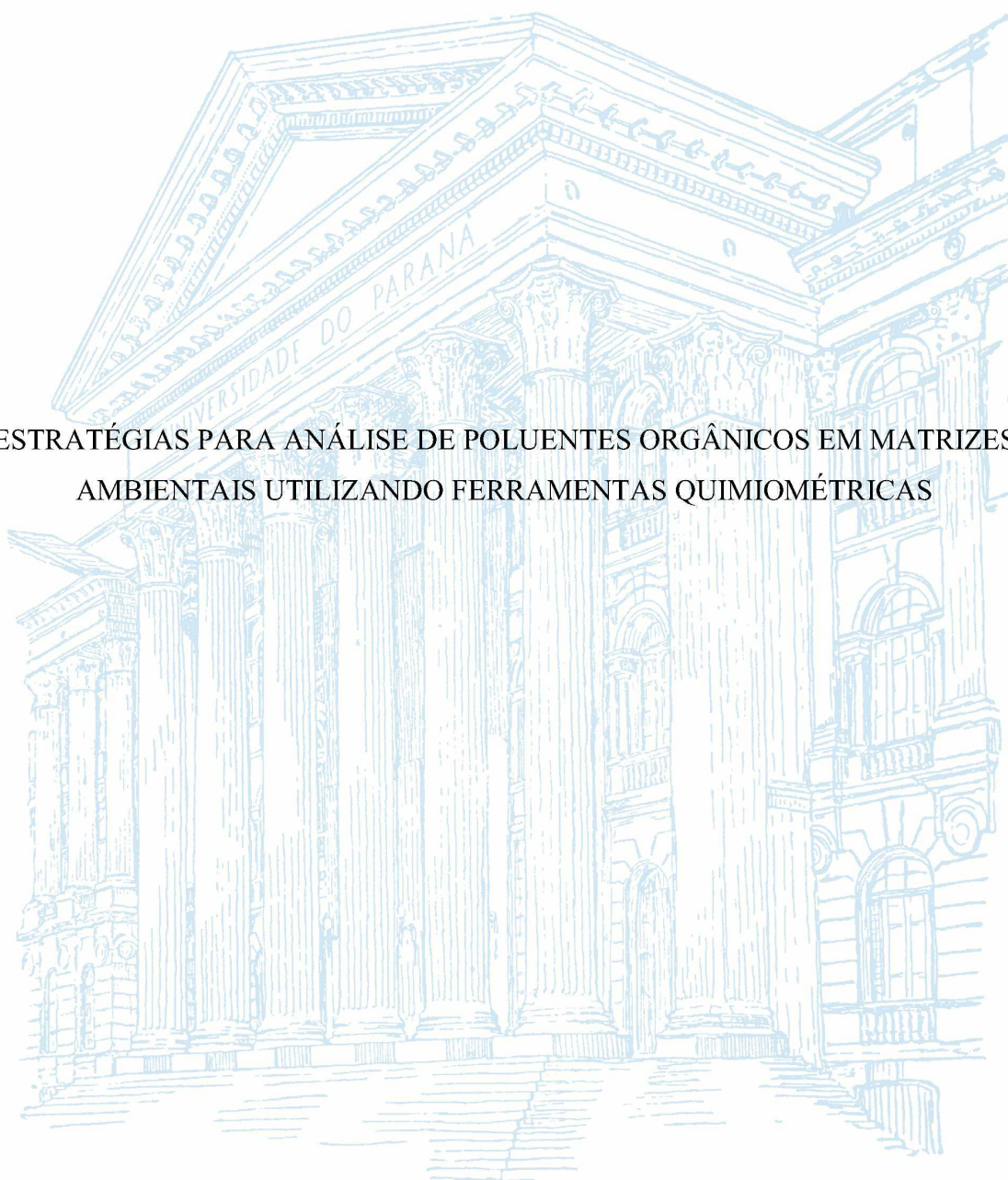


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

SANDRA STETS

ESTRATÉGIAS PARA ANÁLISE DE POLUENTES ORGÂNICOS EM MATRIZES  
AMBIENTAIS UTILIZANDO FERRAMENTAS QUIMIOMÉTRICAS



CURITIBA

2015

SANDRA STETS

ESTRATÉGIAS PARA ANÁLISE DE POLUENTES ORGÂNICOS EM MATRIZES  
AMBIENTAIS UTILIZANDO FERRAMENTAS QUIMIOMÉTRICAS

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutora em Química Analítica, Programa de Pós-Graduação em Química, Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Noemi Nagata

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

CURITIBA

2015

---

ST841e

Stets, Sandra

Estratégias para análise de poluentes orgânicos em matrizes ambientais utilizando ferramentas quimiométricas / Sandra Stets. – Curitiba, 2015.  
133 f. : il. color. ; 30 cm.

Tese - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2015.

Orientadora: Noemi Nagata.

Coorientador: Patricio Peralta-Zamora.

1. Calibração multivariada. 2. Matrizes ambientais. 3. Fluorescência molecular. 4. Fenol.  
5. Expressão gênica. I. Universidade Federal do Paraná. II. Nagata, Noemi. III. Peralta-Zamora, Patricio. IV. Título.

CDD: 543

---


TERMO DE APROVAÇÃO


**ESTRATÉGIAS PARA ANÁLISE DE POLUENTES ORGÂNICOS EM  
MATRIZES AMBIENTAIS UTILIZANDO FERRAMENTAS  
QUIMIOMÉTRICAS**


por


**SANDRA STETS**


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

  
\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Noemi Nagata  
Orientadora  
Dep. de Química – UFPR

  
\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Carla Sirtori  
Instituto de Química – UFRGS

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Marcelo Martins de Sena  
Dep. de Química – UFMG

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Marco Tadeu Grassi  
Dep. de Química – UFPR

  
\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Lara Messerschmidt  
Dep. de Química – UFPR

Curitiba, 07 de julho de 2015.

**Dedico esse trabalho à minha família**

## **Agradecimentos**

Gostaria de primeiramente agradecer a Deus por toda essa caminhada.

Agradeço à minha Mãe Emilia Stets e meu pai Antonio Stets que sempre com tanta dedicação, amor e carinho, não mediram esforços para me apoiar.

Agradeço minha irmã Maria Isabel Stets, pelo companheirismo e amizade em todos os momentos.

Empresto as palavras atribuídas a Isaac Newton: “Se eu vi mais longe, foi por estar sobre ombros de gigantes” para agradecer minha família científica, começando por minha orientadora Profa. Dra. Noemi Nagata, primeiramente por acreditar em mim desde o início da Iniciação Científica, pelos conselhos e ensinamentos.

Ao meu co-orientador Dr. Patricio Peralta-Zamora, sem dúvida, dentre os gigantes o maior, pelo carinho, incentivo, orientação e apoio em todos os momentos, pelo exemplo como pesquisador e professor. Seus ensinamentos eu guardarei por toda a minha vida.

Ao Prof. Dr. Marcus Vinícius de Liz, que em muitos momentos me orientou na execução desse trabalho, pela ajuda nos experimentos, conselhos e exemplo de persistência.

À minha querida amiga Bianca do Amaral, companheira para todos os momentos, por toda ajuda e torcida.

À todos os amigos do grupo TECNOTRATER: Daniele, Alecsandra, Larissa, Ellery, Suzi, Diego, Grazi, Jessica S., Jéssica A., Ivan, Caio, Arlene, Priscila, Monize, Beatriz e André.

À todos os amigos do LABQAM, à todos do grupo GQM e GQA, em especial à Mônica, Mascote, Carol, Hiany, Samantha, Emerson e Kelly.

Ao Rômulo de Oliveira Schwaickhardt, pelo apoio, incentivo e companheirismo.

À todos os amigos do UFZ (instituto Helmholtz – Leipzig / Alemanha) por toda ajuda e paciência, em especial aos meus supervisores Dr. Tobias Schulze e Dr. Werner Brack.

À todos os meus colegas de trabalho e alunos da UNESPAR.

À todos os professores do Programa de pós graduação em Química da UFPR.

Agradeço especialmente ao secretário do programa de Pós-graduação em Química Marcelino Câmara, por toda ajuda durante estes anos de mestrado e doutorado.

À Capes pela bolsa de doutorado concedida, ao programa PDSE pela bolsa de estágio sanduiche concedida e ao CNPq pelo financiamento do projeto.

*“Você não sabe o quanto  
Eu caminhei  
Pra chegar até aqui.  
Percorri milhas e milhas  
Antes de dormir,  
Eu não cochilei  
Os mais belos montes  
Escalei,  
Nas noites escuras de  
Frio chorei...”*

***Toni Garrido, Bino, Lazão e Da Gham***

## RESUMO

Nos últimos anos tem-se observado uma crescente preocupação com a ocorrência ambiental de poluentes orgânicos, principalmente em razão do seu comprovado potencial tóxico para os ecossistemas e a saúde humana. Em forma paralela tem crescido a demanda por métodos analíticos de elevada sensibilidade e seletividade, com capacidade para propiciar alta resolução e baixos limites de quantificação na análise de matrizes ambientais, usualmente de grande complexidade. Neste contexto, métodos de calibração multivariada têm sido cada vez mais utilizados para aumentar a potencialidade analítica das técnicas espectroscópicas, permitindo a sua aplicação na análise ambiental.

Neste trabalho, métodos multivariados foram associados a técnicas espectroscópicas de análise, objetivando aplicações ambientais de relevância.

