

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

BIANCA DO AMARAL

**AVALIAÇÃO DE MÉTODOS DE PRÉ-CONCENTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA
PARA DETERMINAÇÃO DE ATRAZINA E SEUS METABÓLITOS
EMPREGANDO-SE MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS MULTIVARIADOS**

CURITIBA

2014

BIANCA DO AMARAL

**AVALIAÇÃO DE MÉTODOS DE PRÉ-CONCENTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA
PARA DETERMINAÇÃO DE ATRAZINA E SEUS METABÓLITOS
EMPREGANDO-SE MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS MULTIVARIADOS**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Química Analítica, no Curso de Pós-Graduação em Química, Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Noemi Nagata

Co-orientador: Prof. Dr. Patricio G. Peralta-Zamora

CURITIBA

2014

A485a

Amaral, Bianca do

Avaliação de métodos de pré-concretização em fase sólida para determinação de atrazina e seus metabólitos empregando-se métodos espectroscópicos multivariados/ Bianca do Amaral. – Curitiba, 2014.
112f. : il. color. ; 30 cm.

Dissertação - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Exatas, Programa de Pós-graduação em Química, 2014.

Orientador: Noemi Nagata – Co-orientador: Patricio G. Peralta-Zamora.
Bibliografia: p. 97-112.

1. Atrazina. 2. Herbicidas. 3. Análise multivariada. 4. Poliuretanas. 5. Bioquímica. I. Universidade Federal do Paraná. II. Nagata, Noemi. III. Peralta-Zamora, Patricio G. . IV. Título.

CDD: 668.654

TERMO DE APROVAÇÃO

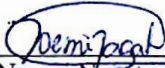
AVALIAÇÃO DE MÉTODOS DE PRÉ-CONCENTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA PARA
DETERMINAÇÃO DE ATRAZINA E SEUS METABÓLITOS EMPREGANDO-SE
MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS MULTIVARIADOS

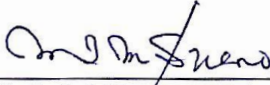
por

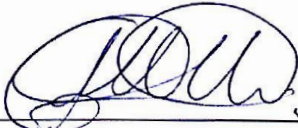
BIANCA DO AMARAL

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre no Programa de Pós-Graduação em Química,
pela Comissão Examinadora composta por:

Orientador:


Profª Drª Noemi Nagata
Dep. de Química – UFPR


Profª Drª Maria Izabel Marétti Silveira Bueno
Instituto de Química – UNICAMP


Prof. Dr. Gilberto Abate
Dep. de Química – UFPR

Curitiba, 11 de março de 2014.

Dedico este trabalho aos meus pais, Catarina e Wilson, pelo amor, exemplo, paciência e motivação em todos os momentos.

Ao meu esposo Tiago por todo amor, pela confiança, paciência, dedicação e por fazer meus dias mais especiais.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família, em especial aos meus pais, Catarina e Wilson, de onde vieram os primeiros incentivos e ensinamentos mais importantes como respeito, dignidade e perseverança e por ajudar, no alcance de suas possibilidades, na realização deste trabalho.

Ao meu marido Tiago pela paciência, apoio, dedicação, compreensão pelos momentos de ausência e amor incondicional em todos os momentos desses onze anos de carinhos compartilhados.

Aos meus queridos orientadores Profa. Dra. Noemi Nagata e Prof. Dr. Patricio G. Peralta-Zamora por me aceitarem de braços abertos, pela dedicação, incentivo, apoio, carinho, confiança em meu trabalho, pelas longas conversas, inúmeros momentos de descontração e ainda, por serem, sobretudo, exemplos de caráter, competência e de pessoas e profissionais a serem seguidos. Muito obrigada!

Ao Prof. Dr. Gilberto Abate pelas valiosas contribuições no meu projeto, na correção do relatório anual, pelas importantes considerações no exame de qualificação e pela disponibilidade e dedicação na correção deste trabalho.

À Profa. Dra. Maria Izabel Maretti Silveira Bueno por aceitar participar da Banca de Defesa e pelas valiosas contribuições.

A todos os amigos do laboratório, especialmente ao grupo TECNOTRATER pelos momentos de discussão, ajuda, companheirismo e pelas boas risadas. Em especial, às minhas amigas Sandritcha e Gi, que me ajudaram com alegria e amizade a trilhar grande parte deste caminho.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram na realização desse trabalho e mais importante que isso, fortaleceram e participaram da construção do conhecimento nesta etapa. Muito Obrigada!

RESUMO

A contaminação de diversos compartimentos ambientais pela aplicação de pesticidas é um fato recorrente devido a necessidade crescente de maximizar a produção agrícola e atender as demandas do crescimento populacional. Dentre os herbicidas mais empregados, a atrazina (ATZ, 2-cloro-4-etilamino-6-isopropilamino-1,3,5-triazina), é usada extensivamente no controle pré e pós-emergente de ervas daninhas em culturas de milho e cana-de-açúcar, entre outras. Em função disso, no presente trabalho foi investigada a viabilidade de dois métodos para a determinação de atrazina. O primeiro método propôs a utilização da espectrofotometria UV associada à Regressão de Mínimos Quadrados Parciais (PLS) para determinação de atrazina na presença de seus principais metabólitos, desetilatrizina (DEA) e desisopropilatrizina (DIA), em águas naturais. A extração em fase sólida (SPE), com cartuchos C18, foi selecionada e otimizada via planejamento fatorial para pré-concentração de ATZ, obtendo-se recuperações próximas a 100% nas condições otimizadas. O modelo multivariado construído utilizou 4 variáveis latentes (explicando 100% da variância da matriz X e 99,61% da variância da matriz Y), com faixa espectral na região do ultravioleta (200-350 nm) e dados alisados em 5 pontos, Recuperações médias de 107, 105 e 93,2% para ATZ, DIA e DEA, respectivamente, foram obtidas para o conjunto de validação externa. O método SPE-UV-PLS foi aplicado em análises de amostras de águas naturais, obtendo-se boas recuperações para ATZ em água de nascente e água mineral (73-120%). As demais amostras de água apresentaram grande efeito de matriz, e, portanto, recuperações acima do esperado foram obtidas devido à presença de grandes quantidades de matéria orgânica. Apesar disso, a metodologia espectrofotométrica multivariada proposta se mostrou simples, rápida e com baixo custo operacional. A segunda metodologia utilizou espumas de poliuretana para adsorção de ATZ e quantificação por espectroscopia de infravermelho com reflectância total atenuada e transformada de Fourier (FTIR-ATR) associada à PLS. Os parâmetros de adsorção otimizados pelo planejamento fatorial foram 250 rpm para agitação, com tempo de 12 h de contato e pH 7,0, sendo a agitação o fator mais significativo para a adsorção de ATZ. O modelo PLS construído utilizou 3 variáveis latentes (explicando 99,98% da variância da matriz X e 78,15% da variância da matriz Y), com faixa espectral completa e primeira derivada dos dados alisados em 25 pontos. A capacidade preditiva do modelo multivariado não foi satisfatória, obtendo-se erro relativo médio de 60% para a concentração de ATZ adsorvida na espuma de PU.

Palavras-chave: Atrazina. Desetilatrizina. Desisopropilatrizina. Calibração multivariada. Espumas de poliuretana.

ABSTRACT

The contamination caused by pesticides application on different environmental matrices is continuous due to maximize agricultural production and to attend the increased population. Among the widely employed herbicides, atrazine (ATZ, 2-chloro-4-ethylamino-6-isopropylamino-1,3,5-triazine), is extensively applied for pre and post-emergent weed control in many crops such as corn and sugar cane, among others. Accordingly, the feasibility of two methods for the determination of atrazine were investigated. The first method proposal is the determination of atrazine in the presence of its major metabolites, deethylatrazine (DEA) and deisopropylatrazine (DIA) in natural waters by UV spectrophotometry associated with Partial Least Squares Regression (PLS). Pre-concentration of ATZ was performed by solid phase extraction (SPE) with C18 cartridges. After optimization by factorial design, recoveries near to 100% was achieved. The multivariate model was built with 4 latent variables (explain 100% of the X matrix variance and 99.61% of the Y matrix variance), smoothing spectral data (200-350 nm) in the ultraviolet region. Mean recoveries were obtained for external validation set of 107, 105 and 93.2% for ATZ, DIA and DEA, respectively. The UV-SPE-PLS method was applied in natural waters analysis and good recoveries for ATZ in spring and mineral waters (73-120%) was obtained. The other water samples showed a large matrix effect and high recoveries due to the presence of large amounts of organic matter. Nevertheless, multivariate spectrophotometric method proposed was simple, fast and low operating cost. The second methodology employed polyurethane foams for ATZ adsorption and quantification by Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Attenuated Total Reflectance (FTIR-ATR) associated with PLS. The adsorption parameters optimized by factorial design were 250 rpm for stirring, 12 h for adsorption and pH 7,0. The stirring was the most significant factor for the adsorption of ATZ. The PLS model was built with 3 latent variables (explain 99.98% of the X matrix variance and 78.15% of the Y matrix variance), with complete spectral range and first derivative with smoothing spectral data (filter width: 25). The multivariate model predictive capability was not satisfactory, resulting in mean relative errors to the concentration of the adsorbed ATZ PU foam of 60%.

Key-words: Atrazine. Deethylatrazine. Deisopropylatrazine. Multivariate calibration. Polyurethane foams.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.	ARTIGOS CIENTÍFICOS PUBLICADOS ENTRE 1990 E 2014 ENVOLVENDO ATRAZINA E A SUA DETERMINAÇÃO POR TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS E ESPECTROSCÓPICAS.....	17
FIGURA 2.	ESTRUTURA QUÍMICA DAS S-TRIAZINAS.....	22
FIGURA 3.	ESTRUTURA QUÍMICA DA ATRAZINA.....	23
FIGURA 4.	ROTAS DE DEGRADAÇÃO DA ATRAZINA.....	25
FIGURA 5.	ETAPAS DO PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA: A) CONDICIONAMENTO; B) APLICAÇÃO DA AMOSTRAS; C) ELUIÇÃO DE INTERFERENTES E D) ELUIÇÃO DO ANALITO.....	29
FIGURA 6.	REGIÕES DO ESPECTRO ELETROMAGNÉTICO E AS ALTERAÇÕES PROMOVIDAS PELA INTERAÇÃO DO ANALITO COM A RADIAÇÃO.....	33
FIGURA 7.	FUNCIONAMENTO ESQUEMÁTICO DE UM SISTEMA DE REFLECTÂNCIA TOTAL ATENUADA (ATR).....	36
FIGURA 8.	ORGANIZAÇÃO DOS DADOS PARA CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA.....	38
FIGURA 9.	PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA OBTENÇÃO DAS MISTURAS DOS CONJUNTOS DE CALIBRAÇÃO E VALIDAÇÃO.....	46
FIGURA 10.	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPE).....	47
FIGURA 11.	REPRESENTAÇÃO DA REAÇÃO QUÍMICA DA FORMAÇÃO DE POLIURETANA.....	51
FIGURA 12.	A) ESPUMAS DE POLIURETANA COM APROXIMADAMENTE 2 MM DE ESPESSURA CORTADA NA FORMA DE UM QUADRADO (10 mm X 10 mm).....	52
FIGURA 13.	COMPORTAMENTO ESPECTROFOTOMÉTRICO UV-VIS PARA ATZ, DIA E DEA ISOLADOS E PRESENTES EM UMA MISTURA NA CONCENTRAÇÃO DE 5,0 mg L ⁻¹	57
FIGURA 14.	COMPORTAMENTO ESPECTRAL DAS 36 MISTURAS SINTÉTICAS DO CONJUNTO DE CALIBRAÇÃO UTILIZADOS NA CONSTRUÇÃO DO MODELO MULTIVARIADO PARA A DETERMINAÇÃO DE ATZ, DIA E DEA.....	58
FIGURA 15.	GRÁFICO DOS VETORES DE REGRESSÃO PARA O MODELO MULTIVARIADO CONSTRUÍDO NA FAIXA DE 190-350 nm.....	59

FIGURA 16.	VALORES DE RMSECV EM FUNÇÃO DO NÚMERO DE VARIÁVEIS LATENTES. INSERIDO: TABELA DE PORCENTAGEM DE VARIÂNCIA CAPTURADA PELO MODELO EM CADA VARIÁVEL LATENTE.....	60
FIGURA 17.	GRÁFICO DO VETOR DE COEFICIENTE DE REGRESSÃO PARA ATZ, DIA E DEA DO MODELO PLSR CONSTRUÍDO.....	61
FIGURA 18.	A) GRÁFICO DOS <i>LOADINGS</i> DAS 4 PRIMEIRAS VLS. COMPORTAMENTO ESPECTRAL NA REGIÃO DO UV DE B) ATZ, C) DIA E D) DEA.....	62
FIGURA 19.	RESÍDUOS DE STUDENT vs. <i>LEVERAGE</i> PARA O MODELO MULTIVARIADO CONSTRUÍDO.....	63
FIGURA 20.	VALOR PREVISTO (CV) VS. VALOR REAL PARA O MODELO DESENVOLVIDO PARA A) ATZ, B) DIA E C) DEA COM 4 VLS.....	64
FIGURA 21.	INTERPRETAÇÃO GEOMÉTRICA DOS EFEITOS SIGNIFICATIVOS DO PLANEJAMENTO 2 ⁴ COM VOLUME DE AMOSTRA FIXO NO NÍVEL (-1) (200 mL).....	69
FIGURA 22.	A) CROMATOGRAMAS PARA OS PADRÕES DE ATZ, DIA E DEA OBTIDOS POR ELUIÇÃO ISOCRÁTICA (H ₂ O:ACN, 50:50 V:V); B) CURVAS ANALÍTICAS CONSTRUÍDAS PARA ATZ ($Y = -0,11 + 7,31C_{ATZ}$, $R=0,999$), DIA ($Y = -0,11 + 9,24C_{DIA}$, $R=0,997$) E DEA ($Y = -0,003 + 3,41C_{DEA}$, $R=0,999$).....	72
FIGURA 23.	COMPORTAMENTO ESPECTROFOTOMÉTRICO UV PARA AMOSTRAS DE ÁGUAS NATURAIS.....	77
FIGURA 24.	COMPORTAMENTO CROMATOGRÁFICO OBTIDO PARA AMOSTRAS DE ÁGUAS NATURAIS EM 220 nm.....	78
FIGURA 25.	ESPECTRO TÍPICO DE FTIR-ATR PARA ESPUMAS DE POLIURETANA OBTIDA COM MÉDIA DE 32 SCANS E RESOLUÇÃO DE 4 cm ⁻¹	79
FIGURA 26.	ESPECTROS DE FTIR-ATR DE ESPUMAS DE PU ADSORVIDAS COM ATZ EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES.....	81
FIGURA 27.	A) GRÁFICO DE SCORES DA PC1 vs. PC2 E B) GRÁFICO DE <i>LOADINGS</i> DA PC2 DA REGIÃO ESPECTRAL COMPREENDIDA ENTRE 1169-722 cm ⁻¹ E 2990-2660 cm ⁻¹ , EMPREGANDO-SE PRÉ-PROCESSAMENTO DETREND, SNV E MSC DE TODAS AS AMOSTRAS.....	82
FIGURA 28.	A) GRÁFICO DE SCORES DA PC1 vs. PC2 E B) GRÁFICO DE <i>LOADINGS</i> DA PC2 DA REGIÃO ESPECTRAL COMPREENDIDA ENTRE 1169-722 cm ⁻¹ E 2990-2660 cm ⁻¹ , EMPREGANDO-SE PRÉ-	

	PROCESSAMENTO DETREND E MSC SEM A AMOSTRA ANÔMALA.....	84
FIGURA 29.	A) CROMATOGRAMAS OBTIDOS POR HPLC-DAD DO SOBRENADANTE APÓS PROCEDIMENTO DE LIMPEZA E B) ESPECTROSFTIR-ATR OBTIDOS DAS ESPUMAS DE POLIURETANA APÓS O TRATAMENTO EM ACN SOB SONICAÇÃO.....	86
FIGURA 30.	A) GRÁFICO DE SCORES DA PC1 vs. PC2 E B) GRÁFICO DE LOADINGS DA PC1 E PC2 EMPREGANDO-SE PRÉ-PROCESSAMENTO DETREND E MSC PARA AVALIAÇÃO DA MODIFICAÇÃO ESTRUTURAL DA ESPUMA DE POLIURETANA.....	87
FIGURA 31.	A) CROMATOGRAMAS PARA O PADRÃO DE ATZ OBTIDO POR ELUIÇÃO ISOCRÁTICA (H ₂ O:ACN, 50:50 v:v); B) CURVAS ANALÍTICAS CONSTRUÍDAS PARA ATZ NA FAIXA DE 9,0 10 ⁻⁴ A 4,0 mg L ⁻¹ (Y= -0,00563 + 8,34C _{ATZ} , R=0,999).....	89
FIGURA 32.	INTERPRETAÇÃO GEOMÉTRICA DOS EFEITOS DE INTERAÇÃO SIGNIFICATIVOS DO PLANEJAMENTO 2 ³ PARA OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DE ADSORÇÃO DE ATZ NA ESPUMA DE PU.....	92
FIGURA 33.	COMPORTAMENTO ESPECTRAL DAS 13 MISTURAS SINTÉTICAS EM DUPLICATA DO CONJUNTO DE CALIBRAÇÃO UTILIZADOS NA CONSTRUÇÃO DO MODELO MULTIVARIADO PARA A DETERMINAÇÃO DE ATZ NAS ESPUMAS DE PU.....	93

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.	CLASSIFICAÇÃO GERAL DE ALGUMAS SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS CONSIDERADAS POLUENTES EMERGENTES.	19
TABELA 2.	COMERCIALIZAÇÃO DE DEFENSIVOS AGRÍCOLAS NO BRASIL NO PERÍODO DE 2010 - 2012.....	21
TABELA 3.	PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E ESTRUTURA MOLECULAR DA ATRAZINA E SEUS PRINCIPAIS METABÓLITOS, DESETILATRAZINA E DESISOPROPILATRAZINA.....	26
TABELA 4.	PRINCIPAIS PARÂMETROS E CONDIÇÕES AVALIADOS DURANTE A SPE DE PESTICIDAS.....	48
TABELA 5.	FATORES E NÍVEIS DO PLANEJAMENTO COMPLETO 2 ⁴ TESTADAS PARA RECUPERAÇÃO DA ATZ EM ÁGUA PURA NA CONCENTRAÇÃO DE 20 µg L ⁻¹ EMPREGANDO CARTUCHOS DE SÍLICA C18.....	49
TABELA 6.	ENSAIOS DE ADSORÇÃO EMPREGANDO ESPUMAS DE POLIURETANA REALIZADOS EM DUPLICATA.....	53
TABELA 7.	FATORES E NÍVEIS DO PLANEJAMENTO COMPLETO 2 ³ TESTADAS PARA ADSORÇÃO DA ATZ EM ÁGUA PURA NA CONCENTRAÇÃO DE 1,0 mg L ⁻¹ EMPREGANDO ESPUMAS DE POLIURETANA.....	54
TABELA 8.	FAIXAS LINEARES, EQUAÇÕES E COEFICIENTES DE CORRELAÇÃO DAS CURVAS ANALÍTICAS INDIVIDUAIS DE ATZ, DIA E DEA.....	57
TABELA 9.	RESULTADOS OBTIDOS E ERROS RELATIVOS PARA DETERMINAÇÃO DE ATZ, DIA E DEA NAS MISTURAS DO CONJUNTO DE VALIDAÇÃO EXTERNA EMPREGANDO O MODELO PLSR DESENVOLVIDO.....	65
TABELA 10.	RESULTADOS OBTIDOS PARA O PLANEJAMENTO 2 ⁴ AVALIANDO OS EFEITOS DO CONDICIONAMENTO, ELUIÇÃO, VOLUME DA AMOSTRA E pH NA RECUPERAÇÃO DE ATZ (20 µg L ⁻¹).....	67
TABELA 11.	EFEITOS PRINCIPAIS E DE INTERAÇÃO ENTRE OS FATORES OTIMIZADOS PELO PLANEJAMENTO FATORIAL 2 ⁴	68
TABELA 12.	RECUPERAÇÃO DE ATRAZINA DE SOLUÇÕES AQUOSAS EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES POR EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA.....	70
TABELA 13.	ANÁLISE DE ÁGUAS NATURAIS PELA METODOLOGIA CROMATOGRÁFICA E PELO MÉTODO MULTIVARIADO PROPOSTO COM OS RESPECTIVOS ERROS RELATIVOS	

	E RECUPERAÇÕES.....	74
TABELA 14.	COMPARAÇÃO ENTRE A CONCENTRAÇÃO PREVISTA PELO MODELO MULTIVARIADO PARA AMOSTRA DE ÁGUA RIO, TORNEIRA E MINERAL COM E SEM FORTIFICAÇÃO COM ATZ E A CONCENTRAÇÃO REAL OBTIDA.....	75
TABELA 15.	AVALIAÇÃO DA RECUPERAÇÃO DE ATZ, DIA E DEA EMPREGANDO ENSAIOS DE <i>CLEAN-UP</i> PARA ÁGUA DE TORNEIRA PELA METODOLOGIA CROMATOGRÁFICA E PELO MÉTODO MULTIVARIADO PROPOSTO.....	76
TABELA 16.	RESULTADOS OBTIDOS PARA O PLANEJAMENTO 2 ³ PARA AVALIAÇÃO DA AGITAÇÃO, TEMPO E PH NA ADSORÇÃO DE ATZ (1,0 mg L ⁻¹) EM ESPUMAS DE POLIURETANA.....	90
TABELA 17.	EFEITOS PRINCIPAIS E DE INTERAÇÃO ENTRE OS FATORES OTIMIZADOS PELO PLANEJAMENTO FATORIAL 2 ³	91
TABELA 18.	QUANTIDADE DE ATZ ADSORVIDA NOS CONJUNTOS DE CALIBRAÇÃO E VALIDAÇÃO.....	94

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACN	–	Acetonitrila
ATZ	–	Atrazina
CP ou PC	–	Componente Principal
CONAMA	–	Conselho Nacional do Meio Ambiente
DAD	–	Detector de arranjo de diodos
DEA	–	Desetilatrazina
DIA	–	Desisopropilatrazina
DPR	–	Desvio Padrão Relativo
FTIR-ATR	–	Espectroscopia de Infravermelho com transformada de Fourier e Reflectância Total Atenuada
GC	–	Cromatografia Gasosa
GC-MS		cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas
HPLC	–	Cromatografia em Fase Líquida de Alta Eficiência
K_{ow}	–	Coefficiente de partição octanol - água
LD	–	Limite de Detecção
LQ	–	Limite de Quantificação
MeOH	–	Metanol
MS	–	Espectrometria de massas
PCA	–	Análise de Componentes Principais
PLSR	–	Regressão de Mínimos Quadrados Parciais
PU	–	Poliuretana
r	–	Coefficiente de Correlação
RMSEC	–	Raiz Quadrada do Erro Médio Quadrático da Calibração
RMSECV	–	Raiz Quadrada do Erro Médio Quadrático da Validação Cruzada
RMSEP	–	Raiz Quadrada do Erro Médio Quadrático da Previsão
SBSE	–	Stir Bar Sortive Extraction (Extração em barra sortiva de agitação)
SPE	–	Extração em fase sólida
USEPA	–	United States Environmental Protection Agency (Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos)

- UV-VIS – Espectrofotometria na região ultravioleta-visível
- VL – Variável Latente
- WHO – World Health Organization (Organização Mundial da Saúde)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1 POLUENTES EMERGENTES.....	18
2.1.1 Pesticidas.....	20
2.1.2 Herbicidas Triazínicos.....	22
2.1.3 Atrazina.....	23
2.1.3.1 Determinação de atrazina e seus derivados em matrizes ambientais.....	27
2.2 EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPE).....	28
2.2.1 Sorventes convencionais.....	30
2.2.2 Poliuretanas.....	31
2.3 MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS DE ANÁLISE.....	33
2.3.1 Espectrofotometria UV-Vis.....	33
2.3.2 Espectrometria de Infravermelho.....	34
2.4 CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA.....	36
3 OBJETIVOS	41
3.1 OBJETIVO GERAL.....	41
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	41
4 MATERIAIS E MÉTODOS	43
4.1 MATERIAIS E REAGENTES.....	43
4.2 EQUIPAMENTOS.....	43
4.3 METODOLOGIA.....	44
4.3.1 Preparo das soluções.....	44
4.3.2 Espectroscopia UV-Vis.....	45
4.3.2.1 Curvas Analíticas.....	45
4.3.2.2 Análise Multivariada.....	45
4.3.2.3 Extração de ATZ empregando fase adsorvente de sílica C18.....	46
4.3.2.4 Análise cromatográfica.....	49
4.3.2.5 Análise de amostras reais.....	49
4.3.2.6 Ensaios de <i>Clean-up</i> para SPE.....	50
4.3.3 Espectroscopia de FTIR-ATR.....	51

4.3.3.1 Síntese das espumas de poliuretana.....	51
4.3.3.2 Preparação e limpeza das espumas de PU.....	52
4.3.3.3 Estudos preliminares.....	52
4.3.3.4 Curva Analítica Cromatográfica.....	53
4.3.3.5 Otimização da extração de atrazina em espuma de PU.....	54
4.3.3.6 Modelo Multivariado.....	54
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	56
5.1 ESPECTROSCOPIA UV-Vis.....	56
5.1.1 Comportamento espectrofotométrico dos analitos.....	56
5.1.2 Método Multivariado.....	58
5.1.3 Extração em Fase Sólida (SPE) de atrazina em solução aquosa.....	66
5.1.4 Análise de Amostras Reais.....	71
5.2 ESPECTROMETRIA DE FTIR-ATR.....	79
5.2.1 Estudos Preliminares.....	79
5.2.2 Avaliação da limpeza das espumas de PU.....	85
5.2.3 Otimização da extração de atrazina em espuma de PU.....	88
5.2.4 Método Multivariado.....	92
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES.....	96
REFERÊNCIAS.....	97

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, a intensificação dos problemas ambientais vinculados às diversas atividades antrópicas tem afirmado um consenso universal quanto à necessidade de se monitorar de forma contínua os diversos compartimentos ambientais sujeitos a contaminação. Dentro deste contexto, destaca-se o interesse pelo monitoramento de micropoluentes orgânicos, sistematicamente lançados no ambiente e não efetivamente removidos ou degradados pelos sistemas convencionais utilizados no tratamento de resíduos industriais, água e esgoto, os quais, contaminam, acumulam e causam um elevado impacto na atividade biológica de organismos não-alvo.

Dentre as atividades antropogênicas de grande impacto ambiental é possível citar a agricultura. O consumo de agrotóxicos tem aumentado em todo o mundo, sendo que no Brasil, nos últimos 40 anos o consumo aumentou 700% enquanto a área agrícola aumentou cerca de 80% no mesmo período.

Em geral, a quantificação destes poluentes em matrizes de relevância ambiental se apresenta bastante complexa, não apenas em função das matrizes envolvidas (ex. solos, águas naturais, esgoto, entre outros), mas também em razão das baixas concentrações apresentadas (frequentemente na faixa de $\mu\text{g L}^{-1}$ a ng L^{-1}) acarretando na habitual incompatibilidade existente entre a concentração das espécies de interesse e a sensibilidade das técnicas instrumentais disponíveis. Em função disso, o desenvolvimento de métodos de extração e pré-concentração se torna de extrema importância, particularmente quando se objetiva a proposta de métodos robustos, rápidos e de baixo consumo de reagentes e solventes.

Os herbicidas triazínicos são utilizados no controle pré e pós-emergente de ervas daninhas em culturas como milho, sorgo e cana-de-açúcar. A atrazina é o herbicida triazínico mais amplamente utilizado e é classificada como um possível desregulador endócrino devido principalmente a sua elevada solubilidade em água e reconhecida persistência e mobilidade no solo, tornando-se cada vez mais presente em matrizes ambientais. Dessa forma, é imprescindível seu monitoramento, bem como, de seus metabólitos que possuem toxicidade similar da atrazina.

O número de trabalhos desenvolvidos com o auxílio de técnicas espectroscópicas para determinação de atrazina é bastante reduzido, sendo

praticamente inexistente a proposta de métodos espectroscópicos assistidos por ferramentas de análise multivariada (ver Figura 1).

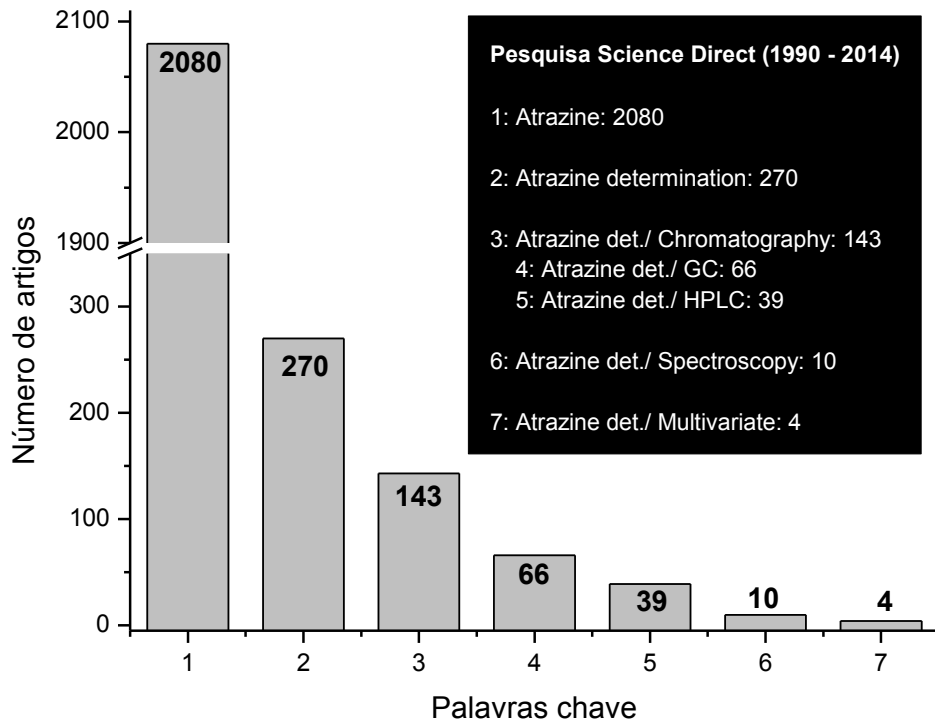


FIGURA 1: ARTIGOS CIENTÍFICOS PUBLICADOS ENTRE 1990 E 2014 ENVOLVENDO ATRAZINA E A SUA DETERMINAÇÃO POR TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS E ESPECTROSCÓPICAS.

A partir dessa perspectiva, o principal objetivo deste trabalho está representado pela avaliação de técnicas de pré-concentração em fase sólida empregando adsorventes clássicos como sílica octadecil (C18), além de verificar a potencialidade na utilização de poliuretana para determinação de atrazina e seus principais metabólitos, desetilatrazina e desisopropilatrazina, por meio de técnicas espectroscópicas associadas a ferramentas quimiométricas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. POLUENTES ORGÂNICOS EMERGENTES

Nas últimas décadas, a ocorrência micropoluentes no ambiente se tornou um problema mundial, basicamente em função das inúmeras atividades antrópicas contribuírem com a contaminação de praticamente todos os compartimentos ambientais (GAVRILESCU *et al*, 2014 ; TIJANI *et al*, 2013; SILVA e COLLINS, 2011; COMERTON *et al*, 2009; GHISELLI e JARDIM, 2007).

O termo “poluentes orgânicos emergentes” (POE) ou simplesmente “contaminantes emergentes” é empregado para definir compostos com significativa distribuição e concentração no ambiente (usualmente na faixa de $\mu\text{g L}^{-1}$ a ng L^{-1}), negligenciados até então, com potenciais efeitos deletérios à saúde dos ecossistemas e, ainda, humana (COMERTON *et al*, 2009; STUART *et al*, 2012).

