) e do AAB (Figura 29) observa-se um desvio quadrático na luminescência para concentrações superiores de ozônio. Este comportamento não foi observado para soluções de mesma intensidade do AAB. Este fato descarta a hipótese de supressão da luminescência por efeito de concentração da molécula fluorescente gerada por auto-absorção da emissão entre elas. Provavelmente o desvio da linearidade observado é resultado da formação de radicais instáveis peróxido durante a reação, diminuindo gradativamente a formação do produto fluorescente. Um aumento da concentração dos ASAB's representa uma maior probabilidade de choques entre as moléculas diminuindo a intensidade

da fluorescência, pois o peróxido provavelmente está sendo consumido impedindo o rearranjo deste radical para a formação da molécula luminescente. Este mecanismo de rearranjo está representado nas Figuras 20 e 30.

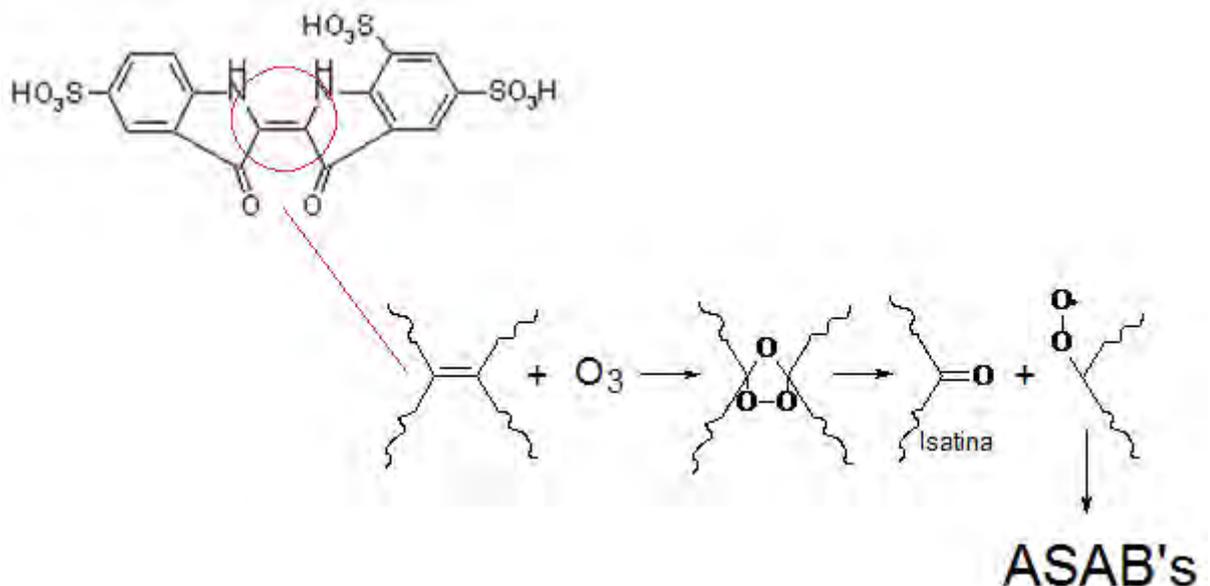


Figura 30. Representação da reação entre a insaturação do corante índigo com ozônio e a formação de radicais peróxido que podem dar origem as substancias fluorescentes (ASAB's).

Os experimentos para obtenção da curva analítica para a reação entre quantidades conhecidas de ozônio e ITS (Figura 28) e a curva analítica para o sinal de fluorescência em função da quantidade de AAB (Figura 29) permitem conhecer a razão entre a quantidade de moléculas fluorescentes formadas após reação e a quantidade corante ITS degradada pela molécula de ozônio.

Isto é possível associando-se a cada sinal de fluorescência obtido na reação entre ITS e o ozônio, o correspondente sinal de fluorescência do AAB, e assim obter a quantidade de moléculas AAB associadas ao sinal medido (Tabela 2).

A razão obtida é de 1:40. Isto significa que para cada 40 moléculas de ITS que reagem apenas uma molécula que possui o grupo luminescente do AAB é formada. Apesar desta pequena proporção do produto ser formada,

os repetidos experimentos mostraram que a reação é quantitativa e o sinal analítico de fluorescência é favorável para medidas quantitativas de ozônio.

Tabela 2. Correlação da concentração das moléculas fluorescentes formadas e da concentração de índigo degradada.

	Índigo degradado ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	Molécula fluorescente formada ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )*	Razão de número de mol entre as moléculas formadas
Ponto 1	0,831 $\pm$ 0,030	0,0172 $\pm$ 0,003	48,33
Ponto 2	1,35 $\pm$ 0,050	0,0379 $\pm$ 0,004	35,47
Ponto 3	1,83 $\pm$ 0,067	0,0472 $\pm$ 0,017	38,63
Ponto 4	2,28 $\pm$ 0,050	0,0745 $\pm$ 0,003	30,57
Ponto 5	2,99 $\pm$ 0,058	0,0899 $\pm$ 0,012	33,25
Ponto 6	3,84 $\pm$ 0,042	0,0984 $\pm$ 0,008	38,99
Ponto 7	5,49 $\pm$ 0,067	0,103 $\pm$ 0,010	53,19
			39,78 $\pm$ 8,17

\* Valor de concentração estimado utilizando como referência o ácido antranílico (AAB) que responde de maneira similar ao sinal de fluorescência.

#### 4.1.4. Considerações sobre o método proposto

O limite de detecção do método considerando 3 vezes o desvio do sinal do branco sobre o coeficiente angular, é de  $0,014 \mu\text{mol.L}^{-1}$  ( $0.92 \text{ ng.L}^{-1}$ ) em concentração de ozônio. Outros parâmetros analíticos da determinação do ozônio residual por fluorescência foram comparados com o método sugerido pelo Standard Methods (CLESCERI et al; 1989). Também foi verificada a repetibilidade do método realizando 50 medidas com concentrações fixas de ozônio residual ( $3,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) e 40 medidas com diferentes concentrações do analito (1,2; 2,4; 5,2 e  $8,2 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) (10 medidas em triplicata para cada concentração). Os resultados são apresentados na Tabela 3. O método fluorimétrico proposto apresentou uma sensibilidade

1000 vezes maior e um limite de detecção 100 vezes menor em relação ao método colorimétrico sugerido para a determinação de ozônio utilizando o corante ITS.

Tabela 3. Características principais do método (comparação com o método padrão)

Características do método	Método Fluorimétrico	Método Colorimétrico
Limite de detecção (3*sm/m)	0.014 $\mu\text{molL}^{-1}$	0,2 $\mu\text{molL}^{-1}$
Sensibilidade do método	1,67x10 <sup>7</sup>	1,99x10 <sup>4</sup>
Precisão	3,66 %	-
Exatidão	87,2 – 112,8 %	-
Tempo de preparo e leitura por amostra*	3 minutos	3 minutos
t (2,78) 95%	0,19	-
F (19,0) 95%	10,59	-

Tempo estimado para a reação entre índigo e ozônio e as leituras de absorbância e fluorescência da amostra.

#### 4.1.5. Teste de interferentes

Os possíveis interferentes testado para o método aqui apresentado são os mesmos descritos para o método desenvolvido por Bader e Hoigne 1981.

Os resultados dos experimentos para os interferentes são apresentados na Tabela 4 e dentro da variação esperada para o método não mostraram interferência na solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, o sinal analítico de fluorescência permaneceu inalterado. O peróxido promove a oxidação da molécula de ITS, porém as moléculas remanescentes do corante ainda terão capacidade de reagir e formar espécies fluorescentes, assim o sinal gerado não sofrerá influencia a não ser que a quantidade de peróxido oxide todas as moléculas de corante em uma quantidade que não existam moléculas de ITS

para reagir quantitativamente com o ozônio presente na amostra. Esta é mais uma vantagem do método fluorimétrico em relação ao ensaio colorimétrico.

Tabela 4. Variação da intensidade do sinal analítico de fluorescência (excitação 260 nm, emissão 413 nm) comparado com a adição dos possíveis interferentes do método (média de 3 leituras).

Concentração (interferente : ozônio)	Sinal Analítico Ex.260 nm, Em 413 nm		
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Mn(II)	OCI <sup>-</sup>
Sem interferente		5,078 ± 0,141	
1 : 1	5,084 ± 0,145	4,879 ± 0,193	5,208 ± 0,198
2 : 1	5,121 ± 0,011	4,668 ± 0,138	5,513 ± 0,287
3 : 1	5,115 ± 0,105	4,496 ± 0,055	5,392 ± 0,302

O Manganês II apresentou interferência negativa no sinal analítico de cerca de 12% para razão de concentração de 3 Mn (II) : 1 O<sub>3</sub>. Essa interferência provavelmente aconteceu porque o ozônio reage com os íons Manganês II (LEE, 1999) (Equação 6):



O Mn(II) também possui a propriedade de interagir com ligações duplas de C=C, formando complexos que não sofrem reação de ozonólise (CLAYSEN, 2008), tendo como consequência a diminuição da quantidade da espécie fluorescente formada, porque o manganês poderá ocupar a ligação dupla do corante impedindo a reação com a molécula de ozônio.

O íon OCI<sup>-</sup> apresentou interferência positiva de cerca de 9 % e com um aumento significativo do desvio padrão das medidas. O íon OCI<sup>-</sup> possui alto poder oxidante e também reage com ozônio (Equação 7)(BADER, 1981):



Nessa reação ocorre a formação de cloreto que interfere na medida de fluorescência, alterando de maneira positiva no sinal analítico. O cloreto

formado não é luminescente, mais possui a capacidade de absorver luz devido a sua eletronegatividade, e transferir a energia para as moléculas do meio, nessa transferência de energia dificulta processo de emissão atribuindo uma alteração no sinal analítico da amostra.

## **4.2. Estudo da viabilidade do método analítico fluorimétrico em uma gota de solução de ITS para determinação de ozônio em ar**

### **4.2.1. Reavaliação sobre o comportamento do produto luminescente reação entre ITS e O<sub>3</sub>**

Neste experimento 10 mL de solução de ITS contendo  $2 \times 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$  (reagente II) que foi introduzido em um amostrador impinger e borbulhando ozônio gerado por um ozonizador de ar gasozon® com vazão constante de 400 mL.min<sup>-1</sup>. Os sinais analíticos de fluorescência e absorvância da solução foram medidos para diferentes tempos de amostragem de ozônio em cada solução submetida ao ensaio.

A quantidade do produto luminescente da reação entre ITS e ozônio aumenta de forma quantitativa em relação à quantidade de ozônio residual que é colocada para reagir com a solução de ITS. Utilizando o método colorimétrico foi possível estabelecer as quantidades de ozônio geradas nas diferentes alíquotas amostradas (Figura 31).

Os resultados mostraram que os picos em 310 nm e 600 nm decrescem com o aumento quantidade de ozônio que reage com a solução de ITS, enquanto que os picos em 260 e 220 sobrem um aumento em relação a quantidade de ozônio adicionado.

Este comportamento observado em 310 e 600 nm é devido à degradação do corante Índigo na presença de ozônio, como resultado a concentração do corante descesse em função do aumento da quantidade de ozônio em solução caracterizando a perda do grupo cromóforo. Com a degradação ocorre a formação de moléculas de Isatina sulfonadas e ácidos sulfanos amino benzóicos proviidas de anéis aromáticos que absorvem na região do ultravioleta, caracterizando desta forma um acréscimo da absorção em 260 e 220 nm em função do acréscimo de ozônio ao meio.

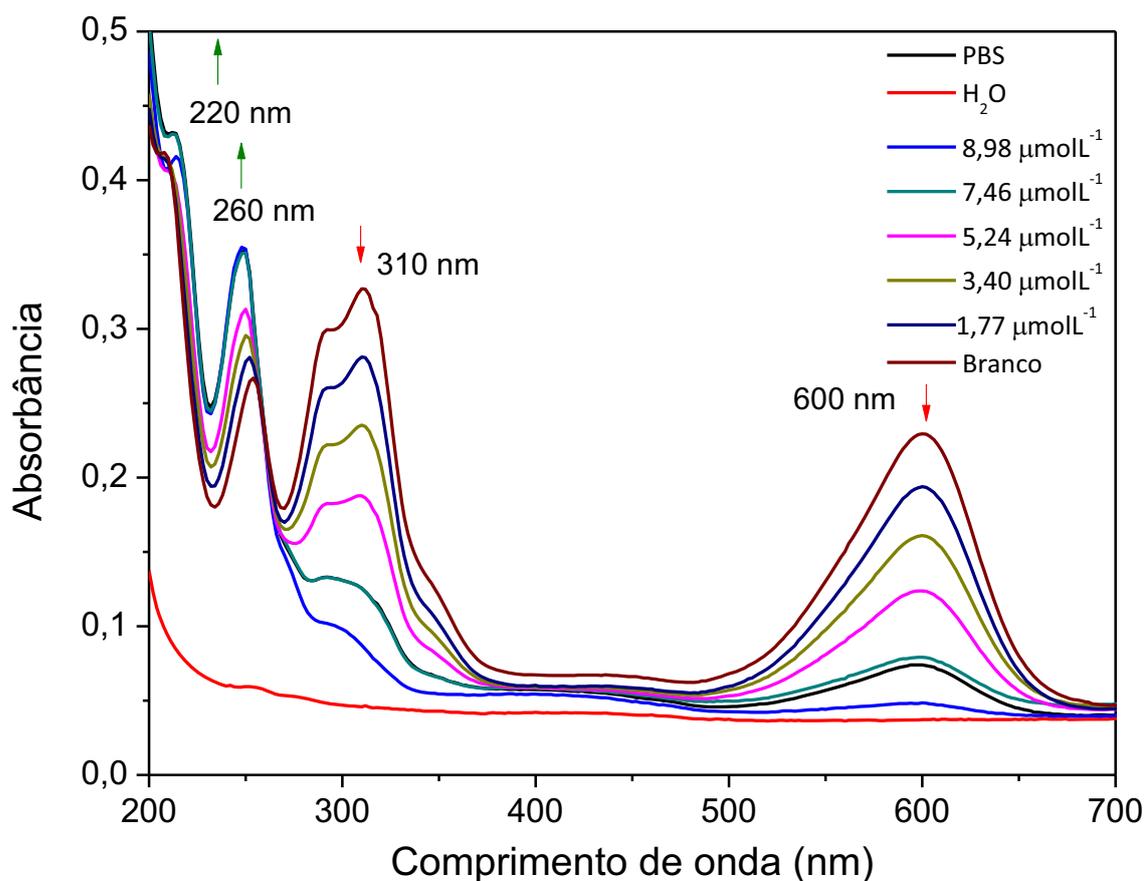


Figura 31. Espectro de absorção para as diferentes concentrações de ozônio residual geradas

Utilizando uma alíquota de uma solução que reagiu com ozônio é possível fazer um estudo fluorimétrico sobre a intensidade do sinal de emissão em função dos diferentes máximos de excitação. O resultado do experimento é apresentado na Figura 32.

Uma análise qualitativa para os espectros de emissão e excitação da reação do produto da reação entre ITS e ozônio mostra que as substâncias luminescentes possuem absorção máxima nos comprimentos de onda de 220, 260 e 340 nm (Figura 32). Considerando-se que existam diferentes tipos de fontes para gerar luz de emissão, entre os comprimentos de onda observados para excitação podemos gerar essas faixas de comprimentos de onda por lâmpadas de deutério que emitem luz no de 220 à 300 nm. Já para os comprimentos de onda de 340 nm é possível o uso de led's como fonte de luz de excitação. A vantagem do uso dos led's é que

estes são excelentes para a construção de equipamentos de baixo consumo de energia para medidas em campo, além de serem de custo reduzido e grande tempo médio de vida.

Como não havia disponível led's de 340 nm e os processos de importação são longos dentro da universidade, optamos em fazer os experimentos iniciais utilizando um laser He-Cd gerando luz em 325 nm. Esta fonte de luz foi então utilizada para promover a excitação de uma gota de solução de ITS.

Após o estudo de excitação e emissão para uma alíquota de uma solução contendo o produto de reação entre ITS e ozônio, repetimos o mesmo experimento utilizando um mesmo volume de solução de ITS que reagiu com diferentes quantidades de ozônio. Os resultados dos experimentos de excitação são representados na Figura 33. Estes espectros de excitação foram obtidos no fluorímetro e observa-se que um aumento de intensidade proporcional a quantidade de ozônio que passou pela solução de corante (Figura 34).

Para as intensidades de absorção em função do acréscimo da concentração de ozônio em 220 nm (Equação 8) e 260 nm (Equação 9) observa-se um aumento quadrático em função das concentrações de ozônio. Em 337 nm (Equação 10) observa-se que os sinais apresentaram uma correção linear.