No primeiro capítulo apresentam-se os resultados relacionados com o uso de espectroscopia de fluorescência molecular e “Paralell Factors Analysis” (PARARFAC), para a determinação simultânea de dois substratos modelo (sulfametoxazol e 17 $\beta$ -estradiol) em amostras aquosas de relevância ambiental. O modelo foi elaborado com quatro fatores, utilizando-se restrição de não-negatividade, iniciação por valores aleatórios ortogonais e critério de convergência igual a  $1 \times 10^{-6}$ , o que permitiu a obtenção de um valor de CONCORDIA (CORe CONCistency DIAgnostic) de 86,4%. O modelo foi aplicado com sucesso na determinação dos analitos em águas de abastecimento e águas superficiais da Bacia do rio Belém, com erros relativos médios inferiores a 10,4% e 17,1%, respectivamente. Restrições da modelagem multivariada foram observadas na análise de amostras mais contaminadas (águas superficiais da Bacia do rio Barigui), em decorrência de elevada intensidade de fluorescência na região de emissão dos analitos.

Os resultados apresentados no segundo capítulo se relacionam com a determinação de gasolina em amostras de solo contaminado, utilizando espectroscopia por refletância difusa no infravermelho médio com transformada de Fourier (DRIFT) e Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLSR). O modelo de melhor desempenho foi elaborado com 4 variáveis latentes (VLs), utilizando espectros pré-processados por MSC e centrados na média. Nestas condições, erros médios de previsão inferiores a 20% foram observados.

O terceiro capítulo tratou sobre a determinação de fenol e seus principais subprodutos de degradação fotocatalítica (hidroquinona, pirocatecol, resorcinol e p-benzoquinona), utilizando-se espectroscopia ultravioleta e PLSR. O modelo de maior capacidade de previsão



foi elaborado com 6 VLs, utilizando-se espectros alisados pelo método Savitzky-Golay (polinômio de primeira ordem e janela de 10 pontos). Erros médios de previsão inferiores a 36% foram observados na previsão das concentrações de fenol e hidroquinona.

No quarto capítulo apresentam-se os resultados de um trabalho realizado em parceria com o instituto Helmholtz (Leipzig-Alemanha), objetivando o estabelecimento de correlações entre a presença de poluentes orgânicos em águas superficiais e os efeitos produzidos na expressão gênica de *E. coli*. Estudos realizados por PCA (*Principal Component Analysis*) e HCA (*Hierarchical Cluster Analysis*) permitiram a identificação de 24 compostos orgânicos responsáveis pelas maiores mudanças na expressão gênica monitorada, sendo todos característicos de águas que recebem aporte de esgoto doméstico, industrial e hospitalar. Trata-se de um ponto de partida promissor para o desenvolvimento de hipóteses sobre o modo de ação dos contaminantes em matrizes ambientais.

**PALAVRAS CHAVE:** calibração multivariada, matrizes ambientais, PARAFAC, fluorescência molecular, PCA, solo, DRIFT, PLSR, fenol, subprodutos de degradação, expressão gênica.

## ABSTRACT

In recent years, there has been a growing concern about the environmental occurrence of organic pollutants, mainly because of their proven toxic potential for ecosystems and human health. Simultaneously, there has been a growing demand for analytical methods of high sensitivity and selectivity, able to provide high resolution and low limits of quantification in environmental analysis linked to both the inherent complexity of these natural matrices and the low analyte levels to be quantified. In this context, chemometrics methods have been increasingly used to enhance the analytical capability of spectroscopic techniques, enabling their application in the environmental analysis.

In this work, multivariate methods were associated with spectroscopic analysis, aiming environmental applications of relevance.

The first chapter presents the results relating to the use of molecular fluorescence spectroscopy and "Parallel Factors Analysis" (PARAFAC) for the simultaneous determination of two model substrates (sulfamethoxazole and 17 $\beta$ -estradiol) in aqueous environmental samples. The model was developed with four factors, using constraint of non-negativity, initiation by orthogonal random values and criteria of convergence  $1 \times 10^{-6}$ , which allowed obtaining a value of CONCORDIA (CORE CONcistency Diagnostic) of 86.4%. This model was successfully applied in the determination of analytes in drinking water and surface water from the Belem river, with average relative errors less than 10.4% and 17.1%, respectively. Restrictions were observed in the analysis of more contaminated samples (surface water of Barigui river) as a result of high fluorescence intensity in the emission region of the analytes.

Second chapter relate the determination of gasoline in contaminated soil samples by using spectroscopy of diffuse reflectance medium infrared Fourier transform (DRIFT) and Partial Least Squares Regression (PLSR). Best model was performed with 04 latent variables (LVs) by MSC and centered in the middle pre-processed spectra. Under these conditions, average prediction errors of less than 20% were observed.

Third chapter presents the determination of phenol and its main photocatalytic degradation products (hydroquinone, pyrocatechol, resorcinol and p-benzoquinone), using ultraviolet spectroscopy and PLSR. The higher capacity prediction model was developed with 6 VLs, using spectrums smoothed by Savitzky-Golay method (first-order polynomial and 10

points window). An average forecast error of less than 36% was observed in predicting phenol and hydroquinone concentrations.

In the fourth chapter results of a study conducted in partnership with the Helmholtz Institute (Leipzig, Germany) can be found, aiming to establish correlations between the presence of organic pollutants in surface water and the effects on gene expression of *E. coli*. Studies by PCA (Principal Component Analysis) and HCA (Hierarchical Cluster Analysis) allowed identification of 24 organic compounds responsible for major changes in the monitored gene expression, and all characteristic of water receiving sewage inflow, industrial and hospital. This is a promising starting point for the development of assumptions about the mode of action of contaminants in environmental matrices.

**KEYWORDS:** Chemometrics tools, environmental matrices, PARAFAC, molecular fluorescence, PCA, soil, DRIFT, PLSR, phenol, degradation by-products, gene expression.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 01:</b> Organização dos dados para calibração. Fonte: Nagata, 2001 <sup>[8]</sup> .....	25
<b>Figura 02:</b> Representação gráfica da estrutura de um modelo de análise de Componentes Principais. ....	26
<b>Figura 03:</b> Representação gráfica da construção de um novo conjunto de eixos no modelo PCA.....	27
<b>Figura 04:</b> Representação gráfica da construção de um modelo PLS, onde ocorre a correlação entre os scores do bloco X e Y, gerando o vetor de regressão B, que permite a previsão da concentração em um novo conjunto de amostras. ....	29
<b>Figura 05:</b> Ilustração da decomposição efetuada pelo PARAFAC. Fonte: Varderrama, 2007 <sup>[32]</sup> .....	32
<b>Figura I.01.:</b> Representação das etapas de extração e pré concentração das amostras após a otimização. ....	44
<b>Figura I.02.</b> Superfícies de matriz Excitação-Emissão dos padrões puros na concentração de 5 mg L <sup>-1</sup> para: (A) estrona; (B) 17-β-estradiol; (C) 17-α-etinilestradiol; (D) estriol.....	46
<b>Figura I.03.</b> Superfícies de Excitação-Emissão do padrão puro de SMz na concentração de 50 μg L <sup>-1</sup> .....	47
<b>Figura I.04.</b> Projeção de curvas de nível para uma amostra de água superficial da bacia do rio Barigui após acidificação e filtração.....	48
<b>Figura I.05.:</b> Curvas analíticas construídas para a quantificação de SMz e E2 via HPLC-FLU. ....	49
<b>Figura I.06.:</b> Espectros de matriz de Emissão-Excitação para Sulfametoxazol e 17β-estradiol na concentração de 5,0 mg L <sup>-1</sup> em meio (A) Acetonitrila; (B) Água/Acetonitrila/trietanolamina – pH=4,0. ....	49
<b>Figura I.07:</b> Representação geométrica do planejamento fatorial para a otimização das condições de extração em fase sólida para SMz e E2 utilizando cartuchos Stracta X (300 mg). ....	50
<b>Figura I.08.:</b> Superfície de fluorescência de águas superficiais do Rio Barigui após pré-concentração e dopagem com (A) E2 na concentração de 600 ng L <sup>-1</sup> ; (B) SMz na concentração de 600 ng L <sup>-1</sup> .....	51
<b>Figura I.09.:</b> Gráfico do parâmetro Concordia para o modelo PARAFAC construído com 4 fatores.....	52
<b>Figura I.10.</b> Espectro de fluorescência deconvoluídos, obtidos através dos pesos do modelo PARAFAC para (A) excitação; (B) emissão;(C) Concentração.....	53