O lançamento ininterrupto de produtos utilizados em grande escala na agricultura e indústria além de uma variedade de compostos lançados diariamente no esgoto doméstico são os principais fatores responsáveis pela ocorrência de POEs no ambiente. Ainda, esses poluentes são apenas parcialmente removidos pelos processos convencionais utilizados no tratamento de esgoto, efluentes industriais e na potabilização da água, sua presença é relativamente comum em águas destinadas ao consumo (BARONTI *et al*, 2000; MUZ *et al*, 2012; PAUWELS *et al*, 2008; SERVOS *et al*, 2007). A Tabela 1 mostra alguns dos principais poluentes emergentes que abrangem desde fármacos de diversas classes, produtos de higiene pessoal, aditivos industriais, pesticidas e recentemente compostos classificados como obesógenos (compostos que aceleram a obesidade). Uma vez lançados no meio, o destino e efeitos potenciais dependem das suas características físico-químicas e das propriedades dos compartimentos ambientais nos quais estão associados. Alguns trabalhos na literatura já relataram diversos efeitos atrelados à: resistência bacteriana e recombinações de bactérias devido a grandes quantidades de antibióticos no meio ambiente (LAHT *et al*, 2014; BAQUERO *et al*, 2008), interferência no sistema endócrino, mimetizando ou

bloqueando a resposta de hormônios (GHISELLI e JARDIM, 2007; LINTELMANN *et al*, 2003) ou ainda apresentando efeito genotóxicos (LIU *et al*, 2014; PANDEY *et al*, 2014).

TABELA 1: CLASSIFICAÇÃO GERAL DE ALGUMAS SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS CONSIDERADAS POLUENTES EMERGENTES.

Classe	Exemplos
Produtos farmacêuticos	
Antibióticos	Sulfametoxazol, trimetoprima, eritromicina, tetraciclina, ciprofloxacina
Analgésicos e anti-inflamatórios	Ácido acetilsalicílico, codeína, diclofenaco, ibuprofeno, paracetamol
Drogas de uso psiquiátrico	Diazepam, fluoxetina, paroxetina
Reguladores lipídicos	Ácido clofíbrico, benzafibrato, genfibrozila
β -bloqueadores	Propranolol, atenolol, timolol
Estimulantes	Cafeína
Esteróides e hormônios	
Naturais	Estrona (E1), 17- β -estradiol (E2), estriol (E3), progesterona
Sintéticos	17- α -etinilestradiol (EE2), dietilestilbestrol
Produtos de higiene pessoal	
Fragrâncias	Almíscares policíclicos
Repelente de insetos	N,N-dietil-metatoluamida (DEET)
Protetores solares	Benzofenona, metoxicinamato, parabenos
Surfactantes	Alquilfenol, alquilfenol etoxilados e carboxilados
Antissépticos	Triclosan
Retardantes de chama	Difeniléter polibromado (PBDE)
Aditivos industriais	EDTA, ácido nitriloacético, aromáticos sulfonados
Pesticidas	Herbicidas triazínicos, 2,4-D, DDT, diuron, carbaril, aldrin, endrin, malation, propiconazol, linuron
Hidrocarbonetos poliaromáticos (HPAs)	Antraceno, naftaleno, benzo[a]pireno, pireno, fluorantreno, fenantreno
Metais pesados	Cádmio, chumbo, mercúrio, zinco
Plastificantes	Dietilftalatos, dibutilftalatos, bisfenol-A
Obesógenos	tribultina, bisphenol A, ftalatos, organotinas,

Fonte: BILA e DEZOTTI, 2007; MONPELAT *et al*, 2009; SILVA e COLLINS, 2011; BASILE *et al*, 2011; STUART *et al*, 2012; RODIL *et al*, 2012; LAPWORTH *et al*, 2012; FISCHER *et al*, 2012; GARCÍA-MAYOR *et al*, 2012; GRACELI *et al*, 2013; RIU *et al*, 2014.

É importante salientar que a maioria dos contaminantes deste grupo não dispõe de regimentos específicos para controle e monitoramento ambiental. A regulamentação futura depende diretamente da pesquisa a respeito dos efeitos deletérios potenciais provocados no meio hídrico além do monitoramento da sua ocorrência no meio ambiente (LAPWORTH *et al*, 2012; FARRÉ *et al*, 2008; LINTELMANN *et al*, 2003).

2.1.1. Pesticidas

A aplicação de substâncias químicas com a finalidade de maximizar a produção agrícola sempre esteve atrelada a crescente necessidade de garantir produtos alimentícios para a população. Os pesticidas constituem uma forma poderosa para prevenir e controlar espécies indesejáveis na agricultura, usualmente interferindo no seu processo reprodutivo. Esta classe engloba inseticidas, fungicidas, herbicidas, acaricidas, entre outros que, além da agricultura, são utilizados com outras finalidades como, por exemplo, na preservação da madeira, como desinfetante e ainda uso doméstico (PINTO *et al*, 2010; BILA e DEZOTTI, 2007).

De acordo com a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA), o termo "*pesticides*" é um termo geral que define qualquer substância ou mistura de substâncias destinadas para prevenir, destruir, repelir ou mitigar qualquer praga. Uma vez que o termo pesticidas é genérico, a Lei Federal 7.802, de 11 de Julho de 1989 regulamentada através do Decreto 98.816, no seu Artigo 2º, Inciso I, define, mais especificamente, o termo agrotóxicos como sendo: "Os produtos e os agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos além de substâncias e produtos, empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento".

O consumo de pesticidas a fim de garantir boa produtividade agrícola e o retorno econômico é bastante significativo no cultivo de soja, milho, cana-de-açúcar entre outros, resultando em um consumo mundial de cerca de 2,4 milhões de toneladas de pesticidas no ano de 2007 de acordo com estimativas de mercado realizados pela USEPA. O Brasil ocupa lugar de destaque no consumo de agrotóxicos segundo o Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola (SINDAG), sendo o segundo maior mercado do mundo, atrás apenas dos Estados Unidos. Em 2012, um total de 346,6 mil toneladas de defensivos (considerando apenas o princípio ativo) foram aplicados nas lavouras do país, em média, 380 gramas de agrotóxicos por tonelada de produto (Tabela 2).

TABELA 2: COMERCIALIZAÇÃO DE DEFENSIVOS AGRÍCOLAS NO BRASIL NO PERÍODO DE 2010 - 2012.

Classes	Produto comercial (1000 t)			Ingrediente ativo (1000 t)		
	2010	2011	2012	2010	2011	2012
Herbicidas	402,1	401,6	469,7	189,5	188,7	214,2
Fungicidas	91,4	109,4	96,9	55,6	56,9	37,8
Inseticidas	141,0	142,1	181,1	59,2	61,2	57,2
Acaricidas	11,8	9,2	9,98	7,27	4,31	4,09
Outras	62,4	68,2	65,5	30,9	33,9	33,2
Total	708,6	730,6	823,2	342,6	345,0	346,6

Fonte: Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola (SINDAG), 2012.

Em virtude do manejo muitas vezes indevido e da ampla aplicação dos defensivos agrícolas para controle de pragas em diversas culturas, a contaminação de vários compartimentos ambientais devido a permanência dos resíduos de pesticidas por longos períodos de tempo é uma realidade. Muitos estudos têm comprovado a presença de uma gama de pesticidas em corpos hídricos como lagos (CUI *et al*, 2013), rios (BONANSEA *et al*, 2013; SEGURA *et al*, 2011; MALDANER e JARDIM, 2012; ROLDÁN-PIJUÁN *et al*, 2013; GERVAIS *et al*, 2008) e águas subterrâneas (ZHOU *et al*, 2009; DUJAKOVIĆ *et al*, 2010).

Os pesticidas mais empregados pertencem à classe dos herbicidas (214,2 mil toneladas de herbicidas aplicados em 2012), que são destinados a eliminar ou ainda impedir o crescimento de ervas daninhas que prejudicam o crescimento de plantas de uma lavoura. A ampla utilização desta classe se deve, provavelmente, a variedade de produtos disponíveis comercialmente, estando entre os principais grupos as benzonitrilas, cloracetamidas, derivados da uréia, dinitroanilinas, fenoxiácidos, tiocarbamatos e triazinas (AMADORI, 2013b).

2.1.2. Herbicidas Triazínicos

Os herbicidas triazínicos são um grupo de substâncias que têm sido extensivamente empregados como herbicidas seletivos no controle pré e pós-emergente de ervas daninhas em muitas culturas como as de milho, sorgo, cana-de-açúcar, abacaxi entre outras (GARPELLINI *et al*, 2007; WU *et al*, 2012). São derivados das s-triazinas, anéis heterocíclicos de seis membros onde os átomos de nitrogênio estão simetricamente localizados (Figura 2). As principais características físico-químicas deste grupo de herbicidas são definidas basicamente pelas diferentes substituições na posição 2 (R1: -Cl, -SCH₃, -OCH₃) uma vez que as posições 4 e 6 geralmente são ocupadas por grupos amino substituídos (PACÁKOVÁ *et al*, 1996).

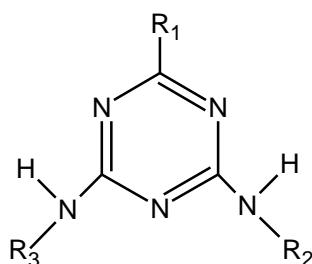


FIGURA 2: ESTRUTURA QUÍMICA DAS S-TRIAZINAS.

A atividade biológica dos herbicidas triazínicos tem como mecanismo de ação a inibição da fotossíntese em todos os organismos com fotossistema envolvendo oxigênio, cessando a produção de adenosina trifosfato (ATP). O modo de atuação se

dá basicamente no bloqueio do transporte de elétrons: as moléculas de herbicidas se ligam aos sistemas carregadores de elétrons presentes no fotossistema II situados na membrana do cloroplasto (plastoquinona, subunidade D1), inibindo o crescimento da planta daninha (LEBARON *et al*, 2008; CHRISTOFFOLETI *et al*, 2008).

2.1.3. Atrazina

Dentro da classe dos herbicidas triazínicos, a atrazina (ATZ, 2-cloro-4-etilamino-6-isopropilamino-1,3,5-triazina) (Figura 3), CAS N° 1912-24-9, ocupa lugar de destaque no cenário de poluição ambiental. Comercializada pela primeira vez no final da década de 50, está entre os defensivos agrícolas mais detectados em águas subterrâneas (GRAYMORE *et al*, 2001). Segundo dados do programa de monitoramento de poluentes orgânicos da Agência Ambiental do Reino Unido (STUART *et al*, 2012), a atrazina ocupa a primeira colocação de um ranking dos 30 contaminantes emergentes mais frequentemente detectados em águas subterrâneas.

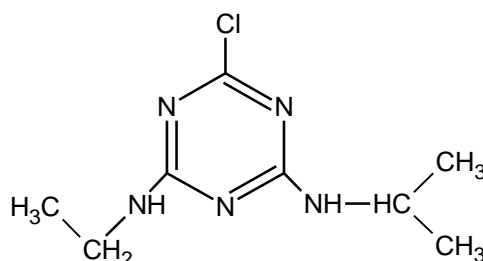


FIGURA 3: ESTRUTURA QUÍMICA DA ATRAZINA

De acordo com a resolução CONAMA 357 de 2005 complementada pela Resolução 430/2011, o valor máximo de atrazina permitido em águas destinadas ao abastecimento para o consumo humano é de $2,0 \mu\text{g L}^{-1}$, valor este similar com a legislação dos Estados Unidos ($3,0 \mu\text{g L}^{-1}$). A Comunidade Europeia, entretanto, possui legislação mais restritiva, estabelecendo em $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ a concentração máxima de qualquer pesticida em águas destinadas ao consumo humano. Apesar disso, a atrazina

ainda tem sido detectada em águas naturais em níveis superiores aos limites máximos estipulados na União Europeia, o que levou alguns países como França, Espanha, Dinamarca, Alemanha, Finlândia, Áustria e Itália a proibição deste herbicida (DEB, 2006).

A ATZ é considerada por alguns autores como um potente interferente endócrino (*EDC*, do termo em inglês "*endocrine disruptor compound*") definido comumente como substância capaz de interferir no funcionamento natural do sistema endócrino de espécies animais (GHISELLI e JARDIM, 2007). Tais efeitos deletérios surgem sob exposição crônica dos organismos em concentrações inferiores às legisladas, alterando características sexuais de peixes, anfíbios e répteis (HAYES *et al*, 2011; ZAYA *et al*, 2011; GRAYMORE *et al*, 2001) além de potenciais efeitos na saúde humana (CRAGIN *et al*, 2011; GAMMON *et al*, 2005; FAN *et al*, 2007; FREEMAN *et al*, 2011). Mnif e colaboradores (2011) publicaram uma revisão sobre os principais pesticidas classificados como interferentes endócrinos e seus efeitos. Dentre os efeitos relatados para atrazina estão a inibição do androgênio (esteróide hormonal responsável pelo desenvolvimento das características sexuais secundárias masculinas), indução da atividade da aromatase (aumentando conseqüentemente a produção de estrogênio) e danos às glândulas adrenais além de redução de metabolismo de esteroides hormonais.

Além da comprovada presença e toxicidade da ATZ, uma vez aplicada, a atrazina pode sofrer os seguintes processos físico-químicos e biológicos: a) volatilização e deriva sendo transportado para a atmosfera; b) escoamento superficial e lixiviação contaminando o ambiente aquático; c) adsorção, interagindo com os diversos componentes do solo permanecendo retidos e ainda, d) sofrer degradação e decomposição (BARCELÓ e HENNION, 1997). A degradação eminente da ATZ ocorre por processos bióticos ou abióticos, tais como, fotólise, hidrólise, biodegradação, entre outros. Os principais produtos de degradação são a desetilatrizona (DEA) e desisopropilatrizona (DIA) gerados por um processo de dealquilação microbiológica, sendo considerados tão tóxicos quanto a ATZ, e a hidroxiatrizona (HA), gerada a partir de uma hidroxilação. Os metabólitos DEA e DIA podem sofrer hidroxilação e a HA, N-dealquilação, resultando, neste caso, nos metabólitos desetilhidroxiatrizona (HDEA) e deisopropilhidroxiatrizona (HDIA) (LOSS e NIESSNER, 1999). A principal rota de

degradação da ATZ e seus subprodutos é mostrada na Figura 4 (UDIKOVIĆ-KOLIĆ *et al*, 2012; SCRIBNER *et al*, 2000; BARCELÓ e HENNION, 1997).

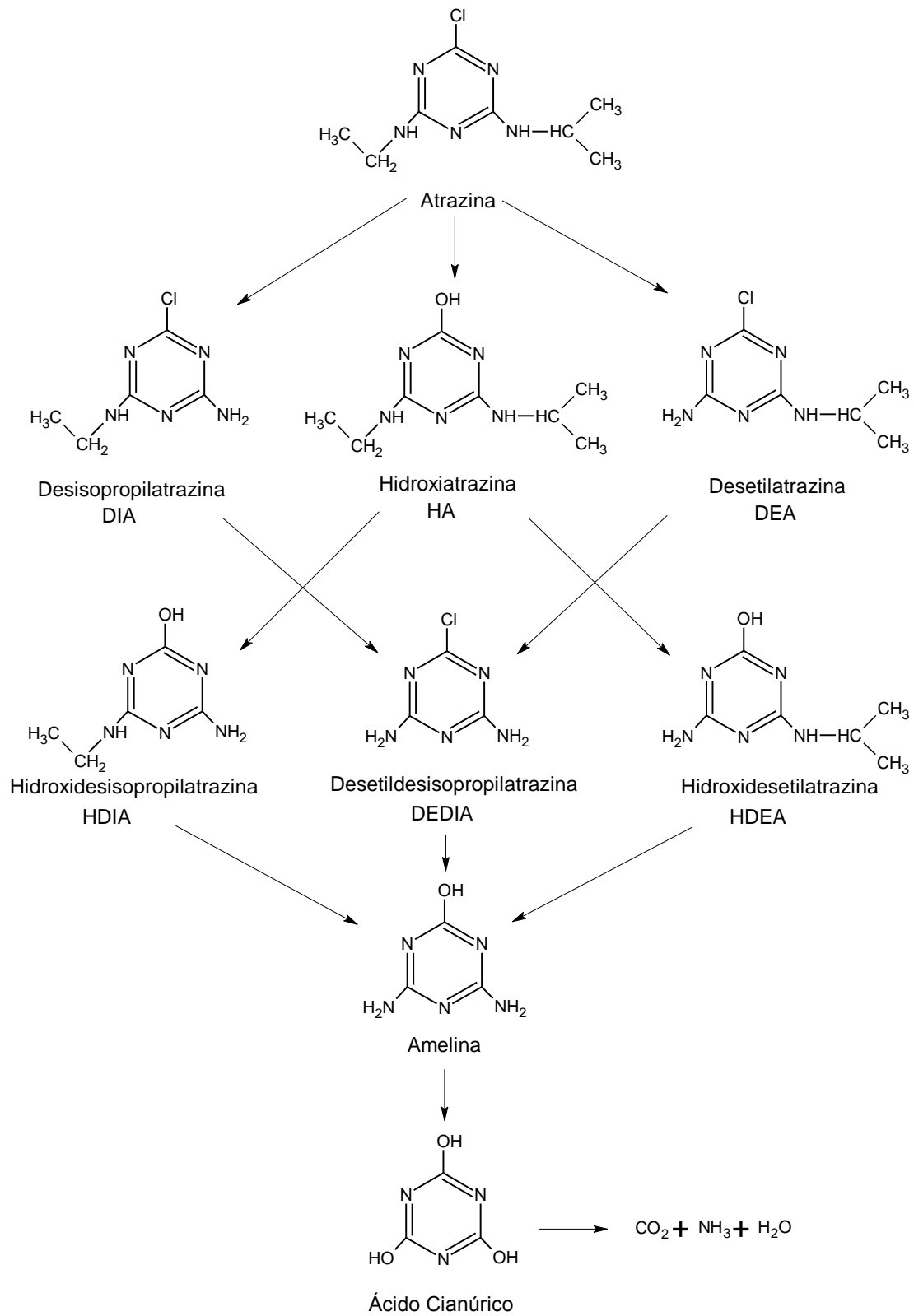


FIGURA 4: ROTAS DE DEGRADAÇÃO DA ATRAZINA. (ADAPTADO DE SCRIBNER *et al*, 2000)

A ATZ é um sólido incolor, com ponto de fusão em 175 °C. Outras propriedades físico-químicas da atrazina e de seus principais metabólitos que interferem diretamente no comportamento no ambiente são listadas na Tabela 3.

TABELA 3: PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E ESTRUTURA MOLECULAR DA ATRAZINA E SEUS PRINCIPAIS METABÓLITOS, DESETILATRAZINA E DESISOPROPILATRAZINA.

Estrutura	Massa molar (g mol ⁻¹)	Solubilidade em água (mg L ⁻¹)	pKa	Log K _{ow}	P vapor (mPa) à 20°C
ATZ	215,68	33	1,68-1,71	2,20-2,70	0,04
DEA	187,68	3200	1,30-1,65	1,52	-
DIA	173,68	670	1,30-1,58	1,13	-

Fonte: LOOS e NIESSNER, 1999; PACÁKOVÁ *et al*, 1996.

O processo de degradação da atrazina aumenta a solubilidade e polaridade já que os novos compostos formados possuem menor número de átomos de carbono em suas estruturas. A ATZ possui solubilidade máxima de 33 mg L⁻¹ enquanto para DEA (perda de dois átomos de carbono) é de 670 mg L⁻¹ e DIA (perda de três átomos de carbono) é de 3200 mg L⁻¹. Com o aumento da polaridade, os metabólitos apresentam maior mobilidade que a ATZ nos compartimentos ambientais. Outro parâmetro relacionado com a solubilidade é o coeficiente de partição octanol-água (log K_{ow}) que indica a tendência de adsorção do composto orgânico ao solo. Valores de log K_{ow} acima de 3 implicam em uma forte interação do composto orgânico com o solo levando, geralmente, a sua acumulação (SCRIBNER *et al*, 2000). Com base nisso, observa-se que a ATZ e principalmente seus metabólitos, não tendem a permanecer adsorvidos no solo, o que justifica a ocorrência e detecção destas espécies em águas naturais. Um estudo sobre o destino e transporte da atrazina dentro da zona costeira no sudeste de Porto Rico, por exemplo, detectou maiores taxas de DEA que ATZ em águas subterrâneas da região (46% e 32% respectivamente). A concentração de DIA encontrada foi abaixo do limite de detecção da técnica (cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas, GC-MS). Os autores atribuíram-na às relativas baixas taxas de formação de DIA quando comparado com DEA (POTTER *et al*, 2013).

2.1.3.1. Determinação de atrazina e seus derivados em matrizes ambientais

O desenvolvimento de métodos analíticos robustos e confiáveis para a determinação de compostos triazínicos em matrizes ambientais exige grande seletividade analítica e baixos limites de detecção, o que, na maioria dos casos, somente pode ser alcançada com a utilização de técnicas cromatográficas em fase gasosa (JIANG *et al*, 2005; SABIN *et al*, 2009; MIN *et al*, 2008; CHERTA *et al*, 2012; BONANSEA *et al*, 2013) e em fase líquida (CARABIAS-MARTÍNEZ *et al*, 2002; PENG *et al*, 2007; SCHELLIN *et al*, 2009; DUJAKOVIĆ *et al*, 2010; BENVENUTO *et al*, 2010; MOU *et al*, 2011; ZHAO *et al*, 2011; WU *et al*, 2012; KUKLENYIK *et al*, 2012; CAPPELINI *et al*, 2012; AMADORI *et al*, 2013a) geralmente associadas a etapas de pré-concentração.

Nesse sentido, Bonansea e colaboradores (2013) desenvolveram uma metodologia que combina as técnicas de SPE e SPME para a concentração e quantificação de uma série de pesticidas, dentre eles a atrazina, por meio de GC-MS. As amostras de água da bacia do Rio Suquía (Córdoba-Argentina) foram analisadas temporal e espacialmente e os dados revelaram que a atrazina, está presente em maior concentração em regiões agrícolas chegando a um máximo de 433,9 ng L⁻¹.

Outro trabalho relacionado é o realizado por Min e colaboradores (2008), onde desenvolveram um método para determinação de ATZ e seus principais metabólitos, DIA e DEA, em amostras de água e solo da província de Jilin (China) empregando extração em fase sólida (SPE) com nanotubos de carbono e GC-MS. Nas condições otimizadas, amplas faixas lineares foram obtidas para os três analitos e baixos limites de detecção foram observados (0,2 - 20 µg L⁻¹, 0,02 - 0,05 µg L⁻¹ para água e 2 - 200 µg kg⁻¹, 0,3 - 1,0 µg kg⁻¹ para solo, respectivamente). Boas taxas de recuperação foram obtidas para amostras fortificadas sendo de 85,71 - 109,7% para água e 72,27 - 88,74% para solo. Os autores ainda aplicaram o método desenvolvido na análise de amostras reais suscetíveis a contaminação por atrazina. Na maioria das amostras, constatou-se somente a presença de ATZ, que apresentou maiores concentrações em amostras de água (1,82 a 10,8 µg L⁻¹), valores superiores aos regulamentados descritos anteriormente.

Apesar das técnicas cromatográficas apresentarem baixos valores de limite de detecção e seletividade, elas apresentam como principais desvantagens o fato de serem trabalhosas e serem relativamente dispendiosas quando se comparam com outras técnicas de análise como as técnicas espectroscópicas. Procedimentos com maior simplicidade, rapidez e de menor custo podem ser desenvolvidos com base nas técnicas espectroscópicas, muitas vezes com limites de quantificação compatíveis com a concentração desses analitos, assim como seletividade suficiente para análise de matrizes ambientais.

Baseado nisso, Tiwari e colaboradores (2013) desenvolveram um método espectrofotométrico para determinação de atrazina a partir da sua derivatização pela reação de Konig (na presença de piridina ocorre a formação de um sal quaternário, que por sua vez, forma aldeído glutacônico na presença de base; subsequentemente é acoplado com 4-aminoacetanilida em meio micelar de surfactante aniônico - dodecil sulfato de sódio). O produto de derivatização apresenta coloração amarelo-alaranjado e foi concentrado em um cartucho de C18, cuja leitura espectrofotométrica foi realizada em 460 nm. A faixa linear foi obtida entre 0,012–0,12 $\mu\text{g mL}^{-1}$ com limite de detecção igual a 0,001 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e foi aplicado com boas taxas de recuperação em amostras biológicas e ambientais (96-101%).

Independentemente da técnica escolhida, a determinação de herbicidas triazínicos, de maneira geral, exige o emprego de métodos de preparação de amostras. A extração líquido-líquido (*liquid-liquid extraction*, LLE) foi, durante muitos anos, a técnica mais empregada para esta classe de compostos sendo ainda reportada em alguns estudos (LI *et al*, 2013). Entretanto, a substituição por extração em fase sólida (SPE) é evidente, uma vez que permitem significativos fatores de pré-concentração, com o uso de pequenos volumes de solventes orgânicos.

2.2. EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA

A SPE é um método já consolidado sendo uma das mais populares ferramentas de preparação de amostra principalmente por apresentar grande versatilidade e seletividade. Uma das razões para o sucesso e popularização do

método está diretamente relacionada à preocupação com a minimização do longo tempo de extração e principalmente do volume de solventes empregados nas extrações líquido-líquido, procedimento comumente utilizados nos anos anteriores ao surgimento dos primeiros cartuchos disponíveis (década de 80), além da possibilidade de determinar uma grande diversidade de analitos (HENNION, 1999; LIŠKA, 2000).

Basicamente se trata de um método de separação líquido-sólido, baseado nos mecanismos de separação da cromatografia líquida de baixa pressão (cromatografia clássica). A forma básica de funcionamento segue, sucintamente, as etapas de condicionamento (ativação do material existente dentro do cartucho), passagem da amostra sendo os analitos retidos no material adsorvente (pode ocorrer retenção de interferentes dependendo da natureza de interação dos mesmos e a fase estacionária), remoção de interferentes e eluição dos analitos (Figura 5). Dentre os principais empregos da SPE se destacam a pré-concentração ou enriquecimento do analito, e o isolamento do analito da matriz (*clean-up*) (LANÇAS, 2009).

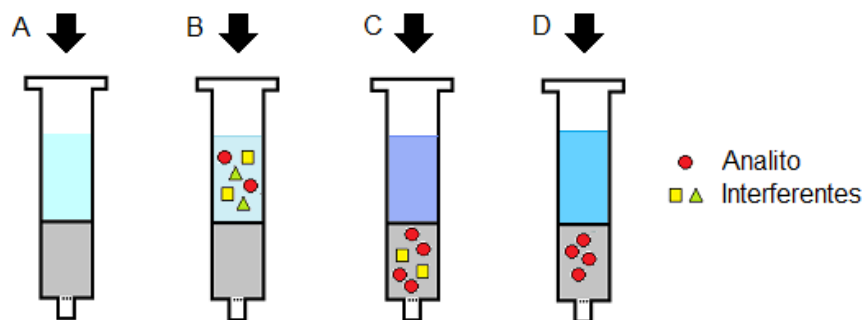


FIGURA 5: ETAPAS DO PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA: A) CONDICIONAMENTO; B) APLICAÇÃO DA AMOSTRAS; C) ELUIÇÃO DE INTERFERENTES E D) ELUIÇÃO DO ANALITO.

No estudo desenvolvido por Carabias-Martínez e colaboradores (2002) para a pré-concentração de três herbicidas amplamente empregados, atrazina, terbutrina e clorotoluron, além de seus produtos de degradação, três tipos de fase adsorventes foram avaliadas: sílica C18 e as fases poliméricas Oasis HLB e LiChrolut EN (sorventes hidrofílico e hidrofóbico, respectivamente). Para 100 mL de amostra de água deionizada fortificadas com $20 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada analito, as melhores taxas de recuperação foram obtidas empregando os cartuchos LiChrolut (82 a 107%). As demais

fases avaliadas mostraram baixas recuperações para os analitos mais polares estudados. Além disso, recuperações semelhantes foram obtidas quando o método SPE desenvolvido foi empregado em análises de amostras de água natural (subterrânea e rio).

Dessa forma, a seleção da fase sólida se encontra entre um dos principais critérios no desenvolvimento de metodologias baseadas em SPE que segue, na maioria dos casos, as mesmas regras empregadas na cromatografia em fase líquida. Inúmeros sorventes podem ser empregados, tais como, carvão ativado (EL-SHEIKH *et al*, 2008) sílica octadecil (C18) (MCLAUGHLIN e JOHNSON, 1997; PINTO e JARDIM, 2000; DORES *et al*, 2006; BRUZZONITI *et al*, 2006), nanotubos de carbono (MIN *et al*, 2008; AL-DEGS *et al*, 2009) e fases poliméricas (poli(divinilbenzeno-co-N-vinilpirrolidina)) (ARMAS *et al*, 2007; RODIL *et al*, 2009), polímero de impressão molecular (WANG *et al*, 2013) e poliuretanas (PORTUGAL *et al*, 2008)).

2.2.1. Sorventes convencionais

Os adsorvente convencionais como carvão ativo e C18 já foram bastante explorados na literatura (LIŠKA, 2000; JEANNOT *et al*, 2002; TOGOLA e BUDZINSKI, 2007; MALDANER e JARDIM, 2012). O carvão ativo teve grande importância no desenvolvimento da extração em fase sólida, já que, comumente empregado em filtros, promoveu o início do interesse por parte dos pesquisadores para o emprego de fase sólida como meio de enriquecimento de elementos traço a partir de amostras aquosas (LIŠKA, 2000). Naturalmente, muitos outros materiais foram desenvolvidos e aplicados na técnica de SPE sendo que, nos últimos anos.

A fase de octadecilsilano quimicamente ligada à sílica, C18 ($\equiv\text{Si}-(\text{CH}_2)_{17}-\text{CH}_3$), é uma das fases mais comuns aplicadas atualmente já que possui um dos mais amplos espectros de retenção de analitos orgânicos em matrizes aquosas dentre os adsorventes de sílica ligados. O principal mecanismo de separação dos analitos é a partição por meio de interações apolares do tipo van der Waals. Particularmente, em análises ambientais, sorventes hidrofóbicos não-seletivos, como C18, tem sido um dos mais empregados (CALDAS *et al*, 2011).

Alguns trabalhos na literatura já empregaram C18 para pré-concentração de ATZ, principalmente na presença de outros pesticidas (MCLAUGHLIN e JOHNSON, 1997; PINTO e JARDIM, 2000; HUANG *et al*, 2003; EL-SHEIKH *et al*, 2008; ZHOU *et al*, 2006; SCHELLIN *et al*, 2009; MORAIS, 2009; CAPPELINI, 2008).

Um exemplo é o trabalho de Bruzzoniti e colaboradores (2006) em que um método de SPE empregando C18 foi avaliado para a determinação simultânea via GC-MS de herbicidas pertencentes a diversas classes, tais como, carbamatos, triazinas, dinitroanilinas e cloroacetamidas. Com os parâmetros instrumentais otimizados, boas recuperações foram obtidas (79-99%) e DPR inferiores a 12%. É interessante ressaltar que para aumentar a recuperação de desetilatrizona frente aos demais herbicidas analisados, uma fase de carvão grafítico não poroso foi acoplada a fase de C18. O método desenvolvido foi aplicado com sucesso em amostras reais de água potável coletada no rio Po (Torino, Itália).

2.2.2. Poliuretanas

As poliuretanas (PUs) são polímeros que apresentam forma de espuma e podem ser aplicadas na extração de compostos de relevância ambiental como metais (SANTOS *et al*, 2009; EL-SHAHAWI *et al*, 2011), pesticidas (PORTUGAL *et al*, 2010; NENG *et al*, 2007), entre outros (DMITRIENKO *et al*, 2002; KUZ'MINA *et al*, 2008; MHLANGA *et al*, 2007). Estes polímeros são produzidos por meio de uma reação, relativamente simples, de poli-isocianato com polióis na presença de agentes de expansão, catalisadores específicos e surfactantes (PORTUGAL *et al*, 2010; NENG *et al*, 2007). O material sintetizado é muito versátil já que a natureza química, a funcionalidade, flexibilidade, estabilidade e suas propriedades em geral, podem ser moduladas através da reação. Ainda existe a possibilidade de inserir materiais sólidos e funcionalizar a estrutura da espuma (KUBOTA *et al*, 2013; ABDEL AZEEM *et al*, 2010).