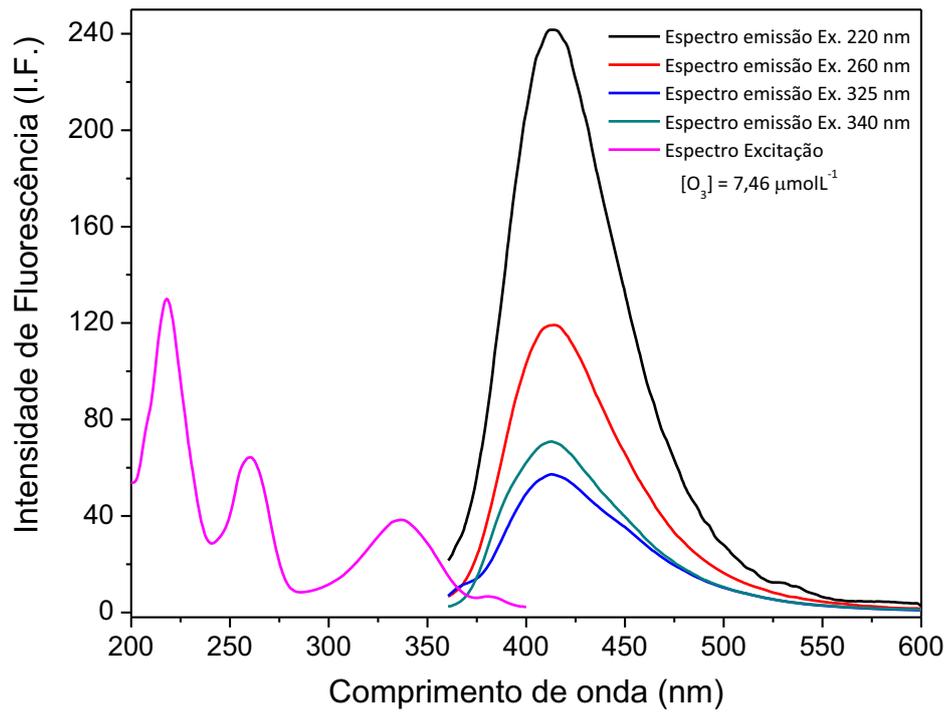


Figura 32. Espectros de emissão e excitação para o produto de reação entre ITS e ozônio.

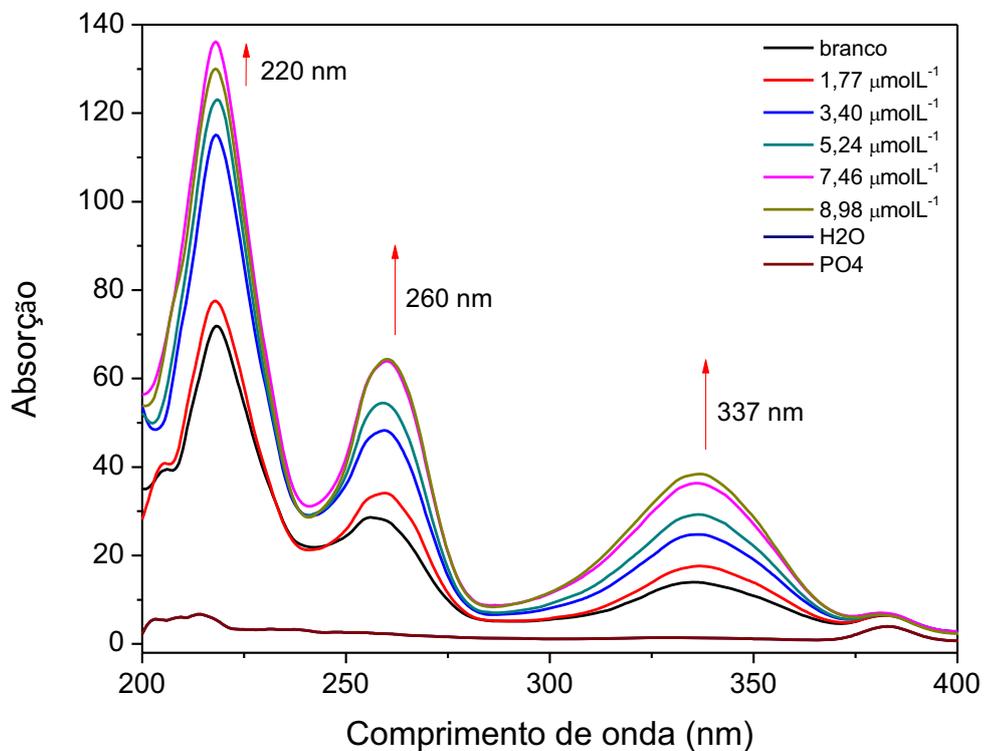


Figura 33. Espectros de excitação obtidos para diferentes quantidades de ozônio, medidos após a reação entre ITS e ozônio.

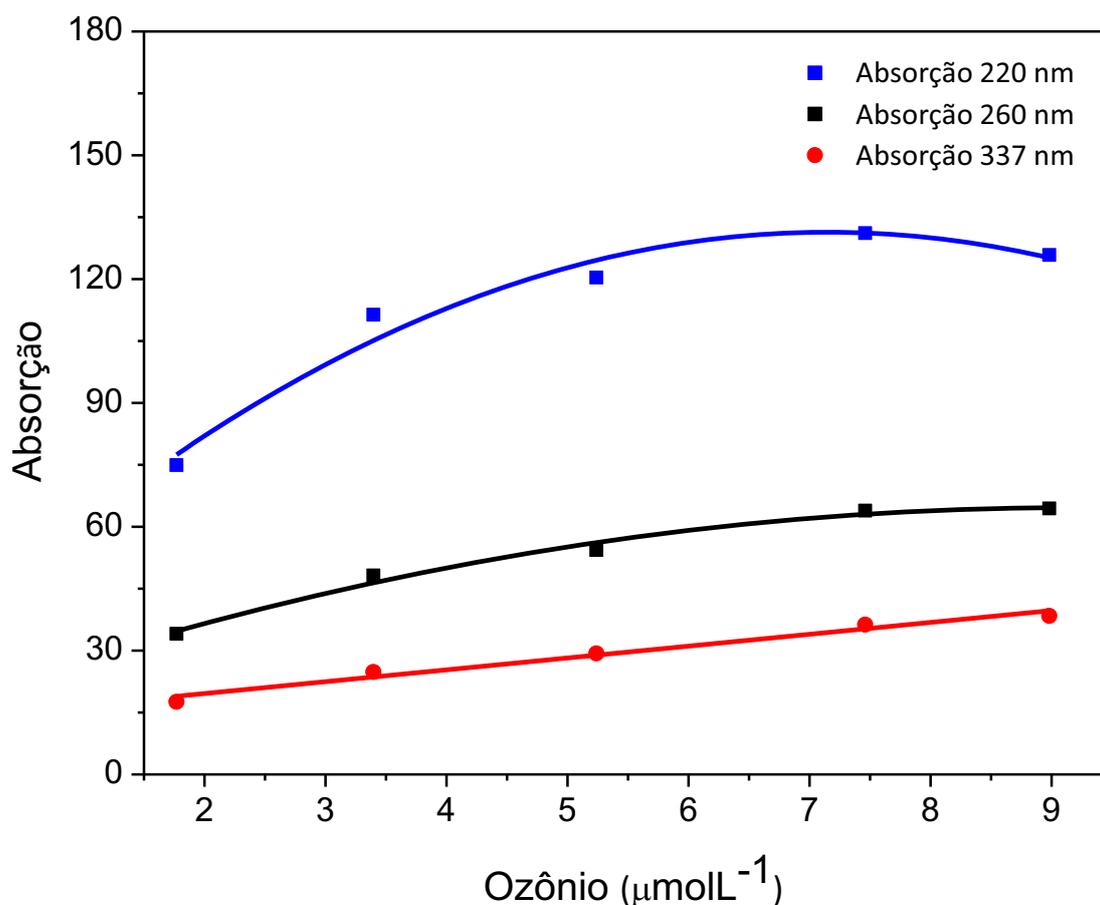


Figura 34. Curvas analíticas com valores de intensidade de absorção nos comprimentos de onda de excitação de 260 nm e 337 nm exibida pela degradação do corante ITS.

$$ABSE_{220 \text{ nm}} = - 1,862 (\pm 0,480)[O_3]^2 + 26,628 (\pm 5,270)[O_3] + 36,163 (\pm 14,139)$$

$$R = 0,9752 \quad (\text{Equação 8})$$

$$ABSE_{260 \text{ nm}} = - 5,455 (\pm 0,168)[O_3]^2 + 10,011 (\pm 1,854)[O_3] + 18,692 (\pm 4,270)$$

$$R = 0,9752 \quad (\text{Equação 9})$$

$$ABSE_{340 \text{ nm}} = 2,879 (\pm 0,237)[O_3] + 13,814 (\pm 1,417)$$

$$R = 0,9733 \quad (\text{Equação 10})$$

Onde ABSE é a intensidade de luz absorvida pelas moléculas formadas após a reação entre ITS e ozônio.

Considerando que existam diferentes comprimentos de onda que podem excitar a molécula fluorescente, formada como produto da reação entre ITS e ozônio, foram feitas medidas de emissão utilizando os comprimentos de onda máximos de excitação. Neste ensaio é possível verificar como o produto luminescente da reação comporta-se em diferentes comprimentos de onda de excitação, isto porque desta forma será possível escolher diferentes fontes de excitação como led's, lasers e lâmpadas de U.V. conhecendo assim a intensidade do sinal analítico para cada uma das fontes radiativas.

Os espectros apresentados nas Figuras 35, 36, 37 e 38 correspondem aos espectros de emissão obtidos utilizando os comprimentos de onda de excitação de 220, 260, 325 e 340 nm respectivamente.

Como é possível observar o sinal analítico de emissão máximo para uma mesma solução excitada em 220 nm, para uma excitação em 260 nm é 50% menor, 325 nm 80% menor e em 340 nm 71% menor.

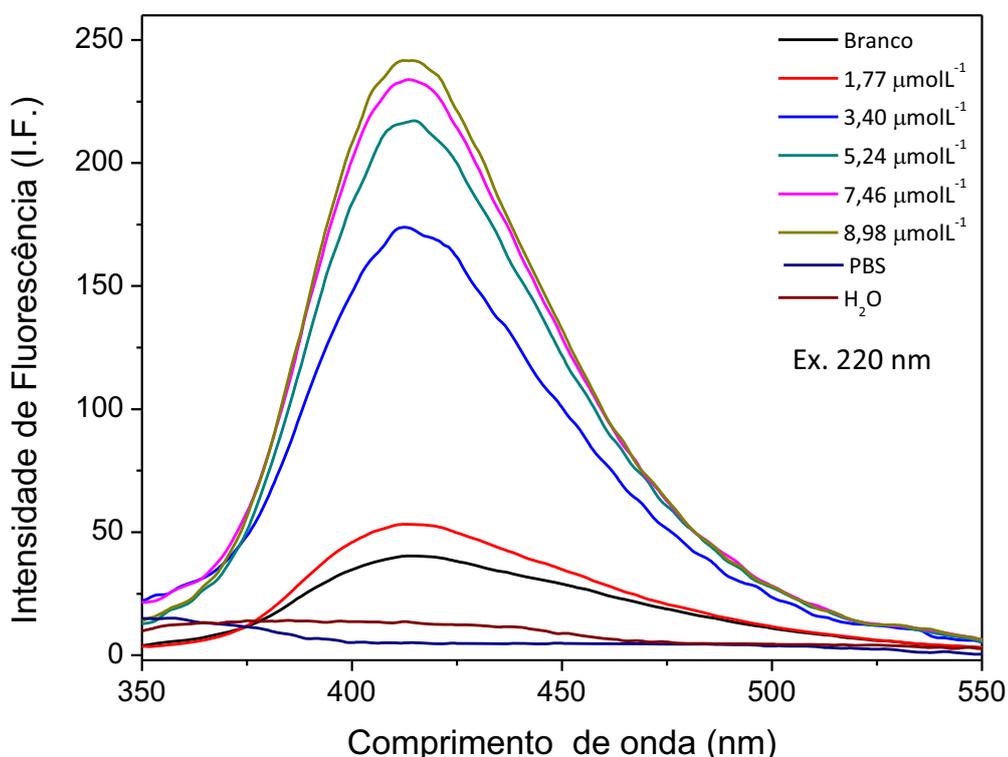


Figura 35. Espectro de emissão para diferentes quantidades de ozônio, medidos após a reação entre ITS e ozônio ( $\lambda\text{Ex. 220 nm}$ )

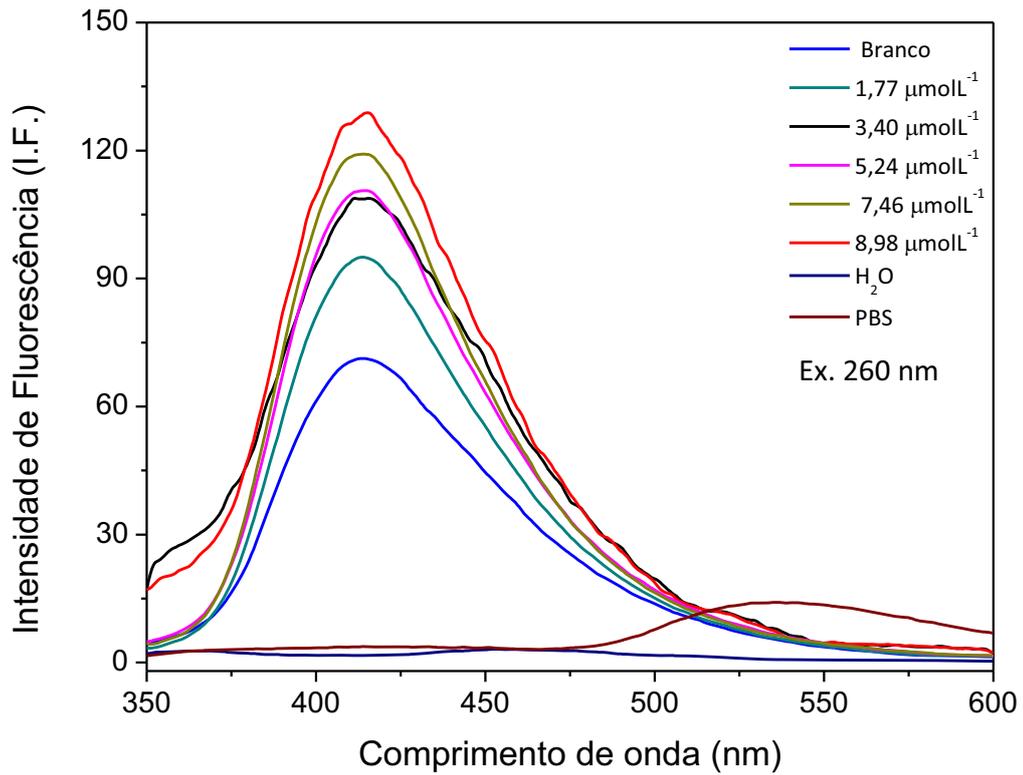


Figura 36. Espectro de emissão para diferentes quantidades de ozônio, medidos após a reação entre ITS e ozônio ( $\lambda\text{Ex. } 260 \text{ nm}$ )

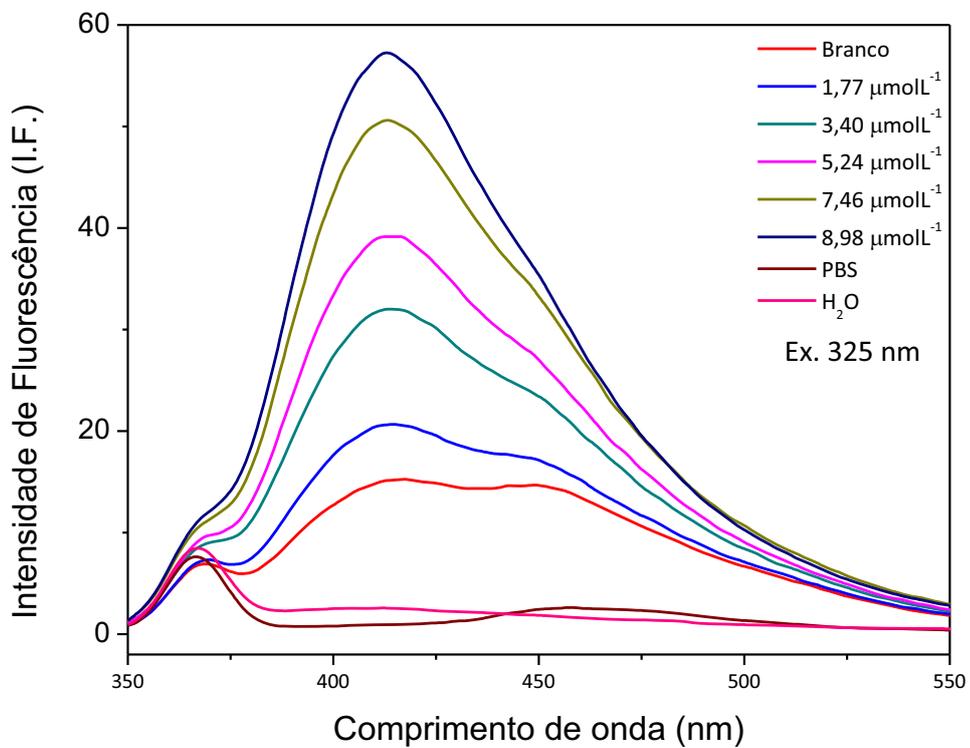


Figura 37. Espectro de emissão para diferentes quantidades de ozônio, medidos após a reação entre ITS e ozônio ( $\lambda\text{Ex. } 325 \text{ nm}$ ).