<b>Figura I.11.</b> Valores reais <i>versus</i> previstos pelo modelo PARAFAC para (A) SMz e (B) E2. .....	55
<b>Figura II.01.</b> Foto microscópica (aumento 75X) dos solos Litoral (A), Karst (B), Serra geral (C) e Caiuá (D). .....	69
<b>Figura II.02.:</b> Representação gráfica das colunas utilizadas para o sistemas de fenton que possibilitam avaliar a lixiviação de gasolina por meio de análise do solo em seus vários segmentos.....	70
<b>Figura II.03.</b> Concentrações percentuais de argila, silte e areia nos diferentes perfis do solo	71
<b>Figura II.04.</b> Comportamento espectral de amostras de solo em diferentes frações granulométricas.....	72
<b>Figura II.05.</b> Espectros de DRIFT de amostras de solo fortificadas com gasolina. As linhas pontilhadas representam regiões onde observou-se grandes alterações espectral de acordo com o aumento na concentração de gasolina. ....	73
<b>Figura II.06.</b> Gráfico de Scores da PC1 vs. PC2 para modelo PCA otimizado. ....	74
<b>Figura II.07.</b> Evolução dos valores de RMSECV em função do número de variáveis latentes .....	75
<b>Figura II.08.</b> Gráfico do (A) vetor de coeficientes de regressão e dos (B) loadings das 4 CPs utilizadas na elaboração do modelo multivariado.....	76
<b>Figura II.09.</b> (A) Resíduos de Students <i>vs</i> leverage para o modelo multivariado construído; (B) Valores previstos na validação cruzada <i>vs</i> valores reais. ....	77
<b>Figura II.10.:</b> Mapa geológico do Paraná contendo as regiões onde predominam tipos de solo: Litoral, Karst, Caiuá e Serra geral.....	79
<b>Figura II.11.:</b> Espectros de refletância dos 04 solos estudados em três amostras retiradas do Topo, meio e base das colunas, antes e após o tratamento Fenton. ....	80
<b>Figura II.12.:</b> Evolução dos valores de variância capturada em função do número de componentes principais.....	81
<b>Figura II.13.:</b> Scores de PC2 <i>vs</i> PC3 para o modelo PCA construído; As amostras em Rosa referem-se ao solo litoral; Roxo: solo Karst; Verde: Serra Geral e Azul: Caiuá.....	81
<b>Figura II.14.:</b> Gráfico de <i>loadings</i> para o modelo construído com 3 componentes principais .....	83
<b>Figura III.01.</b> Etapas da oxidação do fenol durante o processo de fotocatalise.....	90
<b>Figura III.02.</b> Espectros de absorção de fenol e a seus principais subprodutos (hidroquinona , resorcinol , pirocatecol , p- benzoquinona ) na concentração de 15 mg L <sup>-1</sup> . ....	95

<b>Figura III.03:</b> Evolução dos valores de RMSECV pelo número de variáveis latentes.....	96
<b>Figura III.04.</b> Grafico de Loagings para as 6 variáveis latentes do modelo construído .....	98
<b>Figura III.05.</b> Gráfico dos resíduos de <i>students versus Leverage</i> para o modelo construído com 06 variáveis latentes.....	98
<b>Figura III.06.</b> Grafico dos valores reais versus valores previstos por validação cruzada (Cross Validation – Leave one out) para (A) Fenol; (B) Hidroquinona; (C) Resorcinol; (D) Catecol; (E) p-Benzoquinona.....	99
<b>Figura III.07.</b> Curvas analíticas obtidas pela análise cromatográfica de fenol, hidroquinona, resorcinol e p-benzoquinona. ....	102
<b>Figura IV.01.:</b> Representação gráfica da Análise do efeito-dirigido (EDA), que é um procedimento iterativo para análise biológica e de fracionamento, seguido por análises químicas para identificar candidatos contaminantes ( "suspeitos") em extratos de amostras ambientais complexas. ....	109
<b>Figura IV.02.:</b> Representação gráfica da avaliação da expressão gênica de <i>E.Coli</i> . ....	111
<b>Figura IV.03.:</b> Localização geográfica dos pontos de coleta das amostras de água superficial (Alemanha – 2012). ....	117
<b>Figura IV.04.</b> Scores do modelo de PCA construído para a matriz de dados de poluentes químicos (A) PC 1 vs PC8 – amostras circuladas são classificadas como referência; (B) PC2 vs PC3 – amostras circuladas são classificadas como de regiões com aporte hospitalar. ....	121
<b>Figura IV.05.</b> Scores do modelo de PCA construído para a matriz de dados de poluentes químicos (A) PC 2 vs PC7 vs PC5; (B) PC2 vs PC4 vs PC6. ....	122
<b>Figura IV.06.</b> Heatmap da análise de agrupamento dos valores TELI de todas as amostras e todos os genes incluídos na análise estatística com CK para a morte celular, SOS para a resposta SOS e danos no DNA, GF para a função geral, PS para o stress proteína, OS para o stress oxidativo e DR de resistência às drogas. TELI foram determinados para uma concentração de 50 ml de água de superfície/extrato mL.....	125
<b>Figura IV.07.:</b> Análise de Cluster dos genes envolvidos no stress oxidativo. ....	126
<b>Figura IV.08.:</b> Análise de Cluster dos genes envolvidos na morte de células. ....	127
<b>Figura IV.09.:</b> Análise de Cluster dos genes envolvidos em funções gerais. ....	127
<b>Figura IV.10.</b> Correlação ponderada entre o teor de águas residuais e TELI total (modificações na expressão gênica) de todas as amostras com concentração de águas residuais conhecidas. ....	128

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela I.1.:</b> Planejamento e níveis de concentração utilizados para construção das curvas de calibração e misturas de validação.....	43
<b>Tabela I.2.:</b> Planejamento fatorial $2^3$ utilizado para a otimização das condições de extração e pré-concentração para SMz e E2 em cartucho Strata X. ....	44
<b>Tabela I.3.</b> Concentrações obtidas em $\text{mg L}^{-1}$ pelo modelo PARAFAC desenvolvido com 4 fatores.....	54
<b>Tabela I.4.</b> Resultados previstos pelo modelo construído para determinação de E2 e SMz em amostras de águas de abastecimento, comparados com valores obtidos por análise cromatográfica das mesmas amostras. ....	56
<b>Tabela I.5.</b> Resultados previstos pelo modelo construído para determinação de E2 e SMz em amostras de águas superficiais oriundas da bacia do rio Belém, comparados com valores obtidos por análise cromatográfica das mesmas amostras.....	57
<b>Tabela II.1.</b> Concentrações finais de gasolina nas amostras de solo fortificado utilizadas como conjunto de calibração e validação externa para a construção dos modelos multivariados .....	68
<b>Tabela II.2.</b> Principais parâmetros físico-químicos e geotécnicos dos solos em estudo.....	69
<b>Tabela II.3.</b> Resposta prevista e desvio padrão obtidos pelo modelo multivariado PLSR para a previsão externa de gasolina em amostras de solo.....	78
<b>Tabela III.1.</b> Conjunto de calibração para a quantificação de fenol e seus principais subprodutos .....	93
<b>Tabela III.2.</b> Porcentagem de variância capturada pelo modelo construído utilizado alisamento em 5 pontos e 6 variáveis latentes. ....	97
<b>Tabela III.3.</b> Resposta prevista e erros obtidos pelo modelo multivariado PLSR para a previsão de Fenol, hidroquinona, catecol, resorcinol e p-Benzoquinona. ....	101
<b>Tabela III.4.</b> Concentração de fenol e seus principais subprodutos de degradação previstos pelo modelo multivariado. ....	102
<b>Tabela IV.1.:</b> Localização, data, estado (SA para Saxônia-Anhalt e S para Saxônia) e categoria das amostras ( <b><i>0</i></b> para amostras de referência, <b><i>D</i></b> para localizações com aporte de esgoto doméstico, <b><i>D_H</i></b> para localizações de aporte de esgoto hospitalar e doméstico e <b><i>I</i></b> para localizações de aporte de esgoto industrial .....	116
<b>Tabela IV.2.:</b> Genes analisados por ensaios de expressão gênica através de PCR em tempo real, categorias funcionais e conhecidas funções para estes genes.....	118

**Tabela IV.3.:** Lista dos 24 compostos fundamentais para a separação dos grupos referência (cidade, hospital e indústria) através do modelo PCA (após o nome de cada composto, encontra-se entre parêntese a principal utilização do mesmo ..... 123



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CONCORDIA - CORE CONcistency DIAgnostic

DRIFT - Espectroscopia por refletância difusa no infravermelho médio com transformada de Fourier

E2 - 17 $\beta$ -estradiol

MS<sup>2</sup>- espectrometria tandem massa

NIR - espectroscopia no infravermelho próximo

PARAFAC – Paralell factor Analysis

PCA – Análise de Componentes principais

PLSR – regressão por mínimos quadrados parciais

SMz – Sulfametoxazol

UFZ - Helmholtz Zentrum für Umweltforschung

UV-Vis – espectrofotometria na região do ultra violeta e visível

## Sumário

1.INTRODUÇÃO GERAL .....	19
1.1. REFERÊNCIAS DO ITEM .....	21
REVISÃO GERAL .....	23
2. MÉTODOS MULTIVARIADOS APLICADOS EM ANÁLISE AMBIENTAL .....	24
2.1 Análise exploratória: Análise de Componentes Principais (PCA).....	26
2.3. Modelos multidimensionais (PARAFAC) .....	30
2.4. REFERÊNCIAS DO ITEM .....	33
Capítulo I.....	37
I.1. INTRODUÇÃO .....	38
<i>1.1.1 Determinação de poluentes orgânicos em matrizes ambientais utilizando fluorescência molecular e “Parallel Factor Analysis” (PARAFAC).....</i>	<i>38</i>
<i>1.1.2 Fundamentos da fluorescência no modo matriz emissão-excitação (EEM).....</i>	<i>40</i>
I.2. OBJETIVO GERAL .....	41
I.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	41
I.4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	41
<i>1.4.1 Reagentes e insumos .....</i>	<i>41</i>
<i>1.4.2. Desenvolvimento do modelo PARAFAC .....</i>	<i>42</i>
<i>1.4.3. Controle analítico .....</i>	<i>43</i>
<i>1.4.4. Extração e pré-concentração dos analitos .....</i>	<i>43</i>
<i>1.4.5. Análise de amostras reais.....</i>	<i>45</i>
I.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	45
<i>1.5.1 Estudos preliminares .....</i>	<i>45</i>
<i>1.5.2 Desenvolvimento do método cromatográfico e extração em fase sólida.....</i>	<i>48</i>
<i>1.5.3. Modelo multivariado (PARAFAC).....</i>	<i>50</i>
<i>1.5.4 Aplicação do modelo PARAFAC em amostras reais.....</i>	<i>55</i>
I.6. CONCLUSÃO .....	57
I.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58
CAPÍTULO II .....	63
II.1 INTRODUÇÃO.....	64
<i>II.1.1. A Espectroscopia por refletância difusa no infravermelho médio com transformada de Fourier (DRIFT) para análise de solos. ....</i>	<i>64</i>
<i>II.1.2 Contaminação de solo por gasolina .....</i>	<i>65</i>
II.2 OBJETIVO GERAL.....	66