Assim como mencionado, estes materiais têm atraído grande interesse para procedimentos de extração, como no trabalho desenvolvido por Moawed e El-Shahat (2014) que sintetizaram uma espuma de poliuretana polihidroxilada para a extração de

herbicidas triazínicos (atrazina, prometrina e terbutrina) de águas naturais utilizando GC-MS-MS, com boas taxas de recuperação para prometrina e terbutrina (84-96%) e para atrazina recuperações próximas a 50%.

O emprego de espumas de poliuretana em extração em barra sortiva (*stir bar*, SBSE) também tem ganhado destaque no cenário de desenvolvimento de novas metodologias de extração. Portugal e colaboradores (2008), por exemplo, propuseram a extração de herbicidas triazínicos empregando uma barra magnética de teflon recoberta com poliuretana em diferentes formulações. Com o procedimento de extração otimizado (6h, 1250rpm, ausência de sal e 5% de MeOH) e a melhor formulação da espuma de poliuretana selecionada, a dessorção dos analitos (*back extraction*) foi realizada em banho ultrassônico com metanol por 20 min e determinados em HPLC-DAD. A recuperação dos analitos ocorreu na faixa de 20,4 a 62,0% e apresentou limites de detecção entre 0,1 e 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Diante do advento de métodos de extração empregando este tipo de material, a utilização de técnicas espectroscópicas para a quantificação dos compostos de interesse diretamente no adsorvente, especialmente espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier no módulo de refletância total atenuada (FTIR-ATR), se mostra uma excelente alternativa, em razão de diminuir o número de etapas do procedimento e por ser um dos principais métodos de caracterização das espumas (ZHANG *et al*, 2008; OKA *et al*, 2007). Assim, a extração de um determinado analito pode ser monitorada em função da modificação no perfil e/ou intensidade de bandas características da poliuretana.

Apesar dos métodos espectroscópicos oferecem vantagens de ordem prática, geralmente relacionada com sua alta sensibilidade, versatilidade e baixo custo, infelizmente, a baixa seletividade da técnica limita muitas aplicações ambientais, basicamente atribuída a elevada interferência espectral. Tais problemas de interferência podem ser contornados com o emprego de ferramentas de calibração multivariada.

2.3 MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS DE ANÁLISE

Comumente chamados de métodos ópticos, os métodos espectroscópicos são amplamente empregados em química analítica para determinação qualitativa e quantitativa de espécies orgânicas e inorgânicas em diversas matrizes, além de possibilitar a elucidação estrutural. São baseados na interação dos diferentes tipos de radiação com a matéria e classificados de acordo com a região do espectro eletromagnético envolvido na medida. As principais regiões espectrais utilizadas são mostradas na Figura 6 (SKOOG *et al*, 2002).

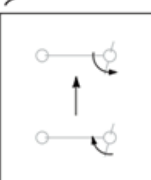
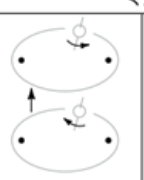
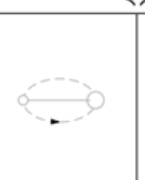
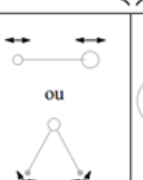
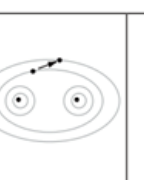


Tipo de alteração quântica:	Alteração de <i>spin</i>		Alteração da orientação	Alteração da configuração	Alteração da distribuição eletrônica		Alteração da configuração nuclear
							
	10^{-2}	1	100	10^4	10^6	Número de onda, cm^{-1} 10^8	
	10 m	100 cm	1 cm	100 μm	1.000 nm	10 nm	Comprimento de onda 100 pm
	3×10^6	3×10^8	3×10^{10}	3×10^{12}	3×10^{14}	3×10^{16}	Freqüência, Hz 3×10^{18}
	10^{-3}	10^{-1}	10	10^3	10^5	10^7	Energia, J mol^{-1} 10^9
Tipo de espectroscopia:	RMN	RSE	Microonda	Infravermelho	Visível e ultravioleta	Raios X	Raios γ

FIGURA 6. REGIÕES DO ESPECTRO ELETROMAGNÉTICO E AS ALTERAÇÕES PROMOVIDAS PELA INTERAÇÃO DO ANALITO COM A RADIAÇÃO (SKOOG *et al*, 2002).

2.3.1 Espectrofotometria UV-Vis

A espectroscopia de absorção na região do UV-Vis é uma técnica amplamente empregada em diversas áreas do conhecimento, tais como, química (ALI, 2014), biologia (WANG *et al*, 2014), agricultura (BERTONE *et al*, 2012), entre outros, basicamente em função da sua robustez analítica, simplicidade operacional, baixo

custo e reduzido tempo de análise. A luz ultravioleta compreende a radiação eletromagnética entre 160 - 400 nm, enquanto a luz visível tem comprimento de onda entre 400 e 780 nm.

O fundamento da espectrofotometria de UV-Vis é que algumas frequências da radiação que atravessa uma camada de um sólido, líquido ou gás, são seletivamente absorvidas, sendo a energia transferida para as moléculas que compõem a amostras. Essa energia absorvida promove as partículas de seu estado fundamental para um ou mais estados excitados de maior energia. Uma vez que a diferença entre esses estados é única para cada espécie, a medida de absorbância ou transmitância em determinados comprimentos de onda, fornece um modo de caracterizar e determinar quantitativamente os constituintes de uma amostra (SKOOG, 2002).

A lei de Lambert-Beer rege a análise espectrofotométrica, pois estabelece uma relação diretamente proporcional entre a absorbância da radiação absorvida (A), a concentração da espécie em solução em mol L⁻¹ (c) e o caminho óptico do meio absorvente (b), $A = \varepsilon b c$, em que ε é a constante de proporcionalidade denominada absorvidade molar. É importante ressaltar que a lei de Lambert-Beer descreve bem o comportamento de absorção das espécies em soluções diluídas (SKOOG, 2002).

2.3.2 Espectrometria de Infravermelho

A espectrometria de infravermelho é uma ferramenta versátil para a determinação qualitativa e quantitativa de espécies moleculares em geral. A região espectral de infravermelho compreende o intervalo de números de onda de aproximadamente 12.800 a 10 cm⁻¹, e do ponto de vista da sua aplicação, é convenientemente dividido em três regiões: infravermelho próximo (*Near Infra-Red*, NIR, 12.800 a 4.000 cm⁻¹), infravermelho médio (*Mid Infra-Red*, MIR, 4.000 a 200 cm⁻¹) e infravermelho distante (*Far Infra-Red*, FIR, 200 a 10 cm⁻¹). A radiação infravermelha não é suficientemente energética para promover transições eletrônicas, entretanto, quando absorvida, converte-se em energia de rotação e vibração (deformações axiais e angulares) (SKOOG, 2002; SILVERSTEIN, 2006). Esse processo de vibração

molecular fornece evidências de inúmeros grupos funcionais presentes na estrutura do composto.

A região do infravermelho médio é, provavelmente, a mais utilizada e com maior número de aplicações já que compreende a região de impressão digital (1200 a 700 cm^{-1}) de um composto ou material, onde pequenas mudanças na constituição ou na estrutura de uma molécula resultam em mudanças significativas na distribuição dos picos nesta região (SKOOG, 2002).

Durante muitos anos, a maioria dos espectros de infravermelho era obtida em equipamento do tipo dispersivo (baseada em redes de difração). A partir de 1980, este tipo de instrumento foi substituído pelos espectrômetros com transformada de Fourier (FTIR), devido à velocidade e confiabilidade, aumentando o número de aplicações na região do MIR. Neste tipo de equipamento, a fonte de radiação é dividida em dois feixes: um dos feixes permanece fixo enquanto o outro se move com o espelho móvel a velocidade constante. Como há variação periódica dos caminhos ópticos e, conseqüentemente, variação na intensidade de radiação, padrões de interferência são recebidos pelo detector (interferograma). A transformada de Fourier é usada para o processamento dos dados, convertendo o interferograma obtido no domínio do tempo para a forma familiar de um interferograma no domínio das frequências. O espectro completo de infravermelho se origina da transformação de Fourier em posições sucessivas do espelho. A técnica de FTIR apresenta diversas vantagens, entre as quais, o fato de ser rápido, permitir uma menor razão sinal/ruído, apresentar elevada resolução, reprodutibilidade, precisão, sensibilidade e simplicidade operacional (SKOOG, 2002; SILVERSTEIN, 2006).

Esta técnica permite a operação em modo de reflectância total atenuada (*Attenuated Total Reflectance*, ATR), que tem como principal característica ser uma técnica não-destrutiva possibilitando a análise de uma variedade de amostras como líquidos, sólidos, filmes, adesivos, pastas, pós, entre outros (SKOOG, 2002).

O princípio de funcionamento se baseia na atenuação de um feixe de infravermelho quando entra em contato com o meio menos denso (amostra). Durante o processo de reflexão, o feixe é direcionado para um cristal opticamente denso (elevado índice de refração) em certo ângulo. Essa reflectância interna dá origem a uma onda evanescente (radiação penetrante), que se estende poucos micrômetros no interior da amostra. Se a amostra absorve parte da radiação, a energia atenuada de cada onda

evanescente retorna para o feixe de infravermelho que segue para o detector, gerando o espectro de infravermelho por reflectância total atenuada (Figura 7).

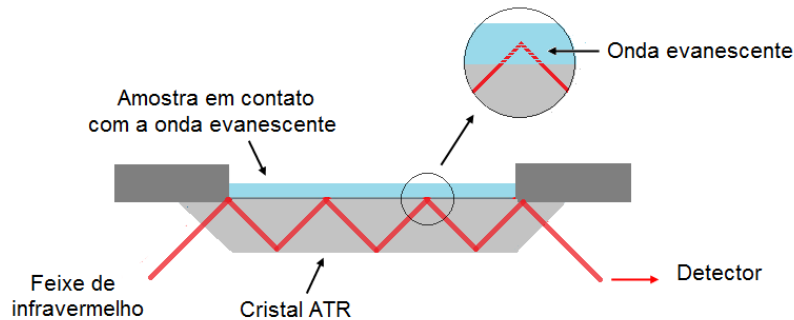


FIGURA 7: FUNCIONAMENTO ESQUEMÁTICO DE UM SISTEMA DE REFLECTÂNCIA TOTAL ATENUADA (ATR). ADAPTADO DE PERKIN-ELMER

De um modo geral, as informações qualitativas e quantitativas obtidas a partir do emprego dos métodos espectroscópicos de análise se tratam de dados multivariados, principalmente quando se tratam de amostras de elevada complexidade como em matrizes ambientais. É imprescindível, portanto, o desenvolvimento e aplicação de métodos quimiométricos neste tipo de conjunto de dados a fim de extrair a maior quantidade de informação possível e obtenção de melhores resultados analíticos.

2.4 CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA

Recentemente, uma variedade de métodos matemáticos tem sido desenvolvidos e aplicados na Química Analítica, principalmente quando não há seletividade na resposta instrumental frente à complexidade da matriz e consequente sobreposição de sinais sem a necessidade de separação prévia (NAGATA *et al*, 2001). De maneira geral, o objetivo da calibração multivariada consiste em explorar toda a informação fornecida pela técnica instrumental utilizada, condição que favorece a previsão de uma resposta de interesse com discrepância mínima, mesmo em condições de severa interferência interespécies (MARTEN e NAES, 1993).

O desenvolvimento da metodologia empregando a calibração multivariada consiste em duas etapas: calibração (detecção de amostras anômalas e otimização do modelo) e previsão (análises de amostras com concentração desconhecida). Na primeira fase, “n” espectros para um conjunto de amostras com composição conhecida são obtidos em “p” valores de comprimentos de onda diferentes, formando uma matriz X (**Xcal**), com “n” linhas e “p” colunas. Ainda, uma matriz Y (**Ycal**) com os valores de concentração pode ser formada contendo “n” linhas, correspondendo às diferentes amostras, e “q” colunas, indicando o número de diferentes compostos presentes nas amostras. A seguir, um modelo matemático que reproduza convenientemente Ycal a partir dos dados da matriz Xcal (determinando-se um vetor dos coeficientes de regressão, **b** – Eq. 1) é desenvolvido (NAGATA *et al*, 2001).

O modelo selecionado é utilizado na etapa de previsão com a finalidade de estimar as concentrações dos constituintes de um novo conjunto de amostras (**Yprev**) a partir das respostas obtidas (**Xteste**) – Eq. 2. Como estas metodologias trabalham com matrizes de dados, o emprego da matriz transposta de X – (**Xteste**)^t – se deve ao isolamento do fator Y da Eq. 1 para obtenção da Eq. 2.

$$\mathbf{Xcal} = \mathbf{b} * \mathbf{Ycal} \qquad \mathbf{Eq. 1}$$

$$\mathbf{Yteste} = (\mathbf{Xteste})^t * \mathbf{b} \qquad \mathbf{Eq. 2}$$

A organização dos dados para aplicação da calibração multivariada é representada na forma de matriz (Figura 8). A intensidade dos espectros a cada comprimento de onda são as variáveis independentes enquanto que as concentrações do conjunto de amostras, as variáveis dependentes (NAGATA *et al*, 2001).

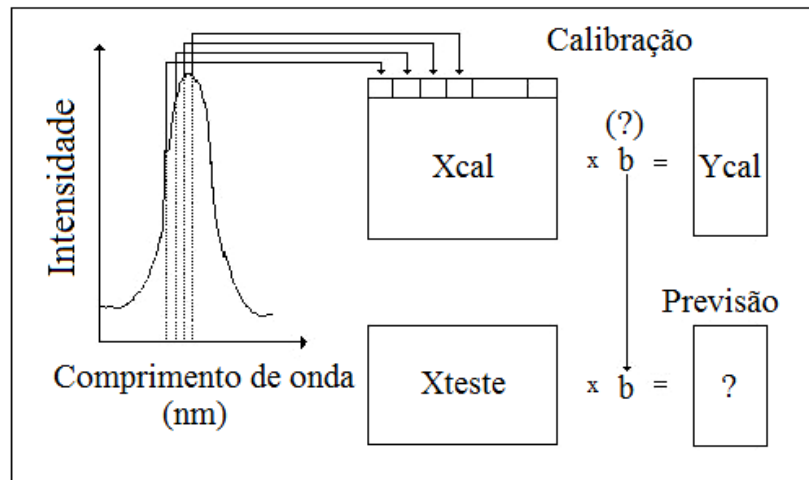


FIGURA 8: ORGANIZAÇÃO DOS DADOS PARA CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA (FONTE: NAGATA *et al*, 2001).

Uma variedade de ferramentas de calibração multivariada vem sendo aplicada com sucesso na determinação simultânea de espécies químicas de interesse ambiental, com destaque para a análise de componentes principais (PCA, SONG *et al*, 2011; VONČINA *et al*, 2007), regressão por mínimos quadrados parciais (PLS, KOOKANA *et al*, 2008; NEVES *et al*, 2012; AL-DEGS *et al*, 2009) e análise de fatores paralelos (PARAFAC, ALVES e POPPI, 2009; NIAZI e SADEGHI, 2006; MAGGIO *et al*, 2010). Entretanto, grande parte destes trabalhos diz respeito à análise de matrizes de menor complexidade (ex. medicamentos) ou de matrizes complexas, porém com elevada concentração do agente poluente (ex. solos contaminados com atrazina) sendo um grande desafio a aplicação dessas ferramentas na quantificação de micropoluentes.

A Análise de Componentes Principais (*Principal Component Analysis*, PCA) é um método quimiométrico amplamente difundido, pois é uma ferramenta valiosa na identificação de padrões de similaridade e diferença em um conjunto de dados através da redução no número de dimensões da matriz (compressão dos dados), sem a perda da informação analítica relevante. Assim, o objetivo da PCA é expressar as informações mais significativas presentes nas variáveis originais em um pequeno número de novas variáveis, denominadas componentes principais, por meio de combinações lineares das variáveis originais (BRERETON, 2000; MUMFORD *et al*, 2007; TEÓFILO, 2013).

Em geral, a PCA decompõe a matriz X em um número reduzido de componentes principais (M) que são o produto de duas pequenas matrizes, *scores* (t) e *loadings* (p), além de uma matriz de erro (BRERETON, 2000; WOLD, 1987):

$$X = M_1 + M_2 + \dots M_a + E = t_1p'_1 + t_2p'_2 + \dots t_ap'_a + E$$

A matriz denominada *scores* contém as coordenadas das amostras nos eixos do novo espaço dimensional, enquanto a matriz de *loadings* representa a magnitude (correlação pequena ou grande) e o modo (correlação positiva ou negativa) na qual a variáveis medidas contribuem para o novo conjunto de eixos (ERIKSSON *et al*, 2002).

Outro método quimiométrico que tem sido bastante aplicado é a Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (*Partial Least Square Regression*, PLS), a qual utiliza a regressão (denominada algumas vezes de transformação ou rotação) para correlacionar os *scores* das componentes principais com dados de concentração. Dessa forma, a decomposição de uma matriz X de dados em variáveis latentes (novo conjunto de variáveis semelhante ao da PCA) é relacionada com uma matriz Y que contém a variável de interesse, possibilitando a previsão da propriedade de interesse mesmo na presença de componentes desconhecidos na amostra. Dois tipos de metodologias, PLS-1 e PLS-2, podem ser empregados na análise multicomponente. A diferença básica é que a metodologia PLS-1 otimiza o número de fatores para cada componente, enquanto que com a PLS-2, um único fator é obtido para todos os componentes de interesse (FERRARO *et al*, 2001; BRERETON, 2000; TEÓFILO, 2013).

Entre os métodos quimiométricos citados acima, regressão por mínimos quadrados parciais se mostrou uma ferramenta poderosa para resolução de sistemas multicomponentes envolvendo interferências espectrais (CARABIAS-MARTÍNEZ *et al*, 1996; TENA *et al*, 1997; AL-DEGS *et al*, 2009; ZHANG e PAN, 2011). Al-Degs e colaboradores (2009) determinaram três pesticidas simultaneamente (atrazina, metidation e propoxur) em água de reservatório e de torneira utilizando nanotubos de carbono de paredes múltiplas como adsorvente e modelos PLS e PCR acoplados a técnica de espectroscopia UV na faixa de 200-300 nm. O número de variáveis latentes para o modelo PLS-1 foi de 4, 3 e 4 para determinação simultânea de atrazina, metidation e propoxur respectivamente. Os limites de detecção obtidos foram de $3 \mu\text{g L}^{-1}$ para atrazina $2 \mu\text{g L}^{-1}$ para metidation, and $3 \mu\text{g L}^{-1}$ para propoxur. Os

coeficientes de correlação foram superiores a 0,9775 e os valores de DPR foram inferiores a 5,0%. A aplicação do método em amostras reais se mostrou satisfatório com boas taxas de recuperação: 95-104% e 84-93% para água de torneira e de reservatório, respectivamente.

Grande interesse existe na determinação de atrazina na presença de seus metabólitos, uma vez que eles possuem estruturas similares. Tena e colaboradores (1997) relataram o emprego de ferramentas de calibração multivariada e método espectrofotométrico derivativo (técnica do ponto de anulação e derivada da razão do espectro) para determinação simultânea de atrazina e seu produto de degradação 2-hidroxi-desetilatrazina em águas subterrâneas. A metodologia que propiciou as melhores recuperações dos analitos a partir de amostras reais empregou o método PLS com a 1ª derivada dos dados espectrais para atrazina (98-104%) e PLS com a 2ª derivada do espectro para 2-hidroxi-desetilatrazina (97-102%). Os autores ainda ressaltam a capacidade do modelo multivariado em solucionar problemas relacionados com a sobreposição espectral de interferentes, principalmente dos ácidos húmicos.

Diante de tais fatos, é possível observar que o desenvolvimento de métodos espectroscópicos para determinação de contaminantes emergentes em amostras ambientais necessita de etapas de pré-concentração e ferramentas que aumentem sua seletividade, sendo que esta última pode ser obtida utilizando-se métodos de calibração multivariada.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo desenvolver e avaliar protocolos de extração em fase sólida para determinação de atrazina na presença ou não de seus metabólitos, via métodos espectroscópicos associados a ferramentas de calibração multivariada.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

A) Desenvolver a extração em fase sólida (SPE) empregando fase sorvente de sílica C18 (em coluna) e determinação de atrazina e seus metabólitos via espectrofotometria na região do UV.

1. Otimizar as principais variáveis operacionais da SPE utilizando rotinas de planejamento fatorial de experimentos;

2. Desenvolver e otimizar modelos de calibração multivariada baseados em PLSR e espectrofotometria na região UV, a partir de misturas sintéticas dos padrões de atrazina e seus principais metabólitos (DIA e DEA);

3. Validar a metodologia analítica multivariada empregando-se a técnica de Cromatografia em fase Líquida de Alta Eficiência (HPLC) com detecção por arranjo de diodos (DAD);

4. Aplicar e comparar o método desenvolvido na determinação de amostras reais (águas naturais).

B) Desenvolver a extração em fase sólida empregando espumas de poliuretana (em batelada) e determinação de atrazina via espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier em modo de reflectância total atenuada.

1. Avaliar a limpeza da espuma de PU;
2. Otimizar as principais variáveis experimentais, realizada por rotinas de planejamento fatorial de experimentos;
3. Desenvolver e otimizar modelos de calibração multivariada baseados em PLSR e FTIR-ATR na determinação de atrazina;
4. Validar a metodologia analítica multivariada empregando-se a técnica de Cromatografia em fase Líquida de Alta Eficiência (HPLC) com detecção por arranjo de diodos (DAD).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. MATERIAIS E REAGENTES

Os padrões utilizados foram atrazina (2-cloro-4-isopropilamina-6-etilamina-1,3,5-triazina (98,9% - Sigma-Aldrich), desisopropilatrazina (6-cloro-N²-etil-1,3,5-triazina-2,4-diamina) (96% - Pestanal) e desetilatrazina (6-cloro-N⁴-isopropil-1,3,5-triazina-2,4-diamina) (97% ± 0,05% - Laboratório Dr.Ehrenstorfer GMBH).

Os solventes empregados foram acetonitrila e metanol grau HPLC (99,99%, JTBaker). Para o preparo de todas as soluções foi utilizada água tratada por osmose reversa e posteriormente deionizada (18,2 MΩ cm, Millipore-Simplicity UV, Bedford, MA, USA). Os demais reagentes foram de grau analítico PA.

Todas as soluções foram preparadas utilizando-se vidraria analítica previamente calibrada.

As vidrarias utilizadas foram lavadas com álcool etílico comercial, água da torneira e deixadas em banho de ácido nítrico 10% por um período mínimo de 24 horas. Em seguida, foram abundantemente enxaguados com água de torneira, água destilada, água deionizada e secos ao ar ou estufa.

4.2. EQUIPAMENTOS

As pesagens foram realizadas em uma balança analítica digital Bioprecisa FA 2104N (± 0,1 mg) e Sartorius, modelo CP225 D com precisão de ± 0,01 mg. A limpeza da cubeta e da espumas de poliuretana foram realizadas com um Ultrassom Ultracleaner 1400 (Unique). As soluções tiveram seus pHs ajustados em um pHmetro Micronal C474. Para a extração com espumas de PU foi utilizado um agitador orbital Tecnal TE 420 e uma mesa agitadora orbital Cientec com temperatura controlada a 25±1 °C.

Os espectros de UV foram adquiridos em um espectrofotômetro de UV-VIS Cary 50 (Varian) com uma cubeta de quartzo de caminho óptico de 1 cm.

Já os espectros de absorbância na região do infravermelho médio (4000 a 600 cm^{-1}) foram registrados em um espectrômetro com transformada de Fourier da marca Vertex 70 (Bruker). O modo de aquisição foi reflectância total atenuada (ATR), que permite a investigação da área próxima da superfície da substância, pelo contato direto com um cristal de ZnSe.

As determinações cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo em fase líquida de alta eficiência (Varian 920 LC), equipado com detector DAD (*Diode Array Detector*), injetor automático, coluna C18 (Zorbax Eclipse Plus 4,6 x 100 mm, com tamanho de partícula de 5 μm), pré-coluna C18 da mesma marca e software GALAXIE v 1.9 para aquisição e tratamento de dados.

4.3. METODOLOGIA

4.3.1. Preparo das soluções

Foram preparadas soluções estoque de cada um dos herbicidas na concentração de 1000 mg L^{-1} para ATZ e DEA e 100 mg L^{-1} para DIA dissolvendo-se 10,0 g e 1,00 mg, respectivamente, dos padrões em 10,0 mL de metanol. Estes padrões foram mantidos ao abrigo da luz e sob refrigeração (5 °C). A partir destas soluções estoque, foram preparadas diariamente soluções trabalho diariamente por diluição em água deionizada.

4.3.2. Espectroscopia UV-Vis

4.3.2.1 Curvas analíticas

As curvas de calibração espectrofotométricas foram realizadas em triplicata a partir dos padrões preparados anteriormente, nas seguintes faixas de concentrações: 0,30 a 3,5 mg L⁻¹ ATZ; 0,40 a 3,5 mg L⁻¹ DIA e 0,30 a 3,0 mg L⁻¹ DEA. Os espectros de absorvância foram adquiridos na região de 190 a 350 nm.

4.3.2.2 Análise Multivariada

Para a análise multivariada dos compostos de interesse via espectrofotometria UV empregou-se um planejamento ternário constituído de 36 misturas para o conjunto de calibração. O intervalo de concentração utilizado para cada um dos analitos foi previamente determinado pela faixa linear das curvas analíticas (Figura 9). Os modelos foram avaliados pela seleção de número de variáveis latentes e variância explicada, ausência de anomalias, erros de validação cruzada e validação externa para a obtenção do melhor vetor de coeficientes de regressão na análise desejada. Um conjunto de validação contendo 8 misturas (em triplicata) foi construído para avaliar a previsão do modelo otimizado.

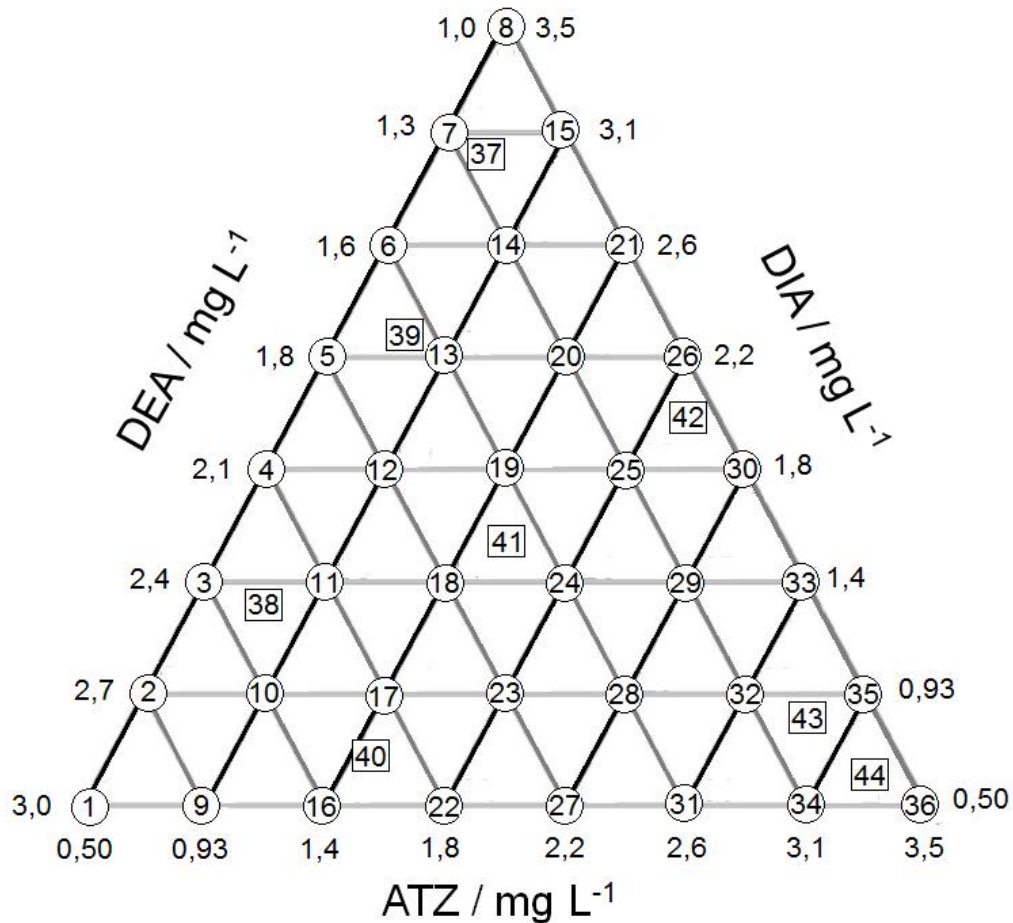


FIGURA 9: PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA OBTENÇÃO DAS MISTURAS DOS CONJUNTOS DE CALIBRAÇÃO E VALIDAÇÃO ((O) = AMOSTRAS DO CONJUNTO DE VALIDAÇÃO E (□) = AMOSTRA DO CONJUNTO DE VALIDAÇÃO REALIZADA EM TRIPLICATA).

Os espectros obtidos foram analisados e os modelos foram construídos e processados em ambiente Matlab 7.0.1, com o pacote PLS Toolbox 3.0.

4.3.2.3 Extração de ATZ empregando fase adsorvente de sílica C18

A extração da atrazina foi executada utilizando cartuchos C18 (Thermo, 500mg, 3 mL), com auxílio por um sistema manifold da Waters (WAT200608) com bomba de vácuo (Tecnal TE-0581) e vazão de 3,5 mL min⁻¹. A sequência de etapas do procedimento de extração é resumidamente apresentada no fluxograma da Figura 10.

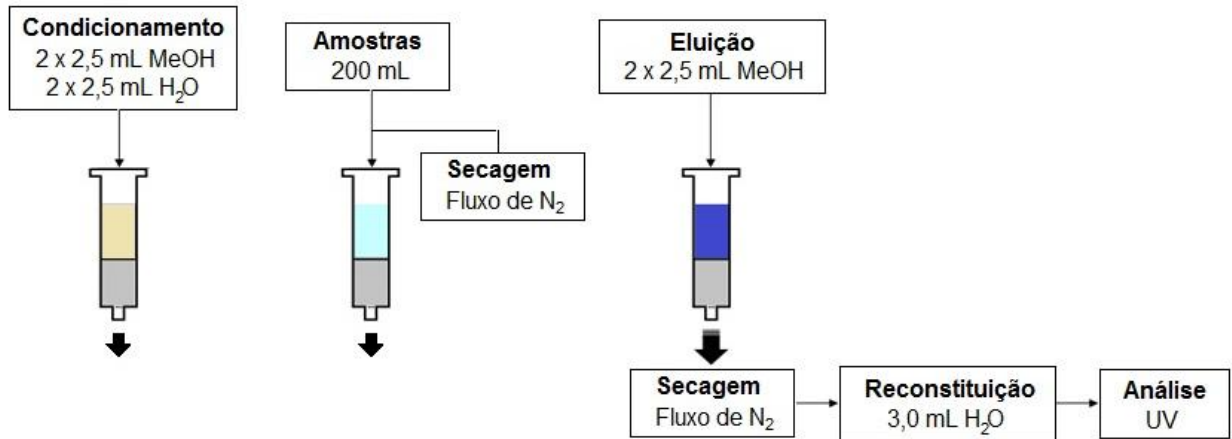


FIGURA 10: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPE).