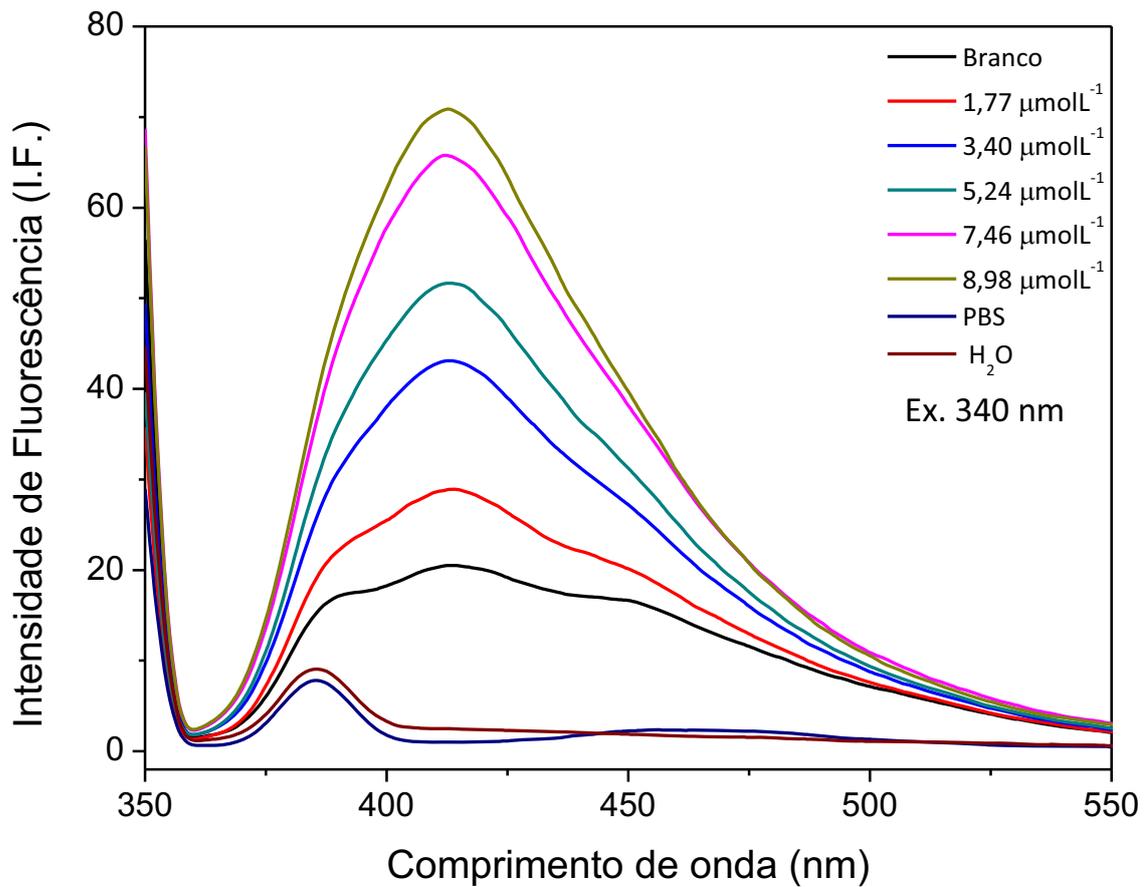


Figura 38. Espectro de emissão para diferentes quantidades de ozônio, medidos após a reação entre ITS e ozônio ( $\lambda\text{Ex. } 340 \text{ nm}$ ).

Considerando que o máximo da intensidade de emissão ocorreu no comprimento de onda de 413 nm, estes valores foram utilizados para a construção de curvas analíticas para as diferentes quantidades de ozônio que reagem com a solução de ITS ( $2 \times 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$ ). Para comparação as curvas foram traçadas nos diferentes comprimentos de onda excitação, com uma emissão fixa de 413 nm para as diferentes concentrações de ozônio em água. Os valores de variação de absorvância também estão apresentados no gráfico da Figura 39.

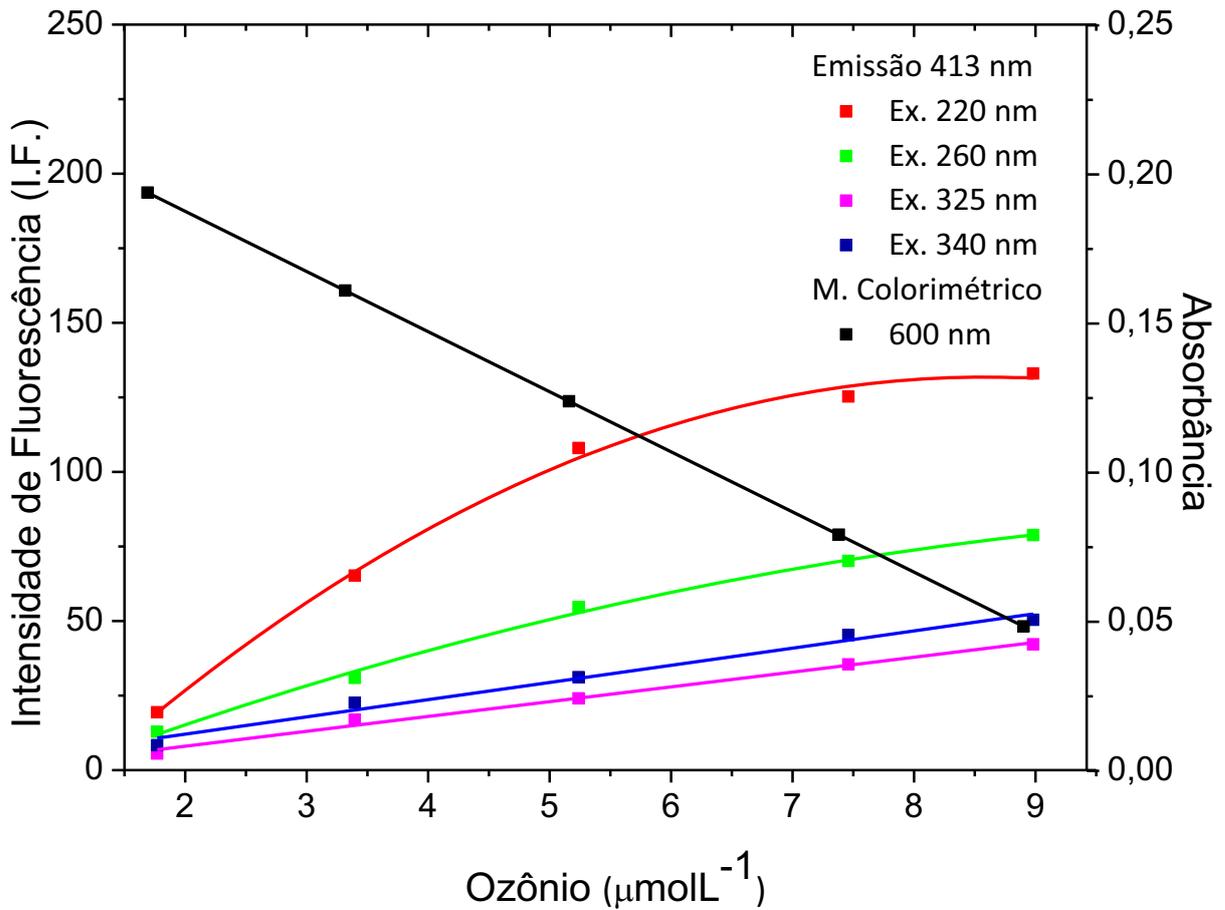


Figura 39. Curvas analíticas com valores de intensidade de fluorescência medidas em 413 nm com excitações em 220, 260, 325 e 340 nm. Comparação com a variação de absorbância exibida pela degradação do corante ITS em 600 nm.

Para as intensidade de fluorescência com excitações em 220 nm (Equação 11) e também em 260 nm (Equação 12) observa-se que os sinais apresentaram uma correlação quadrática com a concentração de ozônio apresentaram uma correção quadrática.

$$I.F. = -2,419(\pm 0,3169)[O_3]^2 + 41,571(\pm 3,4797)[O_3] - 46,5708(\pm 8,0142)$$

$$R = 0,9939 \quad (\text{Equação 11})$$

$$I.F. = -0,667(\pm 0,1826)[O_3]^2 + 16,4474(\pm 2,0047)[O_3] - 15,458(\pm 4,6172)$$

$$R = 0,9938 \quad (\text{Equação 12})$$

As intensidades de fluorescência com excitações em 325 nm (Equação 13) e inclusive em 340 nm (Equação 14) apresentaram uma correção linear com a concentração de ozônio colocada para reagir com ITS.

$$I.F. = 4,9659(\pm 0,2414)[O_3] - 1,8683(\pm 1,4422)$$

$$R = 0,9906 \quad (\text{Equação 13})$$

$$I.F. = 5,7627(\pm 0,4231)[O_3] + 0,5773(\pm 2,5278)$$

$$R = 0,9800 \quad (\text{Equação 14})$$

Para as medidas de absorvância obtidas pelo método colorimétrico ocorre a degradação do corante em função da concentração de ozônio que quebra a dupla ligação carbono carbono (C=C), existente na molécula de ITS, observa-se uma diminuição da absorvância em função do acréscimo da quantidade de ozônio exibindo uma correlação linear como mostra a Equação 15.

$$ABS = - 0,020 (\pm 0,001)[O_3] + 0,229 (\pm 0,001)$$

$$R = 0,9999 \quad (\text{Equação 15})$$

Estes conjuntos de ensaios prévios exploratórios realizados confirmaram várias propriedades para a reação entre ITS e ozônio como a repetibilidade da reação bem como os comprimentos de onda máximos de excitação e emissão das soluções testadas anteriormente para a quantificação de ozônio residual em água. Outra informação importante obtida deste experimento é que o produto da reação poderá ser excitado e quantificado em diferentes comprimentos de onda, isso amplia a gama de fontes radiativas, em especial leds, que poderão ser usados na construção de futuros analisadores de ozônio baseados no método fluorimétrico.

Nesta etapa do trabalho, um dos objetivos principais foi avaliar o potencial do uso de gotas de solução de corante ITS como meio de coleta de ozônio, em fase gasosa, em uma câmara de geometria constante e reproduzível para ser utilizada em medidas de intensidade de fluorescência da reação entre a gota de corante e o ozônio presente no gás amostrado.

Para uma avaliação do método, utilizamos como fonte de excitação um laser de He-Cd ( $\lambda_{\text{Ex.}}$  325nm), a escolha desta fonte de excitação minimizou o efeito de espalhamento da luz pela gota por outros comprimentos de onda, visto que o laser possui um comprimento de onda único. Essa fonte localizava-se a uma distancia de aproximadamente 1,5 metros do capilar que gerava a gota, a está distância também são minimizados os efeitos de espalhamento da luz, pois o laser é uma fonte que propaga a luz de forma contínua no percurso.

#### **4.2.2. Efeito da concentração do ITS na fluorescência do ASAB's**

A concentração do corante ITS foi reavaliada buscando conhecer melhor o efeito das moléculas de corante em meio das moléculas luminescentes formadas após a reação entre ITS e ozônio. Como foi observado nos experimentos anteriores as medidas da intensidade de fluorescência para soluções com diferentes concentrações de corante ITS com a mesma quantidade de ozônio adicionado apresentaram um decréscimo na intensidade de emissão em função da quantidade de corante (Figura 25).

Duas são as possíveis explicações para o fenômeno observado no experimento: 1) As moléculas do corante em concentrações mais elevadas estão absorvendo a luz de excitação e com isso diminuindo a eficiência do processo de fluorescência das moléculas luminescentes no interior da solução; ou; 2) A minimização da fluorescência esperada para altas concentrações do corante é devido a modificação da cinética da reação diminuindo a quantidade das moléculas luminescentes formadas.

Para este ensaio foram realizadas medidas de fluorescência lateral e frontal de alíquotas com diferentes concentrações de ITS e que foram colocadas para reagir com concentrações conhecidas de ozônio, porem, o corante sempre estava em excesso em relação à quantidade de ozônio adicionada resultando em uma solução de cor azul intensa.

Na realização destes experimentos as intensidades de fluorescência das soluções foram mediadas de formas distintas como representado na Figura 38.

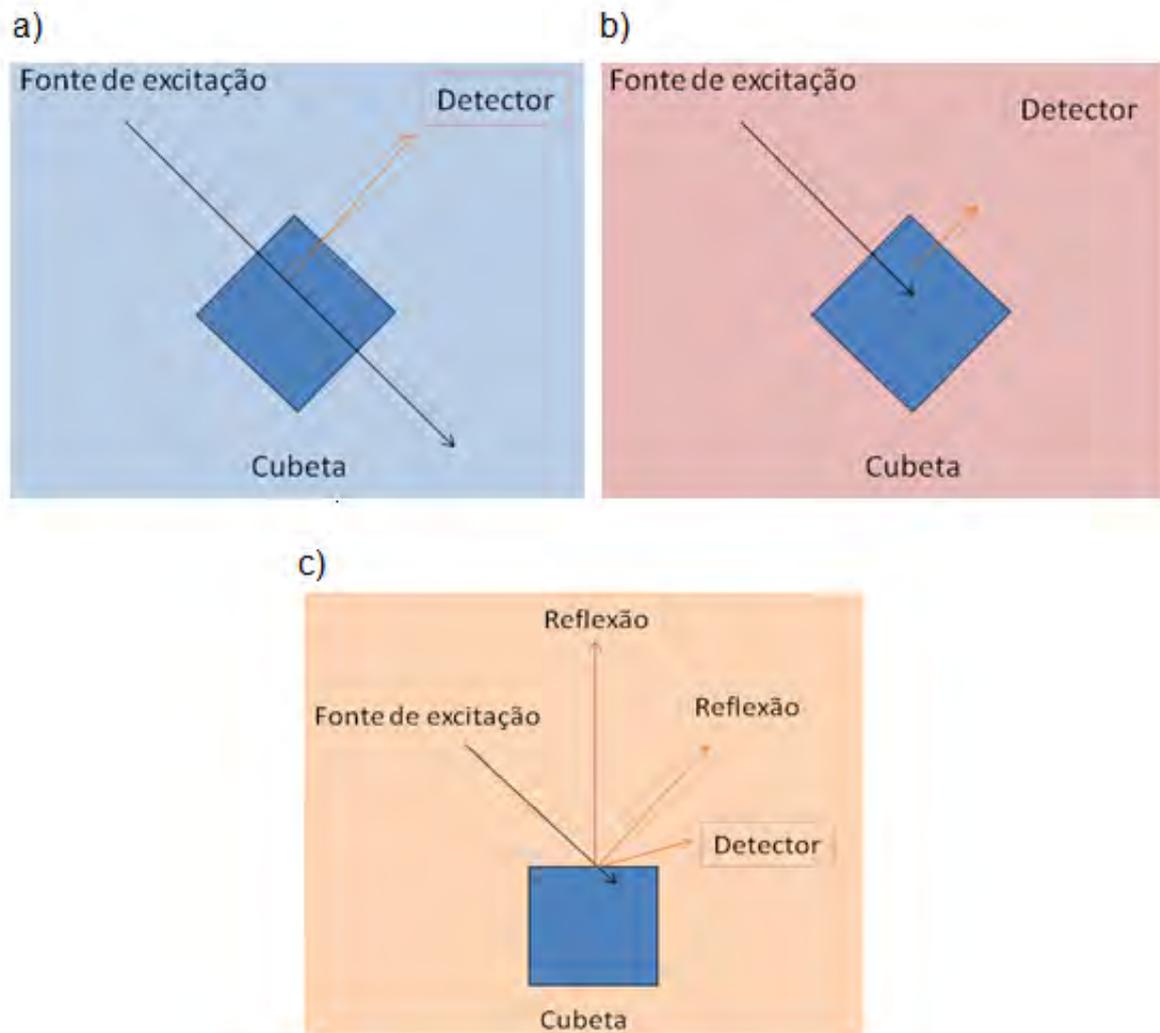


Figura 40. Medidas Fluorimétricas (a) Fluorescência Lateral para uma amostra sem absorção de luz por corantes (b) Fluorescência Lateral para uma amostra com absorção de luz por corantes (c) Fluorescência Frontal de uma amostra medindo a luminescência da alíquota fora da região de reflexão.

Usualmente o espectrofluorímetro emite luz de emissão que atravessa a cubeta com a solução a ser medida. A leitura de fluorescência é feita por um detector que coleta luz emitida em um ângulo de  $90^\circ$  do feixe da luz de excitação (Figura 40- (a)). Nesta montagem dependendo da espécie molecular existente, a luz de excitação sofre atenuação interna devido à existência de centros que absorvem com grande intensidade a luz, e esta não consegue excitar todas as moléculas fluorescentes, com isso o sinal analítico é menor que o esperado (Figura 40-(b)).