II.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	66
II.4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	67
II.4.1. Reagentes e insumos.....	67
II.4.2. Metodologia .....	67
II.4.3. Análise de Solo contaminado por gasolina após tratamento por Fenton.....	68
II.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	71
II.5.2. Análise de componentes principais (PCA) .....	73
II.5.3. Desenvolvimento de modelo multivariado para a quantificação de Gasolina em solo .....	74
II.5.3. Utilização de espectroscopia por refletância difusa no infravermelho médio com transformada de Fourier (DRIFT) e modelos de calibração multivariada como controle analítico durante procedimento de Fenton em solo contaminado por gasolina .....	78
II.6 CONCLUSÃO.....	83
II.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	84
Capítulo III.....	87
III. 1. INTRODUÇÃO .....	88
III.1.1. Importância do monitoramento ambiental de fenol e seus principais subprodutos .....	88
III.1.2. Utilização de Processos Avançados de Oxidação (POA's) para degradação de fenol.....	88
III.1.3. Métodos de determinação simultânea de fenol e seus principais subprodutos .....	90
III.2. OBJETIVO GERAL .....	91
III.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	91
III.4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	91
III.4.1 Reagentes e soluções .....	91
III.4.2. Equipamentos.....	92
III.4.3 Metodologia .....	92
III.4.3.1. Desenvolvimento do modelo multivariado .....	92
III.4.2.2 Degradação de fenol utilizando processo de fotocatalise heterogênea mediada por $TiO_2$ e radiação UVA.....	94
III.4.2.3. Controle analítico .....	94
III.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	95
III. 5.1 Determinação de fenol e subprodutos de degradação fotocatalítica. ....	95
III.6. CONCLUSÕES.....	103
III.7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	103
Capítulo IV.....	107
IV.1. INTRODUÇÃO .....	108
IV.1.1 Análise do efeito dirigido (EDA) .....	108

VI.1.2. <i>Expressão gênica de E. Coli como bioensaio em Análise do efeito dirigido</i> .....	110
IV.2. OBJETIVO GERAL .....	112
IV.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	112
IV.4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	113
IV.4.1 <i>Materiais e equipamentos</i> .....	113
IV.4.2 <i>Preparação das amostras</i> .....	113
IV.4.3 <i>Caracterização Biológica das amostras</i> .....	114
IV.4.4 <i>Análise de dados dos resultados dos ensaios de expressão gênica</i> .....	114
IV.4.5 <i>Modelos de classificação e modelagem</i> .....	114
IV.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	115
IV.5.1 <i>Localização geográfica das coletas na bacia do rio Elbe</i> .....	115
IV.5.2 <i>Análise de componentes principais dos poluentes determinados em águas superficiais.</i>	120
IV.5.3 <i>Análise multivariada dos efeitos observados na expressão gênica de E.coli tratadas com as águas superficiais analisadas</i> .....	124
IV.5.4 <i>Potencialidade de correlação entre efeitos observados na expressão gênica de E. coli e aporte de esgoto.</i> .....	128
IV.5.5 <i>Análise de correlação da expressão gênica e a presença de poluentes orgânicos.</i> .....	128
IV.6. CONCLUSÕES.....	129
IV.7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	129

## 1.INTRODUÇÃO GERAL

Ao analisarmos o mundo que nos cerca, podemos perceber que todos os fenômenos, sejam eles culturais ou naturais, envolvem um grande número de variáveis. Estabelecer relações, encontrar ou propor possíveis explicações é o papel próprio da ciência, o que implica a necessidade de obter, controlar, manusear, medir e interpretar as variáveis que são consideradas relevantes ao entendimento do fenômeno estudado. Analisar separadamente todas essas variáveis é extremamente complicado, pois não basta conhecer informações numéricas isoladas, mas é necessário também conhecer a totalidade das informações fornecidas pelo conjunto de variáveis e, principalmente, reconhecer a existência de efeitos antagonísticos ou sinérgicos de relevância. [1]

Usualmente, a alta complexidade das amostras analisadas em laboratórios de química torna necessário o uso de sofisticados instrumentos de medição, os quais se aprimoram dia a dia em decorrência de um melhor conhecimento dos fenômenos físicos e químicos que os fundamentam, assim como dos notórios avanços verificados na óptica, na eletrônica e nos recursos computacionais. Desta forma, sistemas instrumentais multi-resposta são cada vez mais utilizados nas rotinas da análise química, o que praticamente obriga ao uso de ferramentas matemáticas e estatísticas capazes de processar toda a informação disponível.

A quimiometria é uma especialidade da química que utiliza conhecimentos de matemática, probabilidade, estatística e informática para o processamento de dados multivariados, objetivando explorar ao máximo as respostas fornecidas pelo sistema instrumental, de maneira a permitir o reconhecimento de padrões e o estabelecimento de correlações mútuas entre as propriedades dos analitos, usualmente requerendo um menor tempo de análise.

Atualmente, diversos grupos desenvolvem novos algoritmos, softwares e programas computacionais, procurando o aperfeiçoamento de ferramentas amigáveis que permitam solucionar problemas específicos na área da análise química. Muitos programas são de livre acesso, o que tem viabilizado a difusão da quimiometria, não apenas no universo da química, mas também em diversas áreas correlatas em que a interpretação de dados multivariados é relevante.

Dentre as recentes aplicações da análise multivariada destacam as pesquisas relacionadas com o monitoramento ambiental, basicamente em razão da elevada complexidade das matrizes estudadas, da grande variedade de poluentes de relevância e da

admirável quantidade de dados que podem ser gerados com o uso de poucas ferramentas instrumentais de análise. Adicionalmente, destaca a imposição de normas cada vez mais extensas e restritivas, o que aumenta a demanda por métodos analíticos sensíveis, seletivos e, de preferência, rápidos e de baixo custo.

Nos últimos anos tem sido possível observar uma crescente preocupação com a ocorrência ambiental de poluentes orgânicos, incluindo uma grande variedade de espécies químicas com diferentes estruturas, propriedades, funções e origens. Dentro do contexto dos poluentes orgânicos é possível destacar o grupo dos poluentes emergentes, formado essencialmente por fármacos, hormônios, retardantes de chama e pesticidas, além de outras espécies associadas à atividade industrial.<sup>[2]</sup> A presença destas substâncias tem sido detectada em praticamente todos os compartimentos ambientais, onde provocam efeitos nocivos cada vez melhor elucidados.

Em geral, a análise quantitativa de poluentes orgânicos em amostras ambientais é desafiadora, em razão da complexidade inerente dessas matrizes naturais e dos baixos níveis de concentração em que os contaminantes costumam ser encontrados. Assim, grande parte destas análises recorre ao uso de técnicas cromatográficas associadas a sistemas de detecção cada vez mais seletivos<sup>[3,4]</sup>, técnicas que, embora eficientes, se mostram lentas e dispendiosas. Em função dos inconvenientes apresentados pelas modernas técnicas instrumentais de análise, alternativas mais simples e de domínio mais universal tem sido procuradas, com destaque para métodos espectroscópicos fundamentados, por exemplo, em sensíveis técnicas de fluorescência e fosforescência.<sup>[5]</sup> Infelizmente, os métodos espectroscópicos carecem da seletividade requerida, em particular quando compostos químicos semelhantes devem ser analisados em amostras complexas.

Muitos problemas de interferência espectral podem ser minimizados pelo uso de ferramentas quimiométricas baseadas em sistemas de calibração multivariada, o que aumenta consideravelmente a potencialidade analítica das técnicas espectroscópicas. Assim, recursos quimiométricos têm sido cada vez mais utilizados na área da análise ambiental, principalmente para o desenvolvimento de métodos de análise quantitativa<sup>[6]</sup>, interpretação de resultados associados com a qualidade ambiental<sup>[7]</sup> e estabelecimento de modelos que permitam a previsão de efeitos toxicológicos<sup>[8]</sup>.

Neste trabalho, ferramentas quimiométricas foram utilizadas para viabilizar o estabelecimento de métodos espectroscópicos para a quantificação de poluentes ambientais de relevância e o estudo de correlações entre a presença de poluentes e a expressão gênica de um bioindicador. Em razão da diversidade de objetos de estudo, esta tese foi organizada nos

quatro capítulos individuais apresentados a seguir, sendo precedidos de uma revisão bibliográfica de caráter mais geral.

**Capítulo I:** Determinação de Sulfametoxazol e 17- $\beta$  estradiol em amostras de águas superficiais e de abastecimento utilizando espectrometria de fluorescência molecular e “Parallel factor analysis” (PARAFAC);

**Capítulo II:** Quantificação da contaminação por gasolina em amostras de solo e monitoramento das propriedades do solo após tratamento Fenton utilizando espectroscopia no infravermelho (DRIFT), regressão por mínimos quadrados parciais (PLSR) e análise de componentes principais (PCA);

**Capítulo III:** Determinação de fenol e seus principais subprodutos durante um processo de degradação por fotocatalise-  $\text{TiO}_2$  utilizando espectroscopia UV-Vis e PLSR;

**Capítulo IV:** Estabelecimento de relações entre a presença de poluentes em águas superficiais e o perfil de expressão gênica em *E. coli* utilizando-se métodos de agrupamento, classificação e regressão (ex. análise de componentes principais, PCA; análise de clusters, HCA e regressão por mínimos quadrados parciais, PLSR), trabalho este realizado em parceria com o instituto Alemão Helmholtz Zentrum für Umweltforschung (UFZ).