Os solventes utilizados no condicionamento do cartucho, o volume da amostra a ser pré-concentrado, o pH e o solvente utilizado na eluição dos analitos foram obtidos a partir de um planejamento 2^4 com quintuplicata do ponto central mantendo-se a concentração de ATZ em $20 \mu\text{g L}^{-1}$. Os valores dos níveis do planejamento foram definidos com base em trabalhos relatados anteriormente na literatura (Tabela 4) sendo que as condições estudadas estão apresentadas na Tabela 5.

Como os ensaios do planejamento tiveram que ser realizados em dias diferentes, as replicatas do ponto central foram feitas a cada conjunto de ensaios realizados em dias diferentes. A fim de avaliar a recuperação de menores concentrações de ATZ com as condições otimizadas anteriormente, empregou-se diferentes níveis iniciais de ATZ a serem pré-concentradas em triplicata (5,0, 10 e $20 \mu\text{g L}^{-1}$).

TABELA 4: PRINCIPAIS PARÂMETROS E CONDIÇÕES AVALIADOS DURANTE A SPE DE PESTICIDAS.

Analitos (técnica)	Adsorvente (quantidade)	Volume amostra	Condicionamento	pH	Eluição	Ref.
ATZ, DEA, ametrina, entre outros (GC-MS)	C18 (500 mg)	1000 mL	3 mL acetona 9 mL H ₂ O	-	3 mL acetona	[1]
ATZ, DIA, DEA, metolacloro, entre outros (GC-NPD)	C18 (1000 mg)	500 mL	10 mL MeOH 10 mL H ₂ O	6,5-7,5	20 mL acetato de etila	[2]
ATZ, DIA e DEA (GC-MS)	MWCNT* (100 mg)	100 mL	3 mL MeOH 5 mL H ₂ O	-	4 mL de acetato de etila	[3]
ATZ, Propoxur e Metidation (HPLC-UV)	MWCNT (200 mg) C18 (400 mg) CA(300 mg)**	400 mL	5 mL ACN 5 mL H ₂ O	5,0	10 mL ACN	[4]
Prometrina Propazina, Diuron, ATZ, entre outros (HPLC-MS-MS)	Oasis HLB (200 mg) C18 (500 mg)	13 mL	3 mL ACN:MeOH (1:1) 3 mL H ₂ O	6,0	6 mL ACN:MeOH (1:1) 3 mL ACN:MeOH (1:1)	[5]

[1] BRUZZONITI *et al*, 2006; [2] DORES *et al*, 2006; [3] MIN *et al*, 2008; [4] EL-SHEIKH *et al*, 2008; [5] SCHELLIN *et al*, 2009.

*MWCNT - nanotubos de carbono de paredes múltiplas (*multi-walled carbon nanotubes*)

**CA - carvão ativo

TABELA 5: FATORES E NÍVEIS DO PLANEJAMENTO COMPLETO 2^4 TESTADAS PARA RECUPERAÇÃO DA ATZ EM ÁGUA PURA NA CONCENTRAÇÃO DE $20 \mu\text{g L}^{-1}$ EMPREGANDO CARTUCHOS DE SÍLICA C18.

Variáveis	Níveis		
	(-)	(0)	(+)
Condicionamento	5,0 mL ACN	5,0 mL ACN:MeOH	5,0 mL MeOH
	5,0 mL H ₂ O	5,0 mL H ₂ O	5,0 mL H ₂ O
Eluição	5,0 mL ACN	5,0 mL ACN:MeOH	5,0 mL MeOH
Volume de amostra (mL)	200	300	400
pH	5,0	6,0	7,0

4.3.2.4 Análise cromatográfica

Para avaliar a eficiência do método espectrofotométrico multivariado, foi estabelecida uma análise cromatográfica a partir de informações descritas na literatura (AMADORI *et al*, 2013a; D'ARCHIVIO *et al*, 2007) e em trabalhos anteriores do grupo. Com base nestas informações, um modo de eluição isocrático foi aplicado, com fase móvel constituída de água deionizada:acetonitrila (50:50, v:v), vazão de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, volume de injeção de $50 \mu\text{L}$ e temperatura ambiente. Os comprimentos de onda monitorados foram de 220 nm para ATZ e 210 nm para os metabólitos. As faixas de concentração para a construção de curvas analíticas empregando esta técnica foram avaliadas em triplicata de 0,10 a $3,5 \text{ mg L}^{-1}$.

4.3.2.5 Análise de amostras reais

A metodologia desenvolvida foi aplicada na análise de amostras de águas naturais, coletadas em diferentes pontos: rio e nascente (coletada na cidade de

Arapongas - PR), rio Barigui (coletada na região de Curitiba - PR), água da torneira (coletada no laboratório) e água mineral (comercial). As amostras foram coletadas com auxílio de um frasco de vidro âmbar ambientado com a água a ser coletada. 4 L de amostra foram coletados em cada ponto avaliado sendo adicionados em cada recipiente 4 mL de metanol para inibir o crescimento microbiano. Inicialmente, as amostras foram filtradas em filtro de fibra de vidro GF3 de 55 mm e 0,6 µm de poro (marca MN) para remoção do material particulado e, então, fortificadas com quantidades adequadas dos analitos em estudo e envelhecidas por 24 horas a 4 °C. Posteriormente, alíquotas das amostras foram pré-concentradas por SPE e levadas para análise espectrofotométrica e cromatográfica de acordo com a metodologia descrita anteriormente.

4.3.2.6 Ensaios de *Clean-up* para SPE

Na tentativa de diminuir o efeito de matriz e melhorar as taxas de recuperação obtidas, para a análise de amostras reais fortificadas com os compostos de interesse ensaios de *clean-up* após a retenção dos analitos na fase adsorvente foram realizados. Foram avaliados três tipos diferentes de *clean-up* (A, B e C) em triplicata baseado em trabalhos da literatura (AL-DEGS *et al*, 2009; BRUZZONITI *et al*, 2006; EL-SHEIKH *et al*, 2008; SCHELLIN *et al*, 2009), empregando-se amostra de água de torneira coletada no laboratório como descrito no item 4.3.2.5:

A: 2 x 2,5 mL de solução de MeOH 10%;

B: 2 x 2,5 mL de solução de MeOH 5%;

C: 2 x 2,5 mL de água deionizada.

Ainda, uma triplicata controle, sem a etapa de *clean-up* (SL), foi utilizada para avaliar a eficiência dos ensaios realizados.

4.3.3. Espectroscopia de FTIR-ATR

4.3.3.1 Síntese das espumas de poliuretana

A síntese da espuma PU foi desenvolvida no grupo da Profa. Dra. Sônia Faria Zawadzki e seguiu o método de mistura, em somente um passo, do polioliol (contendo os demais constituintes da formulação adicionados previamente) com o poliisocianato. Esse método tem como vantagem uma maior homogeneidade da mistura. A reação geral está representada na Figura 11.

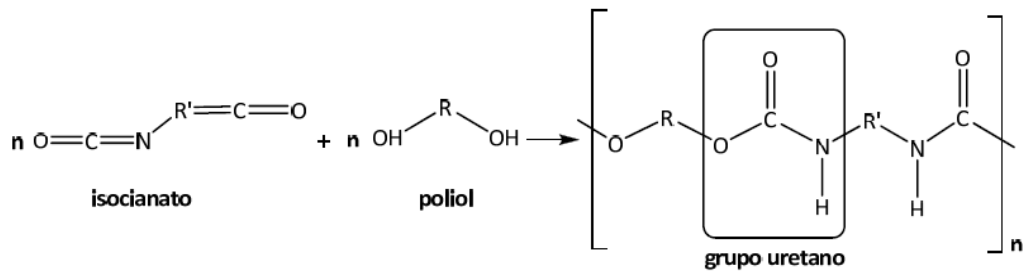


FIGURA 11: REPRESENTAÇÃO DA REAÇÃO QUÍMICA DA FORMAÇÃO DE POLIURETANA.

A PU foi sintetizada em um copo de polietileno, adicionando-se quantidades calculadas de polietilenoglicol (PEG), água destilada e glicerol que foram misturados mecanicamente. A seguir, adicionou-se o isocianato selecionado ao polioliol formulado anteriormente, o 4,4'-difenilmetano di-isocianato (MDI), agitando vigorosamente. A mistura foi deixada sem agitação para permitir o crescimento da espuma e depois de seca, foi retirada do copo, cortada e submetida a limpeza em banho ultrassônico e acetonitrila.

4.3.3.2 Preparação e limpeza das espumas de PU

As espumas de PUs flexíveis obtidas foram cortadas de modo que ficassem com a forma de um quadrado de aproximadamente 2 mm de espessura e área superficial de 100 mm² (Figura 12). As espumas foram pesadas ($0,025 \text{ g} \pm 0,004 \text{ g}$, $n = 12$) e passaram por um processo prévio de *clean up*, no qual, foram submersas em acetonitrila e submetidas ao banho de ultrassom por 15 min. Este procedimento foi repetido inicialmente por seis vezes com 10 amostras de espumas de PU, trocando-se a solução de acetonitrila em cada limpeza e secas a temperatura ambiente de acordo como descrito por NENG e colaboradores (2007). A avaliação da eficiência da limpeza, assim como, de possíveis alterações em sua estrutura foi realizada por Análise de Componentes Principais (PCA) dos espectros de FTIR-ATR obtidos a partir de cada lavagem.

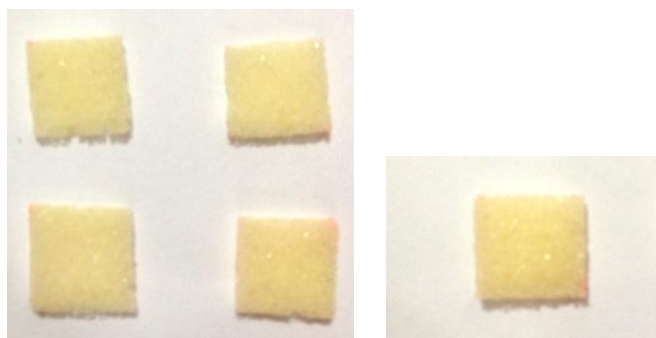


FIGURA 12: A) ESPUMAS DE POLIURETANA COM APROXIMADAMENTE 2 MM DE ESPESSURA CORTADA NA FORMA DE UM QUADRADO (10 mm X 10 mm).

4.3.3.3 Estudos preliminares

O estudo preliminar da adsorção da ATZ nas espumas de poliuretana foi realizado em duplicata (Tabela 6) da seguinte forma: uma amostra de espuma foi colocada em erlenmeyer contendo 10,0 mL de solução aquosa de ATZ na faixa de concentração de 0,05 a 3,5 mg L⁻¹. Como experimento controle, uma prova em branco da espuma em 10,0 mL de água deionizada foi realizado. A agitação foi mantida por

24 h em um agitador orbital (Tecnal TE-420) com temperatura controlada a 25°C e 200 rpm. A seguir, as PUs foram removidas da solução com auxílio de uma pinça e secas sobre papel a temperatura ambiente por aproximadamente 48 h. Os parâmetros instrumentais para aquisição dos espectros de FTIR-ATR foram: número de onda entre 4000 e 600 cm^{-1} com média de 32 scans e com resolução de 4 cm^{-1} . Os dados obtidos foram submetidos à análise por componentes principais (PCA).

TABELA 6: ENSAIOS DE ADSORÇÃO EMPREGANDO ESPUMAS DE POLIURETANA REALIZADOS EM DUPLICATA.

Amostras	Concentração de ATZ
1, 2*	-
3, 4**	-
5, 6	0,050 mg L^{-1}
7, 8	0,10 mg L^{-1}
9, 10	0,50 mg L^{-1}
11, 12	1,0 mg L^{-1}
13, 14	2,0 mg L^{-1}
14, 15	3,0 mg L^{-1}

* Poliuretana (não participou do processo de adsorção)

** Procedimento realizado com a poliuretana em água

4.3.3.4 Curva Analítica Cromatográfica

O monitoramento da quantidade de atrazina adsorvida na espuma foi realizado via HPLC, através da análise da solução sobrenadante. Para tanto, curvas analíticas foram construídas em triplicata na faixa de concentração de 0,001 a 4 mg L^{-1} . Os parâmetros da análise cromatográfica foram mantidos como descrito anteriormente.

4.3.3.5 Otimização da extração de atrazina em espuma de PU

Um planejamento fatorial 2^3 com triplicata do ponto central foi utilizado para otimizar o procedimento de extração de atrazina empregando as espumas de poliuretana mantendo a concentração de ATZ em $1,0 \text{ mg L}^{-1}$. Os fatores e níveis do planejamento foram definidos como mostrado na Tabela 7.

TABELA 7. FATORES E NÍVEIS DO PLANEJAMENTO COMPLETO 2^3 TESTADAS PARA ADSORÇÃO DA ATZ EM ÁGUA PURA NA CONCENTRAÇÃO DE $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ EMPREGANDO ESPUMAS DE POLIURETANA.

Variáveis	Níveis		
	(-)	(0)	(+)
Agitação (rpm)	100	175	250
Tempo (rpm)	12	18	24
pH	5,0	6,0	7,0

A resposta avaliada nesse planejamento para o cálculo do efeitos foi a porcentagem de ATZ adsorvida na espuma de poliuretana, calculada a partir da interpolação direta com a curva analítica cromatográfica obtida.

4.3.3.6 Modelo multivariado

Para o modelo multivariado da adsorção de ATZ com espuma de PU empregaram-se espumas previamente limpas, submetidas às condições de adsorção otimizadas com um conjunto de calibração constituído de 13 misturas sintéticas em duplicata na faixa de $0,010$ a $3,0 \text{ mg L}^{-1}$, de acordo com a faixa analítica cromatográfica desenvolvida. Um conjunto de previsão contendo 8 misturas sintéticas de atrazina também em duplicata foi construído para avaliar a capacidade de previsão do modelo. As concentrações de ATZ adsorvida foram calculadas com base na concentração de

ATZ encontrada na solução sobrenadante por HPLC-DAD. A avaliação dos modelos construídos contou com procedimentos de seleção de variáveis pela delimitação de regiões do espectro FTIR-ATR obtido que pudessem estar atreladas com a adsorção da ATZ, seleção do número de variáveis latentes e variância explicada, ausência de anomalias, erros de validação cruzada e validação externa para a obtenção do melhor vetor de coeficientes de regressão na análise desejada.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. ESPECTROSCOPIA UV-Vis

5.1.1 Comportamento espectrofotométrico dos analitos

As ATZ, DIA e DEA apresentam bandas de absorção bem definidas nos comprimentos de onda de 222, 213 e 212 nm, respectivamente (Figura 13). Entretanto, quando estas espécies de interesse estão presentes em uma mesma solução, observa-se uma elevada interferência espectral (Figura 13), devido à proximidade dos comprimentos de onda de máxima absorção dos compostos. Dessa forma, o desenvolvimento de modelos convencionais de calibração, baseados em curvas analíticas, para a determinação simultânea desses analitos sem nenhuma manipulação dos dados espectrais, não seria possível. Como ressaltado anteriormente, trata-se de um dos principais inconvenientes da técnica de espectroscopia eletrônica, que normalmente limita consideravelmente a sua aplicabilidade. Entretanto, este inconveniente pode ser contornado empregando-se ferramentas de calibração multivariada (PLSR), já que o modelo permite correlacionar o espectro UV completo da mistura com as concentrações individuais da ATZ e seus derivados.

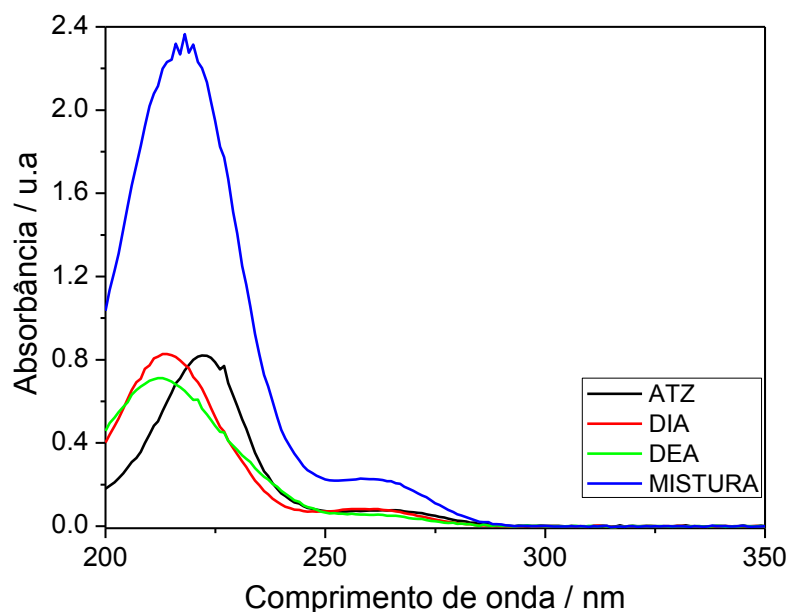


FIGURA 13: COMPORTAMENTO ESPECTROFOTOMÉTRICO UV-VIS PARA ATZ, DIA E DEA ISOLADOS E PRESENTES EM UMA MISTURA NA CONCENTRAÇÃO DE $5,0 \text{ mg L}^{-1}$.

Inicialmente, curvas analíticas individuais (Tabela 8) foram desenvolvidas a fim de identificar as faixas de concentração que se correlacionam linearmente com a absorvância, já que o método multivariado proposto admite apenas pequenas não-linearidades.

TABELA 8: FAIXAS LINEARES, EQUAÇÕES E COEFICIENTES DE CORRELAÇÃO DAS CURVAS ANALÍTICAS INDIVIDUAIS DE ATZ, DIA E DEA.

Composto	λ (nm)	Faixa linear (mg L^{-1})	Eq. Curva analítica	R
ATZ	222	0,500 - 3,50	$\text{Abs}=0,0102+0,179 c_{\text{ATZ}}$	0,999
DIA	213	0,500 - 3,50	$\text{Abs}=0,0448+0,203 c_{\text{DIA}}$	0,999
DEA	212	1,00 - 3,00	$\text{Abs}=0,0413+0,165 c_{\text{DEA}}$	0,984

Linearidades adequadas foram obtidas para os três analitos em questão na faixa de concentração avaliada. A maior sensibilidade foi obtida para a determinação do metabólito DIA.

5.1.2 Método Multivariado

A elaboração do modelo de calibração multivariada por Regressão de Mínimos Quadrados Parciais (PLSR) para a determinação simultânea de ATZ, DIA e DEA foi realizada empregando-se um conjunto de espectros de absorção na região do ultravioleta (Figura 14), composto por 36 misturas sintéticas dos analitos, nas faixas de concentração previamente estudadas (ver Figura 9).

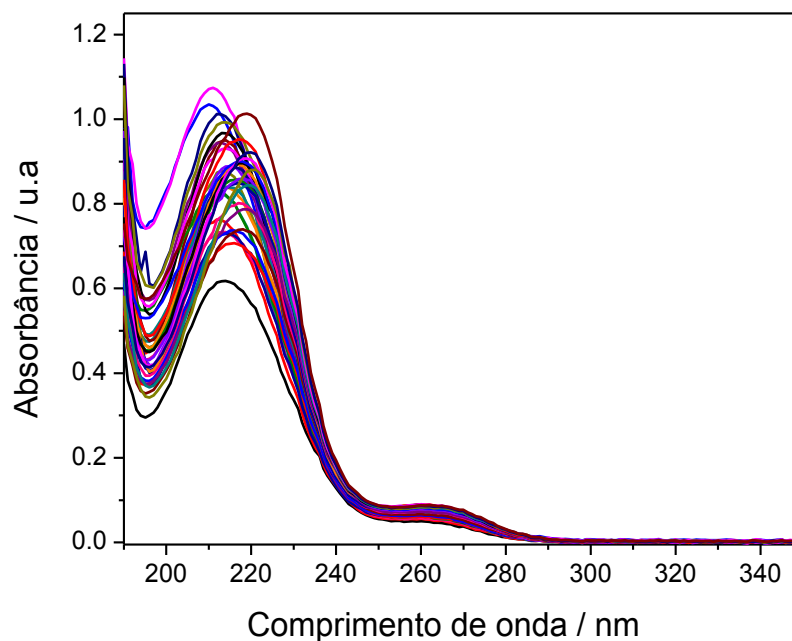


FIGURA 14: COMPORTAMENTO ESPECTRAL DAS 36 MISTURAS SINTÉTICAS DO CONJUNTO DE CALIBRAÇÃO UTILIZADOS NA CONSTRUÇÃO DO MODELO MULTIVARIADO PARA A DETERMINAÇÃO DE ATZ, DIA E DEA.

A fim de obter o menor erro relativo na determinação destes analitos, além dos dados originais, diversos procedimentos de pré-processamento de dados foram testados (primeira derivada, alisamento, normalização, dados centrados na média).

A faixa espectral empregada inicialmente foi de 190 a 350 nm. Entretanto, observou-se que o melhor modelo construído nesta faixa espectral com 4 variáveis latentes e alisamento, apresentava uma grande importância atribuída à região de 190 a

200 nm para a determinação das espécies de interesse como mostrado pelos vetores de regressão da Figura 15.

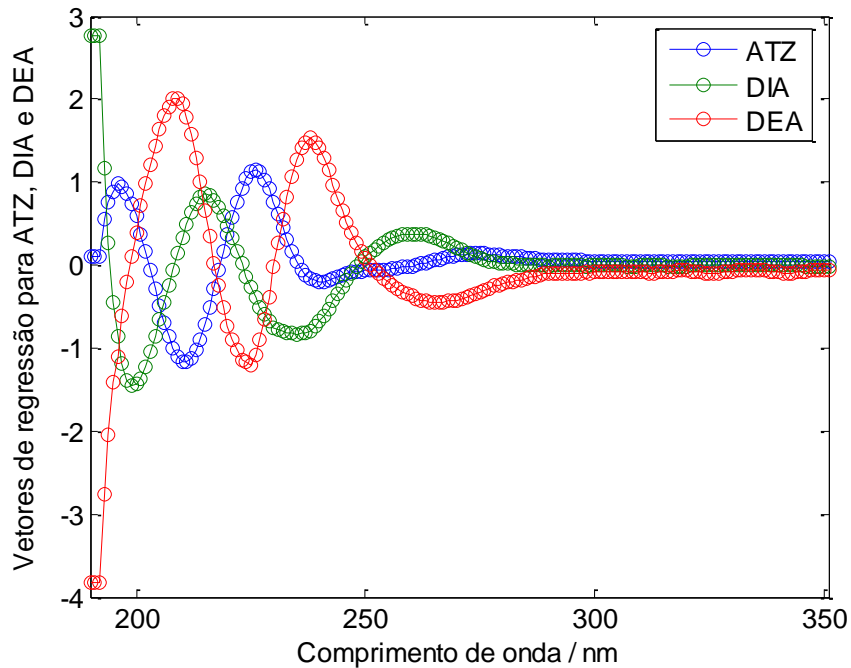


FIGURA 15: GRÁFICO DOS VETORES DE REGRESSÃO PARA O MODELO MULTIVARIADO CONSTRUÍDO NA FAIXA DE 190-350 nm.

Como a região inicial do espectro (190-200 nm) não apresenta informação química relevante para as espécies de interesse, uma vez que os máximos de absorção não se localizam neste intervalo de comprimento de onda, optou-se pela construção de um novo modelo com faixa espectral reduzida. Assim, um novo modelo multivariado foi construído para a determinação simultânea de ATZ, DIA e DEA com faixa espectral de 200 - 350 nm para a determinação simultânea de ATZ, DIA e DEA com (200 - 350 nm). Dentre os pré-processamentos empregados, o modelo que apresentou a melhor capacidade de previsão foi conseguido com alisamento dos dados espectrais (largura de filtro de 5 pontos), que possibilita a minimização dos ruídos instrumentais.

A seleção do número de variáveis latentes (VLs) foi realizada por meio do método de validação cruzada *Leave-one-out*, ou seja, os dados de uma amostra do conjunto de calibração são retirados das matrizes (espectro e concentração) e o modelo é construído com as amostras restantes. A seguir, o espectro da amostra

retirada é utilizado para prever a concentração da mesma. Pela comparação com o valor conhecido, geram-se erros apresentados como a raiz quadrada da soma dos erros de validação cruzada (RMSECV). Este procedimento é repetido até que todas as amostras do conjunto de calibração passem por uma etapa de previsão, e um erro médio é calculado em função do número de VLs (Figura 16).

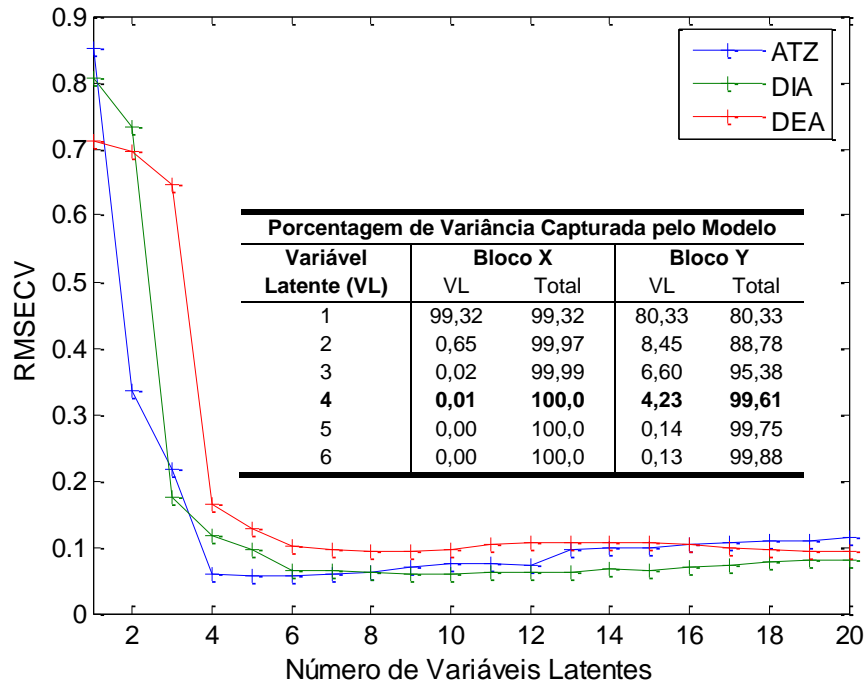


FIGURA 16: VALORES DE RMSECV EM FUNÇÃO DO NÚMERO DE VARIÁVEIS LATENTES. INSERIDO: TABELA DE PORCENTAGEM DE VARIÂNCIA CAPTURADA PELO MODELO EM CADA VARIÁVEL LATENTE.

Os menores valores de erro foram obtidos com a utilização de 4 variáveis latentes sendo que a variância capturada para a matriz X é 100% e da matriz Y 99,67%. A inclusão de mais variáveis latentes não acrescenta ganho significativo em relação à minimização dos erros, não justificando o uso de um maior número de variáveis. Por outro lado, seria esperado que o modelo fosse construído apenas com 3 VLs (uma para cada analito). Entretanto, além de apresentar elevados valores de RMSECV, modelos desenvolvidos empregando 3 VLs apresentaram baixa capacidade de previsão em relação ao conjunto de validação externa, indicando que a inclusão de uma quarta VL é bastante relevante para explicar parte da informação espectral da mistura.

A análise do gráfico de vetores de regressão (Figura 17) revelou que praticamente todas as regiões do espectro avaliado são consideradas relevantes para a correlação construída pelo modelo. Apenas a região após os 300 nm não apresenta informação analítica relevante (coeficientes de regressão muito próximos de zero).

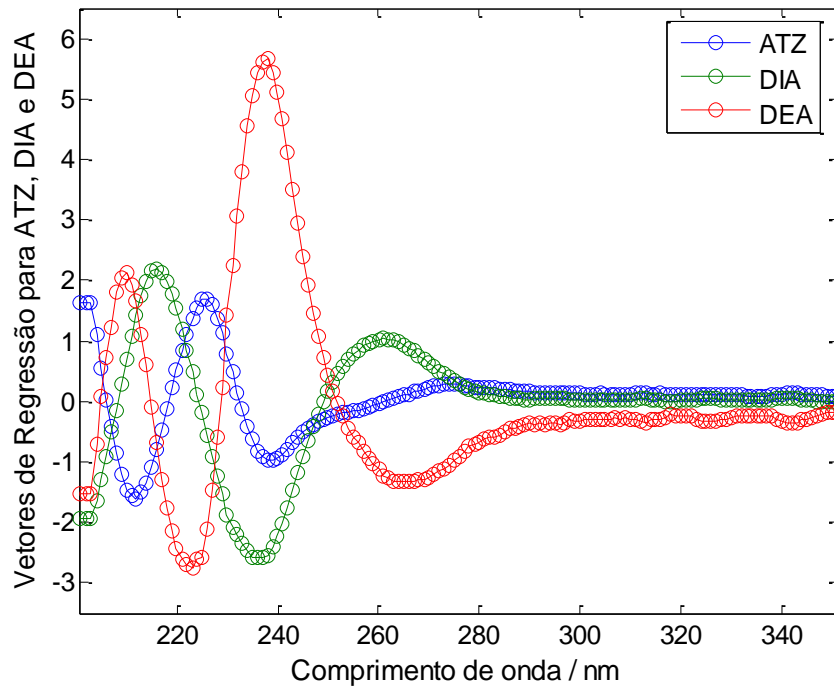


FIGURA 17: GRÁFICO DO VETOR DE COEFICIENTE DE REGRESSÃO PARA ATZ, DIA E DEA DO MODELO PLSR CONSTRUÍDO.

No gráfico de *loadings* (Figura 18A), nota-se a semelhança entre os *loadings* da VL2, VL3 e VL4 com o comportamento espectral característico da ATZ, DIA e DEA, respectivamente.

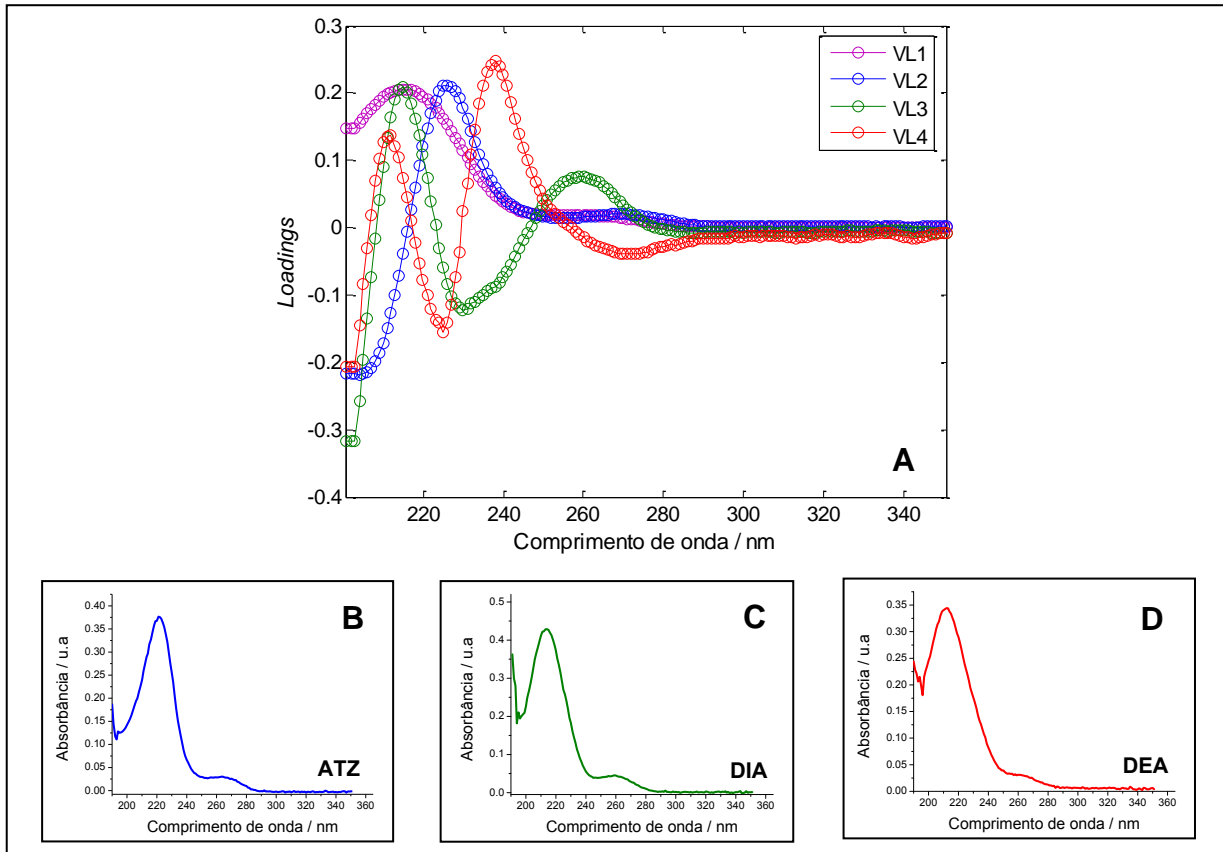


FIGURA 18: A) GRÁFICO DOS *LOADINGS* DAS 4 PRIMEIRAS VLS. COMPORTAMENTO ESPECTRAL NA REGIÃO DO UV DE B) ATZ, C) DIA E D) DEA.