Para contornar esse problema é possível modificar a posição da cubeta dentro do espectrofluorímetro, criando um rearranjo onde a luz de excitação é colocada para incidir formando um ângulo  $\alpha$  com a superfície da cubeta. Neste procedimento a luz refletida que afetar o sinal de fluorescência é limitado pelo ângulo  $\alpha$  oposto. O detector está em uma posição fora da região de reflexão de luz, assim é possível determinar a fluorescência das moléculas frontais excitadas pela luz. Com isso ocorre uma minimização drástica do efeito de atenuação da luz de excitação, pois o ponto de excitação da cubeta é praticamente o mesmo utilizado para obter o sinal de fluorescência da amostra (Figura 40 (c)).

As amostras submetidas à fluorescência lateral com  $\lambda_{\text{Ex.}}$  325 e 340 nm exibiram um comportamento similar às amostras avaliadas para o método quantitativo analisado anteriormente. No experimento foram feitas medidas de fluorescência lateral e frontal de soluções provenientes da reação entre ITS e ozônio para diferentes concentrações de ambos. Para as medidas de fluorescência lateral foram testadas as concentrações de ozônio de 4,60 e 5,30  $\mu\text{molL}^{-1}$  em uma solução de ITS  $2 \times 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$ , e 5,30  $\mu\text{molL}^{-1}$  em uma solução de ITS  $2 \times 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$ . O sinal de fluorescência sofreu uma diminuição em função do acréscimo da concentração de ITS para excitações em 325 e 340 nm representados pelas Figuras 41 e 42 respectivamente.

Porém quando as soluções são medidas pelo procedimento de fluorescência frontal observa-se que para uma mesma quantidade de ozônio (5,30  $\mu\text{molL}^{-1}$ ) em diferentes concentrações de ITS em  $2 \times 10^{-3}$  e  $2 \times 10^{-4}$ , verificou-se que ocorreu um aumento da luminescência frontal com o aumento da quantidade de corante em  $\lambda_{\text{Ex.}}$  325 e 400nm (Figuras 43 e 44).

Este aumento da concentração de ITS para uma mesma concentração de ozônio mostra que o efeito de supressão da fluorescência na verdade ocorre porque as moléculas de corante presentes na solução absorvem luz, impedindo que os fótons excitem de maneira efetiva os centros das moléculas de ASAB's responsáveis pela fluorescência observada.

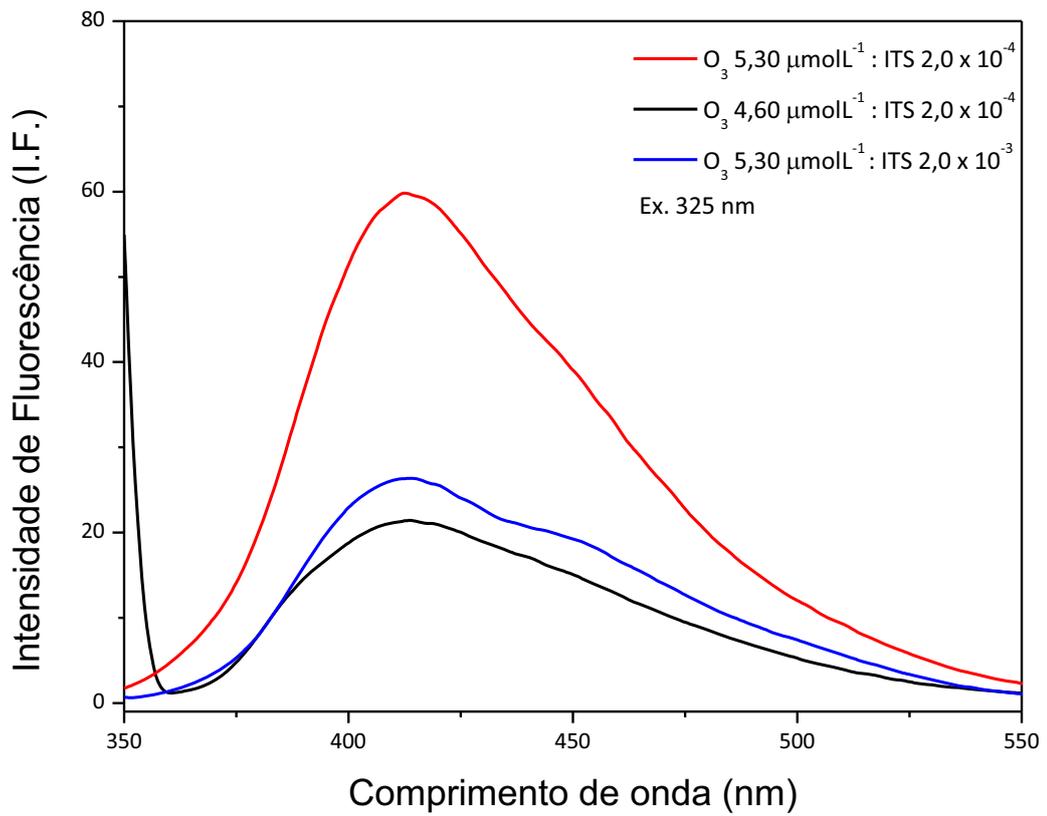


Figura 41. Espectro de fluorescência lateral  $\lambda$ Ex. 325 nm

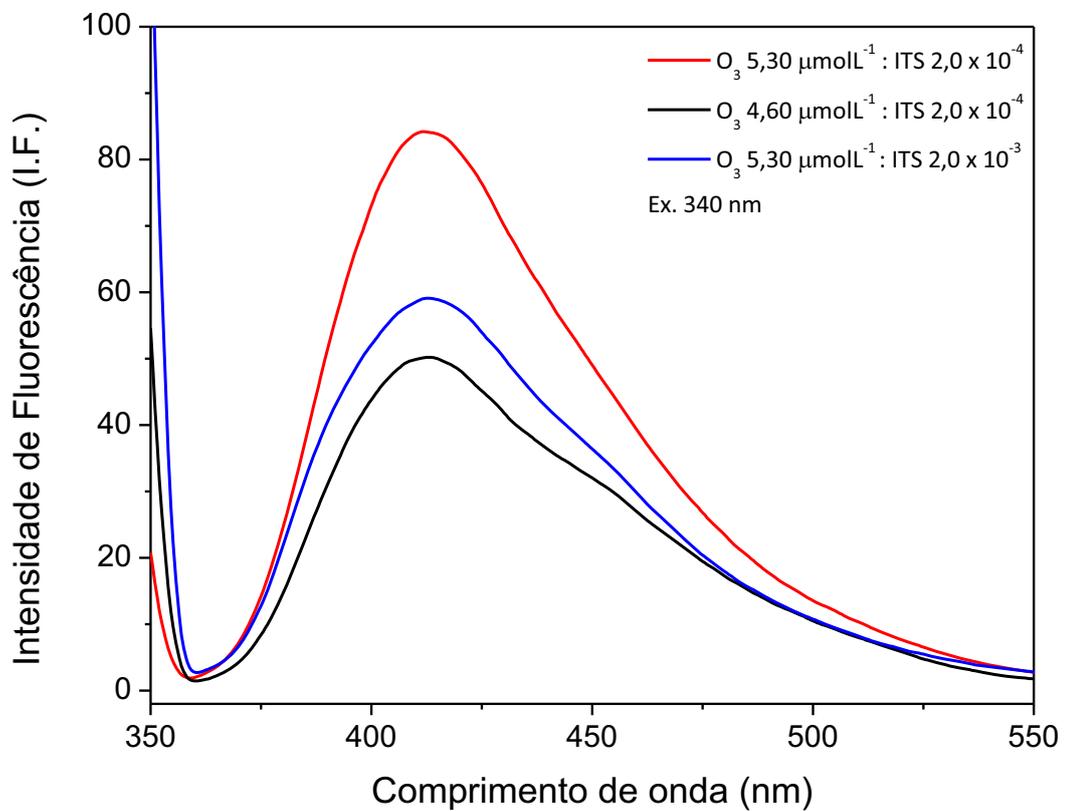
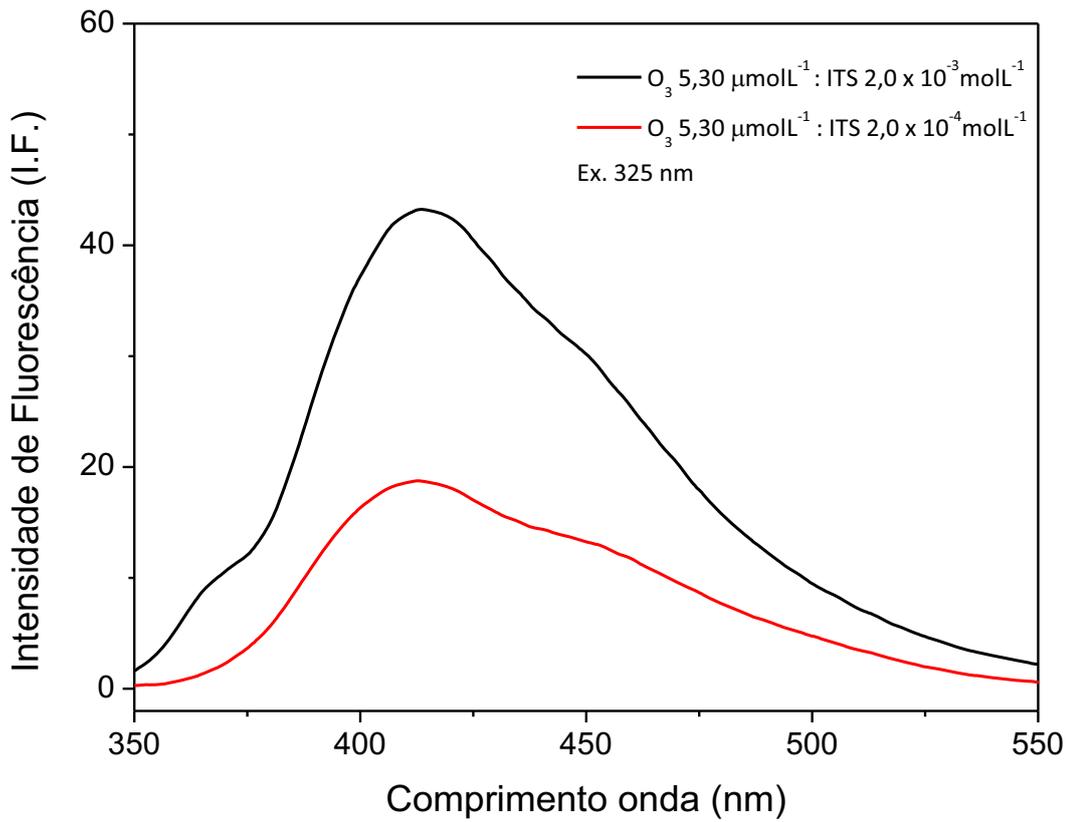
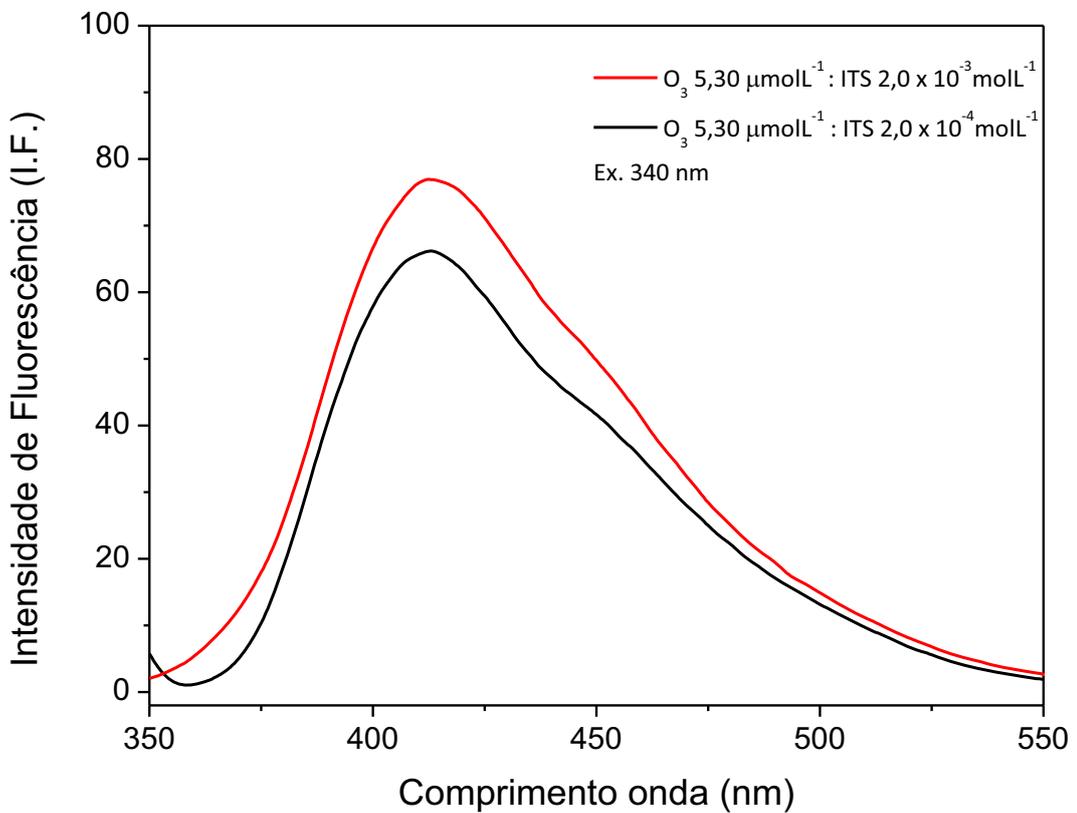


Figura 42. Espectro de fluorescência lateral  $\lambda$ Ex. 340 nm

Figura 43. Espectro de fluorescência frontal  $\lambda\text{Ex. 325 nm}$ .Figura 44. Espectro de fluorescência frontal  $\lambda\text{Ex. 325 nm}$

Desta forma soluções mais concentradas em relação à concentração de ITS são mais convenientes para medidas de ozônio. Diante disso, a concentração estipulada para fazer as amostragens de ozônio pelo método da gota suspensa foi de  $2,0 \times 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$ , pois como foi mostrado nessa concentração de corante não irá ocorrer à supressão na fluorescência observada. A otimização do sistema de reação e de medida de fluorescência mostrou uma luminescência intensa na gota de solução excitada pelo laser após a reação com ozônio. A fluorescência da gota é tão intensa que pode ser observada a olho nu como é representado nas Figuras 45 e 46.



Figura 45. Gota Fluorescendo

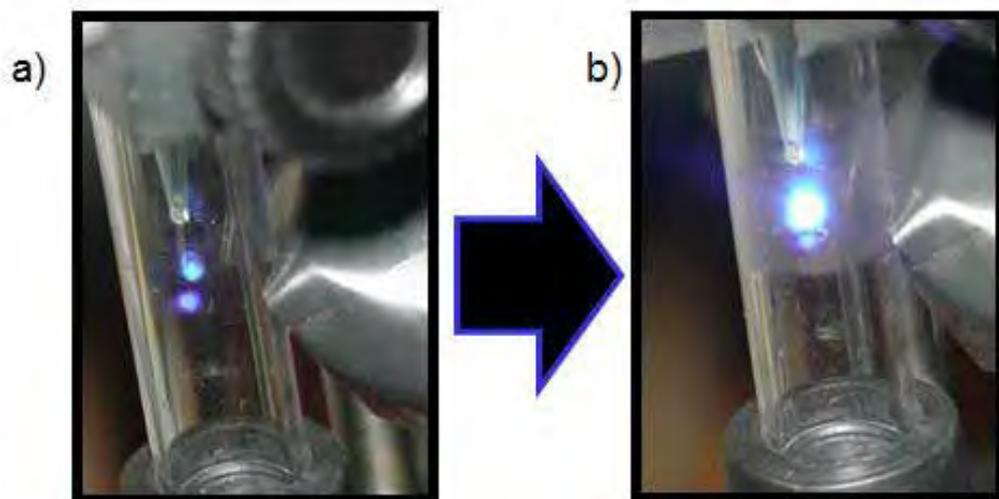


Figura 46. Gota fluorescendo a) antes da passagem de ozônio, após a passagem de ozônio

### **4.2.3. Montagem e avaliação do sistema fluorimétrico para determinação de ozônio em ar utilizando uma gota de solução como sensor analítico**

Para montar um sistema para amostrar a concentração de ozônio na atmosfera utilizando gotas de solução de ITS com posterior medida fluorimétrica para medida de fluorescência da gota, foi montado um sistema apresentado nas Figuras 50, 51 e 52. Nesta montagem para medir a fluorescência exibida pela gota foi usado um fotodiodo como detector, para transformar a luz emitida pela gota em sinal analítico. Esse detector foi posicionado a 90° em relação ao feixe de laser de He-Cd ( $\lambda 325$  nm) sendo utilizado para a excitação da gota.