## 1.1. REFERÊNCIAS DO ITEM

- [1] BORTOLOTTI, L., MOITA NETO, J. M.; Introdução á filosofia da ciência: Estatística multivariada Uma visão didática-metodológica. Lisboa: Gradiva, Dezembro de **2013**, 340 pp. Tradução de Jorge Beleza.
- [2] Disponível em: <http://www.epa.gov/ebtpages/pollutants.html> em 13 de fevereiro de 2015.
- [3] VAN LEEUWEN, S.P.J., DE BOER, J. Advances in the gas chromatographic determination of persistent organic pollutants in the aquatic environment. *Journal of Chromatography A*, **2008**, v. 1186 (1-2), . 161-182.
- [4] GROS, M., PETROVIĆ, M., BARCELÓ, D., Development of a multi-residue analytical methodology based on liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) for screening and trace level determination of pharmaceuticals in surface and wastewaters. *Talanta*, **2006**, v. 70 (4),78-690.
- [5] SALINAS CASTILLO, A., SEGURA CARRETERO, A., COSTA FERNÁNDEZ, J.M., JIN, W.J., FERNÁNDEZ GUTIÉRREZ, A., Heavy atom induced room temperature

phosphorescence: A tool for the analytical characterization of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Analytica Chimica Acta*, **2004**, v. 516 (1-2),213-220

- [6] MAS, S., JUAN, A., TULER, R., OLIVIERI, A.C., ESCANDAR, G.M., Application of chemometric methods to environmental analysis of organic pollutants: A review. *Talanta*, **2010**, V. 80 (3),1052-1067
- [7] LOGANATHAN G. KRISHNARAJ S. MUTHUMANICKAM J. AND K R., Chemometric and trend analysis of water quality of the South Chennai lakes: an integrated environmental study, *Journal of Chemometrics*, **2014**, v. 29, 59–68.
- [8] BEYENE, J. AND TRITCHLER, D., Multivariate analysis of complex gene expression and clinical phenotypes with genetic marker data. *Genet. Epidemiol.*,**2007**, v. 31, 103–109.



# REVISÃO GERAL

## 2. MÉTODOS MULTIVARIADOS APLICADOS EM ANÁLISE AMBIENTAL

A quimiometria ganhou grande aceitação ao longo das duas últimas décadas, respondendo à necessidade de estudar amostras cada vez mais complexas e melhorando protocolos analíticos já existentes. Há intensa investigação dedicada ao desenvolvimento de algoritmos aplicados a cada vez mais complexos cenários químicos<sup>[1]</sup>.

Métodos de calibração multivariada têm sido cada vez mais utilizados em análise ambiental, principalmente quando os componentes presentes numa mistura necessitam ser determinados, mas a informação analítica disponível não apresenta seletividade<sup>[2,3]</sup>. Isto é, quando em uma mistura não é possível identificar os componentes individuais, a partir da resposta instrumental.

Durante muitos anos, a determinação da concentração de poluentes orgânicos em matrizes ambientais foi fundamentada em sistemas de calibração univariada, em que apenas uma variável é utilizada para estabelecer correlações com a concentração (ex. corrente de pico em um valor de potencial nas medições eletroquímicas, valor de absorbância em um dado comprimento de onda, dentre outras) Assim, grande parte das respostas fornecidas pelos sistemas instrumentais modernos (considere-se, por exemplo, um espectro UV-Vis contendo 500 valores de absorbância em igual número de comprimentos de onda) é subutilizada, o que, no caso específico da espectrofotometria UVVis, aumenta consideravelmente a possibilidade de interferências espectrais que limitam sensivelmente a sua aplicação na análise de matrizes ambientais, usualmente muito complexas. <sup>[4]</sup>

Por sua vez, métodos de calibração multivariada foram desenvolvidos para processar grandes quantidades de informação, o que, novamente no contexto dos métodos espectroscópicos, permite contornar os efeitos produzidos pela presença de interferentes<sup>[2]</sup>, desde que a espécie de interesse apresente um sinal que possa ser diferenciado do sinal da matriz <sup>[5]</sup>.

A base da calibração multivariada é estabelecer uma relação entre duas matrizes (ou blocos) de dados químicos, quando houver uma dependência entre as propriedades que descrevem cada uma delas. Assim, a calibração multivariada consiste basicamente de duas fases<sup>[6,7]</sup>: a calibração e a previsão. Na fase de calibração, “n” espectros para um conjunto de amostras com composição conhecida são obtidos em “p” valores de energia (ou comprimento de onda) diferentes, formando uma matriz X, com “n” linhas e “p” colunas. Também uma

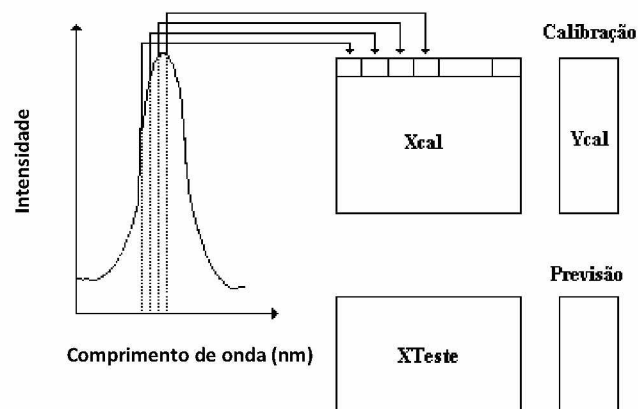
matriz  $Y$  com os valores de concentração pode ser formada contendo “ $n$ ” linhas, correspondendo às diferentes amostras, e “ $q$ ” colunas <sup>[7,8]</sup>.

O próximo passo é desenvolver um modelo matemático apropriado (determinando-se um vetor dos coeficientes de regressão –  $b$ ) que melhor possa reproduzir  $Y_{cal}$  a partir dos dados da matriz  $X_{cal}$  (Eq. 01). Esse modelo é utilizado na fase de previsão (com um conjunto teste) para estimar as concentrações ( $Y_{prev}$ ) dos constituintes de novas amostras, a partir de seus espectros ( $X_{teste}$ ) (Eq. 02). Como estas metodologias trabalham com matrizes de dados, o processo de isolar o fator  $Y$  da Eq. 01 para a obtenção da Eq.02, implica a utilização da matriz transposta de  $X$ , ou seja,  $(X_{teste})^t$  <sup>[8]</sup>.

$$X_{cal} = b * Y_{cal} \quad \text{Eq.01}$$

$$Y_{teste} = (X_{teste})^t * b \quad \text{Eq.02}$$

Os dados para a calibração multivariada podem ser organizados conforme mostrado na Figura 01. Os valores de absorvância dos espectros, a cada valor de comprimento de onda, são as variáveis independentes, e as concentrações das espécies e interesse nas amostras, as variáveis dependentes.



**Figura 01:** Organização dos dados para calibração. Fonte: Nagata, 2001 <sup>[8]</sup>.

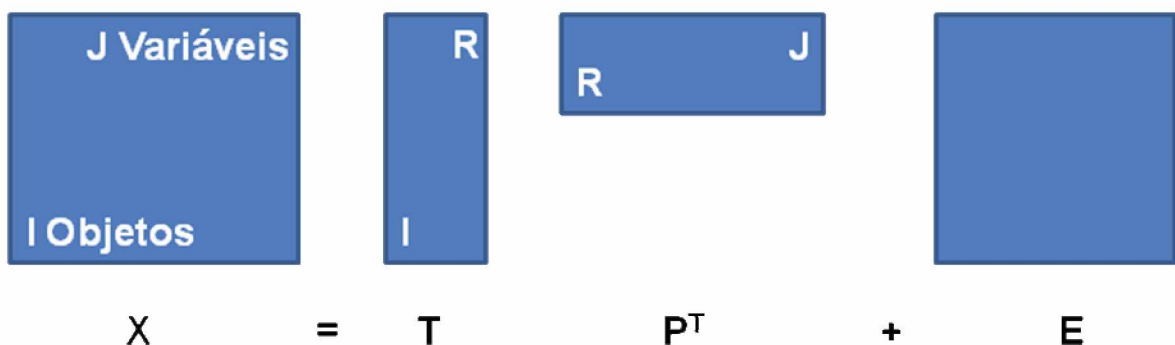
### 2.1 Análise exploratória: Análise de Componentes Principais (PCA)

A análise de Componentes Principais (PCA) é uma técnica que permite representar os dados multivariados de uma forma simplificada, de maneira a evidenciar semelhanças e diferenças que possam representar padrões de discriminação.

Analisar semelhanças e diferenças em um grande conjunto de dados pode ser bastante complicado. Desta forma, a PCA opera com o objetivo de diminuir a dimensionalidade da matriz original (compressão), sem perda de informação relevante, permitindo representações gráficas que facilitam a observação de padrões dentro do conjunto.