Mediante a análise do gráfico de *loadings* é possível verificar a influência de cada variável selecionada no modelo sendo que nenhuma delas se refere a ruídos modelados. A primeira VL explica a maior parte da informação analítica relacionada com o espectro da mistura dos três analitos sendo que as demais se assemelham aos espectros individuais dos mesmos. Destaque deve ser dado à região situada entre 230 a 290 nm no gráfico dos vetores de regressão e *loadings*, já que pequenas diferenças nas absorvâncias das bandas de baixa intensidade dessa região contribuem para a diferenciação dos analitos pelo modelo. Portanto, o emprego de 4 VLS para a construção do modelo é fundamental para quantificação dos analitos estudados.

Outro aspecto avaliado para a construção do modelo é a detecção de amostras anômalas no conjunto de calibração (*outliers*) por meio do gráfico dos resíduo de Student vs *Leverage* (Figura 19).

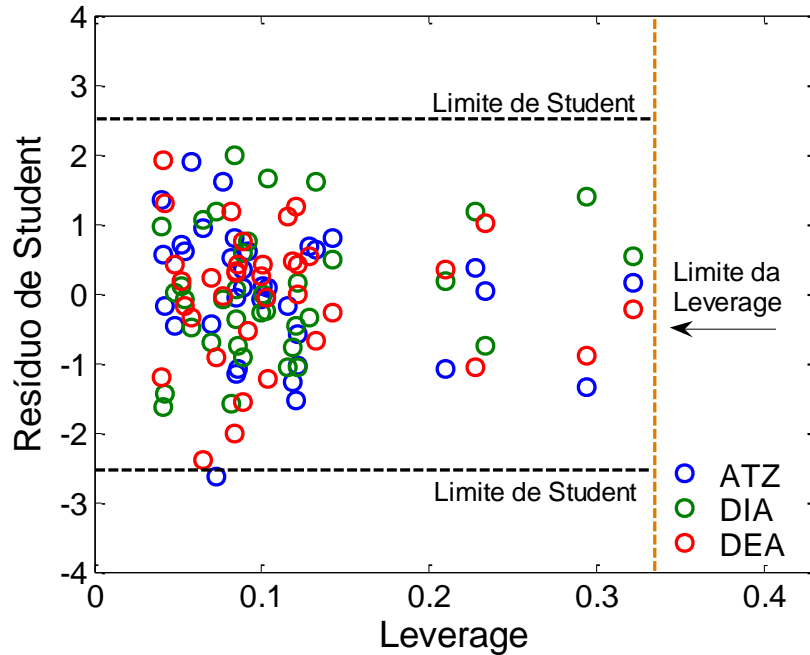


FIGURA 19: RESÍDUOS DE STUDENT vs. *LEVERAGE* PARA O MODELO MULTIVARIADO CONSTRUÍDO.

A *Leverage* é uma medida da influência de cada amostra no modelo de regressão desenvolvido representada pela distância entre cada espectro ao centro do conjunto de dados (através do cálculo da distância Euclidiana). Já os resíduos de Student correspondem aos desvios entre os dados de referência e os estimados pelo modelo, indicando se as amostras estão dentro ou fora da distribuição normal (BARTHUS *et al*, 2005). De acordo com a definição, os limites permitidos para estes critérios são respectivamente, 0,33 (considerando-se $3 \times VL/N$, onde VL representa o número de variáveis latentes utilizadas na construção do modelo, e N é o número de amostras do conjunto de calibração) e $\pm 2,5$ (nível de confiança de 95%). A amostra 11 foi identificada com alto resíduo de Student sem apresentar, no entanto, elevada *Leverage*. Como a retirada desta amostra do modelo não acarretou em melhoras significativas dos valores de previsão, a mesma não foi considerada uma amostra anômala.

Finalmente, a Figura 20 mostra o gráfico que relaciona valores reais com valores previstos pelo modelo para cada analito avaliado.

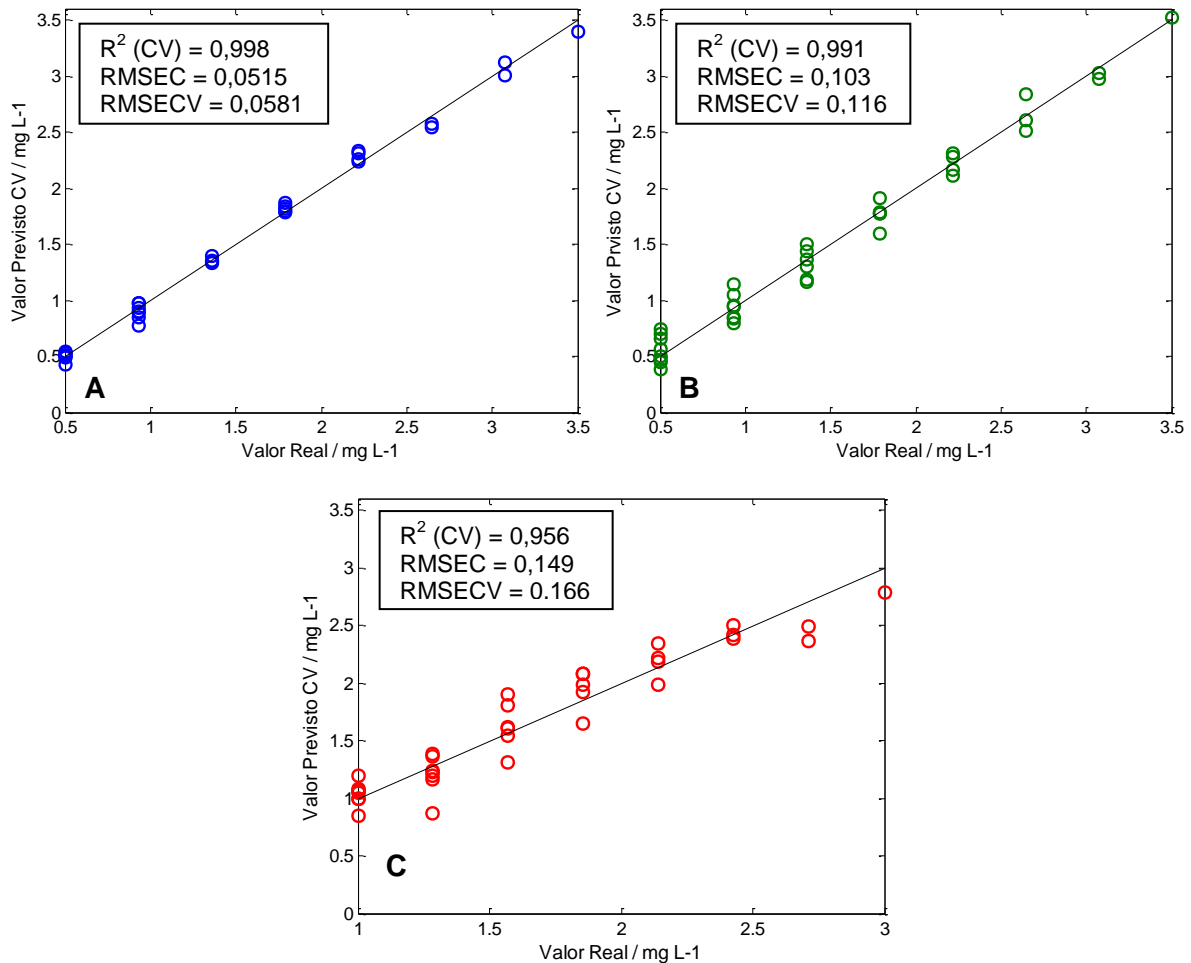


FIGURA 20: VALOR PREVISTO (CV) vs. VALOR REAL PARA O MODELO DESENVOLVIDO PARA A) ATZ, B) DIA E C) DEA COM 4 VLS.

O modelo apresentou boa capacidade preditiva, sendo que os bons coeficientes de regressão obtidos ($R^2=0,998$; $R^2=0,991$; $R^2=0,956$) indicam que, principalmente para ATZ, os valores previstos pelo modelo são muito próximo ao valor real das concentrações.

A confirmação da capacidade de previsão foi realizada por meio de um conjunto de validação externa contendo 8 misturas ternárias (diferentes daquelas empregadas no conjunto de calibração) realizadas em triplicata. As misturas foram selecionadas de modo que a concentração de ATZ variasse dentro da faixa avaliada e as menores concentrações de DIA e DEA fossem contempladas, simulando a concentração esperada nas amostras reais. Os resultados obtidos são mostrados na Tabela 9.

TABELA 9: RESULTADOS OBTIDOS E ERROS RELATIVOS PARA DETERMINAÇÃO DE ATZ, DIA E DEA NAS MISTURAS DO CONJUNTO DE VALIDAÇÃO EXTERNA EMPREGANDO O MODELO PLSR DESENVOLVIDO.

$C_{\text{real}} \text{ (mg L}^{-1}\text{)}$			$C_{\text{prevista}} \text{ (mg L}^{-1}\text{)}$			Erro relativo (%)			Recuperação (%)		
ATZ	DIA	DEA	ATZ	DIA	DEA	ATZ	DIA	DEA	ATZ	DIA	DEA
0,618	3,01	1,24	0,676±0,06	3,00±0,09	1,28±0,02	9,38	-0,332	3,23	109	99,9	103
0,746	1,28	2,30	0,806±0,13	1,20±0,05	2,00±0,54	8,04	-6,25	-13,0	108	93,8	72,6
0,843	2,26	1,61	0,922±0,04	2,28±0,06	1,64±0,05	9,37	0,885	1,86	109	101	102
1,40	0,71	2,26	1,53±0,07	0,760±0,04	2,13±0,08	9,28	7,04	-5,75	109	106	94,5
1,46	1,53	1,74	1,56±0,04	1,61±0,07	1,64±0,03	6,85	5,23	-5,75	106	105	94,7
1,86	2,02	1,06	1,94±0,04	2,16±0,02	1,02±0,05	4,30	6,93	-3,77	104	107	96,7
2,90	0,84	1,19	3,00±0,05	0,959±0,03	1,10±0,02	3,45	14,2	-7,56	103	114	93,0
3,26	0,63	1,08	3,43±0,06	0,717±0,08	0,965±0,05	5,22	13,8	-10,6	105	114	89,4
Média±D.P.R						7,00±2,4	6,83±5,1	6,44±3,8	107±2,4	105±6,9	93,2±9,5

Os dados revelaram que maiores erros relativos são obtidos para concentrações menores de ATZ (de 8,04 a 9,38%), enquanto que para os metabólitos não houve um padrão na variação do erro de relativo em relação às concentrações avaliadas. Entretanto, observou-se que existe uma tendência do modelo em determinar concentrações de DEA menores que as concentrações reais, enquanto para ATZ e DIA esta tendência é inversa. Os dados da média da estimativa do desvio padrão para as concentrações previstas indicam uma menor precisão do modelo para a determinação dos metabólitos DIA e DEA. Apesar disso, a associação da espectrofotometria UV e o método de PLSR para determinação de ATZ e seus principais metabólitos se mostrou satisfatória, já que se trata de uma técnica simples, de baixo custo, alta seletividade, com erros relativos satisfatórios na quantificação das espécies avaliadas uma vez que a sobreposição espectral é bastante elevada, principalmente no caso dos metabólitos.

5.1.3. Extração em Fase Sólida (SPE) de atrazina em solução aquosa

A proposta de determinar ATZ e seus principais metabólitos por meio de UV-Vis associado com ferramentas de calibração multivariada se apresenta como uma alternativa frente às propostas relatadas na literatura (em geral, técnicas cromatográficas como HPLC-UV (AMADORI *et al*, 2013a; BENVENUTO *et al*, 2010; PENG *et al*, 2007) e GC-MS (MIN *et al*, 2008; JIANG *et al*, 2005; PANSHIN *et al*, 2000). Grande parte destas propostas utiliza métodos que apresentam fatores de pré-concentração requeridos para essas espécies em níveis traço. Assim, neste trabalho empregou-se a fase adsorvente de sílica C18 e foram selecionados metanol e acetonitrila para avaliação do condicionamento e eluição, carregamento da amostra na faixa de 200 a 400 mL e faixa de pH de 5,0 a 7,0 a partir de dados compilados de trabalhos da literatura (Tabela 4). A matriz do planejamento experimental contendo as absorbâncias e as recuperações de ATZ em cada ensaio realizado são mostradas na Tabela 10.

TABELA 10: RESULTADOS OBTIDOS PARA O PLANEJAMENTO 2⁴ AVALIANDO OS EFEITOS DO CONDICIONAMENTO, ELUIÇÃO, VOLUME DA AMOSTRA E pH NA RECUPERAÇÃO DE ATZ (20 µg L⁻¹).

Ensaio	Cond.	Eluição	V _{amostra}	pH	Absorbância (u.a)	Recuperação (%)
1	-	-	-	-	0,130	52,4
2	+	-	-	-	0,207	83,0
3	-	+	-	-	0,186	74,5
4	+	+	-	-	0,261	105
5	-	-	+	-	0,329	67,4
6	+	-	+	-	0,217	44,4
7	-	+	+	-	0,414	84,8
8	+	+	+	-	0,351	71,9
9	-	-	-	+	0,188	75,3
10	+	-	-	+	0,154	61,8
11	-	+	-	+	0,240	96,4
12	+	+	-	+	0,289	116
13	-	-	+	+	0,370	75,9
14	+	-	+	+	0,202	41,4
15	-	+	+	+	0,404	82,9
16	+	+	+	+	0,279	57,2
17	0	0	0	0	0,324	87,8
18	0	0	0	0	0,311	84,5
19	0	0	0	0	0,331	89,8
20	0	0	0	0	0,377	102
21	0	0	0	0	0,380	103

NOTA: Condicionamento: (-) 5 mL ACN, 5 mL H₂O; (+) 5 mL MeOH, 5 mL H₂O, (0) 5 mL ACN:MeOH (1:1), 5 mL H₂O;

Eluição: (-) 5 mL ACN, (+) 5 mL MeOH, (0) 5 mL ACN:MeOH (1:1);

Volume da amostra: (-) 200 mL, (+) 400 mL, (0) 300 mL;

pH: (-) 5,0, (+) 7,0, (0) 6,0.

Avaliando-se os resultados obtidos observa-se que boas recuperações foram conseguidas nos ensaios 4, 11 e 12 e também para os ensaios do ponto central. Esses ensaios convergem para o emprego de metanol na eluição e volume de amostra de 200 mL. A fim de avaliar, portanto, qual é o ensaio que apresenta as melhores

condições para pré-concentração de ATZ e a influência dos fatores estudados na resposta, o cálculo dos efeitos do planejamento foi realizado (Tabela 11).

TABELA 11: EFEITOS PRINCIPAIS E DE INTERAÇÃO ENTRE OS FATORES OTIMIZADOS PELO PLANEJAMENTO FATORIAL 2⁴.

Fatores	Efeitos Principais	Efeitos de interação
Condicionamento	-3,60	-
Eluição	23,4	-
Volume da amostra	-17,3	-
pH	3,00	-
Cond. x Eluição	-	6,47
Cond. x Vol. amostra	-	-20,4
Cond. x pH	-	-9,86
Eluição x Vol. amostra	-	-6,45
Eluição x pH	-	27,4
Vol. amostra x pH	-	-5,79
Cond x Eluição x Vol. amostra	-	-1,75
Cond x Eluição x pH	-	30,2
Cond x Vol. amostra x pH	-	-20,4
Eluição x Vol. amostra x pH	-	-6,70
Cond. x Eluição x Vol. amostra x pH	-	-4,37
<i>Estimativa do desvio padrão</i>		<i>24,1</i>

Com base na estimativa do desvio padrão (obtido via quintuplicata do ponto central) com 95% de confiança ($t_{95\%, 5} = 2,776$) de 24,1, nenhum efeito principal foi significativo. Apenas o efeito calculado para eluição (+23,4) se aproximou da estimativa do desvio. Isto indica uma leve tendência de se obter melhores resultados promovendo a eluição com metanol como verificado anteriormente. Acredita-se que a variação de pH não se mostrou significativa já que, na faixa avaliada, a ATZ se encontra na sua forma não ionizada ($pK_a = 1,62$, MUTAVDŽIC *et al*, 2006; $pK_a = 1,68-1,71$, LOOS e NIESSNER, 1999). Logo, na sua forma neutra, o tipo de interação com os grupos do

adsorvente se daria da mesma forma entre pH 5,0 e 7,0 por meio de interações hidrofóbicas do tipo van der Waals com a cadeia carbônica. Valores menores de pH não foram considerados, tendo em vista que o objetivo do trabalho é determinar as espécies de interesse em águas naturais, assim a faixa de pH estudada não representaria uma modificação muito acentuada da concentração hidrogeniônica da amostra. Em relação ao volume de amostra, as menores recuperações foram encontradas para a passagem de 400 mL de amostra (maior volume estudado), provavelmente devido a perda do analito pela criação de caminhos preferenciais na fase adsorvente ou ainda lixiviação do analito adsorvido.

Apesar disso, os efeitos de interação da eluição x pH (+27,4) e do condicionamento x eluição x pH (+30,2) revelaram-se significativos. Isto indica que esses fatores não podem ser avaliados individualmente e, para uma melhor visualização, a Figura 21 apresenta a interpretação geométrica.

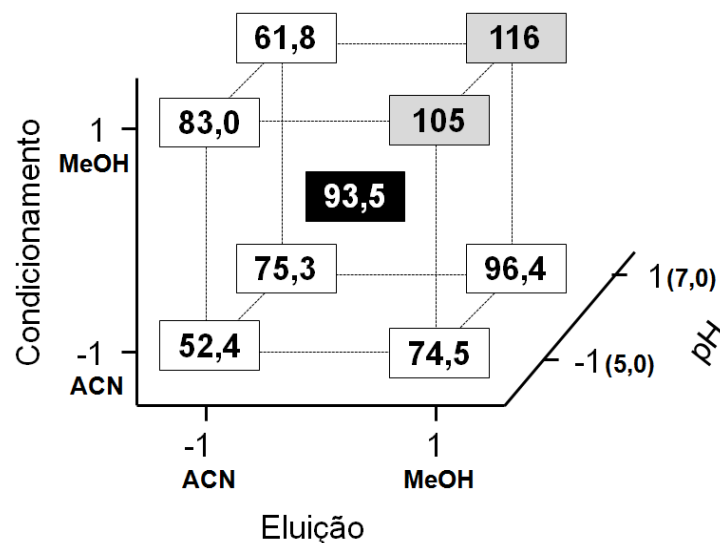


FIGURA 21: INTERPRETAÇÃO GEOMÉTRICA DOS EFEITOS SIGNIFICATIVOS DO PLANEJAMENTO 2^4 COM VOLUME DE AMOSTRA FIXO NO NÍVEL (-1) (200 mL).

Nesta figura é possível observar que as melhores recuperações de atrazina foram obtidas mantendo-se o nível (+) do condicionamento e eluição (utilizando metanol). Isso pode ser explicado pelas diferentes disponibilidades de sítios ativos presentes na sílica C18 quando se altera o solvente de condicionamento e de eluição.

Para a variável pH, observa-se que as recuperações obtidas foram satisfatórias para ambos os níveis. Dessa forma, optou-se pela escolha do valor otimizado para os parâmetros avaliados de solvente no condicionamento, solvente na eluição, volume da amostra e pH como sendo, respectivamente, 5 mL de metanol seguido de 5 mL de água deionizada, 5 mL de metanol, volume de amostra de 200 mL e pH 7. Nessa condição, o fator de pré-concentração obtido (volume inicial de amostra (200 mL) dividido pelo volume final reconstituído(3,5 mL)) foi de 66,7.

Mantendo-se as condições otimizadas do procedimento de extração, avaliou-se a tentativa de diminuição da concentração de ATZ a ser pré-concentrada, de modo a manter a repetibilidade e exatidão do método por SPE. Os resultados são mostrados na Tabela 12.

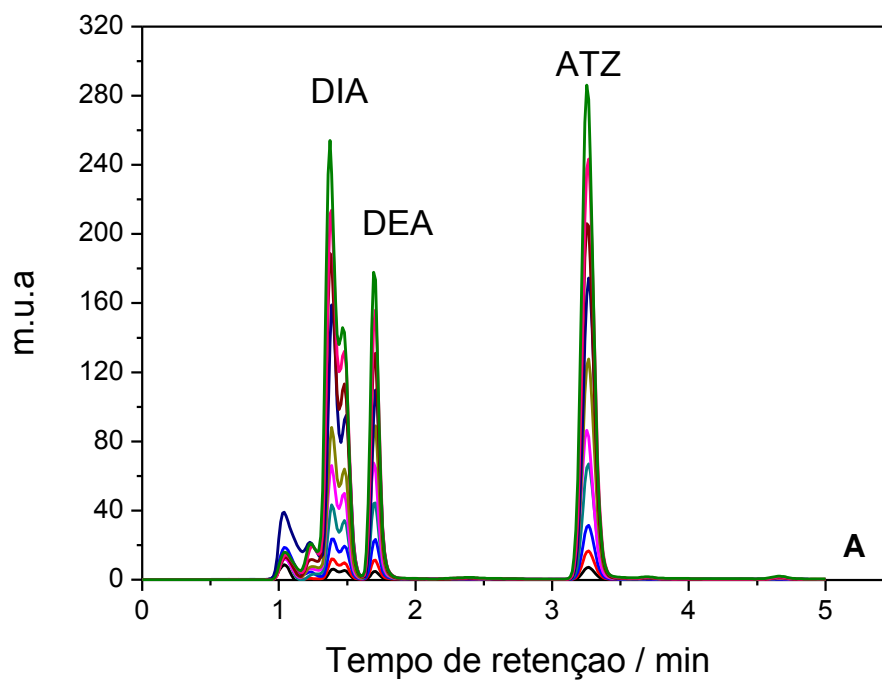
TABELA 12: RECUPERAÇÃO DE ATRAZINA DE SOLUÇÕES AQUOSAS EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES POR EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA.

Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação de ATZ (%)
5,00	161 \pm 23
10,0	107 \pm 9,9
20,0	118 \pm 6,0

O procedimento permite uma adequada recuperação para concentrações iniciais a partir de 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ de ATZ. Para determinação de menores concentrações, por sua vez, o fator de pré-concentração de 66,7 vezes não atinge o limite de quantificação da curva espectrofotométrica, gerando uma taxa de recuperação ruim e altas estimativas de desvio padrão. Optou-se, dessa forma, pela utilização da concentração mínima de ATZ de 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ para os estudos posteriores de recuperação em amostras reais.

5.1.4. Análise de Amostras Reais

A fim de avaliar a exatidão do método multivariado proposto, os resultados foram comparados com os obtidos por cromatografia em fase líquida de alta eficiência. Para tanto, curvas analíticas foram desenvolvidas como mostra a Figura 22. Sob as condições cromatográficas estabelecidas, obteve-se uma excelente linearidade para todos os compostos avaliados, com coeficientes de correlação acima de 0,997 na faixa de 0,10 a 3,5 mg L⁻¹ e a maior sensibilidade encontrada para a curva analítica da DIA seguida da ATZ e DEA. Observou-se uma boa separação dos picos cromatográficos, sendo que os tempos de retenção foram de 1,48, 1,71 e 3,27 min para DIA, DEA e ATZ, respectivamente.



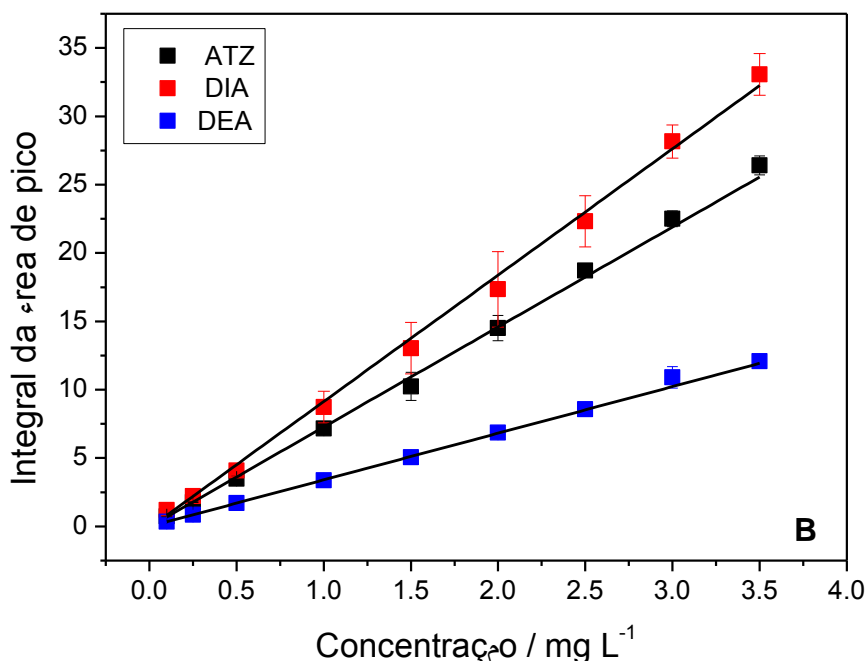


FIGURA 22: A) CROMATOGRAMAS PARA OS PADRÕES DE ATZ, DIA E DEA OBTIDOS POR ELUIÇÃO ISOCRÁTICA (H₂O:ACN, 50:50 v:v); B) CURVAS ANALÍTICAS CONSTRUÍDAS PARA ATZ ($Y = -0,11 + 7,31C_{ATZ}$, $R=0,999$), DIA ($Y = -0,11 + 9,24C_{DIA}$, $R=0,997$) e DEA ($Y = -0,003 + 3,41C_{DEA}$, $R=0,999$).

A determinação de DIA empregando a curva analítica apresentou maior sensibilidade, seguido da ATZ e DEA. Ainda, excelentes coeficientes de correlação foram obtidos.

Após aplicação do processo de extração em fase sólida estimou-se a quantidade dos analitos em cada amostra real analisada empregando a curva analítica cromatográfica construída. Para as amostras de água analisadas, o herbicida em questão e seus metabólitos não estavam presentes em concentrações mensuráveis. Assim, as amostras foram fortificadas com os analitos, de modo que após a etapa de pré-concentração, suas concentrações ficassem dentro da faixa analítica do modelo multivariado. Estes dados foram comparados com os obtidos pelo método espectroscópico multivariado conforme mostrado na Tabela 13.

Os dados revelaram que a metodologia proposta apresentou elevados erros relativos e desvios padrão relativos (D.P.R) na maioria dos pontos avaliados. Isso pode ser atribuído possivelmente a elevada interferência espectral de espécies não retidas durante o processo de SPE. Ou seja, existe um grande efeito de matriz nessas amostras, uma vez que grande parte dos compostos orgânicos, tipicamente

substâncias húmicas, apresentam bandas de absorção na região do ultravioleta. Tal fato também pode ser observado pelas elevadas recuperações obtidas. Tena e colaboradores (1997) também constataram a influência de ácido húmico na sobreposição espectral na determinação de atrazina e hidróxi-2-desetilatraxina. Além disso, Tran e colaboradores (2007) afirmaram que águas naturais coletadas em regiões agrícolas como é o caso da água de rio coletada em Arapongas contêm elevadas quantidades de material particulado muito fino, que pode ser transportado até o extrato final, interferindo na análise espectrofotométrica e, inclusive, cromatográfica. Tal fato, pode explicar os resultados obtidos para amostra de água de rio coletada em Arapongas.

TABELA 13: ANÁLISE DE ÁGUAS NATURAIS PELA METODOLOGIA CROMATOGRÁFICA E PELO MÉTODO MULTIVARIADO PROPOSTO COM OS RESPECTIVOS ERROS RELATIVOS E RECUPERAÇÕES.

$C_{\text{adicionada}} \text{ (mg L}^{-1}\text{)}^{\text{a}}$			$C_{\text{real}} \text{ (mg L}^{-1}\text{)}^{\text{b}}$			$C_{\text{prevista}} \text{ (mg L}^{-1}\text{)}^{\text{c}}$			Erro relativo (%)			Recuperação (%)		
ATZ	DIA	DEA	ATZ	DIA	DEA	ATZ	DIA	DEA	ATZ	DIA	DEA	ATZ	DIA	DEA
Água de torneira														
1,33	0,733	2,27	1,37	0,736	0,803	4,99±0,44	0	19,2±2,7	264	100	>500	368±40	0	>500
Água Mineral														
1,33	0,733	2,27	1,15	0,666	1,63	1,37±0,04	0	2,83±0,13	19,1	100	73,6	120±2,6	0	173±7,8
Água de Nascente (Arapongas)														
0,667	3,00	1,20	0,826	4,40	2,06	0,679	1,83	2,13	-17,8	-58,4	3,40	72,7±10	41,0±3,6	108±13
1,33	0,733	2,27	1,03	0,80	1,98	1,19±0,19	0	2,90±0,62	15,5	100	46,5	115±18	0	146±31
3,33	0,667	1,07	3,26	0,78	1,24	2,72±1,1	0	2,17±0,44	-16,6	100	73,2	83,5±35	0	174±34
Água de Rio (Arapongas)														
0,667	3,00	1,20	0,55	2,95	1,08	1,28±0,05	0,848±0,08	3,80±0,13	133	-71,2	252	155±5,9	19,3±1,8	184±6,3
1,33	0,733	2,27	0,896	1,26	2,15	2,00±0,13	0	3,98±0,15	123	100	85,1	194±13	0	201±7,6
3,33	0,667	1,07	3,14	1,08	0,957	3,56±0,27	0	3,17±0,11	13,4	100	231	109±8,4	0	255±9,1
Água Rio Barigui														
0,667	3,00	1,20	0,507	0,537	0,670	9,13±0,18	0	17,3±0,36	170	100	>500	>500	0	>500
1,33	0,733	2,27	1,16	n.d*	1,87	10,0±0,09	0	18,3±0,61	>500	0	>500	>500	0	>500
3,33	0,667	1,07	3,27	n.d*	0,755	11,8±0,11	0	18,0±0,10	261	0	>500	360±3,2	0	>500

a: fortificação

b: por HPLC

c: obtida pelo modelo

*n.d : não detectado

Este elevado efeito de matriz também é visualizado para os dados cromatográficos. Por exemplo, recuperações na faixa de 67-171% foram obtidas para água de nascente, que teoricamente deveria conter uma das menores influências da matéria orgânica. As menores taxas de recuperação dos metabólitos, entretanto, se devem em parte a baixa eficiência da fase adsorvente de sílica C18 em reter analitos mais polares como é o caso de DIA e DEA (MIN *et al*, 2008).

A análise dos resultados do modelo multivariado para amostras controle (sem fortificação), revelou que grande parte da absorção na região do ultravioleta é atribuída a presença do analito na amostra, fato que foi descartado pela análise das amostras por HPLC. Outra evidência do efeito de matriz pode ser observada na Tabela 14, cujos resultados da subtração entre as concentrações previstas pelo modelo PLSR para as amostras fortificadas e não fortificadas geram valores muito similares às concentrações de ATZ via HPLC (real).