A luz refletida pela gota concorre com a luz emitida por fluorescência interferindo no sinal analítico. Como a emissão de fluorescência ocorre em comprimentos de onda maiores do que o de excitação é possível utilizar um filtro para reter a luz refletida deixando passar a luz correspondente à fluorescência.

Foram testados dois filtros, um vidro de cobalto e um vidro semicondutor dopado com gálio para atenuar a possível interferência da luz por espalhamento do laser. O espectro de transmitância dos filtros é representado na Figura 47. A melhor escolha como filtro para ser usada na frente do detector foi o vidro de semicondutor de gálio, pois este absorve a luz em 325 nm espalhada pelo laser, diferente do vidro de cobalto que não absorve nessa região.

No arranjo experimental buscado, um importante fator foi encontrar a melhor distância entre a gota e o fotodetector. Os resultados relativos à intensidade de fluorescência e as diferentes distâncias entre a gota e o fotodiodo estão apresentados na Figura 48. A melhor distância encontrada para um sinal de fluorescência foi de 1 cm de distância entre gota e o fotodetector. Essa distância foi a mínima, pois, existe uma câmara de vidro em volta da gota que impede uma maior aproximação do detector.

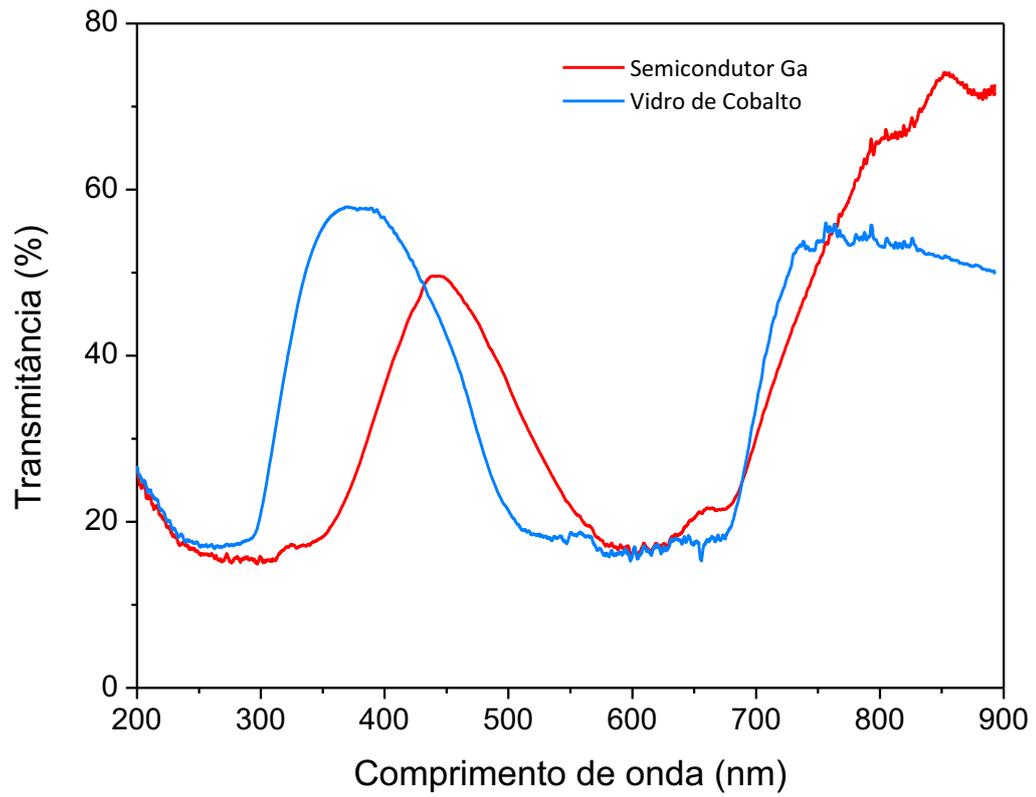


Figura 47. Porcentagem de transmitância observada para o vidro de cobalto e o vidro semicondutor de gálio

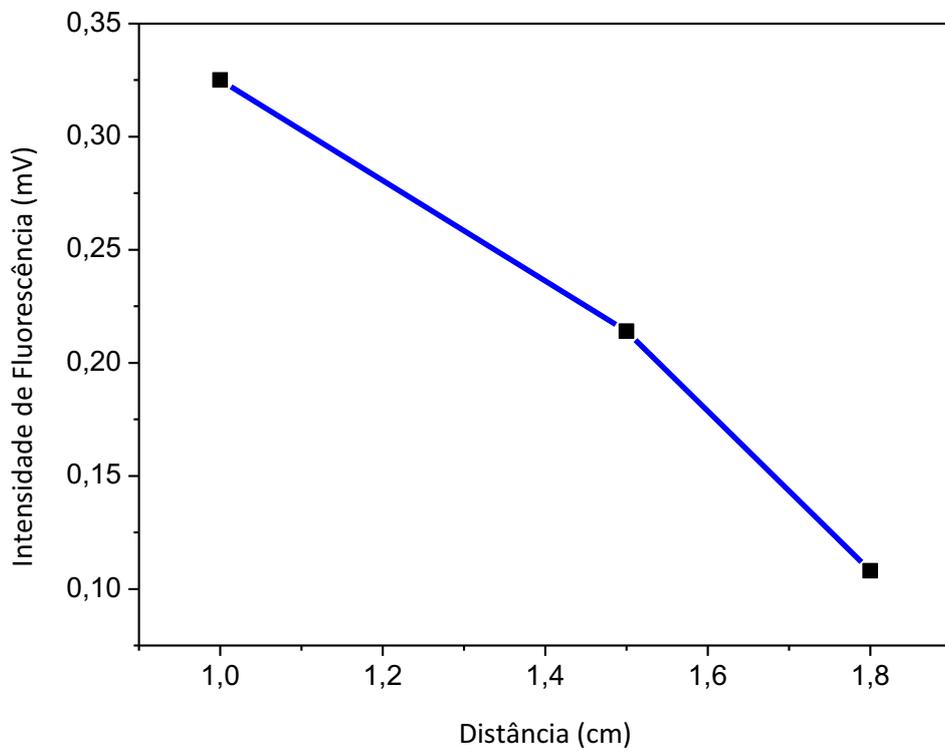


Figura 48. Sinal de fluorescência (mV) em função da distância do detector em relação à gota formada.

Na utilização da gota de ITS para determinar a concentração de ozônio é possível utilizar dois procedimentos diferentes: 1) formar uma gota até um volume máximo com a gota suspensa por um determinado tempo para fazer a amostragem e determinar quanto do analito foi absorvido pela gota 2) manter o gotejamento constante e determinar ozônio nesta condição.

A gota pode ser parada em qualquer momento interrompendo o fluxo da solução de corante com o auxílio da válvula solenóide, porém é necessário estabelecer o volume da gota para uma medida repetitiva do sinal analítico. A gota na ausência de ozônio, ao iniciar sua formação e crescimento, exibe um sinal analítico diretamente proporcional ao seu volume.

Desta forma é possível controlar esse volume interrompendo o fluxo da solução de corante acompanhando o sinal analítico da gota. Neste caso a interrupção do fluxo do corante, foi no momento em que o sinal analítico para a gota era máximo (Figura 49).

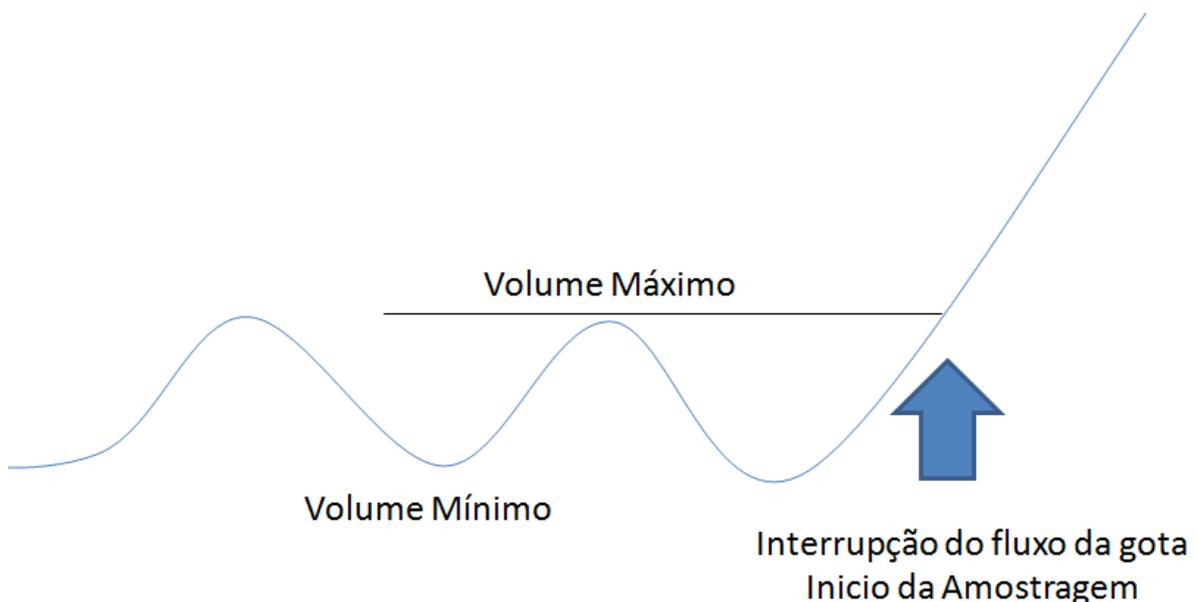


Figura 49. Comportamento do sinal analítico de uma solução de ITS em gotejamento constante na presença de ozônio.

Estabelecidas as melhores condições de trabalho foi montado um sistema de gotas para a determinação de ozônio. O sistema completo de análise fluorimétrica para uma gota suspensa é representado nas Figuras 50,

51 e 52. Com o sistema montado foi feito um experimento mantendo-se constante a concentração do ozônio e mudando-se a vazão de amostragem. Os resultados são apresentados na Figura 51. Como é possível observar no início do experimento o aumento da vazão resulta em um aumento do sinal analítico. Após a vazão de  $300 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  o sinal tende a um patamar. Isto provavelmente é devido ao efeito de saturação da gota como meio coletor de ozônio, um resultado da maior velocidade com que as moléculas de ozônio passam pela gota, diminuindo assim sua eficiência de coleta. Como resultado deste experimento a vazão de amostragem foi estabelecida em  $300\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ .

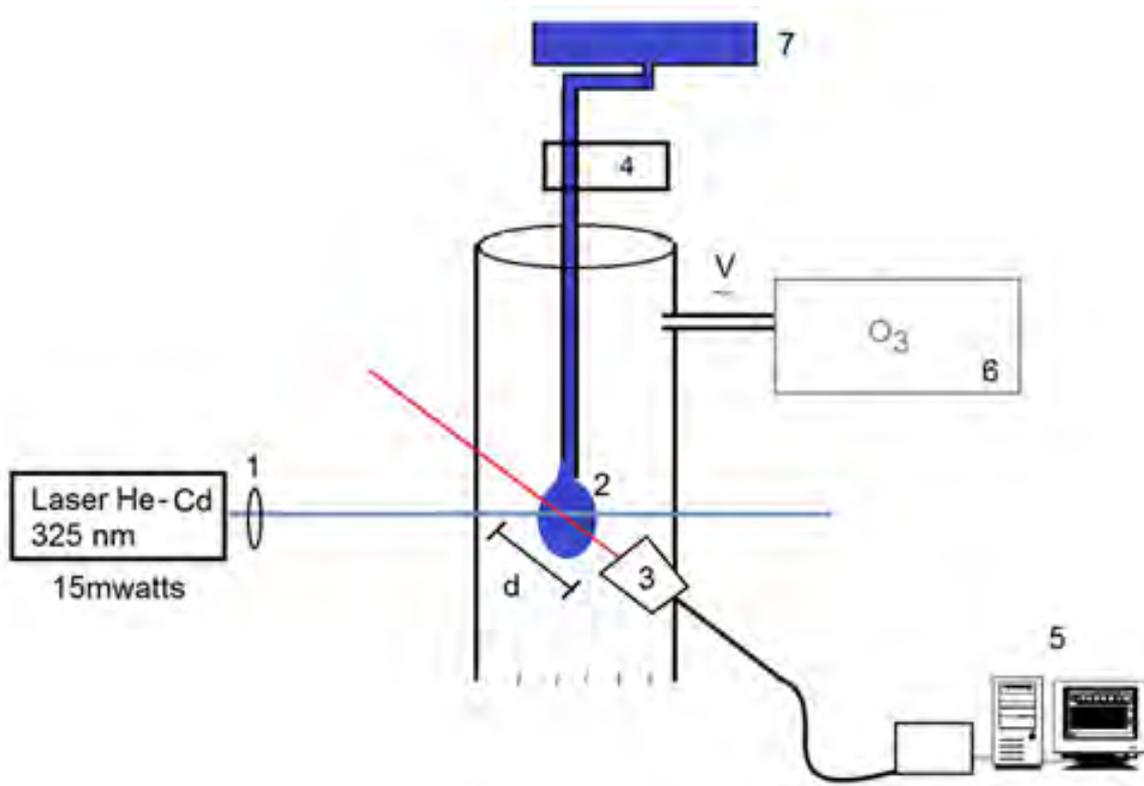


Figura 50. Configuração final do sistema proposto para análise fluorimétrica em gota. 1). Fonte de Excitação (Laser He-Cd 325nm) com um filtro de Transmitância 60%, 2). Formador de gota, 3). Fotodetector com filtro colocado a 1 cm da gota, 4). Válvula solenóide para controle do volume da gota, 5). Sistema de aquisição de dados, 6). Fonte de Ozônio gerado por lâmpada germicida, 7) Solução de corante ITS  $2,0 \times 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$ .

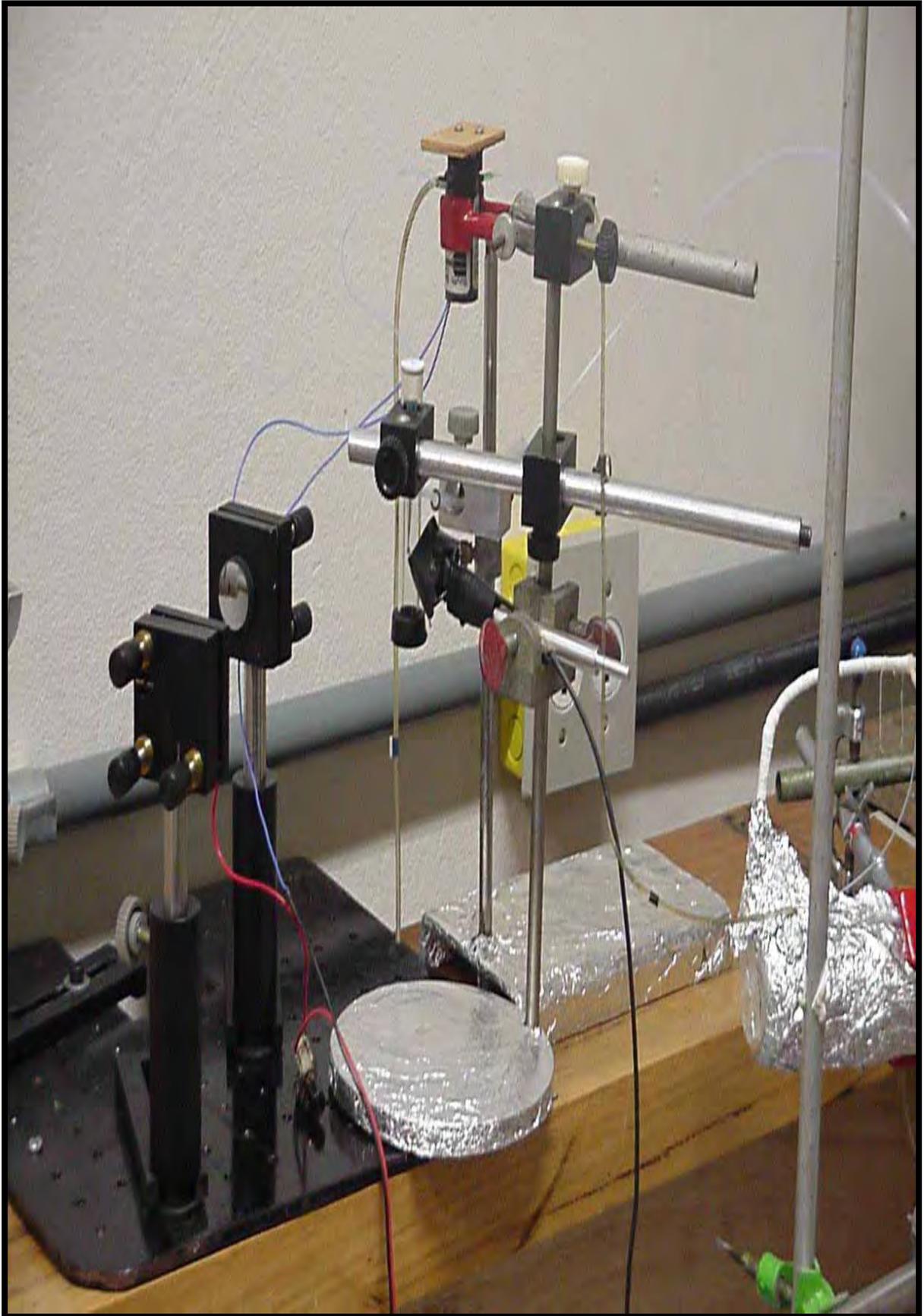


Figura 51. Foto do sistema montado para medidas fluorimétricas em uma gota de solução