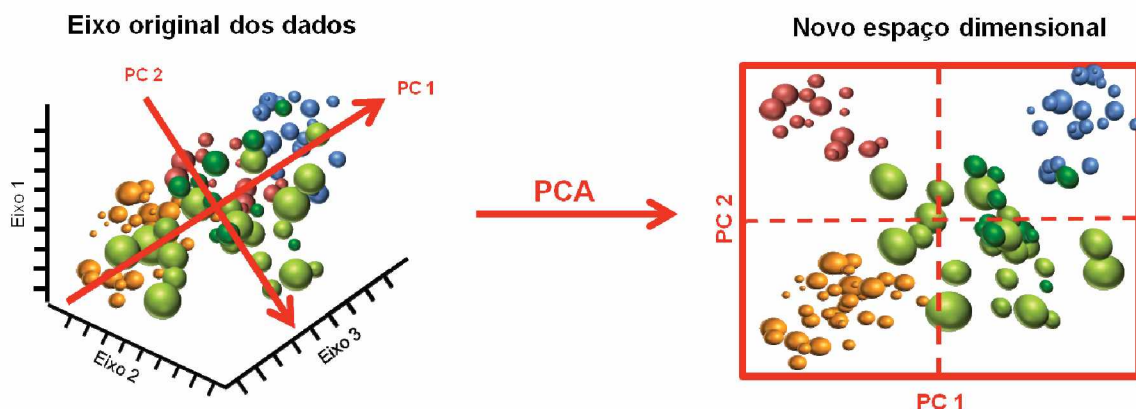
Dois técnicas estreitamente relacionadas, a análise de componentes principais (PCA) e a análise hierárquica (clusters), são usadas para reduzir a dimensionalidade das matrizes de dados, facilitando o agrupamento das amostras segundo as suas similaridades [9-11].

A análise de componentes principais emprega uma transformação matemática do conjunto original de dados, com nenhuma suposição sobre a forma da matriz de covariância. O objetivo deste procedimento é determinar algumas combinações lineares do conjunto de variáveis originais, que podem ser utilizados para sintetizar o conjunto de dados sem perder muita informação. O método é baseado na decomposição das matrizes de variáveis independentes  $X_{cal}$  (conjunto de calibração) em um novo sistema de eixos (componentes principais, variáveis latentes ou fatores), representando as amostras em um menor número de dimensões, sem que haja perda de informação analítica relevante. As novas coordenadas da amostra são denominadas “scores” (T), enquanto que o peso com que cada variável original contribui para formar as componentes principais é chamado de “loading” (P). Uma representação gráfica deste processo é apresentada na Figura 02.<sup>[12]</sup>



**Figura 02:** Representação gráfica da estrutura de um modelo de análise de Componentes Principais.

Em particular, a análise de componentes principais permite identificar as principais direções em que ocorre a variância dos dados. Na Figura 03, por exemplo, as esferas coloridas representam um conjunto de dados distribuídos no espaço definido pelas variáveis originais X, Y e Z. No processamento por PCA calculam-se novos eixos, denominados componentes principais, sempre com a intenção de representar a maior parte da variância contida no conjunto de dados. Assim, a primeira componente principal (PC1) se projeta na direção da maior variância, enquanto que a segunda (PC2), sendo ortogonal, complementa a representação da variância projetando em outra direção. Em geral, toda a variância descrita por um grande número de variáveis originais pode ser representada por um pequeno número de componentes principais, o que facilita a visualização do conjunto de dados e a identificação de agrupamentos (padrões).



**Figura 03:** Representação gráfica da construção de um novo conjunto de eixos no modelo PCA.

Uma importante aplicação deste tipo de procedimento foi apresentada por Berrow e Burrige em 1991<sup>[13]</sup>, que, a partir do teor de alguns metais de relevância ambiental (Cu, Pb, Zn, Cr, Ni, Hg, Cd e Ag) em amostras de sedimento e moluscos (mexilhões), conseguiu encontrar correlações que sugeriram as fontes de contaminação.

Outro exemplo que merece destaque corresponde ao trabalho de Rajendran *et al.* (1992)<sup>[15]</sup>, que utilizou estratégias multivariadas (PCA) para a avaliação de resultados relacionados com a concentração de pesticidas em amostras de peixe. O estudo mostrou que um pequeno número de componentes principais representa cerca de 95% da variância original

dos dados, o que permitiu encontrar correlações que não são óbvias na análise dos dados brutos.

Shimoyama e colaboradores (1999)<sup>[16]</sup> avaliaram a fotodegradação de um material polimérico (polimetil acrilato) utilizando um método não destrutivo fundamentado no uso de espectroscopia no infravermelho próximo (NIR) e um *probe* de fibra ótica. Neste estudo, o uso de PCA permitiu observar que o processo de degradação envolve principalmente o sinal correspondente ao “*overtone*” associado ao grupo C-O.

## 2.2. Regressão por mínimos quadrados parciais (PLSR)

A Calibração Multivariada fundamentada em técnicas de regressão parcial corresponde a uma ferramenta poderosa para a química analítica, de interessante potencial de aplicação em muitos problemas de análise farmacêutica<sup>[17-19]</sup>. Em geral, este recurso permite a determinação de um componente de interesse em matrizes complexas ou a análise de multicomponentes em sistemas mais simples.

A base do método dos mínimos quadrados parciais (PLSR) está na decomposição de uma matriz de dados X em termos da soma de várias matrizes M<sub>i</sub>, que não podem mais ser expandidas, mais uma matriz de erros (que corresponde a parte não modelada de X). As matrizes M<sub>i</sub> constituem os chamados componentes principais, e são formadas pelo produto de dois vetores, T (os *scores*) e P (os *loadings*)<sup>[20]</sup>:

$$X = M_1 + M_2 + \dots + M_a + E \quad \text{ou,} \quad \text{Eq.03}$$

$$X = t_1p_1 + t_2p_2 + \dots + t_ap_a + E \quad \text{ou,} \quad \text{Eq.04}$$

$$X = TP' + E \quad \text{Eq.05}$$

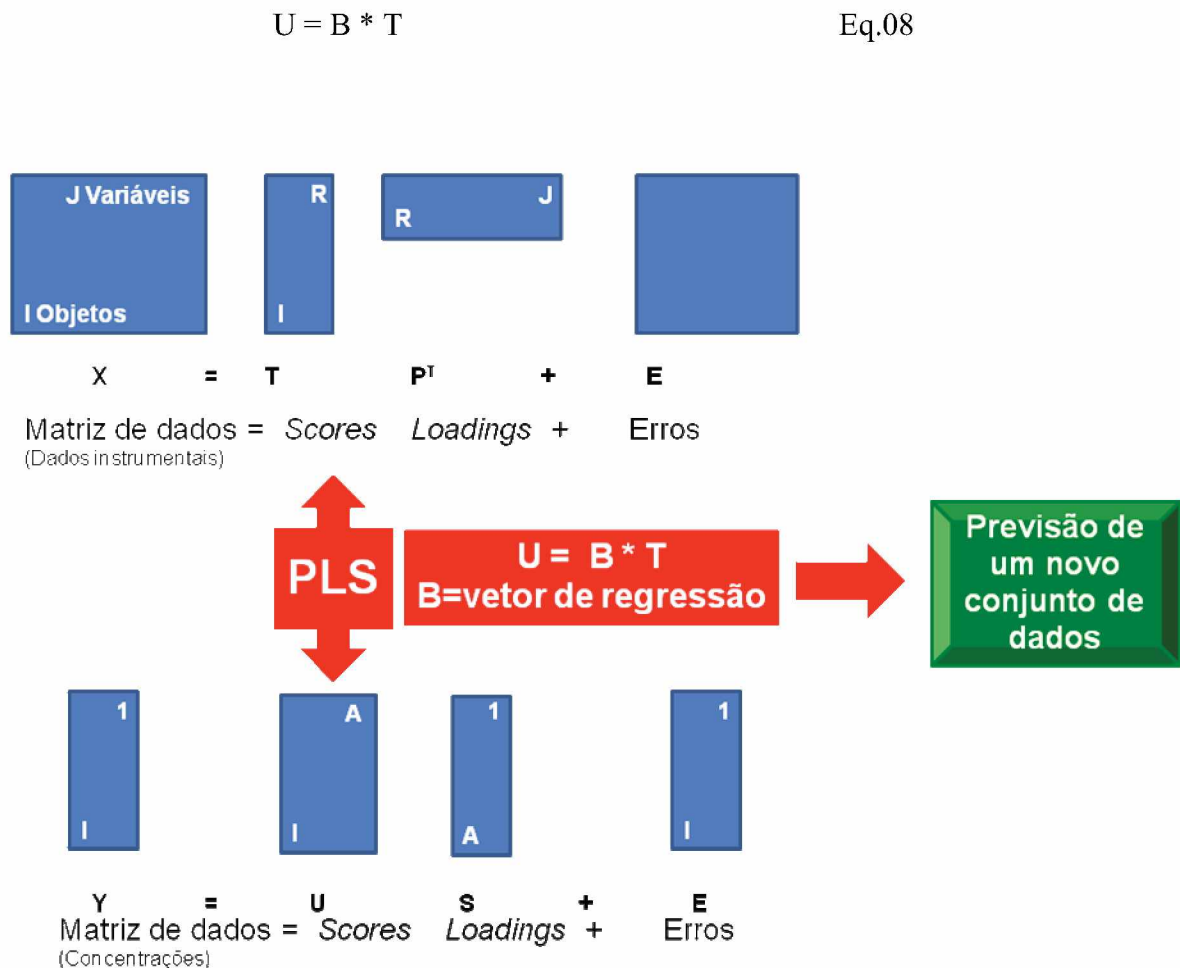
A dimensionalidade do espaço original é igual ao número de colunas em X, ou seja, o número de variáveis originais. No novo modelo, a dimensionalidade é descrita pelo número de matrizes M<sub>i</sub> necessárias para descrever X. Assim, se for possível descrever uma matriz X que tenha muitas variáveis, por um número pequeno dessas matrizes M<sub>i</sub>, haverá um decréscimo na dimensionalidade, sem perda de informação relevante.