TABELA 14: COMPARAÇÃO ENTRE A CONCENTRAÇÃO PREVISTA PELO MODELO MULTIVARIADO PARA AMOSTRA DE ÁGUA RIO, TORNEIRA E MINERAL COM E SEM FORTIFICAÇÃO COM ATZ E A CONCENTRAÇÃO REAL OBTIDA.

	C_{prevista} de ATZ (SPE-UV-PLS) (mg L⁻¹)		Subtração	C_{real} (HPLC) (mg L⁻¹)
	Amostras sem fortificar	Amostras fortificadas	C_{fortificada} - C_{sem forticar} (mg L⁻¹)	
Rio		1,28	0,36	0,55
(Arapongas)	0,929	2,00	1,07	0,896
		3,56	2,63	3,14
Água torneira	3,477	5,00	1,52	1,37
Água mineral	0,177	1,38	1,20	1,15

Apesar disso, o método espectroscópico multivariado desenvolvido mostrou recuperações satisfatórias para análise de ATZ em água de nascente (72,7-115%), com erros relativos médios um pouco superiores às previsões do modelo para o conjunto de validação externa (composta apenas por misturas sintéticas). Isto indica que a determinação quantitativa de ATZ pode ser realizada em matrizes com

quantidade reduzida de matéria orgânica na presença dos metabólitos. Discussão semelhante pode ser feita para água mineral analisada.

Em função destes resultados, é primordial a investigação de procedimentos prévios para *clean up* da amostra de água. Tais ensaios foram executados empregando água de torneira e três diferentes alternativas: (A) 2 x 2,5 mL MeOH 10%, (B) 2 x 2,5 mL MeOH 5% e (C) 2 x 2,5 mL água deionizada. Os resultados cromatográficos e a concentração prevista pelo modelo multivariado são mostrados na Tabela 15.

TABELA 15: AVALIAÇÃO DA RECUPERAÇÃO DE ATZ, DIA E DEA EMPREGANDO ENSAIOS DE *CLEAN-UP* PARA ÁGUA DE TORNEIRA PELA METODOLOGIA CROMATOGRÁFICA E PELO MÉTODO MULTIVARIADO PROPOSTO.

Mistura	C _{adicionada} (mg L ⁻¹)	C _{real} (mg L ⁻¹)				C _{prevista} (mg L ⁻¹)			
		SC*	A	B	C	SC*	A	B	C
ATZ	0,667	0,659	0,659	0,657	0,659	4,40	3,20	2,80	3,80
DIA	3,00	1,20	1,23	1,30	1,17	0	0	0	0
DEA	1,20	1,12	1,12	1,14	1,12	14,3	12,0	10,2	16,4

Recuperação (%)				
Mistura	SC*	A	B	C
ATZ	562±46	485±15	426±10	576±26
DIA	0	0	0	0
DEA	1277±43	1069±6	894±9	1447±25

*SC: sem etapa de *clean-up*;

Os resultados de recuperação para os ensaios de *clean-up* revelaram que a concentração prevista pelo modelo multivariado continua mais elevada que a real, não acarretando em melhoras significativas para determinação do analitos para que haja inclusão desta etapa no procedimento de SPE. Novamente, tais fatos confirmam a intensa interferência espectral da matéria orgânica presente em águas naturais na análise de ATZ e seus metabólitos pelo modelo espectroscópico multivariado. Os

espectros de ultravioleta para as amostras analisadas, sem fortificação com os analitos estudados, são apresentados na Figura 23.

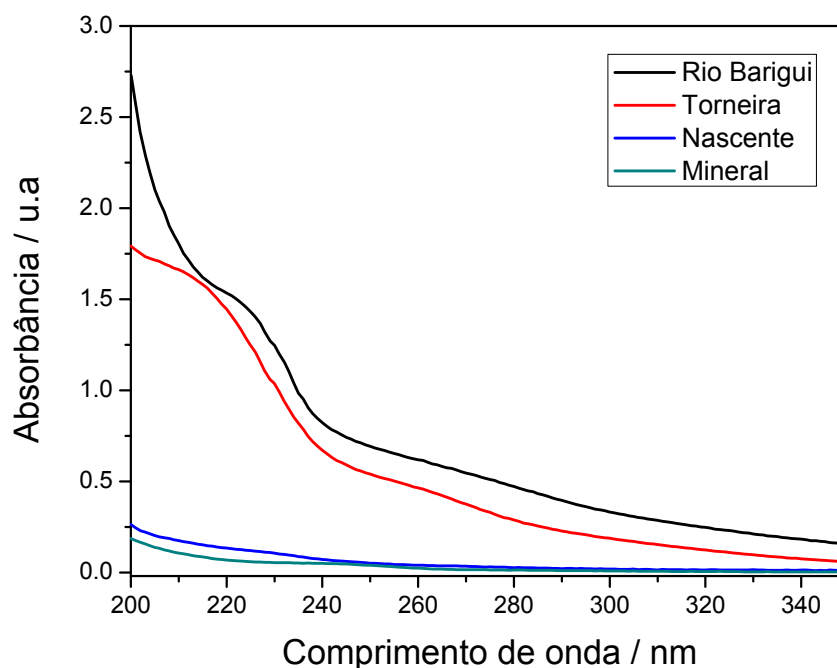


FIGURA 23: COMPORTAMENTO ESPECTROFOTOMÉTRICO UV PARA AMOSTRAS DE ÁGUAS NATURAIS.

Observa-se claramente que as amostras de água mineral e de nascente apresentam baixa intensidade de absorção a região UV, provavelmente devido à presença de menores quantidades de matéria orgânica nestas amostras. Por outro lado, as amostras de água do rio Barigui e de torneira coletada no laboratório, possuem elevada absorvância acarretando, portanto, nas altas recuperações obtidas para os analitos em questão. D'Archivio e colaboradores (2007) relataram que na região monitorada para a maioria dos pesticidas avaliados via HPLC-DAD (220 nm), o efeito de matriz foi mais significativo para aqueles com o menor tempo de retenção devido ao aparecimento de um pico largo no início do cromatograma. Tal fato pode ser comprovado como mostra a Figura 24, onde no tempo de retenção dos metabólitos avaliados há a presença de um pico largo que pode ser atribuído a elevada carga orgânica das amostras.

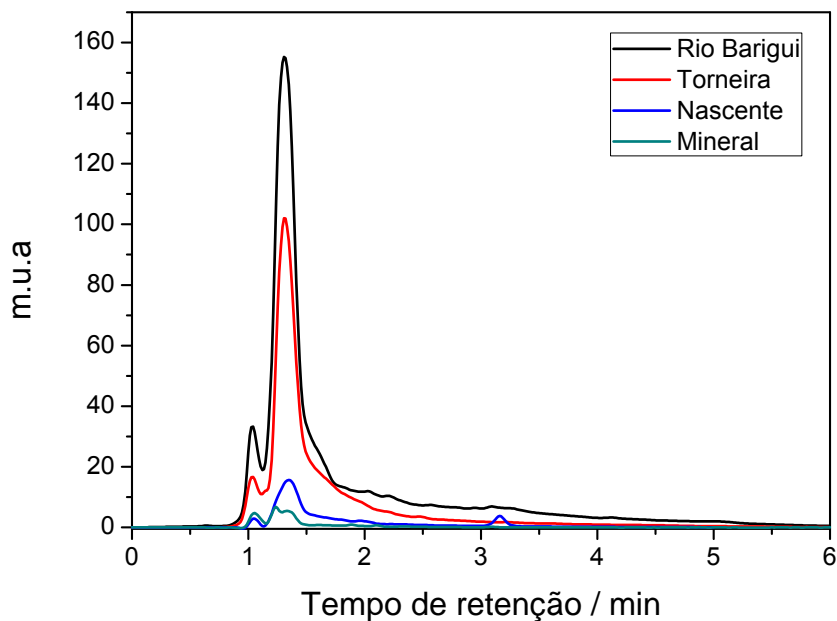


FIGURA 24: COMPORTAMENTO CROMATOGRÁFICO OBTIDO PARA AMOSTRAS DE ÁGUAS NATURAIS EM 220 nm.

Geralmente, efeitos de matriz não são relatados na literatura. Al-Degs e colaboradores (2009), por exemplo, não enfrentaram problemas tão pronunciados relacionados com a matriz, obtendo-se boas recuperações (84 a 93%) de atrazina, metidation, e propoxur em amostras de água de reservatório.

Apesar disso, nos últimos anos, algumas abordagens diferentes como uso de padrões internos e curvas combinadas de calibração, têm sido empregadas para minimizar os efeitos da matriz nas análises, principalmente em trabalhos que empregam técnicas cromatográficas acopladas a espectrometria de massas (MS-MS) (GARCÍA-GALÁN *et al*, 2013; FARRÉ *et al*, 2014). Outros trabalhos propõem a diluição das amostras com elevada complexidade para solucionar o efeito causado pela matriz (STAHNKE *et al*, 2012) apesar dessa prática reduzir consideravelmente a detectabilidade do método.

Ainda que grande influência da matriz seja observada, assim como, em outros trabalhos, a metodologia espectrofotométrica multivariada proposta se mostra um procedimento analítico simples, com baixo custo em relação a equipamentos e reagentes empregados além de reduzido impacto ambiental da análise pelo baixo consumo de solventes orgânico tóxicos.

5.2. ESPECTROMETRIA DE FTIR-ATR

5.2.1 Estudos Preliminares

Paralelamente a avaliação de procedimentos de pré-concentração empregando sílica C18 para determinação de atrazina juntamente com seus principais metabólitos por espectrofotometria UV-PLS, um estudo de adsorção empregando espumas de poliuretanas e análise por espectroscopia de infravermelho com reflectância total atenuada e transformada de Fourier também foi desenvolvido para o herbicida atrazina.

A técnica de espectroscopia no infravermelho tem sido amplamente utilizada na caracterização de substâncias e produtos químicos, e neste caso, associado a ferramentas de calibração multivariada, apresenta-se como uma alternativa interessante para a quantificação de atrazina em níveis traço de concentração. O espectro típico de FTIR-ATR da espuma de poliuretana é mostrado na Figura 25.

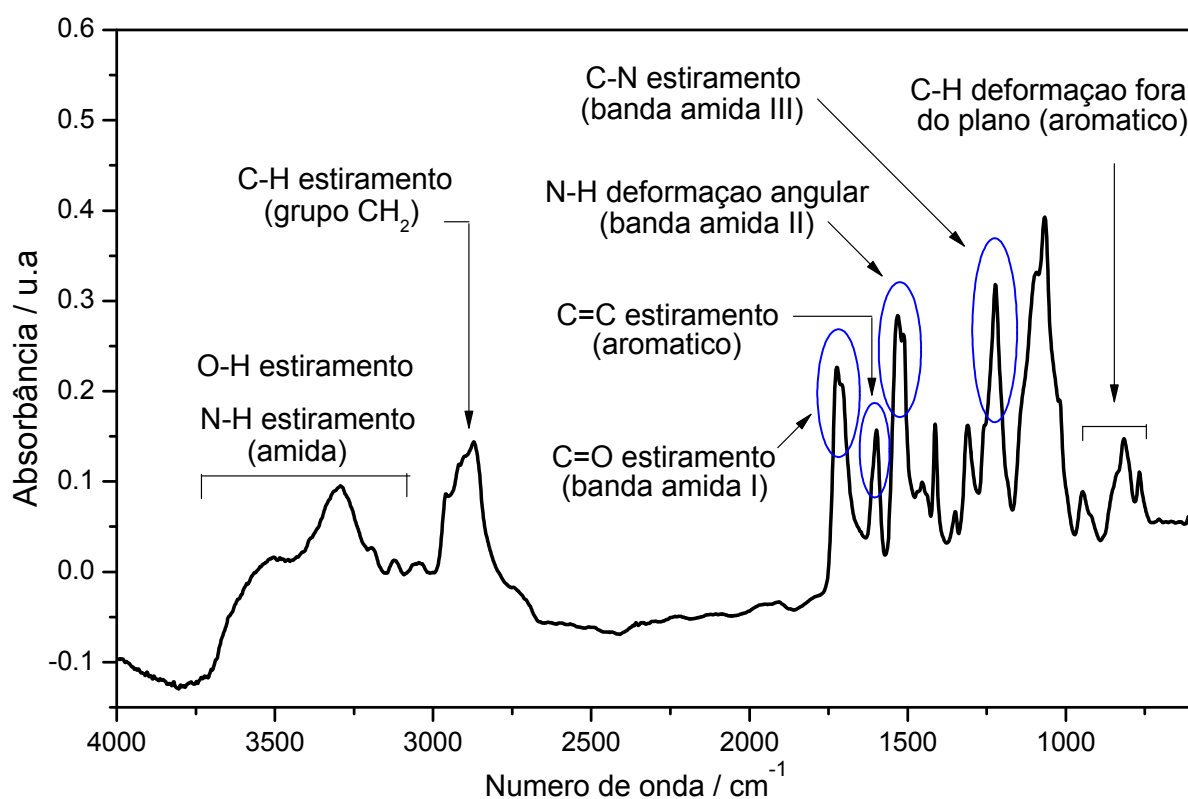


FIGURA 25: ESPECTRO TÍPICO DE FTIR-ATR PARA ESPUMAS DE POLIURETANA OBTIDA COM MÉDIA DE 32 SCANS E RESOLUÇÃO DE 4 cm^{-1} .

A região situada entre 1800 a 1100 cm^{-1} é característica de absorções de grupos que compõem a estrutura de poliuretana. A banda amida I (1680-1700 cm^{-1}), referente a deformação axial da carbonila, a banda amida II (1570-1514 cm^{-1}) que representa deformações angulares do grupo N-H originadas da interação entre a deformação angular de N-H e a deformação axial (estiramento) de C-N do grupo C-N-H e, banda amida III (próximo a 1400 cm^{-1}) relacionada com a banda de deformação axial (estiramento) de C-N, comprovam a formação dos grupos poliméricos de poliuretana. Devido à existência de inúmeros grupos carbonila na matriz polimérica, ocorre a superposição das frequências de deformação levando, conseqüentemente, ao alargamento das bandas (SILVERSTEIN, 2006).

Ainda é possível observar a presença de bandas de estiramento de grupos O-H residuais e bandas de estiramento N-H dos grupos amida na região entre 3600 e 3000 cm^{-1} , e bandas a 2870 cm^{-1} correspondentes a estiramentos do tipo C-H em grupos CH_2 da cadeia carbônicas da PU, bem como estiramento C=C de anéis aromáticos (1597 cm^{-1}) provenientes do precursor de isocianato utilizado (MDI).

O espectro FTIR-ATR obtido é bastante similar a outros trabalhos da literatura (ZHANG *et al*, 2008; PORTUGAL *et al*, 2008; MOAWED e EL-SHAHAT, 2014), comprovando a presença de sítios polares na estrutura das espumas de poliuretana os quais, possivelmente, podem atuar como sítios de adsorção do analito a partir da matriz aquosa.

Logo, para atingir os objetivos relacionados a adsorção de atrazina nas espumas de poliuretanas, estudos preliminares da potencialidade de adsorção da espuma foram realizados em duplicata na faixa de concentração de ATZ de 0,050 a 3,5 mg L^{-1} . Após a etapa de adsorção e secagem, os espectros de infravermelho referente a estas análises são mostrados na Figura 26.

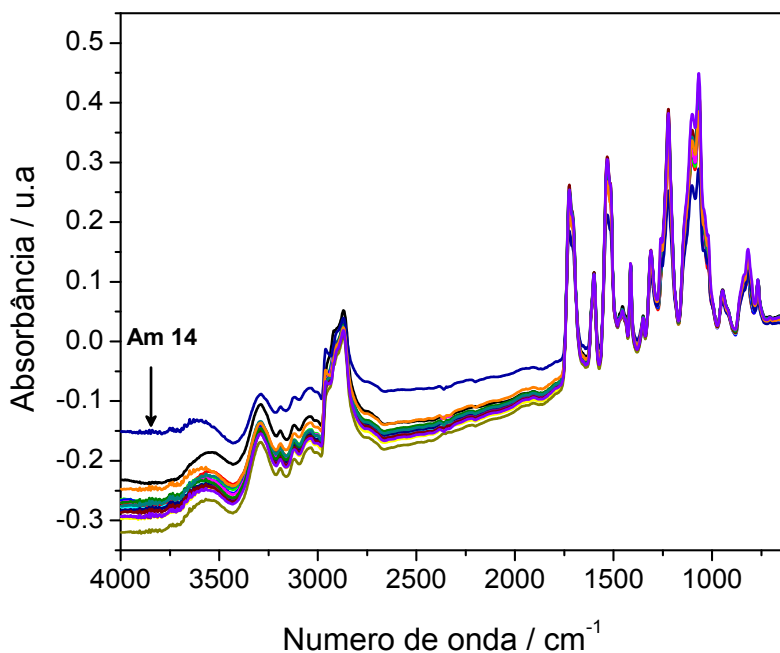


FIGURA 26: ESPECTROS DE FTIR-ATR DE ESPUMAS DE PU ADSORVIDAS COM ATZ EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES.

A diferença entre os espectros é muito sutil, mesmo com a alta concentração de ATZ (mg L^{-1}) presente em solução. Ou seja, nenhuma banda pode ser relacionada diretamente com o aumento da concentração do analito. Neste caso, empregou-se a Análise de Componentes Principais (PCA) como uma ferramenta para a avaliação e classificação dos possíveis sinais referentes à quantidade de ATZ adsorvida na espuma de PU. O método de PCA promove a decomposição da matriz de dados do FTIR-ATR, criando um novo sistema de eixos (componente principais - CPs) os quais, em menor número do que as variáveis originais, permitem representar grande parte da variância total do sistema. A parte não modelada dos espectros nesse novo sistema passa a ser uma matriz de erros. As novas coordenadas de cada uma das amostras são denominadas de *scores* e o peso que cada variável original (número de onda, cm^{-1}) contribui para a formação das componentes principais, é chamada de *loadings*.

Dessa forma, foram desenvolvidos modelos com e sem pré-processamentos para o espectro completo e para duas regiões selecionadas ($1169\text{-}722\text{ cm}^{-1}$ e $2990\text{-}2660\text{ cm}^{-1}$), individualmente e em conjunto. Os principais objetivos da etapa de pré-processamento são melhorar a posterior análise exploratória dos dados e modelos classificatórios e ainda, fazer com que os dados obedeçam a lei de

Lambert-Beer (RINNAN *et al*, 2009). Geralmente, os pré-processamentos empregados em espectros de infravermelho são o MSC (*Multiplicative Scatter Corretion*) e SNV (*Standard Normal Variate*) que removem e/ou corrigem o espalhamento da radiação especular e DETREND que remove tendências lineares e flutuações dos dados. O melhor processamento está demonstrado na Figura 27 a seguir.

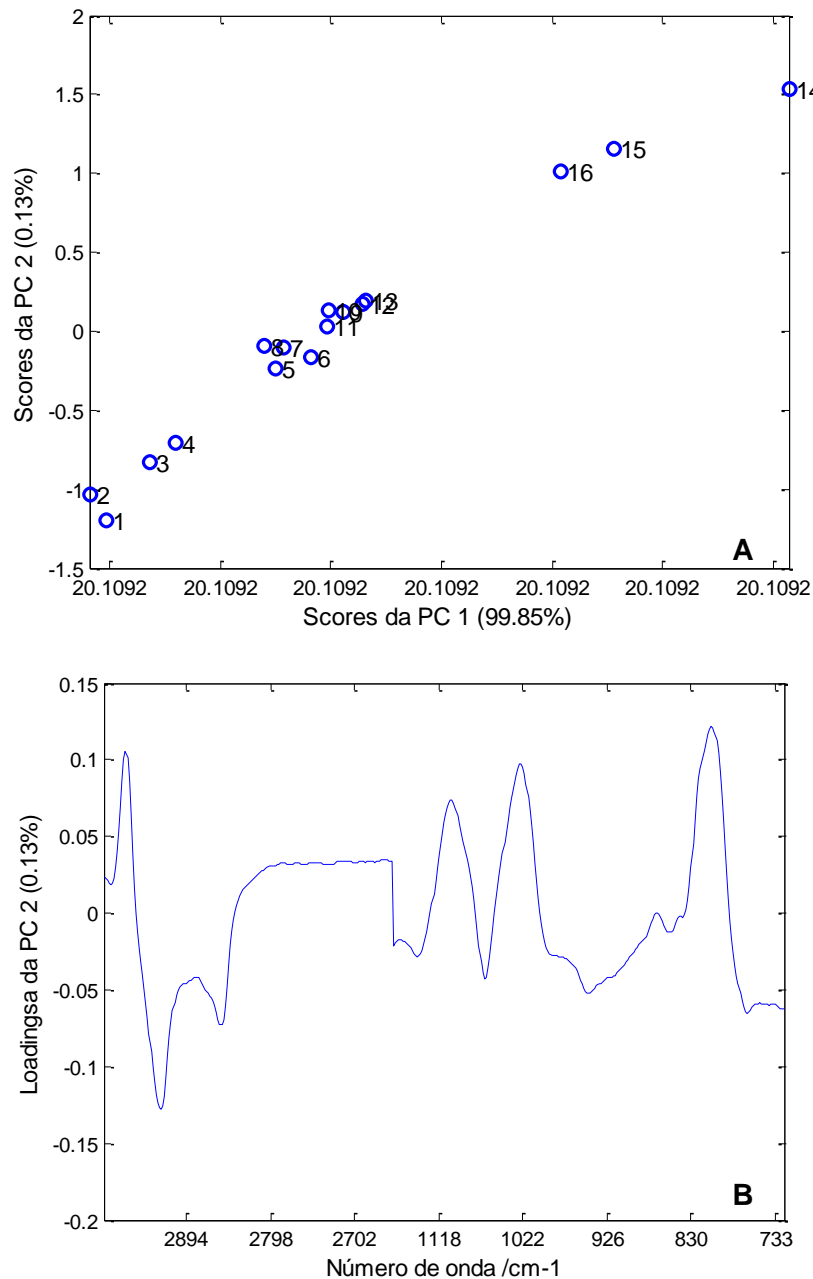
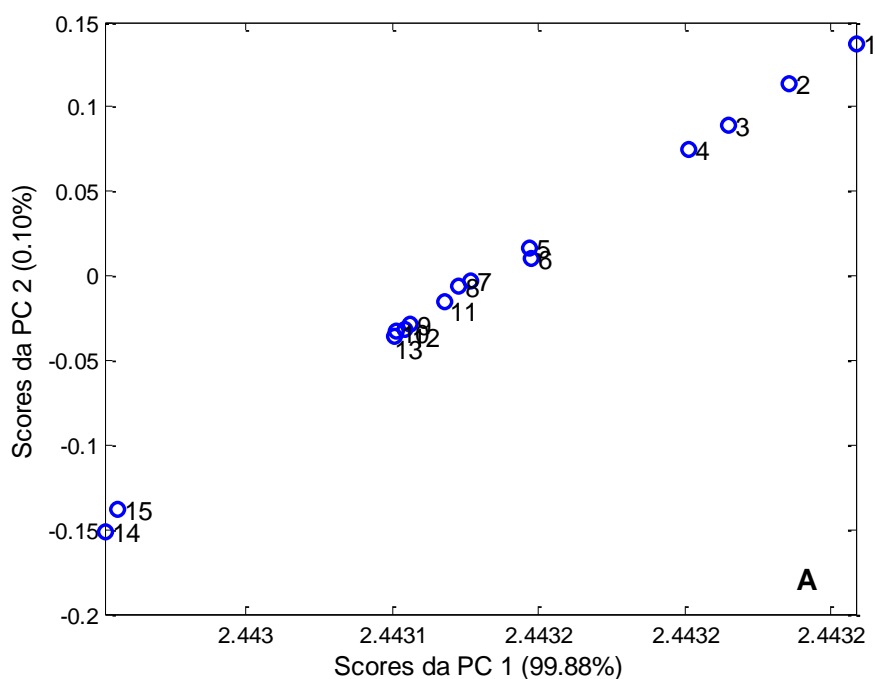


FIGURA 27: A) GRÁFICO DE SCORES DA PC1 vs. PC2 E B) GRÁFICO DE *LOADINGS* DA PC2 DA REGIÃO ESPECTRAL COMPREENDIDA ENTRE 1169-722 cm^{-1} E 2990-2660 cm^{-1} , EMPREGANDO-SE PRÉ-PROCESSAMENTO DETREND, SNV E MSC DE TODAS AS AMOSTRAS.

Apenas duas componentes principais foram necessárias para explicar 99,98% da variância dos dados, sendo que todas as PCAs obtidas evidenciaram a presença de uma amostra anômala. Analisando-se a Figura 26A (*scores*) e o espectro de FTIR-ATR (Figura 25) é possível observar que a amostra 14 apresenta um comportamento anômalo (localizado em valores de *scores* bem positivo na PC2, e bem distante da sua duplicata – amostra 13), não importando qual o tipo de pré-processamento e/ou região espectral utilizada. Tal anomalia está associada a diferenças no comportamento das bandas localizadas em 2960 cm^{-1} , 1100 cm^{-1} e 1025 cm^{-1} (conforme é possível observar pelos *loadings* positivos da PC2). Assim, a referida amostra foi retirada do próximo processamento.

A Figura 28 resultou em uma separação das amostras que não continham ATZ (1 a 4) daquelas com concentração intermediária (5 a 13) e das amostras com elevada concentração de ATZ (14 e 15). Além disso, é possível observar certa proximidade das amostras com mesma concentração de ATZ adsorvida (duplicatas – 5 e 6, 7 e 8, 9 e 10, 14 e 15).



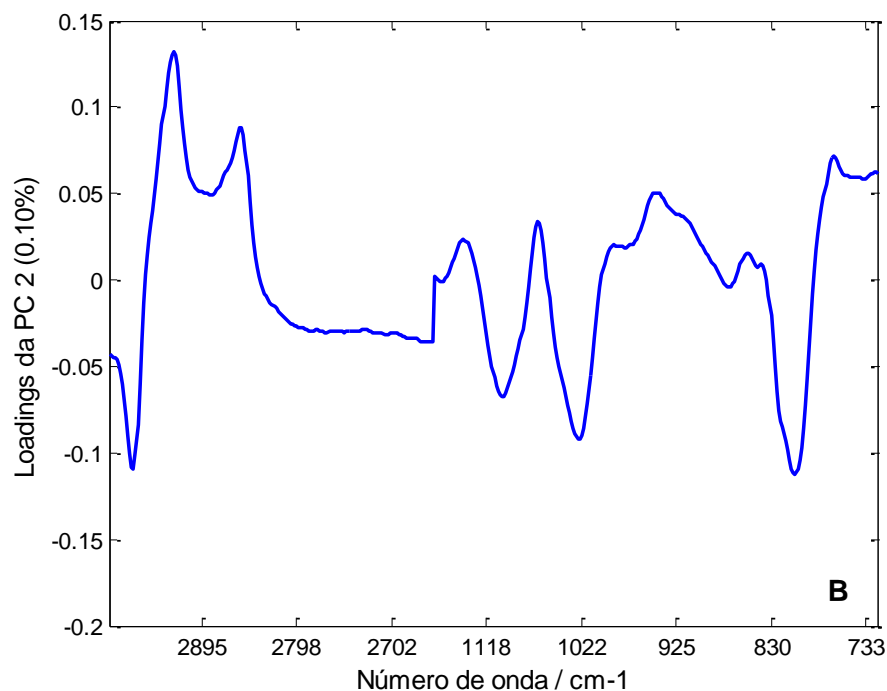


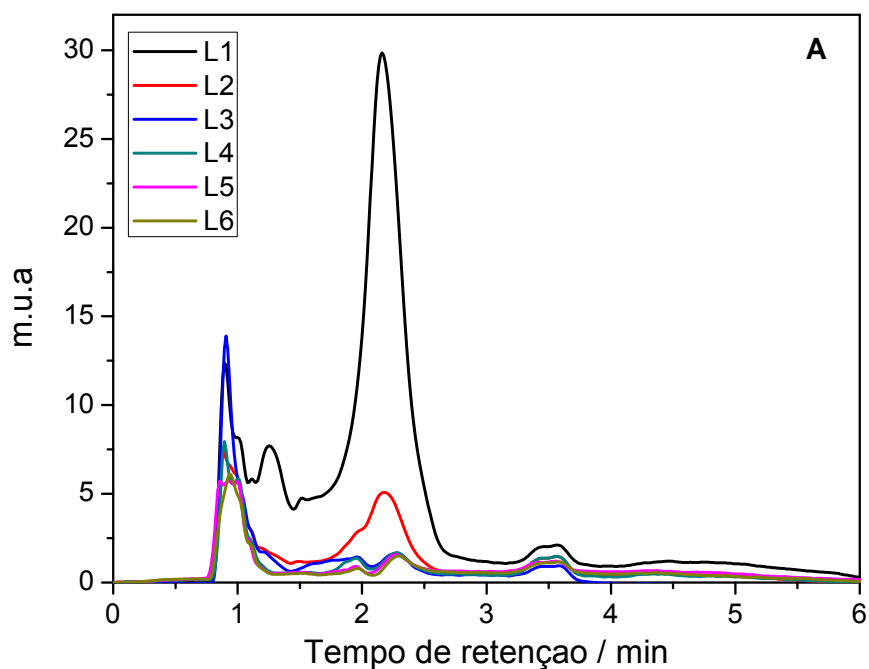
FIGURA 28: A) GRÁFICO DE SCORES DA PC1 vs. PC2 E B) GRÁFICO DE *LOADINGS* DA PC2 DA REGIÃO ESPECTRAL COMPREENDIDA ENTRE 1169-722 cm^{-1} E 2990-2660 cm^{-1} , EMPREGANDO-SE PRÉ-PROCESSAMENTO DETREND E MSC SEM A AMOSTRA ANÔMALA.

Avaliando-se juntamente os gráficos de *scores* e *loadings* verifica-se que existem regiões situadas em valores positivos dos *loadings* da PC2 correspondentes a regiões do espectro que identificam as PUs que não contém ATZ (relacionadas às bandas 2923 cm^{-1} , 2854 cm^{-1} e 765 cm^{-1}). Por outro lado, valores negativos de *loadings* da PC2 classificam amostras com alta concentração de ATZ correspondendo às bandas 2960 cm^{-1} , 1100 cm^{-1} , 1025 cm^{-1} e 805 cm^{-1} .

Estes resultados indicam a possibilidade da correlação entre o sinal espectral de FTIR-ATR obtido com a concentração de ATZ adsorvida. Tal potencial foi estudado com mais profundidade nos resultados mostrados a seguir.

5.2.2 Avaliação da limpeza das espumas de PU

Uma etapa de limpeza prévia das espumas de PU se faz necessária para eliminar possíveis interferentes e remover completamente compostos residuais da síntese. Dessa forma, baseado em método previamente descrito na literatura (NENG *et al*, 2007), testou-se um procedimento com acetonitrila em banho ultrassônico para a avaliação da eficiência da limpeza, assim como, de possíveis alterações em sua estrutura. As Figuras 29A e 29B mostram, respectivamente, os cromatogramas obtidos da acetonitrila sobrenadante e espectros de FTIR-ATR das espumas em cada tempo avaliado com novo volume de acetonitrila.