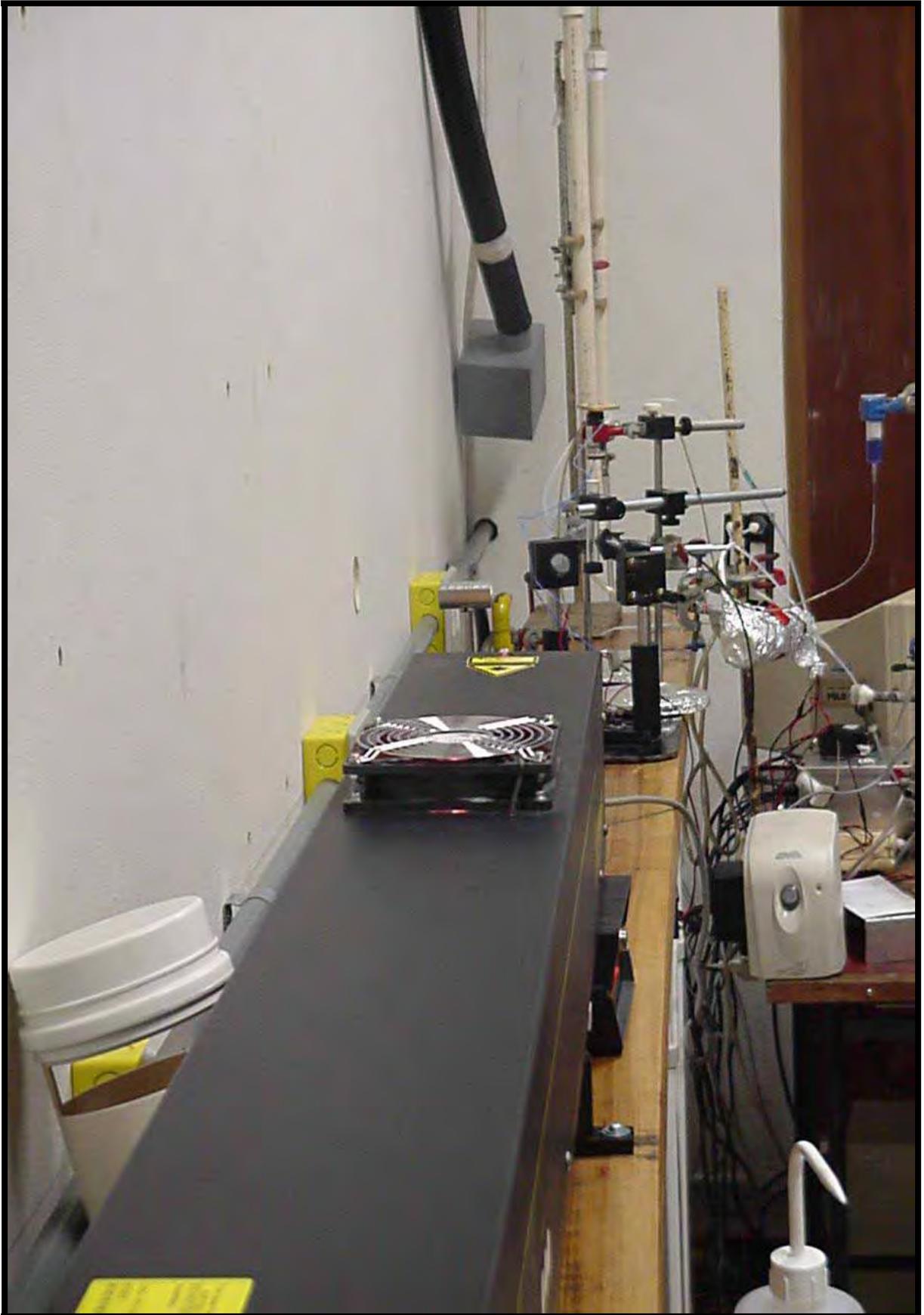


Figura 52. Foto do sistema montado para medidas fluorimétricas em uma gota de solução mostrando o laser utilizado para a excitação

Com o sistema montado, foi necessário realizar um experimento para determinar a maior fluorescência observada para uma gota de solução para uma concentração constante de ozônio (Figura 53). A melhor vazão de ar encontrada foi de  $300 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ .

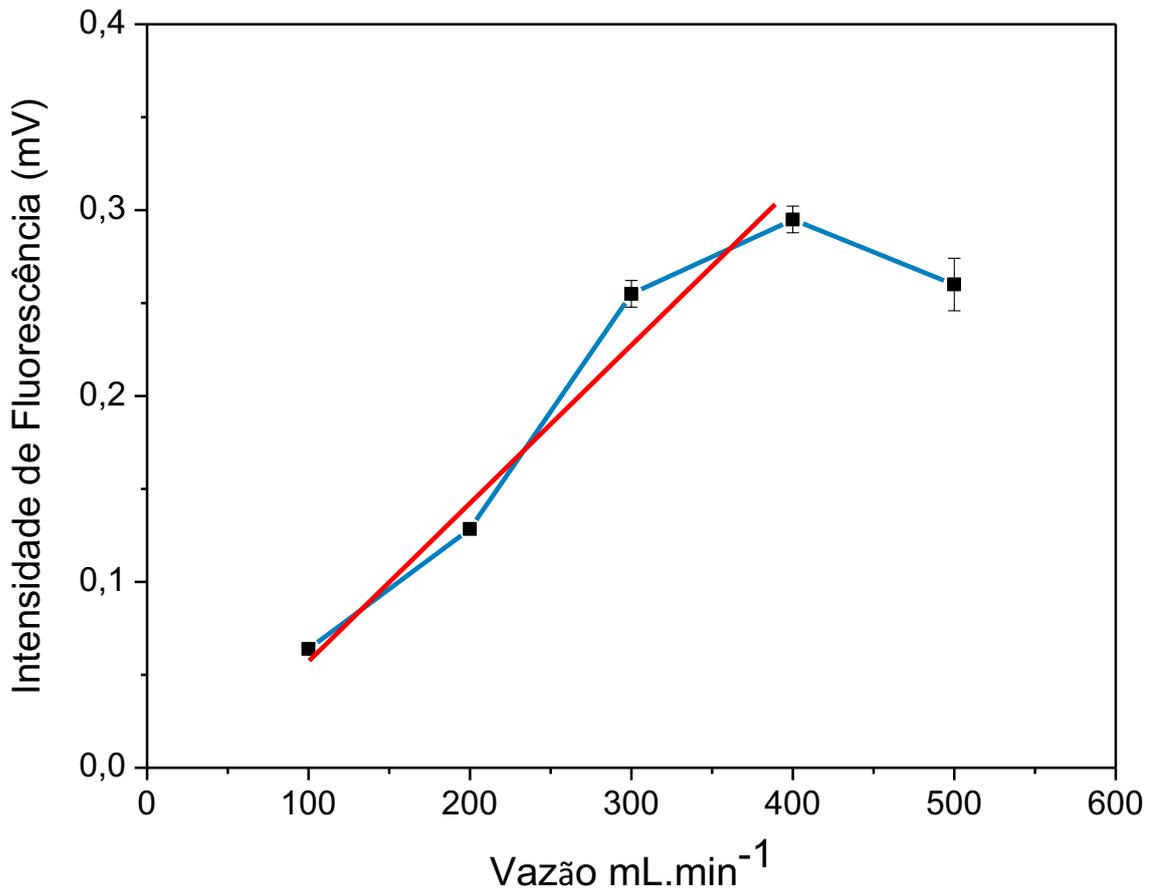


Figura 53. Variação da intensidade de fluorescência em função da vazão do ar.

Estabelecida a vazão de amostragem, o próximo passo foi determinar a concentração de ozônio gerado pelo sistema de geração de atmosfera controlada de ozônio.

O sistema para geração e calibração de ozônio foi montado utilizando uma lâmpada germicida de 4 watts para formação de ozônio. Foram utilizados tubos e conexões de teflon para a montagem dos componentes representado na Figura 54. O sistema é composto por uma câmara de ar alimentada (2) por um compressor (1), o ar entra no sistema e

passa por um conjunto de colunas de KI (3) e carvão ativado (4) para a eliminação de substâncias orgânicas presentes no ar, com um controle na vazão de entrada do ar que passa pela lâmpada germicida, ligado a um controlador de vazão para controlar a quantidade de ar que passa pela lâmpada

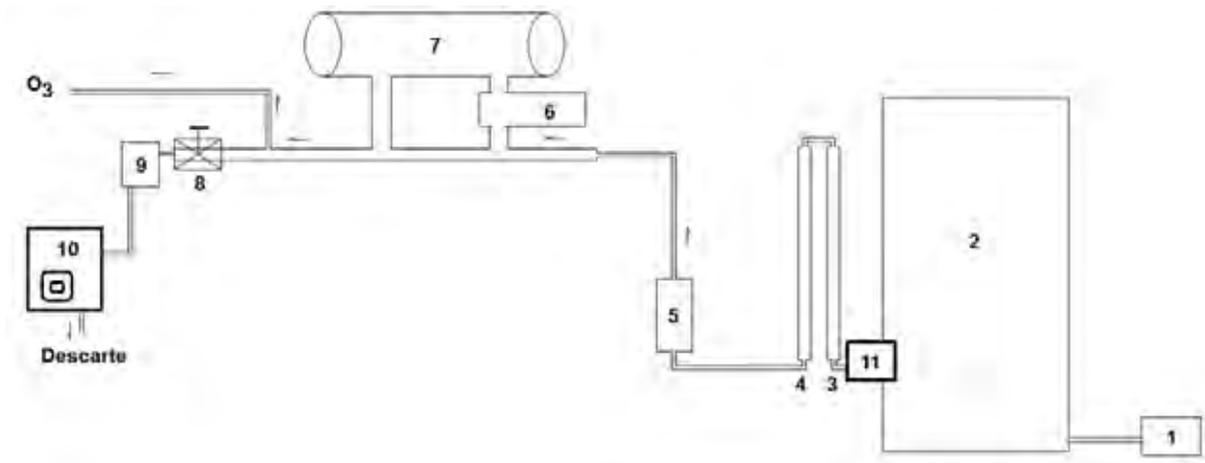


Figura 54. Montagem e Calibração do sistema para gerar uma atmosfera de ozônio em ar. 1) Compressor, 2) Câmara do compressor, 3) Coluna com KI, 4) Coluna com carvão ativado, 5) Controlador de Vazão, 6) Controlador de vazão para diluição do gás, 7) Lâmpada de ultravioleta germicida 4 watts, 8) Válvula, 9) Controlador de Vazão, 10) Bomba e 11) Controlador de pressão

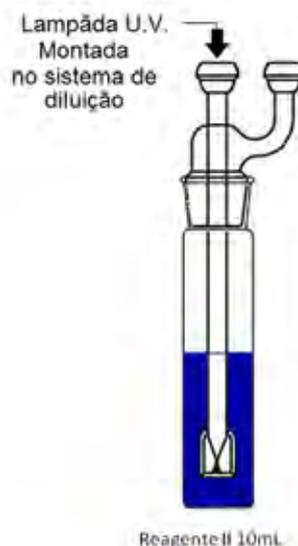


Figura 55. Amostrador Impingir ligado ao sistema de geração de uma atmosfera de ozônio

Para este procedimento a atmosfera de ozônio foi borbulhada em um tubo impinger contendo uma solução do reagente II ITS, com uma vazão de  $300 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  e tempo de amostragem de zero, 20, 40 e 60 minutos (Figura 55). A solução foi retirada do impinger e nela foram feitas medidas de absorbância (Figura 56) e fluorescência (Figura 57).

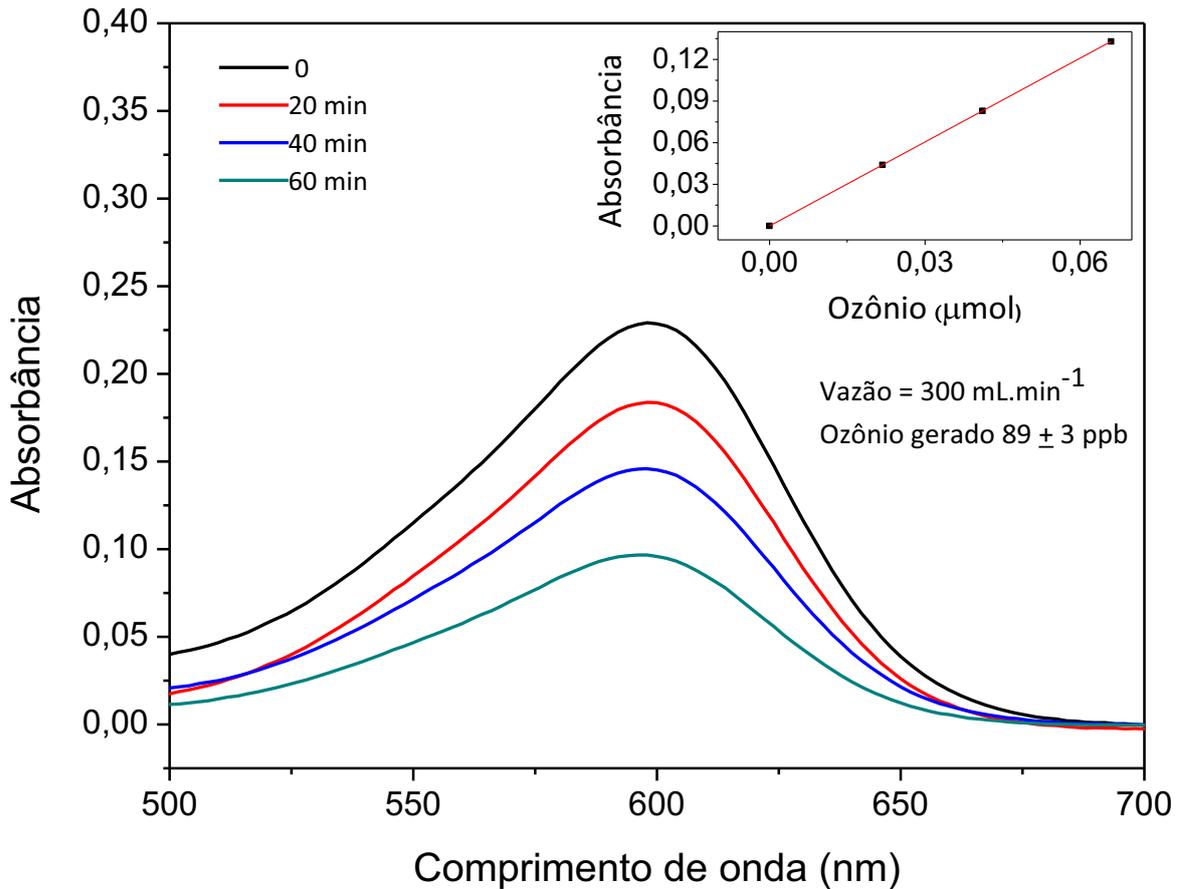


Figura 56. Calibração da atmosfera padrão de ozônio utilizando o método de borbulhamento em solução de ITS

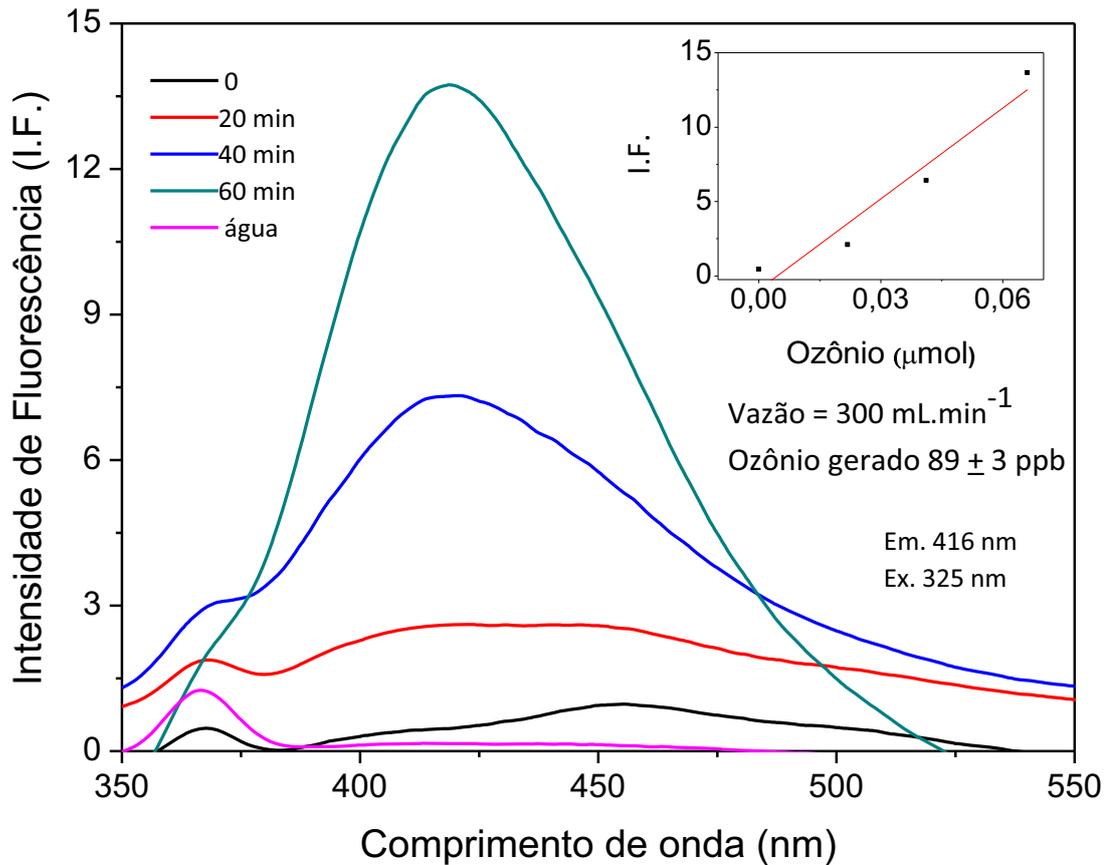


Figura 57. Fluorescência observada após a reação entre ITS e ozônio nas alíquotas usadas para calibrar a atmosfera padrão de ozônio.