No PLS, tanto a matriz das variáveis independentes X, como a das variáveis dependentes Y, são representadas pelos *scores* e *loadings*, mais uma matriz de erros:

$$X = TP' + E \quad \text{Eq.06}$$

$$Y = UQ' + F \quad \text{Eq.07}$$

Uma relação entre as duas matrizes de dados X e Y pode ser construída, correlacionando-se os scores de cada bloco, utilizando um modelo linear, conforme mostrado na Figura 04:



**Figura 04:** Representação gráfica da construção de um modelo PLS, onde ocorre a correlação entre os scores do bloco X e Y, gerando o vetor de regressão B, que permite a previsão da concentração em um novo conjunto de amostras.

Métodos de calibração multivariada têm sido utilizados com bastante frequência na resolução de problemas de interferência espectral. Os exemplos são abundantes e atestam o grande potencial dos processos de calibração multivariada para a resolução deste tipo de problemas, sem a necessidade de recorrer a metodologias químicas de separação, frequentemente associadas a contaminação ou perda da amostra de interesse. Neste sentido,

destacam os bons resultados conseguidos na determinação espectrofotométrica de fármacos [21-23] e metais pesados [24-26]

Garrido e colaboradores (2003)<sup>[27]</sup>, por exemplo, propuseram uma metodologia multivariada, fundamentada em cromatografia em fase gasosa (CG/MS) e PLS, para a quantificação de pesticidas em amostras de vegetais com resultados satisfatórios em níveis de concentração da ordem de décimos de  $\text{mg kg}^{-1}$ .

A espectrofotometria UV-Vis em combinação com PLS foi aplicada para o estudo da degradação fotoquímica de 2 – nitrofenol e 4 – nitrofenol, individualmente e em misturas com catalisador oxido de titânio. A recuperação para a mistura dos dois analitos foi entre 90 e 105%. A combinação de UV-Vis e PLS proporcionaram meios de previsão para a concentração do monitoramento in situ dos analitos durante o processo de oxidação fotocatalítica<sup>[28]</sup>

### 2.3. Modelos multidimensionais (PARAFAC)

Os métodos multidimensionais de calibração multivariada, também conhecidos como modelos de segunda ordem, empregam uma matriz de dados por amostra na construção do modelo de calibração. Esse tipo de dados pode ser gerado através de diversas técnicas como, por exemplo, a cromatografia líquida de alta eficiência ou cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massas (HPLC-MS e GC-MS), fluorescência molecular de excitação e emissão, análise por injeção em fluxo com gradiente de pH e detecção por arranjo de diodos, dentre outras.

A maior vantagem da calibração de segunda ordem é a de permitir a determinação da espécie de interesse na presença de interferentes, mesmo que estes interferentes não tenham sido incluídos nas amostras de calibração, característica que é chamada de vantagem de segunda ordem. Além disso, o perfil de cada composto linearmente independente presente na amostra pode ser estimado com dados de segunda ordem.<sup>[29]</sup>

O PARAFAC (do inglês, *Parallel Factor Analysis*) é um método de calibração multivariada de segunda ordem que apresenta grandes vantagens na modelagem de dados espectroscópicos, principalmente de fluorescência de excitação e emissão e dados cromatográficos. Isso ocorre, devido à estrutura desses dados que parecem se ajustar perfeitamente ao modelo. Além da calibração, este método também pode ser empregado na análise espectral de misturas em que os espectros reais das espécies puras podem ser



recuperados se os dados forem de fato trilineares, se o número de fatores for correto e se a razão sinal/ruído for adequada.<sup>[30]</sup>

Medidas de matriz Emissão-Excitação podem fornecer um conjunto de dados de três dimensões, em que cada amostra dá origem a uma matriz de dados. Uma série desse tipo de matrizes de dados pode tornar-se um cubo de dados algoritmo X. O PARAFAC <sup>[20-22]</sup> decompõe o cubo de dados em matrizes de carga X em A, B e C, e gera um modelo trilinear que minimiza a soma quadrática dos resíduos:

$$X_{ijk} = \sum_{n=1}^N a_{in} b_{jn} c_{kn} + E_{ijk} \quad \text{Eq. 09}$$

Onde N é o número total de constituintes químicos que geram o sinal medido,  $a_{in}$  representa a concentração relativa ou pontuação do componente n na amostra de ordem i, e  $b_{jn}$  e  $c_{kn}$  são as intensidades nos canais instrumentais (ou dimensões de dados – emissão/excitação) J e K, respectivamente. Os valores de  $E_{ijk}$  são os elementos da matriz tridimensional E, que representam o erro residual, e tem as mesmas dimensões do conjunto X. O vetor é uma coluna na matriz A, enquanto vetores de  $b_n$  e  $c_n$  são obtidos pelas matrizes B e C (geralmente  $b_n$  e  $c_n$  são normalizados para unidade de comprimento).

O princípio acima pode ser formulado em uma forma menos matemática. Uma matriz tridimensional será trilinear desde que os seguintes requisitos sejam verificados <sup>[31]</sup>:

- (1) o sinal é linearmente relacionado com a concentração do analito;
- (2) o sinal para uma dada amostra é bilinear; e,
- (3) os perfis dos componentes são constantes em diferentes amostras.

O primeiro ponto significa que o sinal máximo, medido por um componente puro em valores selecionados dos sensores em cada uma das duas dimensões de dados, é diretamente proporcional à concentração do componente.

O segundo requisito implica que um único componente de matriz de dados pode ser decomposto no produto de dois vetores, cada um contendo o componente de perfil numa das duas dimensões dados. Um exemplo conhecido de dados bilinear é uma matriz de fluorescência de emissão de excitação, que se decompõe para a excitação e o espectro de emissão para um dado componente fluorescente. Em contraste, os dados de espectrometria tandem massa ( $MS^2$ ) não são bilineares, porque cada fragmento de um único composto tem

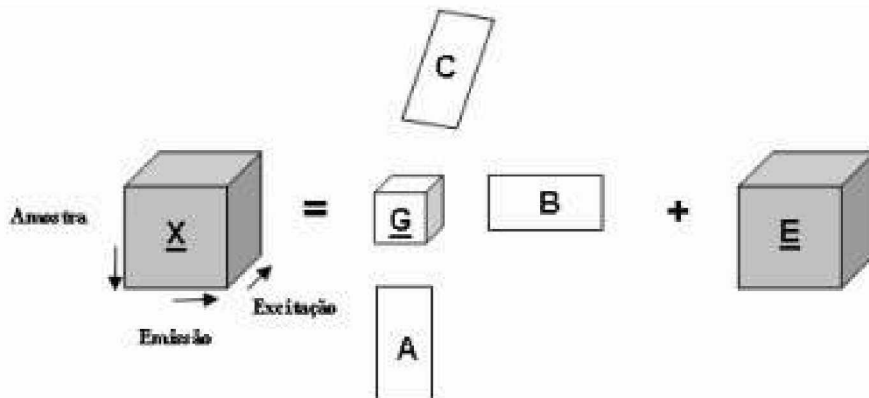
um padrão específica de MS na segunda dimensão MS, o que torna impossível para descrever os dados  $MS^2$  em termos de um perfil de MS em cada dimensão [15].

Finalmente, o terceiro requisito implica que a forma dos perfis em todas as dimensões de um dado componente deve ser o mesmo, com variações de intensidade ser devida apenas a diferentes concentrações em diferentes amostras.

Quando a matriz tridimensional de dados de segunda ordem é trilinear, modelos trilineares tais como PARAFAC podem ser convenientemente aplicados, uma vez que a sua estrutura interna é o da Equação (9). Geralmente, os perfis dos componentes são passíveis de interpretação física, uma vez que correspondem ao espectro, cromatogramas ou evoluções cinéticas de componentes puros, dependendo do tipo de dados registrados de segunda ordem.

O PARAFAC é um método estável e robusto na decomposição espectral de dados multidimensionais trilineares. Neste método os componentes não são obrigatoriamente ortogonais, de modo que a variância somada para cada componente não é igual à variância total do modelo.

A Figura 05 mostra a representação da decomposição efetuada pelo método PARAFAC.



**Figura 05:** Ilustração da decomposição efetuada pelo PARAFAC. Fonte: Varderrama, 2007<sup>[32]</sup>.

Os dados decompostos em tríades são relacionados através de um tensor núcleo  $G$  que apresenta em sua superdiagonal valores unitários e nas demais posições zeros, de modo que o posto é o mesmo nos três modos. Este tensor núcleo pode ser facilmente eliminado da estrutura, o modelo é constituído por uma matriz de *scores*  $A$  e duas matrizes de *loadings*  $B$  e  $C$ . Isso torna o modelo menos flexível, pois utiliza menos graus de liberdade, o que determina

solução única do sistema. Se por um lado esta característica é a grande vantagem na modelagem de dados espectroscópicos, por outro lado é necessário conhecimento *à priori* do sistema para a escolha do número correto de fatores que deverão ser utilizados para efetuar a decomposição dos dados <sup>[33]</sup>.

Poucos trabalhos envolvem o uso de PARAFAC em análises ambientais, e consistem, basicamente, na determinação de matéria orgânica dissolvida, utilizando caracterização por espectrofluorimetria <sup>[34-39]</sup>.