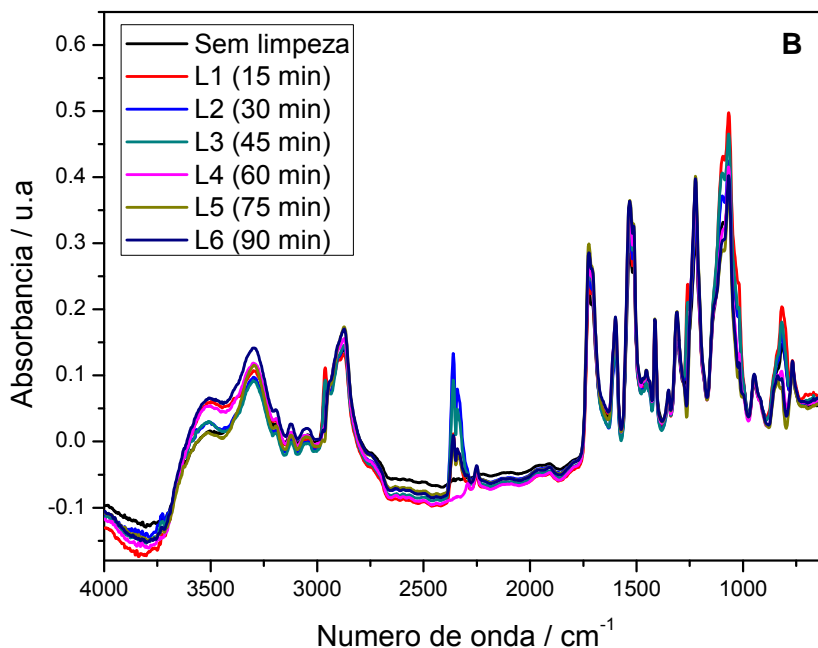


FIGURA 29: A) CROMATOGRAMAS OBTIDOS POR HPLC-DAD DO SOBRENADANTE APÓS PROCEDIMENTO DE LIMPEZA E B) ESPECTROS FTIR-ATR OBTIDOS DAS ESPUMAS DE POLIURETANA APÓS O TRATAMENTO EM ACN SOB SONICAÇÃO.

Com o aumento no tempo de lavagens, observa-se uma diminuição na intensidade dos picos dos interferentes, removidos pela acetonitrila durante o tempo de sonicação, sugerindo que o procedimento foi eficaz na remoção dos interferentes. Por outro lado, somente a diminuição da intensidade de absorção dos interferentes na cromatografia não comprova que alterações na estrutura da espuma estejam ocorrendo uma vez que apenas pequenas diferenças no espectro de infravermelho foram observadas. Para garantir que o melhor procedimento de limpeza fosse realizado, empregou-se a Análise de Componentes Principais (PCA) dos espectros de FTIR-ATR obtidos a partir de cada lavagem. Como avaliado anteriormente, MSC e DETREND se mostraram bons pré-processamentos para este tipo de matriz de dados, sendo utilizados, neste caso, para avaliar as diferenças da limpeza da espuma (Figura 30).

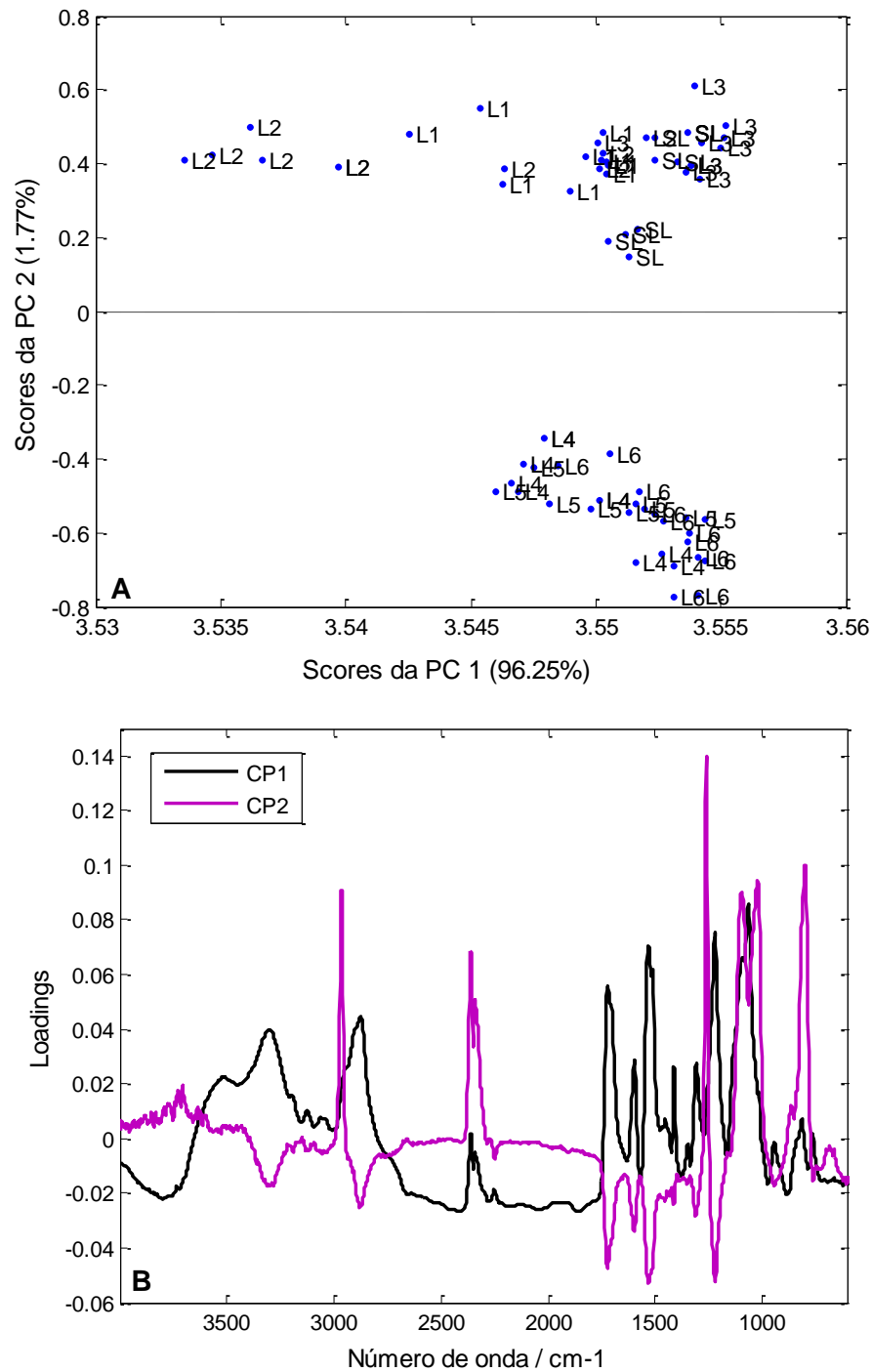


FIGURA 30: A) GRÁFICO DE SCORES DA PC1 vs. PC2 E B) GRÁFICO DE LOADINGS DA PC1 E PC2 EMPREGANDO-SE PRÉ-PROCESSAMENTO DETREND E MSC PARA AVALIAÇÃO DA MODIFICAÇÃO ESTRUTURAL DA ESPUMA DE POLIURETANA.

Com apenas duas componentes principais observou-se que 98% da variância dos dados foi explicada para o espectro completo. A primeira componente principal

representa a maior parte da variância dos dados espectrais (96,25%) não havendo, entretanto, classificação das amostras nessa componente. Por meio do gráfico de *loadings* correspondente a PC1, é possível afirmar que a dificuldade de classificação das amostras se deve ao fato que o espectro médio é considerado nessa componente sendo verificado pela semelhança dos *loadings* da PC1 com o espectro de FTIR-ATR obtido para as amostras de espuma. A segunda componente principal mostra claramente uma separação entre as três primeiras lavagens (L1-L3, valores positivos dos *scores*) e as três últimas (L4-L6, valores negativos dos *scores*). Essa diferença pode ser explicada pelo gráfico de *loadings* para a CP2 (Figura 29B): uma leve diminuição das bandas características da poliuretana, banda amida I, II e III além da banda N-H de grupo amida, apontam para uma modificação da estrutura da espuma com o aumento no número de lavagens da espuma. Provavelmente, ocorre a quebra das ligações previamente formadas durante a síntese da PU. Como tal fato é altamente indesejado, optou-se por manter o procedimento de limpeza em três etapas de 15 min em banho ultrassônico com acetonitrila renovada a cada passo.

5.2.3 Otimização da extração de atrazina em espuma de PU

A fim de otimizar o procedimento de adsorção de atrazina empregando as espumas de poliuretanas, um planejamento fatorial 2^3 com quadruplicata do ponto central foi realizado, mantendo a concentração constante de ATZ em $1,0 \text{ mg L}^{-1}$. A porcentagem de adsorção da ATZ nas espumas de PU foi calculada a partir da relação: $(C_0 - C/C_0) \times 100$, onde C_0 é a concentração inicial e C a concentração restante do herbicida no sobrenadante, sendo calculada a partir da interpolação direta com a curva analítica construída para ATZ mostrada na Figura 31. Um ganho de sensibilidade pode ser observado quando comparado com a curva realizada anteriormente na presença de DIA e DEA e em uma faixa de concentração menor (Figura 22).

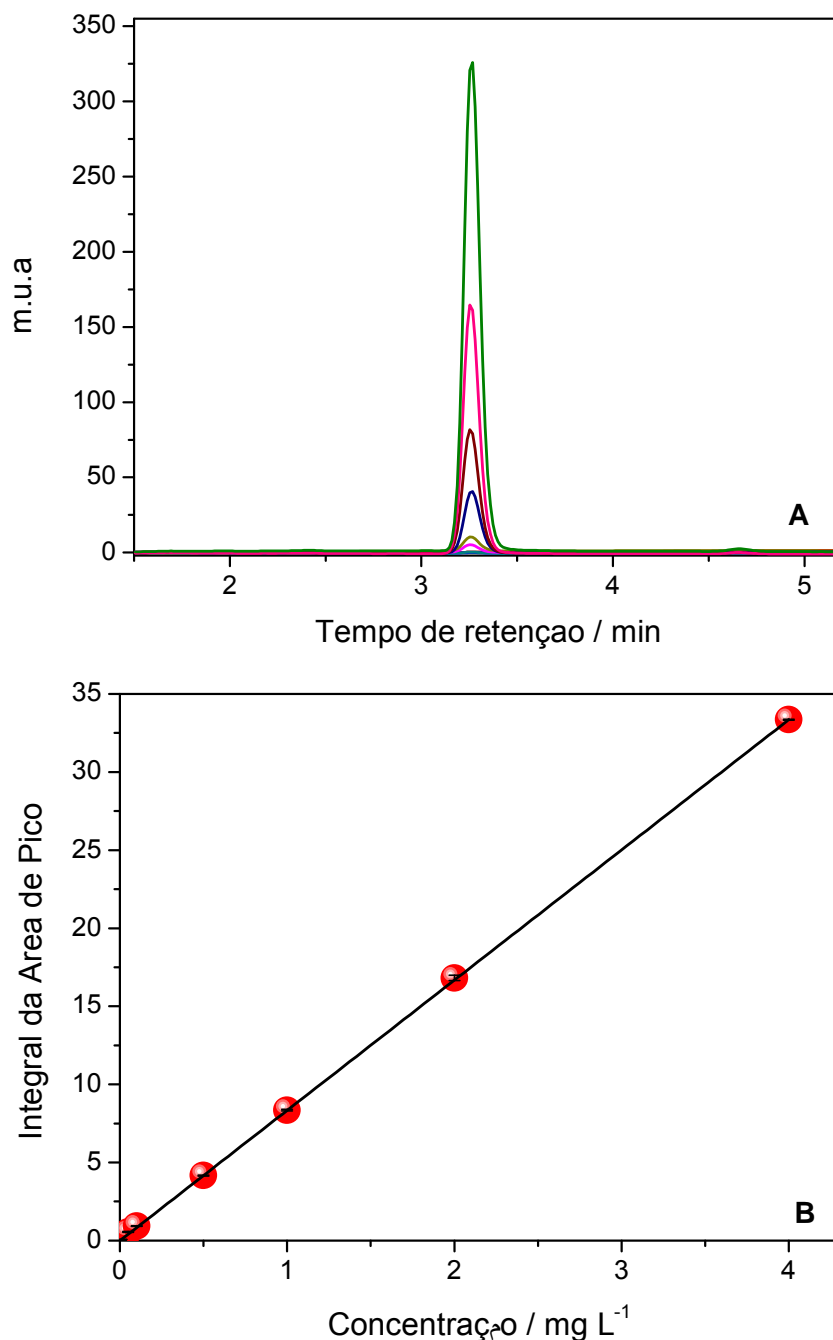


FIGURA 31: A) CROMATOGRAMAS PARA O PADRÃO DE ATZ OBTIDO POR ELUIÇÃO ISOCRÁTICA (H₂O:ACN, 50:50 v:v); B) CURVAS ANALÍTICAS CONSTRUÍDAS PARA ATZ NA FAIXA DE $9,0 \cdot 10^{-4}$ A $4,0 \text{ mg L}^{-1}$ ($Y = -0,00563 + 8,34C_{\text{ATZ}}$, $R=0,999$).

A matriz do planejamento experimental contendo as porcentagens de ATZ adsorvidas na espuma de poliuretano em cada ensaio realizado é mostrada na Tabela 16.

TABELA 16: RESULTADOS OBTIDOS PARA O PLANEJAMENTO 2^3 PARA AVALIAÇÃO DA AGITAÇÃO, TEMPO E pH NA ADSORÇÃO DE ATZ ($1,0 \text{ mg L}^{-1}$) EM ESPUMAS DE POLIURETANA.

Ensaio	Agitação	Tempo	pH	ATZ adsorvida (%)
1	-	-	-	19,8
2	+	-	-	23,3
3	-	+	-	20,6
4	+	+	-	26,2
5	-	-	+	22,8
6	+	-	+	28,7
7	-	+	+	20,1
8	+	+	+	27,0
9	0	0	0	23,7
10	0	0	0	22,8
11	0	0	0	23,0
12	0	0	0	18,7

NOTA: Agitação: (-) 100 rpm; (+) 250 rpm; Tempo: (-) 12h, (+) 24h; pH: (-) 5,0, (+) 7,0.

O ensaio com a máxima adsorção de ATZ foi aquele que empregou maior velocidade de agitação (250 rpm) e pH (7,0) e menor tempo (12 h). Tal resultado é compatível com os resultados empregando espumas de poliuretana com extração em barra sortiva obtidos na literatura (NENG *et al*, 2007 e PORTUGAL *et al*, 2008), nos quais as recuperações de atrazina são próximas a 30 %. Isto é típico de sistemas que são baseados em microextração em fase sólida, onde as moléculas de analito se deslocam e penetram na matriz de adsorção até o estabelecimento de um equilíbrio de partição, que não se altera mesmo que se aumente o tempo de contato (VALENTE e AUGUSTO, 2000).

Para avaliar o efeito de cada variável na adsorção de ATZ realizou-se, inicialmente, um teste Q para verificar a presença de anomalias nos dados das replicatas do ponto central. O teste Q indicou que o resultado do ensaio 12 é anômalo e, portanto, não foi considerado no cálculo da estimativa do desvio padrão.

A seguir, com base na estimativa do desvio padrão calculada com 95% de confiança de 2,03 ($t_{95\%, \nu=3} = 4,303$) constatou-se que foram significativos os efeitos principais (agitação e pH) e um leve efeito de segunda ordem ou de interação (tempo x

pH). Os demais efeitos calculados não foram significativos com intervalo de confiança de 95% como mostrado na Tabela 17.

TABELA 17: EFEITOS PRINCIPAIS E DE INTERAÇÃO ENTRE OS FATORES OTIMIZADOS PELO PLANEJAMENTO FATORIAL 2³.

Fatores	Efeitos Principais	Efeitos de interação
Agitação	5,50	-
Tempo	-0,183	-
pH	2,22	-
Agitação x Tempo	-	0,783
Agitação x pH	-	0,943
Tempo x pH	-	-2,08
Agitação x Tempo x pH	-	-0,2625
<i>Estimativa do desvio padrão</i>		2,03

O efeito da agitação se mostrou o mais importante para adsorção de ATZ na espuma de PU, uma vez que este fator controla o transporte de massa dos analitos da solução aquosa para a matriz polimérica até que o equilíbrio seja atingido (PORTUGAL *et al*, 2008). Em relação ao efeito do pH, é provável que em pH 5,0 os grupos da poliuretana (grupos amida e oxigênios) estejam protonados, diminuindo a capacidade de adsorção de ATZ (MOAWED e EL-SHAHAT, 2014). Dessa forma, mantendo o pH próximo a neutralidade, a ATZ, que também possui átomos de nitrogênio, tende a formar mais ligações de hidrogênio com os grupos da PU, aumentando, conseqüentemente, a porcentagem adsorvida.

Apesar do efeito principal do tempo não se mostrar significativo, é um parâmetro extremamente importante para que o equilíbrio entre as fases seja alcançado. Além disso, observou-se que o efeito de interação tempo x pH, ainda que levemente, se mostrou significativo, o que pode ser melhor visualizado na interpretação geométrica a seguir (Figura 32).

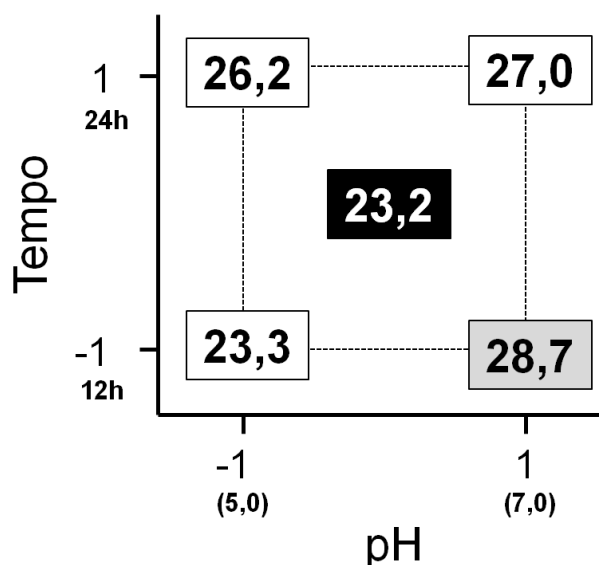


FIGURA 32: INTERPRETAÇÃO GEOMÉTRICA DOS EFEITOS DE INTERAÇÃO SIGNIFICATIVOS DO PLANEJAMENTO 2^3 PARA OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DE ADSORÇÃO DE ATZ NA ESPUMA DE PU.

De acordo com a interpretação geométrica foi possível constatar que passando do nível (-) para o nível (+) de pH, ocorre um aumento na porcentagem de adsorção de ATZ em ambos os níveis de tempo, sendo mais pronunciado para o nível (-). No entanto, fazendo a mesma análise em relação ao tempo, é possível observar que passando do nível (-) para o nível (+) de tempo, um aumento na porcentagem de adsorção de ATZ é observado para o nível (-) de pH e um decréscimo para nível (+) de pH. Esses resultados mostram que principalmente para o pH 7,0 no qual as melhores respostas foram obtidas, o tempo influencia negativamente, ou seja, com o aumento do tempo, ocorre uma diminuição da porcentagem de adsorção. Então, os parâmetros de agitação, tempo e pH avaliados foram mantidos em 250 rpm, 12 h e 7,0, respectivamente.

5.2.4 Método Multivariado

Novamente, o modelo de calibração multivariada foi elaborado empregando-se Regressão de Mínimos Quadrados Parciais (PLSR) para a determinação de ATZ. O

conjunto de espectros de FTIR-ATR obtidos (Figura 33), composto por 13 misturas sintéticas do analito em duplicata na faixa de 0,01 a 3 mg L⁻¹ foram utilizados na etapa de calibração para construção do modelo.

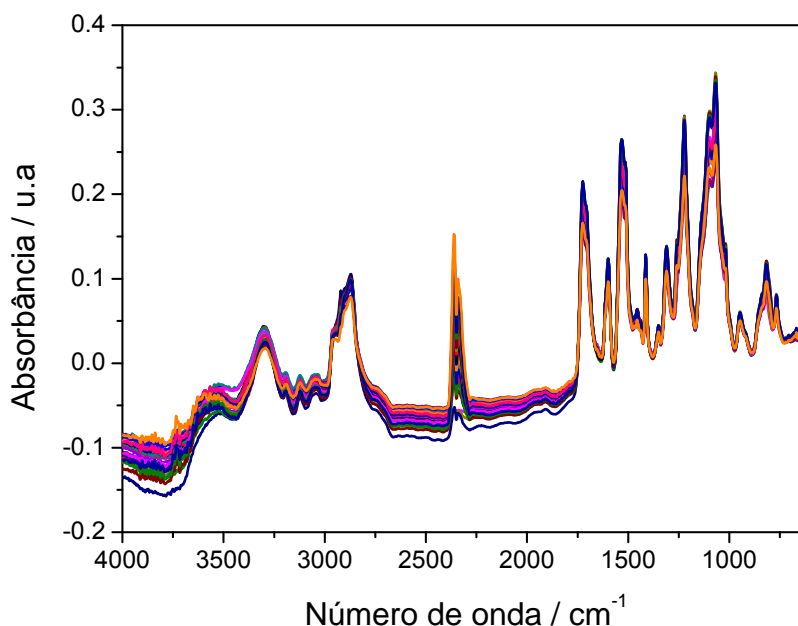


FIGURA 33: COMPORTAMENTO ESPECTRAL DAS 13 MISTURAS SINTÉTICAS EM DUPLICATA DO CONJUNTO DE CALIBRAÇÃO UTILIZADOS NA CONSTRUÇÃO DO MODELO MULTIVARIADO PARA A DETERMINAÇÃO DE ATZ NAS ESPUMAS DE PU.

Como observado na Figura 33, existe um crescente aumento na banda na região entre 2410 a 2230 cm⁻¹. Tal sinal está atrelado ao aumento da presença de CO₂ durante as medidas consecutivas. Dessa forma, a região entre 2410 a 2230 cm⁻¹ foi removida dos espectros empregados tanto para a etapa de calibração quanto na de validação.

As concentrações para a matriz Y_{cal} do modelo de calibração representadas como a porcentagem de adsorção da ATZ nas espumas de PU foram calculadas novamente seguindo a relação: $(C_0 - C/C_0) \times 100$, onde C₀ é a concentração inicial e C a concentração restante do herbicida no sobrenadante, considerando a curva analítica construída para ATZ mostrada na Figura 31. Com base nos dados cromatográficos da solução sobrenadante da duplicata mostrados na Tabela 18, a ATZ não foi adsorvida na espuma de poliuretano para as soluções de menor concentração do conjunto de calibração, ou seja, na faixa entre 0,0100 e 0,0500 mg L⁻¹. Provavelmente nestas

condições de concentração, o equilíbrio de partição seja atingido em um tempo maior que o utilizado.

TABELA 18: QUANTIDADE DE ATZ ADSORVIDA NOS CONJUNTOS DE CALIBRAÇÃO E VALIDAÇÃO.

Conj. de Calibração	Concentração inicial (mg L ⁻¹)		Concentração sobrenadante (mg L ⁻¹)		ATZ adsorvida (%)	
	R1*	R2**	R1	R2	R1	R2
0,0100	0,0110	0,0120	-	-	-	-
0,0250	0,0290	0,0250	-	-	-	-
0,0500	0,0542	0,0567	-	-	-	-
0,100	0,0985	0,102	1,50	-	1,50	-
0,200	0,201	0,142	-	29,0	-	29,0
0,250	0,259	0,242	-	3,20	-	3,20
0,500	0,481	0,493	3,80	1,40	3,80	1,40
0,750	0,437	0,418	41,7	44,3	41,7	44,3
1,00	0,688	0,724	31,2	27,6	31,2	27,6
1,50	0,977	1,38	34,9	8,00	34,9	8,00
2,00	1,95	1,94	2,50	3,00	2,50	3,00
2,50	2,44	1,66	2,40	33,6	2,40	33,6
3,00	3,03	2,95	-	1,67	-	1,67
Conj. de Validação	R1*	R2**	R1	R2	R1	R2
0,0300	0,0322	0,0302	-	-	-	-
0,0750	0,0750	0,0747	-	0,400	-	0,400
0,300	0,278	0,276	7,33	8,00	7,33	8,00
0,600	0,542	0,539	9,67	10,2	9,67	10,2
0,900	0,714	0,826	20,7	8,22	20,7	8,22
1,20	1,08	1,10	10,0	8,33	10,0	8,33
1,75	1,57	1,60	10,3	8,57	10,3	8,57
2,25	1,09	2,08	51,6	7,56	51,6	7,56

*R1 e **R2: valores obtidos para a duplicatas realizada mantendo a mesma concentração inicial de ATZ.

Os dados da Tabela 18 destacam ainda, para a maioria dos casos, a falta de reprodutibilidade entre as replicatas realizadas com a mesma concentração de atrazina (R1 e R2). Tendo isto em vista, para o conjunto de calibração considerou-se valor zero para os casos em que não foram observadas % de ATZ adsorvida e para os demais espectros de FTIR-ATR obtidos, o valor calculado como mostrado na Tabela 18, resultando em 26 misturas sintéticas para a etapa de calibração. Ainda, outro conjunto de calibração foi construído removendo os espectros onde não foi observada a adsorção de ATZ contando com 16 misturas sintéticas. O mesmo foi considerado para a construção do conjunto de validação. Em ambos os casos, procedimentos de seleção de variáveis de dados espectrais também foram empregadas para melhorar a capacidade de previsão do método desenvolvido.

Diversos modelos foram construídos empregando os espectros salientados acima e em diferentes regiões do espectro selecionadas a partir do estudo preliminar realizado (item 5.2.1). Vários pré-processamentos foram testados e os diferentes modelos construídos estabeleceram relações que não foram favoráveis para correlação da intensidade das bandas de FTIR-ATR com a atrazina adsorvida nas espumas refletindo diretamente nas baixas capacidades de previsão encontradas. Tal fato enfatiza a falta de reprodutibilidade do método desenvolvido já que as concentrações previstas são muito diferentes das concentrações reais indicadas.

Isto pode ter ocorrido devido a espuma de poliuretana utilizada ser modificada com um argilomineral (montmorilonita) modificando a forma de interação da ATZ anteriormente observada no estudo preliminar. Argilas interagem preferencialmente através de troca iônica desfavorecendo a interação da ATZ, que está na sua forma neutra nas condições experimentais utilizadas. Logo, como provavelmente o argilomineral não está distribuído homogeneamente na espuma de poliuretana, os fragmentos empregados na adsorção podem conter diferentes quantidades de montmorilonita, o que pode explicar as diferenças entre as duplicatas realizadas.

Os resultados obtidos para a previsão da concentração de atrazina adsorvida nas espumas de poliuretana são desfavoráveis, ficando clara a impossibilidade de concluir tal proposta.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES

Para a primeira proposta, um modelo de calibração multivariada foi elaborado para determinação simultânea de atrazina e seus principais metabólitos via espectrofotometria na região ultravioleta, em função dos problemas de interferência espectral observados que inviabilizam a determinação convencional de suas misturas. O modelo com melhor capacidade de previsão para os analitos em misturas sintéticas utilizou faixa espectral de 200 a 350 nm, com alisamento dos dados espectrais (largura de filtro de 5 pontos) e 4 VLs, apresentando erros relativos médios entre 6,44-7,00%. Apesar disso, a análise de amostras de águas naturais pelo método SPE-UV-PLS desenvolvido, se mostrou bastante complexa por apresentar inúmeros interferentes, principalmente substâncias húmicas na matéria orgânica que absorvem na mesma região espectral que os analitos avaliados.

A partir do segundo método proposto, conclui-se que a aplicação das poliuretanas para adsorção de ATZ foi viável apenas para concentrações de solução inicial de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$, chegando a aproximadamente 30% de adsorção do analito. Entretanto, a correlação da concentração de ATZ adsorvida com os espectros de FTIR-ATR da poliuretana a partir de ferramentas de calibração multivariada se mostrou pouco eficiente (elevados erros relativos e taxas de recuperação) devido principalmente a regiões espectrais que não contribuem significativamente para a previsão do modelo.

REFERÊNCIAS

- ABDEL AZEEM, S. M. A.; ARAFA, W. A. A.; EL-SHAHAT, M. F. Synthesis and application of alizarin complexone functionalized polyurethane foam: Preconcentration/separation of metal ions from tap water and human urine. *Journal of Hazardous Materials*, 182, **2010**, p. 286–294
- AL-DEGS, Y. S.; AL-GHOUTI, M. A.; EL-SHEIKH, A. H. Simultaneous determination of pesticides at trace levels in water using multiwalled carbon nanotubes as solid-phase extractant and multivariate calibration. *Journal of Hazardous Materials*, 169, **2009**, p. 128-135.
- ALI, O. A. M. Synthesis, spectroscopic, fluorescence properties and biological evaluation of novel Pd(II) and Cd (II) complexes of NOON tetradentate Schiff bases. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 121, **2014**, p. 188-195.
- ALVES, J. C. L.; POPPI, R. J. Simultaneous determination of acetylsalicylic acid, paracetamol and caffeine using solid-phase molecular fluorescence and parallel factor analysis. *Analytica Chimica Acta*, 642, **2009**, p. 212-216.
- AMADORI, M. F.; CORDEIRO, G. A.; REBOUÇAS, C. C.; PERALTA-ZAMORA, P. G.; GRASSI, M. T.; ABATE, G. Extraction method for determination of atrazine, deethylatrazine, and deisopropylatrazine in agricultural soil using factorial design. *Journal of Brazilian Chemical Society*, 24, **2013**, p. 483-491a.
- AMADORI, M. F. Avaliação do comportamento do herbicida Atrazina em amostras de solo do sudoeste do Paraná. Curitiba - PR. 2013. Tese (Doutorado em Química Analítica) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, **2013b**.
- ARMAS, E. D.; MONTEIRO, R. T. R.; ANTUNES, P. M.; SANTOS, M. A. P. F.; CAMARGO, P. B. Diagnóstico espaço-temporal da ocorrência de herbicidas nas águas superficiais e sedimentos do rio Corumbataí e principais afluentes. *Química Nova*, 30, **2007**, p. 1119-1127.
- AUFARTOVÁ, J.; MAHUGO-SANTANA, C.; SOSA-FERRERA, Z.; SANTANA-RODRÍGUEZ, J. J.; NOVÁKOVÁ, L.; SOLICH, P. Determination of steroid

hormones in biological and environmental samples using green microextraction techniques: An overview. *Analytica Chimica Acta*, 704, **2011**, p. 33-46.

BARCELÓ, D.; HENNION, M. Trace Determinants of Pesticides and their Degradation Products in Water. *Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry*. v. 19, Elsevier, **1997**. Cap. 1.

BARONTI, C.; CURINI, R.; D'ASCENZO, G.; DI CORCIA, A.; GENTILI, A.; SAMPERI, R. Monitoring natural and synthetic estrogens at activated sludge sewage treatment plants and in a receiving river water. *Environmental Science & Technology*, 34, **2000**, p. 5059-5066.

BARTHUS, R. C.; MAZO, L. H.; POPPI, R. J. Determinação simultânea de NADH e ácido ascórbico usando voltametria de onda quadrada com eletrodo de carbono vítreo e calibração multivariada. *Eclética Química*, 30, **2005**, p. 51-58.

BASILE, T.; PETRELLA, A.; PETRELLA, M.; BOGHETICH, G.; PETRUZZELLI, V.; COLASUONNO, S.; PETRUZZELLI, D. Review of endocrine-disrupting-compound removal technologies in water and wastewater treatment plants: An EU perspective. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 50, **2011**, p. 8389-8401.

BAQUERO, F.; MARTÍNEZ, J.; CANTÓN, R. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Current Opinion in Biotechnology*, 19, **2008**, p. 260-265.

BENVENUTO, F.; MARIN, J. M.; SANCHO, J. V.; CANOBBIO, S.; MEZZANOTTE, V.; HERNÁNDEZ, F. Simultaneous determination of triazines and their main transformation products in surface and urban wastewater by ultra-high-pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397, **2010**, p. 2791-2805.

BERTONE, E.; VENTURELLO, A.; LEARDI, R.; GEOBALDO, F. Prediction of the optimum harvest time of 'Scarlet' apples using DR-UV-Vis and NIR spectroscopy. *Postharvest Biology and Technology*, 69, **2012**, p. 15-23.

BESSE, J.; GARRIE, J. Human pharmaceuticals in surface waters. Implementation of a prioritization methodology and application to the French situation. *Toxicology Letters*, 176, **2008**, p. 104-123.

- BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. *Química Nova*, 30, **2007**, p. 651-666.
- BONANSEA, R. I.; AMÉ, M. V.; WUNDERLIN, D. A. Determination of priority pesticides in water samples combining SPE and SPME coupled to GC-MS. A case study: Suquia River basin (Argentina). *Chemosphere*, 90, **2013**, p. 1860-1869.
- BRERETON, R. G. Introduction to multivariate calibration in analytical chemistry. *Analyst*, 125, **2000**, p. 2125-2154.
- BRUZZONITI, M. C.; SARZANINI, C.; COSTANTINO, G.; FUNGI, M. Determination of herbicides by solid phase extraction gas chromatography-mass spectrometry in drinking Waters. *Analytica Chimica Acta*, 578, **2006**, p. 241-249.
- CALDAS, S. S.; GOLÇALVES, F. F.; PRIMEL, E. G.; PRESTES, O. D.; MARTINS, M. L.; ZANELLA, R. Principais técnicas de preparo de amostra para a determinação de resíduos de agrotóxicos em água por cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos e por espectrometria de massas. *Química Nova*, 34, **2011**, p. 1604-1617.
- CAPPELINI, L. T. D. Análise dos pesticidas ametrina, atrazina, diuron e fipronil em amostras de água do Ribeirão do Feijão - São Carlos - SP. 2008. Tese (Doutorado em Química Analítica) – Universidade de São Paulo, São Carlos, **2008**.
- CAPPELINI, L. T. D.; CORDEIRO, D.; BRONDI, S. H. G.; PRIETO, K. R.; VIEIRA, E. M. Development of methodology for determination of pesticides residue in water by SPE/HPLC/DAD. *Environmental Technology*, 33, **2012**, p. 2299-2304.
- CARABIAS-MARTÍNEZ, R.; RODRÍGUEZ-GONZALO, R.; HERRERO-HERNÁNDEZ, E.; ROMÁN, F. J. S.; FLORES, M. G. P. Determination of herbicides and metabolites by solid-phase extraction and liquid chromatography. Evaluation of pollution due to herbicides in surface and groundwater. *Journal of Chromatography A*, 950, **2002**, p. 157-166.
- CARABIAS-MARTÍNEZ, R.; RODRÍGUEZ-GONZALO, R.; SANTIAGO-TORIBIO, M. P.; HERNÁNDEZ-MÉNDEZ, J. Determination of triazine in surface waters by membrane separation coupled on-line to a flow-injection system and partial least squares regression. *Analytica Chimica Acta*, 321, **1996**, p. 147-155.

- CHERTA, L.; BELTRAN, J.; PORTOLÉS, T.; HERNÁNDEZ, F. Multiclass determination of 66 organic micropollutants in environmental water samples by fast gas chromatography-mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 402, **2012**, p. 2301-2314.
- CHRISTOFFOLETI, P. J.; OVEJERO, R. F. L.; NICOLAI, M.; VARGAS, L.; CARVALHO, S. J. P.; CATANEO, A. C.; CARVALHO, J. C.; MOREIRA, M. S. Aspectos de resistência de plantas daninhas a herbicidas. 3ª ed., Associação Brasileira de Ação à Resistência de Plantas aos Herbicidas: Piracicaba:, **2008**, p. 99.
- COMERTON, A. M.; ANDREWS, R. C.; BAGLEY, D. M. Practical overview of analytical methods for endocrine-disrupting compounds, pharmaceutical and personal care products in water and wastewater. *Philosophical Transactions of the Royal Society A*, 367, **2009**, p. 3923-3939.
- CONAMA. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente, Resolução n. 357, **2005**.
- CRAGIN, L. A.; KESNER, J. S.; BACHAND, A. M.; BARR, D. B.; MEADOWS, J. W.; KRIEG, E. F.; REIF, J. S. Menstrual cycle characteristics and reproductive hormone levels in women exposed to atrazine in drinking waters. *Environmental Research*, 111, **2011**, p. 1293-1301.
- CUI, S.; CHEN, Q.; WANG, W.; MIAO, J.; WANG, A.; CHEN, J. Ultra-preconcentration and determination of multiple pesticides residues in water samples using ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction and GC-FID. *Chromatographia*, 76, **2013**, p. 671-678.
- D'ARCHIVIO, A. A.; FANELLI, M.; MAZZEO, P.; RUGGIERI, F. Comparison of different sorbents for multiresidue solid-phase extraction of 16 pesticides from groundwater coupled with high-performance liquid-chromatography. *Talanta*, 71, **2007**, p. 25-30.
- DEB, G. Atrazine: A Case Study in the Differences Between Regulations of Endocrine Disrupting Chemicals in the EU and the US. *The Temple Journal of Science, Technology & Environmental Law*, 25, **2006**, p. 173-190.
- DMITRIENKO, S. G.; SHAPOVALOVA, E. N.; GURARII, E. Y.; KOCHETOVA, M. V.; SHPIGUN, O. A.; ZOLOTOV, Y. A. Preconcentration of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons on Polyurethane Foams and Their Determination in Waters with the

Use of Luminescence and High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Analytical Chemistry*, 57, **2002**, p. 1009–1016.

DORES, E. F. G. C.; NAVICKIENE, S.; CUNHA, M. L. F.; CARBO, L.; RIBEIRO, M. L.; DE-LAMONICA-FREIRE, R. M. Multiresidue determination of herbicides in environmental waters from Primavera do Leste Region (middle west of Brazil) by SPE-GC-NPD. *Journal of Brazilian Chemical Society*, 17, **2006**, p. 866-873.

DUJAKOVIĆ, N.; GRUJIĆ, S.; RADIŠIĆ, M.; VASILJEVIĆ, T.; LAUŠEVIĆ, M. Determination of pesticides in surface and ground water by liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 678, **2010**, p. 63-72.

EC. Review of priority substances under the WFD; **2011**.

EL-SHAHAWI, M. S.; BASHAMMAKH, A. S.; AL-SIBAAI, A. A.; ORIEF, M. I.; AL-SHAREEF, F. M. Solid phase preconcentration and determination of trace concentrations of total gold (I) and/or (III) in sea and wastewater by ion pairing impregnated polyurethane foam packed column prior flame atomic absorption spectrometry. *International Journal of Mineral Processing*, 100, **2011**, p. 110–115.

EL-SHEIKH, A. H.; SWEILEH, J. A.; AL-DEGS, Y. S.; INSISI, A. A.; AL-RABADY, N. Critical evaluation and comparison of enrichment efficiency of multi-walled carbon nanotubes, C18 silica and activated carbon towards some pesticides from environmental waters. *Talanta*, 74, **2008**, p. 1675-1680.

ERIKSSON, L. E. J.; KETTANEH-WOLD, N.; WOLD, S. *Multi- and Megavariate Data Analysis Principles and Applications*. Umetrics: Sweden, **2001**.

FAN, W. Q.; YANASE, T.; MORINAGA, H.; GONDO, S.; OKABE, T.; NOMURA, M.; KOMATSU, T.; MOROHASHI, K.; HAYES, T. B.; TAKAYANAGI, R.; NAWATA, H. Atrazine-induced aromatase expression is SF-1 dependent: implications for endocrine disruption in wildlife and reproductive cancers in humans. *Environmental Health Perspectives*, 115, **2007**, p. 720-727.

FARRÉ, M.; PÉREZ, S.; KANTIANI, L.; BARCELÓ, D. Fate and toxicity of emerging pollutants, their metabolites and transformation products in the aquatic environment. *Trends in Analytical Chemistry*, 27, **2008**, p. 991-1007.

- FARRÉ, M.; PICÓ, Y.; BARCELÓ, D. Application of ultra-high pressure liquid chromatography linear ion-trap orbitrap to qualitative and quantitative assesment of pesticides residues. *Journal of Chromatography A*, 1328, **2014**, p. 66-79.
- FERRARO, M. C. F.; CASTELLANO, P. M.; KAUFMAN, T. S. A spectrophotometric-partial least squares (PLS-1) methos for the simultaneous determination of furosemide and amiloride hydrochloride in pharmaceutical formulations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 26, **2001**, p. 443-451.
- FISCHER, K.; FRIES, E.; KÖRNER, W.; SCHMALZ, C.; ZWIENER, C. New developments in the trace analysis of organic water pollutants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 94, **2012**, p. 11-28.
- FREEMAN, L. E. B.; RUSIECKI, J. A.; HOPPIN, J. A.; LUBIN, J. H.; KOUTROS, S.; ANDREOTTI, G.; ZAHM, S. H.; HINES, C. J.; COBLE, J. B.; BARONE-ADESI, F.; SLOAN, J.; SANDLER, D. P.; BLAIR, A.; ALAVANJA, M. C. R. Atrazine and cancer incidence among pesticides applicators in the agricultural health study (1994-2007). *Environmental Health Perspectives*, 119, **2011**, p. 1253-1259.
- GAMMON, D. W.; ALDOUS, C. N.; CARR, W. C.; SANBORN, J. R.; PFEIFER, K. F. A risk assessment of atrazine use in California: human health and ecological aspects. *Pest Management Science*, 61, **2005**, p. 331-355.
- GARBELLINI, G. S.; PEDROSA, V. A.; SALAZAR-BANDA, G. R.; AVACA, L. A. Metodologias eletroanalíticas para a determinação de herbicidas triazínicos por voltametria de onda quadrada e técnicas de deconvolução. *Química Nova*, 30, n. 8, **2007**, p. 2025-2034.
- GARCÍA-GALÁN, M. J.; DÍAZ-CRUZ, S.; BARCELÓ, D. Multiresidue trace analysis of sulfonamide antibiotics and theirs metabolites in soils and sewage sludge by pressurized liquid extraction followed by liquid chromatography-electrospray-quadrupole linear ion trap mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1275, **2013**, p. 32-40.
- GARCÍA-MAYOR, R. V.; VIDAL, A. L.; CAAMAÑO, M. F. D.; GIMÉNEZ, A. L. Disruptores endocrinos y obesidad: obesógenos. *Endocrinología y Nutrición*, 59, **2012**, p. 261-267.
- GERVAIS, G.; BROSILLON, S.; LAPLANCHE, A.; HELEN, C. Ultra-pressure liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry for multiresidue

- determination of pesticides in water. *Journal of Chromatography A*, 1202, **2008**, p. 163-172.
- GHISELLI, G.; JARDIM, W. F. Interferentes endócrinos no ambiente. *Química Nova*, 30, **2007**, p. 695-706.
- GRAYMORE, M.; STAGNITTI, F.; ALLINSON, G. Impacts of atrazine in aquatic ecosystems. *Environment International*, 26, **2001**, p. 483-495.
- HAYES, T. B. ANDERSON, L. L.; BEASLEY, V. R.; SOLLA, S. R.; IGUCHI, T.; INGRAHAM, H.; KESTEMONT, P.; KNIEWALD, J.; KNIEWALD, Z.; LANGLOIS, V. S.; LUQUE, E. H.; MCCOY, K. A.; MUÑOZ-DE-TORO, M.; OKA, T.; OLIVEIRA, C. A.; ORTON, F.; RUBY, S.; SUZAWA, M.; TAVERA-MENDOZA, L. E.; TRUDEAU, V. L.; VICTOR-COSTA, A. B.; WILLINGHAM, E. Desmaculinization and feminization of male gonads by atrazine: Consistent effects across vertebrate classes. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 127, **2011**, p. 64-73.
- HENNION, M. Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, 856, **1999**, p. 3-54.
- HUANG, S.; STANTON, J. S.; LIN, Y.; YOKLEY, R. A. Analytical method for the determination of atrazine and its dealkylated chlorotriazine metabolites in water using SPE sample preparation and GC-MSD analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, **2003**, p. 7252-7258.
- JEANNOT, R.; SABIK, H.; SAUVARD, E.; DAGNAC, T.; DOHRENDORF, K. Determination of endocrine-disrupting compounds in environmental samples using gas and liquid chromatography with mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 974, **2002**, p. 143-159.
- JIANG, H.; ADAMS, C. D.; KOFFSKEY, W. Determination of chloro-s-triazines including didealkylatrazine using solid-phase extraction coupled with gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1064, **2005**, p. 219-226.
- KOOKANA, R. S.; JANIK, L. J.; FOROUZANGO HAR, M.; FORRESTER, S. T. Prediction of atrazine sorption coefficients in soils using mid-infrared spectroscopy and partial least-squares analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, **2008**, p. 3208-3213.

- KUBOTA, T.; ARAÚJO, M. V. G.; VIEIRA, J. V. F.; SILVA, T. A.; RAMOS, L. P.; ZAWADZKI, S. F. Synthesis of new carbohydrate-based polyurethanes and their application in the purification of methyl esters (biodiesel). *Journal of Polymer Research*, 20, **2013**, p. 1-8
- KUKLENYIK, Z.; PANUWET, P.; JAYATILAKA, N. K.; PIRKLE, J. L.; CALAFAT, A. M. Two-dimensional high performance liquid chromatography separation and tandem mass spectrometry detection of atrazine and its metabolic and hydrolysis products in urine. *Journal of Chromatography B*, 901, **2012**, p. 1– 8.
- KUZ'MINA, E. V.; KHATUNTSEVA, L. N.; DMITRIENKO, S. G. Determination of Aniline and Phenol in Waters Using Polyurethane Foams and Diffuse Reflectance Spectroscopy. *Journal of Analytical Chemistry*, 63, **2008**, p. 34–40.
- LAHT, M.; KARKMAN, A.; VOOLAID, V.; RITZ, C.; TENSON, T.; VIRTA, M.; KISAND, V. Abundance of tetracycline, sulphonamide and beta-lactam antibiotic resistance genes in conventional wastewater treatment plants (WWTPs) with different waste load. *PLoS ONE*, 9, **2014**, p. 1-9.
- LANÇAS, F. M. *Cromatografia Líquida Moderna*. Ed. Átomo, Campinas, **2009**, p. 263-296.
- LAPWORTH, D. J.; BARAN, N.; STUART, M. E.; WARD, R. S. Emerging organic contaminants in groundwater: A review of sources, fate and occurrence. *Environmental Pollution*, 163, **2012**, p. 287-303.
- LEBARON, H., MCFARLAND, J., BURNSIDE, O. The triazine herbicides – 50 years revolutionizing agriculture. 1 ed., Elsevier, **2008**, Cap 8.
- LI, P.; YANG, X.; MIAO, H.; ZHAO, Y.; LIU, W.; WU, Y. Simultaneous determination of 19 triazine pesticides and degradation products in processed cereal samples from Chinese total diet study by isotope dilution–high performance liquid chromatography–linear ion trap mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 781, **2013**, 63-71.
- LINTELMANN, J.; KATAYAMA, A.; KURIHARA, N.; SHORE, L.; WENZEL, A. Endocrine disruptors in the environment (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, 75, **2003**, p. 631-681.

- LIŠKA, I. Fifty years of solid-phase extraction in water analysis - historical development and overview. *Journal of Chromatography A*, 885, **2000**, p. 3-16.
- LIU, J.; LU, G.; WU, D.; YAN, Z. A multi-biomarker assessment of single and combined effects of norfloxacin and sulfamethoxazole on male goldfish (*Carassius auratus*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 102, **2014**, p. 12-17.
- LOOS, R.; NIESSNER, R. Analysis of atrazine, terbutylazine and their N-dealkylated chloro and hydroxy metabolites by solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry and capillary electrophoresis-ultraviolet detection. *Journal of Chromatography A*, 835, **1999**, p. 217-229.
- MAGGIO, R. M.; DAMIANI, P. C.; OLIVIERI, A. C. Four-way kinetic-excitation-emission fluorescence data processed by multi-way algorithms. Determination of carbaryl and 1-naphthol in water samples in the presence of fluorescent interferents. *Analytica Chimica Acta*, 677, **2010**, p. 97-107.
- MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. F. Determination of some organic contaminants in water samples by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Talanta*, 100, **2012**, p. 38-44.
- MARTENS, H.; NAES, T., *Multivariate Calibration*. John Wiley & Sons, Chichester, **1993**.
- MARTÍN, J.; SANTOS, J. L.; APARÍCIO, I.; ALONSO, E. Multi-residue method for the analysis of pharmaceutical compounds in sewage sludge, compost and sediments by sonication-assisted extraction and LC determination. *Journal of Separation Science*, 33, **2010**, p. 1760-1766.
- MCLAUGHLIN, R. A.; JOHNSON, B. S. Optimizing recoveries of two chlorotriazine herbicide metabolites and 11 pesticides from aqueous samples using solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 790, **1997**, p. 161-167.
- MHLANGA, S. D.; MAMBA, B. B.; KRAUSE, R. W.; MALEFETSE, T. J. Removal of organic contaminants from water using nanosponge cyclodextrin polyurethanes. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 82, **2007**, p. 382-388
- MIN, G.; WANG, S.; ZHU, H.; FANG, G.; ZHANG, Y. Multi-walled carbon nanotubes as solid-phase extraction adsorbents for determination of atrazine and its principal

- metabolites in water and soil samples by gas chromatography-mass spectrometry. *Science of the Total Environment*, 396, **2008**, p. 78-85.
- MNIF, W.; HASSINE, A. I. H.; BOUAZIZ, A.; BARTEGI, A.; THOMAS, O.; ROIG, B. Effect of endocrine disruptor pesticides: A review. *International Journal of Environmental Reserch and Public Health*, 8, **2011**, p. 2265-2303.
- MOAWED, E. A.; EL-SHAHAT, M. F. Extraction of triazine herbicides by polyhydroxyl-polyurethane foam in environmental samples. *Journal of Chromatographic Science*, 52, **2014**, p. 12-18.
- MOMPELAT, S.; LE BOT, B. L.; THOMAS, O. Occurrence and fate of pharmaceutical products and by-products, from resource to drinking water. *Environment International*, 35, **2009**, p. 803-814.
- MORAIS, L. S. R. Desenvolvimento e validação de métodos para a determinação de agrotóxicos em água e solo das áreas de recarga do Aquífero Guarani, na região das nascentes do Rio Araguaia MT/GO. 2009. Tese (Doutorado em Química Analítica) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, **2009**.
- MOU, R.; CHEN, M.; CAO, Z.; ZHU, Z. Simultaneous determination of triazine herbicides in rice by high-performance liquid chromatography coupled with high resolution and high mass accuracy hybrid linear ion trap-orbitrap mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 706, **2011**, p. 149– 156.
- MUMFORD, K. G.; MACGREGOR, J. F.; DICKSON, S. E.; PRAPPA, R. H. Multivariate analysis of ground water and soil data from a waste disposal site. *Ground water monitoring & remediation*, 27, **2007**, p. 92-102.
- MUTAVDŽIĆ, D.; BRNARDIĆ, I.; KAŠTELAN-MACAN, M. Influence of Suspended Clay Minerals and Humic Matter on the Solid Phase Extraction Efficiency of Selected Pesticides from Water. *Journal of Environmental Science and Health Part B*, 41, **2006**, p. 1085-1101.
- MUZ, M.; SÖNMEZ, M. S.; KOMESLI, O. T.; BAKIRDERE, S.; GÖKÇAY, C. F. Determination of selected natural hormones and endocrine disrupting compounds in domestic wastewater treatment plants by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry after solid phase extraction. *Analyst*, 137, **2012**, p. 884-889.

- NAGATA, N.; BUENO, I. M. S.; PERALTA-ZAMORA, P. G. Métodos matemáticos para correção de interferências espectrais e efeitos interelementos na análise quantitativa por fluorescência de raios-X. *Química Nova*, 24, **2001**, p. 531-539.
- NENG, N. R.; PINTO, M. L.; PIRES, J.; MARCOS, P. M.; NOGUEIRA, J. M. F. Development, optimisation and application of polyurethane foams as new polymeric phases for stir bar sorptive extraction. *Journal of Chromatography A*, 1171, **2007**, p. 8-14.
- NEVES, A. C. O.; SOARES, G. M.; MARAIS, S. C.; COSTA, F. S. L.; PORTO, D. L.; LIMA, K. M. G. Dissolution testing of isoniazid, rifampicin, pyrazinamide and ethambutol tablets using near-infrared spectroscopy (NIRS) and multivariate calibration. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 57, **2012**, p. 115-119.
- NIAZI, A.; SADEGHI, M. PARAFAC and PLS applied to spectrophotometric determination of tetracycline in pharmaceutical formulation and biological fluids. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 54, **2006**, p. 711-713.
- OKA, H.; TOKUNAGA, Y.; MASUDA, T.; KISO, H.; YOSHIMURA, H. Characterization of Local Structures in Flexible Polyurethane Foams by Solid-state NMR and FTIR Spectroscopy. *Journal of Cellular Plastics*, 42, **2007**, p. 307-323.
- PACÁKOVÁ, V.; ŠTULÍK, K.; JISKRA, J. High-performance separations in the determination of triazine herbicides and their residues. *Journal of Chromatography A*, 754, **1996**, p. 17-31.
- PANDEY, M. R.; GUO, H. Evaluation of cytotoxicity, genotoxicity and embryotoxicity of insecticide propoxur using flounder gill (FG) cells and zebrafish embryos. *Toxicology in Vitro*, 28, **2014**, p. 340-353.
- PANSHIN, S. Y.; CARTER, D. S.; BAYLESS, E. R. Analysis of atrazine and four degradation products in the pore water of the Vadose Zone, Central Indiana. *Environmental Science and Technology*, 34, **2000**, p. 2131-2137.
- PAUWELS, B.; NOPPE, H.; BRABANDER, H.; VERSTRAETE, W. Comparison of steroid hormone concentrations in domestic and hospital wastewater treatment plants. *Journal Of Environmental Engineering*, 134, **2008**, p. 933-936.

- PENG, J.; LÜ, J. HU, X.; LIU, J.; JIANG, G. Determination of atrazine, desethyl atrazine and deisopropyl atrazine in environmental water samples using hollow fiber-protected liquid-phase microextraction and high performance liquid chromatography. *Microchimica Acta*, 158, **2007**, p. 181-186.
- PERKINELMER. FT-IR Spectroscopy: Attenuated Total Reflectance (ATR). Technical Note (**2005**).
- PINTO, G. M. F.; JARDIM, I. C. S. F. Use of solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography for the determination of triazine residues in water: validation of the method. *Journal of Chromatography A*, 869, **2000**, p. 463-469.
- PINTO, M. I.; SONTAG, G.; BERNARDINO, R. J.; NORONHA, J. P. Pesticides in water and the performance of the liquid-phase microextraction based techniques. A review. *Microchemical Journal*, 96, **2010**, p. 225-237.
- PORTUGAL, F. C. M.; PINTO, M. L.; NOGUEIRA, J. M. F. Optimization of polyurethane foams for enhanced stir bar sorptive extraction of triazinic herbicides in water matrices. *Talanta*, 77, **2008**, p. 765-773.
- PORTUGAL, F. C. M.; PINTO, M. L.; PIRES, J.; NOGUEIRA, J. M. F. Potentialities of polyurethane foams for trace level analysis of triazinic metabolites in water matrices by stir bar sorptive extraction. *Journal of Chromatography A*, 1217, **2010**, p. 3707–3710.
- POTTER, T. L.; BOSCH, D. D.; DIEPPA, A.; WHITALL, D. R.; STRICKLAND, T. C. Atrazine fate and transport within the coastal zone in southeastern Puerto Rico. *Marine Pollution Bulletin*, 67, **2013**, p. 36-44.
- RINNAN, Å.; BERG, F.; ENGELSEN, S. B. Review of the most common pre-processing techniques for near-infrared spectra. *Trends in Analytical Chemistry*, 28, **2009**, p. 1201-1222.
- RIU, A.; McCOLLUM, C. W.; PINTO, C. L.; GRIMALDI, M.; HILLENWEEK, A.; PERDU, E.; ZALKO, D.; BERNARD, L.; LAUDET, V.; BALAGUER, P.; BONDESSON, M.; GUSTAFSSON, J. Halogenated bisphenol-A analogs act as obesogens in zebrafish larvae (*Danio rerio*). *Toxicological Sciences*, 139, **2014**, p. 48-58.

- RODIL, R.; QUINTANA, J. B.; CONCHA-GRAÑA, E.; LÓPEZ-MAHÍA, P.; MUNIATEGUI-LORENZO, S.; PRADA-RODRÍGUEZ, D. Emerging pollutants in sewage, surface and drinking water in Galicia (NW Spain). *Chemosphere*, 86, **2012**, p. 1040-1049.
- RODIL, R.; QUINTANA, J. B.; LÓPEZ-MAHÍA, P.; MUNIATEGUI-LORENZO, S.; PRADA-RODRÍGUEZ, D. Multi-residue analytical methods for the determination of emerging pollutants in water by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1216, **2009**, p. 2958-2969.
- ROLDÁN-PIJUÁN, M. LUCENA, R.; ALCUDIA-LEÓN, M. C.; CÁRDENAS, S.; VALCÁRCEL, M. Stir octadecyl-modified borosilicate disk for the liquid phase microextraction of triazine herbicides from environmental waters. *Journal of Chromatography A*, 1307, **2013**, p. 58-65.
- SABIN, G. P.; PRESTES, O. D.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. Multiresidue determination of pesticides in drinking water by gas chromatography-mass spectrometry after solid-phase extraction. *Journal of Brazilian Chemical Society*, 20, **2009**, p. 918-925.
- SANTOS, J. S.; GUÁRDIA, M.; PASTOR, A.; SANTOS, M. L. P. Determination of organic and inorganic mercury species in water and sediment samples by HPLC on-line coupled with ICP-MS. *Talanta*, 80, **2009**, p. 207–211.
- SCHELLIN, M. P.; BAUER, C.; POPP, P. High performance liquid-chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of 10 pesticides in water: A comparison between membrane-assisted solvent extraction and solid phase extraction. *Journal of Chromatography A*, 1216, **2009**, p. 5800-5806.
- SCRIBNER, E. A.; THURMAN, E. M.; ZIMMERMAN, L. R. Analysis of selected herbicide metabolites in surface and ground water of the United States. *The Science of the Total Environment*, 248, **2000**, p. 157-167.
- SEGURA, P. A.; MACLEOD, S. L.; LEMOINE, P.; SAUVÉ, S.; CAGNON, C. Quantification of carbamazepine and atrazine and screening of suspect organic contaminants in surface and drinking waters. *Chemosphere*, 84, **2011**, p. 1085-1094.
- SERVOS, M. R.; SMITH, M.; McINNIS, R.; BURNISON, B. K.; LEE, B.; SETO, P.; BACKUS, S. The presence of selected pharmaceuticals and the antimicrobial

- triclosan in drinking water in Ontario, Canada. *Water Quality Research Journal of Canada*, 42, **2007**, p. 130-137.
- SILVA, C. G. A.; COLLINS, C. H. Aplicações de cromatografia líquida de alta eficiência para o estudo de poluentes orgânicos emergentes. *Química Nova*, 34, **2011**, p. 665-676.
- SILVERSTEIN, R.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos. 7ª ed, LTC: Rio de Janeiro, **2006**, Cap. 2.
- SINDAG, 2014 - Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola. Disponível em <http://www.sindiveg.org.br>. Acesso em 02/08/**2010**.
- SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. Princípios de Análise Instrumental. 5ª ed, Bookman: São Paulo, **2002**.
- SONG, M. W.; HUANG, P.; LI, F.; ZHANG, H.; XIE, K. Z.; WANG, X. H.; HE, G. X. Water quality of a tributary of the Pearl River, the Beijiang, Southern China: implications from multivariate statistical analyses. *Environmental Monitoring and Assessment*, 172, **2011**, p. 589-603.
- STAHNKE, H.; KITTLAUS, S.; KEMPE, G.; ALDER, L. Reduction of matrix effects in liquid chromatography-electrospray ionization - mass spectrometry by dilution of the sample extracts: How much is needed? *Analytical Chemistry*, 84, **2012**, p. 1474-1482.
- STUART, M.; LAPWORTH, D.; CRANE, E.; HART, A. Review of risk from potential emerging contaminants in UK groundwater. *Science of The Total Environment*, 416, **2012**, p. 1-21.
- TENA, R. C.; DELGADO, M. A. R.; SANCHEZ, M. J.; MONTELONGO, F. G. Comparative study of the zero-crossing, ratio spectra derivative and partial least-squares methods applied to the simultaneous determination of atrazine and its degradation product desethylatrazin-2-hydroxy in ground waters, *Talanta*, 44, **1997**, p. 673-683.
- TEÓFILO, R. F.; Métodos quimiométricos: uma visão geral - Conceitos básicos de quimiometria. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, **2013**.

- TIWARI, N.; ASTHANA, A.; UPADHYAY, K. A sensitive spectrophotometric determination of atrazine in micellar medium and its application in environmental samples. *Research on Chemical Intermediates*, 39, **2013**, p. 2867-2879.
- TOGOLA, A.; BUDZINSKI, H. Analytical development for analysis of pharmaceuticals in water samples by SPE and GC-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 388, **2007**, p. 627-635.
- TRAN, A. T. K.; HYNE, R. V.; DOBLE, P. Determination of commonly used polar herbicides in agricultural drainage waters in Australia by HPLC. *Chemosphere*, 67, **2007**, p. 944-953.
- UDIKOVIĆ-KOLIĆ, N.; SCOTT, C.; MARTIN-LAURENT, F. Evolution of atrazine-degrading capabilities in the environment. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 96, **2012**, p. 1175-1189.
- USEPA. National Primary Drinking Water Regulations. United States Environmental Protection Agency; **2010**.
- VALENTE, A. L. P.; AUGUSTO, F. Microextração por fase sólida. *Química Nova*, 23, **2000**, p. 523-530.
- VONČINA, E.; VONČINA, D. B.; MIRKOVIČ, N.; NOVIČ, M. Chemometric characterisation of the quality of ground waters from different wells in Slovenia. *Acta Chimica Slovenica*, 54, **2007**, p. 119-125.
- WANG, F.; YAN, H.; WU, R.; CAI, T.; HAN, K.; LI, Z. Selective screening of trace triazine herbicides in tomato samples employing dummy molecularly imprinted solid-phase extraction coupled with liquid chromatography. *Analytical Methods*, 5, **2013**, p. 2398-2405.
- WANG, Y.; ZHANG, G.; WANG, L. Interactions of prometryn to human serum albumin: Insights from spectroscopic and molecular docking studies. *Pesticides Biochemistry and Physiology*, 108, **2014**, p. 66-73.
- WOLD, S. Principal component analysis. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 2, **1987**, p. 37-52.

- WU, Q.; FENG, C.; ZHAO, G.; WANG, C.; WANG, Z. Graphene-coated fiber for solid-phase microextraction of triazine herbicides in water samples. *Journal of Separation Science*, 35, **2012**, p. 193-199.
- ZAYA, R. M.; AMINI, Z.; WHITAKER, A. S.; KOHLER, S. L.; IDE, C. F. Atrazine exposure affects growth, body condition and liver health in *Xenopus laevis* tadpoles. *Aquatic Toxicology*, 104, **2011**, p. 243-253.
- ZHANG, C.; REN, Z.; YIN, Z.; QIAN, H.; MA, D. Amide II and Amide III Bands in Polyurethane Model Soft and Hard Segments. *Polymer Bulletin*, 60, **2008**, p. 97-101.
- ZHANG, G.; PAN, J. Simultaneous spectrophotometric determination of atrazine and cyanazine by chemometric methods, *Spectrochimica Acta A*, 78, **2011**, p. 238-242.
- ZHAO, G.; SONG, S.; WANG, C.; WU, Q.; WANG, Z. Determination of triazine herbicides in environmental water samples by high-performance liquid chromatography using graphene-coated magnetic nanoparticles as adsorbent. *Analytica Chimica Acta*, 708, **2011**, p. 155-159.
- ZHOU, Q.; PANG, L.; XIE, G.; XIAO, J.; BAI, H. Determination of atrazine and simazine in environmental water samples by dispersive liquid-liquid microextraction with high performance liquid chromatography. *Analytical Sciences*, 25, **2009**, p. 73-76.
- ZHOU, Q.; WANG, XIAO, J.; WANG, J.; LIU, G.; SHI, Q.; GUO, G. Comparison of the enrichment efficiency of multiwalled carbon nanotubes, C18 Silica, and activated carbon as the adsorbents for the solid phase extraction of atrazine and simazine in water samples. *Microchimica Acta*, 152, **2006**, p. 215-224.