Com os valores de diferença de absorbância foi possível determinar a quantidade de ozônio gerado pela atmosfera controlada de ozônio, correlacionado o consumo de ITS e a formação dos ASAB's com o tempo total de borbulhamento de ozônio na solução (Equação 16 e 17). Estes dados permitiram determinar a concentração de ozônio gerada pela atmosfera que foi de  $89 \pm 3 \text{ ppb}$ .

$$\text{Variação de Absorbância.} = 2,016(\pm 0,001)\text{tempo}(min)$$

$$R = 0,9999 \quad (\text{Equação 16})$$

$$I.F. = 203,560(\pm 36,579)\text{tempo}(min) - 0,909 (\pm 1,477)$$

$$R = 0,920 \quad (\text{Equação 17})$$

Estabelecida a concentração da atmosfera padrão de ozônio em 89 ppb, foi possível fazer uma diluição inserindo ar limpo no sistema, obtendo desta forma novas concentrações de ozônio. Como a diluição com ar limpo aumenta a vazão total, parte do volume da atmosfera é descartado restando  $300 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  na linha do amostrador. As concentrações para a atmosfera de ozônio obtidas por diluição foram zero, 29, 66 e 89 ppb.

Mantendo-se uma gota suspensa com volume fixo, foi passado ar contendo 29 ppb de ozônio com vazão de amostragem de  $300 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . O sinal analítico de fluorescência foi medido 12 minutos enquanto que a atmosfera padrão era passada pela gota. O resultado do experimento é apresentado na Figura 58.

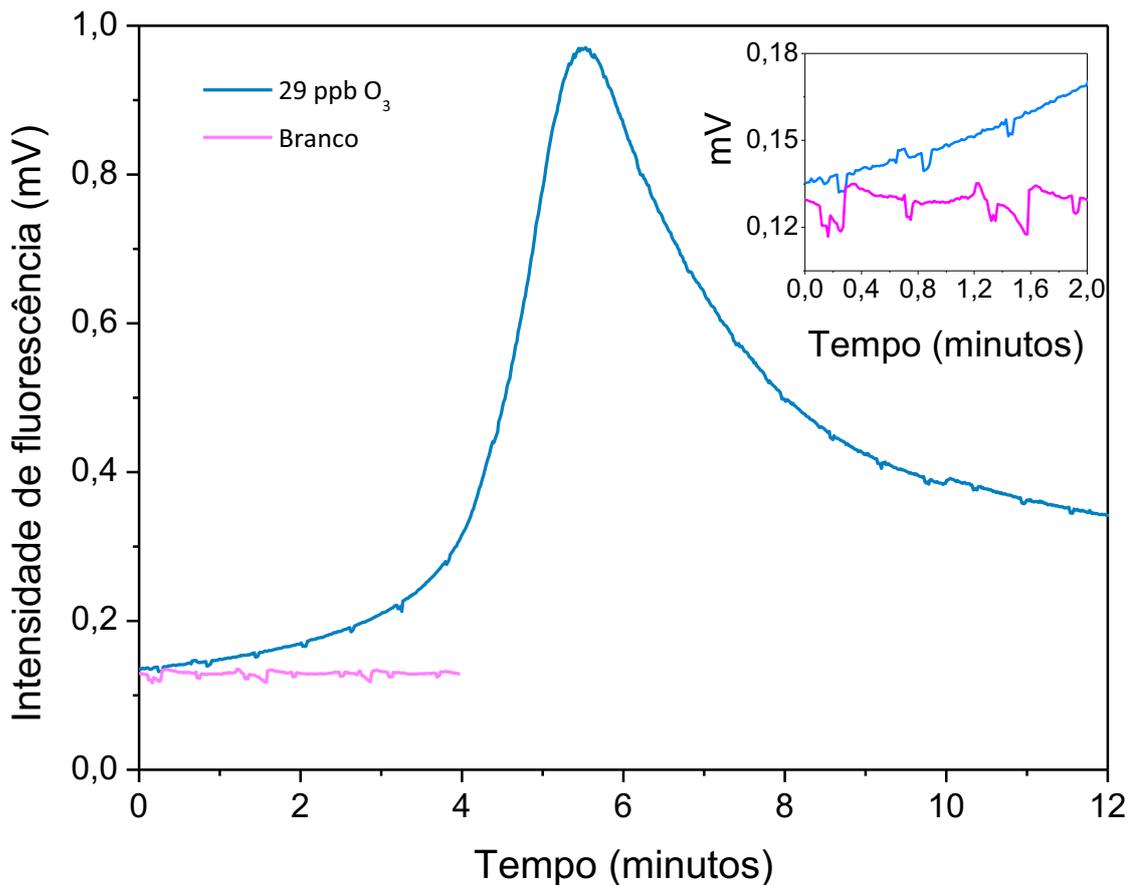


Figura 58. Tempo de amostragem para a gota suspensa em uma concentração 29 ppb de O<sub>3</sub>

No início da amostragem observa-se um aumento constante do sinal analítico até chegar um tempo de 2 minutos, onde o sinal cresce bruscamente até chegar um máximo em 5,50 minutos, quando o sinal começa a decrescer até atingir um patamar. Uma das possibilidades para explicar esse comportamento é que após o início da amostragem, o ozônio é dissolvido na superfície da gota consumindo rapidamente o corante presente nesta superfície, de forma linear e constante (zero a 2 minutos de amostragem).

Nesta etapa inicial devido ao consumo do reagente pelo ozônio é necessário a reposição do corante, de modo que, por difusão as moléculas de ITS se movimentam em direção a superfície da gota, caracterizando um processo mais lento. Mantida a vazão e a concentração de ozônio na atmosfera em volta da gota, cria-se uma perturbação em sua superfície, fazendo que ela saia do estado estacionário, para um movimento convectivo, fazendo com que as moléculas de corante movimentem-se mais rapidamente para a superfície da gota para que ocorra a reação com ozônio, desta forma a reação processa-se cada vez mais rápida com o aumento dos movimentos de convecção no interior da gota.

O sinal analítico passa a crescer de forma exponencial (2 à 5,5 minutos). Em paralelo a este processo o ar amostrado evapora a gota fazendo com que ela diminua de tamanho e isto tira o foco da luz emitida pela gota em direção ao fotodiodo. Durante o período de amostragem a gota atinge um sinal máximo, porém acompanhado da evaporação da gota.

O tempo de amostragem ideal seria, portanto, o menor tempo para atingir o máximo de sinal analítico, um tempo inferior a 7 minutos como mostrado no experimento. Este tempo menor de amostragem possibilita a determinação de ozônio próximo do tempo real.

Outra forma de visualizar o resultado deste experimento é calcular e representar os dados do sinal da fluorescência com a 1ª derivada como representado na Figura 59. Neste caso ficam mais nítidos os limites relacionados ao menor e maior tempo de amostragem.

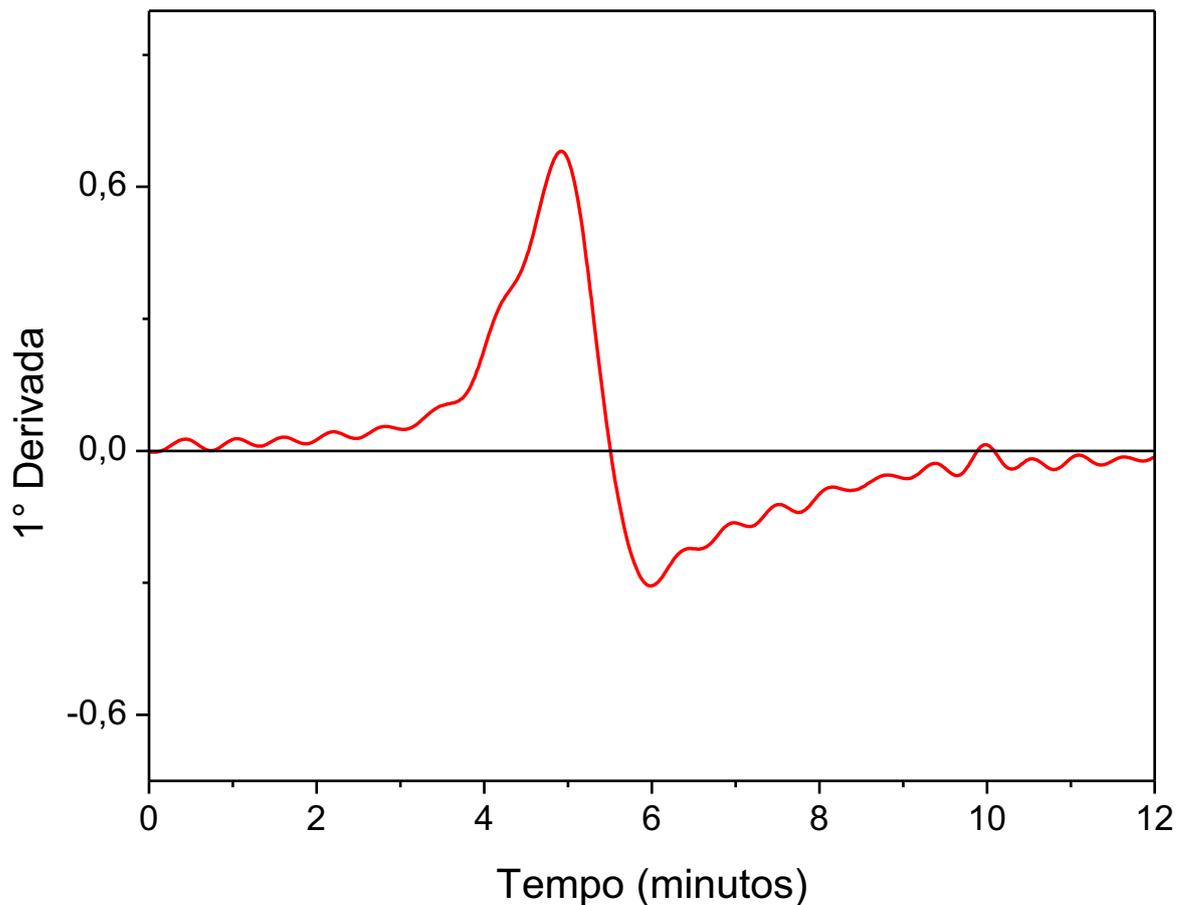


Figura 59. Gráfico da 1ª Derivada do tempo de amostragem para a gota suspensa em uma concentração 29 ppb de  $O_3$  mostrando a variação de luminescência da gota.

O tempo de amostragem para a gota suspensa em uma concentração de 29 ppb de  $O_3$  foi avaliado em aproximadamente 2 minutos (Figura 58), pois neste intervalo de tempo a luminescência da gota foi constante (Figura 59), mais estudos são necessários para entender a cinética de reação entre o ozônio e a gota de corante. Porém vale ressaltar que após 2 minutos de amostragem a luminescência aumenta significativamente podendo representar a cinética de incorporação do ozônio pela gota e as reações que aconteceram dentro dela.

Estabelecendo as condições ótimas de trabalho (Tabela 5), foi feito um experimento exploratório para reconhecer o potencial da gota fluorescente para determinar ozônio em diferentes concentrações na atmosfera.

Fixando o tempo de amostragem em 2 minutos e mudando a concentração de ozônio que passava pela gota, observa-se um acréscimo proporcional no sinal analítico (Figura 60) e como consequência correlação quadrática entre sinal máximo obtido e concentração de ozônio (Equação 18). O gráfico da 1ª Derivada mostra que a luminescência observada em cada gota que reagiu com ozônio é constante, mostrando que o processo de amostragem foi igual para cada gota (Figura 61).

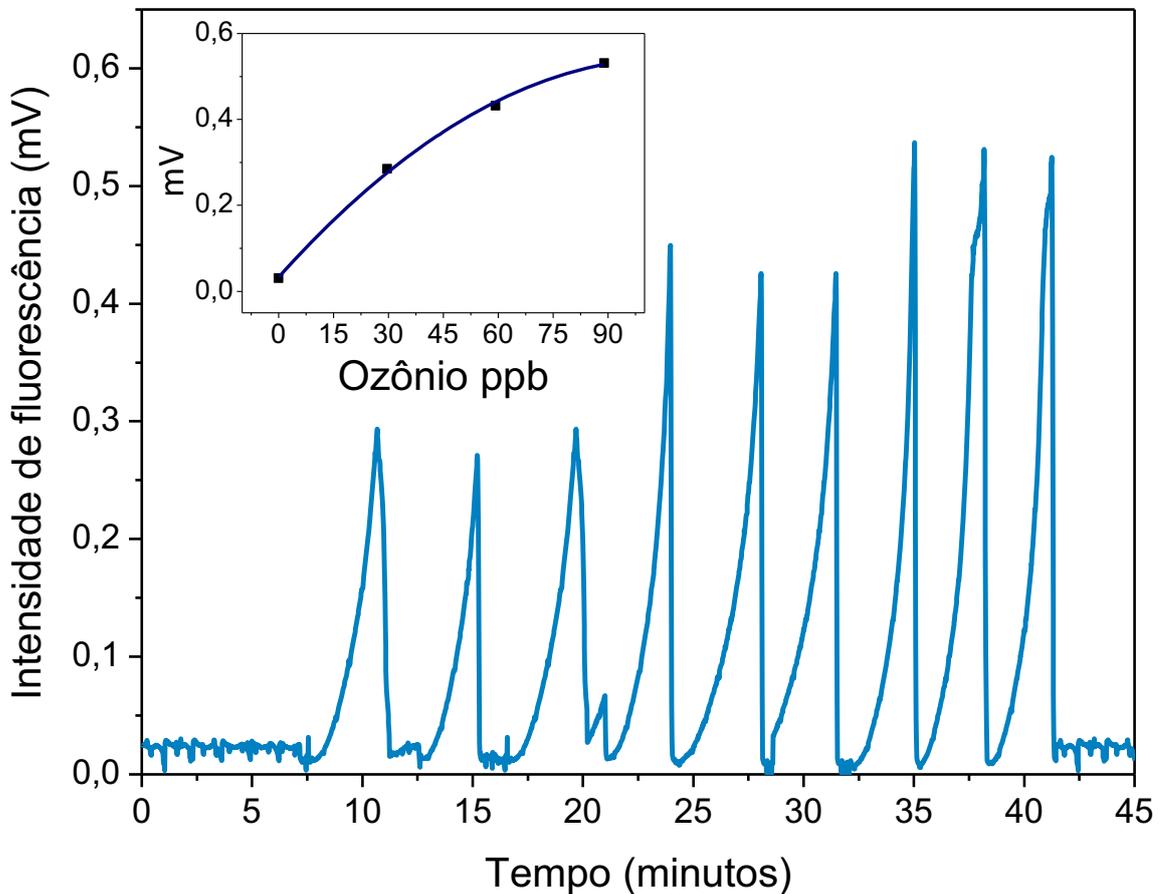


Figura 60. Sinal analítico medido para uma gota suspensa em um período de 2 minutos de amostragem para diferentes concentrações de ozônio.

$$I.F.(mV) = -4,43 \times 10^{-5} (\pm 7,66 \times 10^{-6}) [O_3 ppb]^2 + 0,01 (\pm 7,11 \times 10^{-4}) [O_3 ppb] - 0,03 (\pm 0,01)$$

$$R = 0,9961 \text{ (Equação 18)}$$

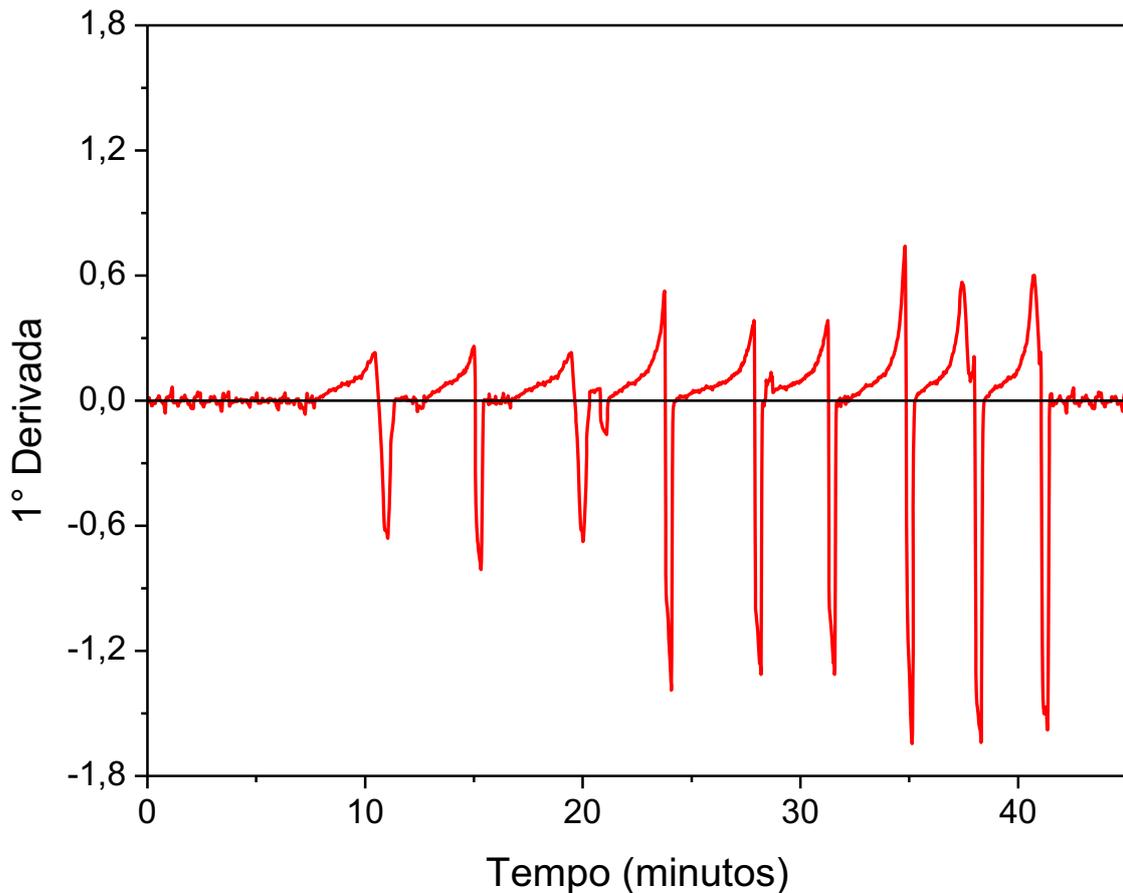


Figura 61. Gráfico da 1ª Derivada do tempo de amostragem para a gota suspensa diferentes concentrações de ozônio mostrando a variação de luminescência da gota e a homogeneidade da amostragem.

Tabela 5. Configuração da montagem do método em uma gota suspensa

Características para a montagem do método em uma gota suspensa	
Detector	Fotodiodo de silício
Filtro do detector	Semicondutor Gálio (azul)
Distância detector-gota	1 cm
Concentração do Corante ITS	$2.0 \times 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$
Vazão de amostragem	$300 \text{ mL.min}^{-1}$
Concentrações de ozônio geradas	Zero, 29, 66 e 89 ppb
Tempo de amostragem	2 minutos
Fonte de excitação	Laser He-Cd (325 nm)

Os valores observados mostram que o método é sensível e poderá ser usado para medir ozônio em concentrações próximas às encontradas em ambientes abertos. Este experimento demonstrou a viabilidade de se usar a técnica de amostragem de gota suspensa para medidas de ozônio troposférico pela técnica de fluorescência de forma sensível e seletiva, além do tempo reduzido de amostragem o que garante medidas em espaços de tempo de 2 minutos, consideradas próximas ao tempo real e necessárias visto que o ozônio é extremamente reativo e sua concentração varia rapidamente no decorrer do dia.

## Conclusões

A fluorescência pode ser empregada como técnica de medida para o ozônio residual em água. O procedimento é baseado no descoramento do corante ITS pelo ozônio presente na amostra. O procedimento utilizado é idêntico ao previamente descrito para medidas das diferenças de absorvância. As vantagens são que o sinal analítico de fluorescência é resultado de uma medida de um produto da reação enquanto que na absorvância o sinal analítico obtido do descoramento requer a diferença entre duas medidas, uma antes e outra após a reação. Para medidas de ozônio em baixa concentração o método aqui descrito possui um limite de detecção mais baixo do que o do descoramento do ITS. Em condições otimizadas de reação a intensidade de fluorescência é linear na faixa de zero e  $5,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , com um limite de detecção de  $0,014 \mu\text{mol.L}^{-1}$ . O método proposto baseia-se em apenas uma medida, é mais sensível e não difere significativamente do método colorimétrico recomendado em um intervalo de confiança de 95%.

O método fluorimétrico em uma gota suspensa mostrou-se promissor, como elevada sensibilidade, baixo tempo de amostragem produzindo resultados de determinação de ozônio em ar muito próximos do tempo real. Experimentos posteriores devem ser feitos com uma maior variação nas faixas de concentrações de ozônio, para determinar as condições da reação para uma gota de solução estabelecendo desta forma os limites de quantificação e detecção da técnica.

O estudo revelou que fontes de diversos comprimentos de onda poderão ser utilizados, aumentando a gama de possibilidades para a construção de sistemas compactos, com custo de montagem reduzido, um menor gasto de reagentes e diminuição na geração de resíduos, aliado ainda a um baixo consumo de energia para amostragens de ozônio ambiental em tempos próximos ao real.

## REFERÊNCIAS

- ASHMORE, M. et al. New directions: a new generation of ozone critical levels for the protection of vegetation in Europe. **Atmospheric Environment**, v. 38, n. 15, p. 2213-2214, 2004.
- BADER, H.; HOIGNE, J. Determination of ozone in water by the indigo method. **Water Research**, v. 15, n. 4, p. 449-456, 1981.
- BAIRD, C. **Química ambiental**. 2. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002.
- BELTRÁN, J. F. **Ozone reaction kinetics for water and wastewater system**. Cherry Hill: Lewis Publishers, 2004.
- BERCI FILHO, P. et al. Photophysics of ambident organic anions I. **Journal of Photochemistry and Photobiology A**, v. 92, p.155-161, 1995.
- BERGSHOEFF, G. et al. Spectrophotometric determination of ozone in air with Indigo disulphonate. **Analyst**, v. 109, n. 9, p. 1165-1169, 1984.
- BIKDSALL, C. M.; JENKINS, A. C.; SPADINGER, E. Iodometric determination of ozone. **Analytical Chemistry**, v. 24, n. 4, p. 662-664, 1952.
- BIODIVERSIDADE TESES E DISSERTAÇÕES HEALTH. **Teses e dissertações**. 2007. Disponível em:  
<[http://www.biodiversidade.pgibt.ibot.sp.gov.br/teses\\_dissert/110407silvia.htm](http://www.biodiversidade.pgibt.ibot.sp.gov.br/teses_dissert/110407silvia.htm)>. Acesso em: 20 dez. 2010.
- BOUBEL, R. W.; FOX, D. L.; TURNER, D. B. **Fundamentals of air pollution**. 3rd ed. New York: Academic Press, 1994.
- BY, J. L. et al. Automated measurement of aqueous ozone concentration. **Process Control Quality**, v. 6, n. 4, p. 229-243, 1995.
- CARDOSO, A. A.; PEREIRA, E. A.; ROCHA, J. C. Gotas suspensas: uma proposta para amostra e análise de gases da atmosfera. **Química Nova**, v. 21, p. 217-20, 1998.
- CLAYDEN, J. et al. **Organic chemistry**. New York: Oxford University Press, 2008.
- CLESCERI, L. S.; GREENBERG, A. E.; TRUSSELL, R. R. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 17th ed. Washington: Port City Press, 1989. p. 4162-4165.

CRUTZEN, P. J., GOLDAMMER J. G. **Fire in the environment, the ecological, atmospheric, and climatic importance of vegetation fires**. New York: John Wiley & Sons, 1992.

DALMÁZIO, I. et al. Electrospray ionization mass spectrometry monitoring of indigo carmine degradation by advanced oxidative processes. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 8, n. 42, p. 1273-1278, 2007.

DELGADO-SABORIT, J. M.; ESTEVE-CANO, V. J. Field comparison of passive sampling versus UV-Photometric analyser to measure surface ozone in a mediterranean área. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 9, p 610-615, 2007.

DERWENT, R. et al. Global ozone concentrations and regional air quality. **Environmental Science and Technology**, v. 36, n. 19, p. 379-382, 2002.

EINFELD, J. H.; PANDIS, S. N. **Atmospheric chemistry and physics**. New York: John Wiley and Sons, 1998.

EUROPEAN ENVIRONMENT AGENCY. Tropospheric ozone in urban in the European Union: the consolidated report. **Topic Report**, n. 8, p. 135-138, 1998.

FAUST, S. D.; ALY, O. M. **Chemistry of water treatment**. 2nd ed. New York: Lewis Publishers, 1998.

FELIX, E. P.; CARDOSO, A. A. Colorimetric determination of ambient ozone using indigo blue droplet. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 17, n. 2, p. 296-301, 2006.

FELIX, E. P. et al. Measurement of ambient ozone using indigo blue coated filters. **Journal of AOAC International**, v. 89, n. 2, p. 480-485, 2006.

FINLAYSON-PITTS, B. J.; PITTS, L. N. Jr. **Atmospheric chemistry: fundamentals and experimental techniques**. New York: John Wiley and Sons, 1986.

GEROSA, G. et al. Estimates of ozone AOT40 from passive sampling in forest sites in South-Western Europe. **Environmental Pollution**, v. 145, n. 3, p. 629-635, 2007.

GRAVANO, E. et al. C. Ozone symptoms in leaves of woody plants in open-top chambers: ultrastructural and physiological characteristics. **Physiologia Plantarum**, v. 121, n. 4, p. 620-633, 2004.

GRØNTOFT, T.; HENRIKSEN, J.; FSEIP, H. M. The humidity dependence of ozone deposition onto a variety of building surfaces. **Atmospheric Environment**, v. 38, n. 1, p. 59-68, 2004.

GROSJEAN, D. et al. Ozone fading of organic colorants: products and mechanism of the reaction of ozone with curcumin. **Environmental Science and Technology**, v. 22, p. 1357-1361, 1988.

GUERRA, J. C. et al. Study on the formation and transport of ozone in relation to the air quality management and vegetation protection in Tenerife (Canary Islands). **Chemosphere**, v. 56, n. 11, p. 1157-1167, 2004.

HAUCKE, G.; SEIDEL, B.; GRANESS, A. The photochemistry of isatin. **Journal of Photochemistry and Photobiology, A: Chemistry**, v. 37, n. 1, p. 139-146, 1987.

JACOB, D. J. Heterogeneous chemistry and tropospheric ozone. **Atmosphere Environmental**, v. 34, p. 2131-2159, 2000.

KETTLE, A. J.; CLARK, B. M.; WINTERBOURN, C. C.; Superoxide converts indigo carmine to isatin sulfonic acid. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 18, p. 18521-18525, 2004.

KLEINDIENST, T. E. et al. Comparison chemiluminescence and ultraviolet ozone monitor responses in the presence of humidity and photochemical pollutants. **Journal of Air and Waste Management Association**, v. 43, n. 3, p. 213-222, 1993.

KLEY, D. et al. Photochemical oxidants: state of the science. **Environmental Pollution**, v. 100, n. 1-3, p. 19-42, 1999.

KOT-WASIK, A. et al. Advances in passive sampling in environmental studies. **Analitica Chimica Acta**, v. 602, n. 2, p. 141-163, 2007.

LARASFRIEND.COM. **SMOG**. 2007. Disponível em:  
<<http://www.larasfriends.com/Smog.html>>. Acesso em: 20 dez. 2010.

LEE, J. D. **Química inorgânica não tão concisa**. 3. ed.  
São Paulo: Edgar Blücher, 1999.

LODGE, J. **Methods of air sampling and analysis**. 3rd ed. Michigan: Lewis Publishers, 1989.

MAWATARI, K. et al. Fluorimetric determination of isatin in human urine and serum by liquid chromatography postcolumn photoirradiation. **Analyst**, v. 126, n. 1, p. 33-36, 2001.

MINIATLÁNTICO. **Purificador de água**. 2010. Disponível em:  
<<http://miniatlantico.page.tl/-Filtragem.htm>>. Acesso em: 20 dez. 2010.

NATIONAL INSTITUTE FOR OCCUPATIONAL SAFETY AND HEALTH. **Pocket guide to chemical hazards**. 2005. Disponível em:  
<<http://www.cdc.gov/niosh/npg/npgd0476.html>>. Acesso em: 05 set. 2010.

NOVAIS, V. L. D. **Ozônio**: aliado e inimigo. São Paulo: Scipione, 1998.

O'NEILL, P. **Environmental chemistry**. 2. ed. Great Britain: Chapman & Hall, 1993

PARRISH, D. D.; FEHSENFELD, F. C. Methods for gas-phase measurements of ozone, ozone precursors and aerosol precursors. **Atmospheric Environment**, v. 34, n. 12, p. 1921-1957, 2000.

PARRISH, D. D. et al. New directions; does pollution increase or decrease tropospheric ozone in winter-spring? **Atmospheric Environment**, v. 33, n. 30, p. 5147-5149, 1999.

PLAISANCE, H. et al. Radial diffuse sampler for determination for 8-h ambient ozone concentrations. **Environmental Pollution**, v. 148, n. 1, p. 1-9, 2007.

RICOZON DESEDORA. **Purificador de ar**. 2010. Disponível em: <<http://www.ricozon.com.br/desodora.htm>>. Acesso em: 20 set. 2010.

RICOZON ARUJA. **Purificador de água**. 2010. Disponível em: <[http://www.ricozon.com.br/f\\_aruja.htm](http://www.ricozon.com.br/f_aruja.htm)>. Acesso em: 20 dez. 2010.

ROCHA, J. C.; ROSA, A. H. ; CARDOSO, A. A. **Introdução a Química Ambiental**, Porto Alegre: Bookman 2004

RIDLEY, B. A.; GRAHEK, F. E.; WALEGA, J. G. A small, high-sensitivity, medium-response ozone detector suitable for measurements from light aircraft. **Journal of Atmospheric Oceanic Technology**, v. 9, p. 142-148, 1992.

SACHDEV, S. L.; LODGE, Lr. J. P.; WEST, P. W. Specific method for the determination of ozone in the atmosphere. **Analytica Chimica Acta**, v. 58, n. 1, p. 141-147, 1972.

SALMON, L. G. et al. Ozone exposure inside museums in the historic central district of Krakow, Poland. **Atmospheric Environment**, v. 34, n. 22, p. 3823-2832, 2000.

SCHEEREN, B. A.; ADEMA, E. H. Monitoring ambient ozone with a passive measurement technique: method, field results and strategy. **Water, Air and Soil Pollution**, v. 91, n. 3-4, p. 335-350, 1996.

SCHURATH, U.; SPEUSER, W.; SCHMIDT, R. Principle and application of a fast sensor atmospheric ozone. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, v. 340, n. 9, p. 544-547, 1991.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. **Química orgânica**. 5. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2005. p. 345-347.

SOUZA, K. A. F. de; FELIX, E. P.; CARDOSO, A. A. Ozônio: um problema analítico e ambiental para o século XXI. **Saneamento Ambiental**, n. 110, p. 36-40, 2004.

STAEHEILN, J.; HOLGNÉ J. Decomposition of ozone in water in the presence of organic solutes acting as promoters and inhibitors of radical chain reactions. **Environmental Science and Technology**, v.19, p. 1206-1213, 1985.

TRAT'BEM. **Hidromassagens e banheiras**. 2010. Disponível em: <[http://www.tratbem.com.br/representacao\\_albacete.html](http://www.tratbem.com.br/representacao_albacete.html)>. Acesso em: 20 dez. 2010.

WAYNE, R. P. **Chemistry of atmosphere**. 3rd ed. New York: Oxford, 2000. p. 775.