#### 2.4. REFERÊNCIAS DO ITEM

- [1] ESCANDAR, G.M., OLIVIERI, A.C., FABER, N.(K.) M., GOICOECHEA, H.C., MUÑOZ de la PEÑA, A., POPPI, R.J. Second- and third-order multivariate calibration: data, algorithms and applications. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, **2007**, v. 26 (7), pag. 752-765.
- [2] BRO, R.; Multivariate calibration. What is in chemometrics for the analytical chemist? *Anal. Chim. Acta*, **2003**, v. 500, 185-198.
- [3] HOPKE, P. K.; The evolution of chemometrics. *Anal. Chim. Acta*, **2003**, v. 500, 365- 370.
- [4] KEITHLEY, R.B., WIGHTMAN, R.M., HEIEN, M.L., Multivariate concentration determination using principal component regression with residual analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **2009**, v. 28(9), 1127-1136.
- [5] HEIEN, M.L.A.V., JOHNSON, M.A., WIGHTMAN, R.M., Resolving Neurotransmitters Detected by Fast-Scan Cyclic Voltammetry. *Analytical Chemistry*, **2004**, v.76 (19), 5697-5704
- [6] MARTENS, H.; NAES, T.; Multivariate Calibration; John Wiley & Sons; Chichester, England, **1989**.
- [7] FERREIRA, M. M. C.; ANTUNES, A. M.; MELGO, M. S.; VOLPE, P. L. O.; Quimiometria I: Calibração multivariada, um tutorial. *Quim. Nova*, **1999**, v. 22, 724-731.
- [8] NAGATA, N.; Uso de métodos de calibração multivariada na análise de amostras de interesse industrial e espécies de importância ambiental por fluorescência e raios-X. Tese de Doutorado, IQ-UNICAMP, **2001**.
- [9] BEEBE K. R.; PELL, R. J.; SEASHOLTZ, M. B.; Chemometrics: a practical guide, John Wiley & Sons: New York, **1997**.
- [10] SHARAF, M. A.; ILLMAN, D. L.; KOWALSKI, B. R.; Chemometrics, John Wiley & Sons: New York, **1986**.

- [11] CHRISTIE, O. H. J.; Introduction to multivariate methodology, an alternative way? *Chemometr Intell Lab Syst*, **1995**, v. 29, 177–188.
- [12] BRERETON, R.G. introduction to multivariate calibration in analytical chemistry. *Analyst*, **2000**, v. 125, 2125-2154.
- [13] BERROW, M. L. e BURRIDGE, J. C.: Uptake, Distribution, and Effects of Metal Compounds on Plants, in Merian, E. (ed.), *Metals and their Compounds in the Environment*, VCH, *Weinheim.*, **1991**, 1438.
- [15] RAJENDRAN R.B., KARUNAGARAN V.M., BABU S., SUBRAMANIAN A., Levels of chlorinated insecticides in fishes from the Bay of Bengal. *Marine Pollution Bulletin*, **1992**, v 24, 567-570.
- [16] SHIMOYAMA M., MATSUKAWA K., INOUE H, NINOMIYA T AND OZAKI Y, Non-destructive analysis of photo-degradation of poly(methyl methacrylate) by near infrared light-fibre spectroscopy and chemometrics, *J. Near Infrared Spectrosc.*, **1999**, v. 7(1), 27–32.
- [17] ARANCIBIA, J. A.; NEPOTE, A. J.; ESCANDAR, G. M.; OLIVIERI A. C.; Spectrofluorimetric determination of phenylephrine in the presence of a large excess of paracetamol. *Anal. Chim. Acta*, **2000**, v. 419, 159-186.
- [18] SENA, M. M.; FERNANDES, J. C. B.; ROVER, L. ; POPPI, R. J.; KUBOTA, L. T.; Application of two- and three-way chemometric methods in the study of acetylsalicylic acid and ascorbic acid mixtures using ultraviolet spectrophotometry. *Anal. Chim. Acta*, **2000**, v. 409, 159-167.
- [19] MEDINA, A. R.; FERNANDEZ DE CÓRDOVA, M. L.; MOLINA-DIAZ, A.; Simultaneous determination of paracetamol, caffeine and acetylsalicylic acid by means of a FI ultraviolet pls multioposensing device. *J. Pharm. Biomed. Anal* , **1999**, v. 21, 983-990.
- [20] ABDI, H.; Partial Least Squares (PLS) Regression. In M. Lewis-Beck, A. Bryman, T. Futing (Eds); *Encyclopedia for Research Methods for the Social Sciences*. **2003**.
- [21] BOERIS, M. S.; LUCO, J. M.; OLSINA R. A.; Simultaneous spectrophotometric determination of phenobarbital, phenytoin and methylphenobarbital in pharmaceutical preparations by using partial least-squares and principal component regression multivariate calibration. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2000**, v.24, 259-264.
- [22] CRIADO, A.; CÁRDENAS, S.; GALLEGRO, M.; VALCÁRCEL, M.; Continuous flow spectrophotometric determination of paracetamol in pharmaceuticals following continuous microwave assisted alkaline hydrolysis. *Talanta*, **2000**, v. 53, 417-422.

- [23] BENAMOR, M.; BELHAMEL, K.; DRAA, M. T.; Use of xylenol orange and cetylpyridinium chloride in rapid spectrophotometric determination of zinc in pharmaceutical products; *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2000**, v.23, 1033- 1044.
- [24] FERNÁNDEZ, F. M.; TUDINO, M. B.; TROCCOLI, O. E.; Multicomponent kinetic determination of Cu, Zn, Co, Ni and Fe at trace levels by first and second order multivariate calibration. *Anal. Chim. Acta*, **2001**, v. 433,119- 124.
- [25] CHACAROLLI, C. J.; ANDRADE, J. F.; GUIMARÃES, O. M.; BALBO, V. R.; VENEZUELA, C. S.; TERUEL, F. S.; Spectrophotometric study of iron oxidation in the iron(II)/azide/tetrahydrofuran system and some analytical applications. *Anal. Chim. Acta*, **2000**, v. 411, 217-222.
- [26] CROUCH, S. R.; COELLO, J.; MASPOCH, S.; PORCEL, M.; Evaluation of classical and three-way multivariate calibration procedures in kinetic-spectrophotometric analysis. *Anal. Chim. Acta*, **2000**, v. 424, 115- 123.
- [27] GUARRIGUES, S.; ANDRADE, J. M.; LA GUARDIA; M.; PRADA, D. Multivariate calibrations in Fourier transform infrared spectrometry for prediction of kerosene properties. *Analytica Chimica Acta*, vol. 317, 1995, 95-105.
- [28] TIAN M., WU G., ADAMS B., WEN J., CHEN A. Kinetics of photoelectrocatalytic degradation of nitrophenols on nanostructured TiO<sub>2</sub> electrodes. *Journal of Physical Chemistry C*, **2008**, v. 112 (3), 825-831
- [29] BOOKSH K.S.; KOWALSKI B.R.; Theory in analytical chemistry. *Anal. Chem.*, **1994**, v. 66, 782-791.
- [30] BRO, R.; PARAFAC: Tutorial and applications. *Chemometr. Intell. Lab.*, **1997**, vol. 38, 149 - 171.
- [31] OLIVIERI, A.C., ESCANDAR, G.M., MUÑOZ DE LA PEÑA, A., Second-order and higher-order multivariate calibration methods applied to non-multilinear data using different algorithms, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **2011**, v. 30(4), 607-617.
- [32] VALDERRAMA, P. Calibração multivariada de primeira e segunda ordem e figuras de mérito na quantificação de enantiômeros por espectroscopia. Tese de Doutorado, UNICAMP, **2007**.
- [33] YAMASHITA, Y., SCINTO, L.J., MAIE, N., JAFFÉ, R. Dissolved Organic Matter Characteristics Across a Subtropical Wetland's Landscape: Application of Optical Properties in the Assessment of Environmental Dynamics. *Ecosystems*, **2010**, v.13 (7), 1006-1019.

- [34] INAMDAR, S., FINGER, N., SINGH, S., MITCHELL, M., LEVIA, D., BAIS, H., SCOTT, D., MCHALE, P. Dissolved organic matter (DOM) concentration and quality in a forested mid-Atlantic watershed, USA, *Biogeochemistry*, **2011**, 1-22.
- [35] AUSTNES, K., EVANS, C.D., ELIOT-LAIZE, C., NADEN, P.S., OLD, G.H.; Effects of storm events on mobilisation and in-stream processing of dissolved organic matter (DOM) in a Welsh peatland catchment. *Biogeochemistry*, **2010**, v. 99 (1), 157-173.
- [36] FELLMAN, J.B., MILLER, M.P., CORY, R.M., D'AMORE, D.V., WHITE, D. Characterizing dissolved organic matter using PARAFAC modeling of fluorescence spectroscopy: A comparison of two models. *Environmental Science and Technology*, **2009**, v. 43 (16), 6228-6234.
- [37] TREVISAN M. G.; POPPI R. J.; Determination of doxorubicin in human plasma by excitation–emission matrix fluorescence and multi-way analysis. *Analytica Chimica Acta*, **2003**, v. 493, 69-81.
- [38] ORTIZ M.C.; SARABIA L.A.; SÁNCHEZ M.S.; GIMENEZ D.; Identification and quantification of ciprofloxacin in urine through excitation-emission fluorescence and three-way PARAFAC calibration. *Analytica Chimica Acta*, **2009**, v. 642, 193-205
- [39] BOSCO M. V.; LARRECHI S.; PARAFAC and MCR-ALS applied to the quantitative monitoring of the photodegradation process of polycyclic aromatic hydrocarbons using three-dimensional excitation emission fluorescent spectra: Comparative results with HPLC. *Talanta*, **2007**, v.71, 1703-1709.

# Capítulo I

Determinação de Sulfametoxazol e 17- $\beta$  estradiol em amostras de águas superficiais e de abastecimento utilizando espectrometria de fluorescência molecular e “Parallel factor analysis” (PARAFAC).

## I.1. INTRODUÇÃO

### *I.1.1 Determinação de poluentes orgânicos em matrizes ambientais utilizando fluorescência molecular e “Parallel Factor Analysis” (PARAFAC)*

A análise química de poluentes presentes em matrizes ambientais, geralmente envolve amostras que estão longe de ter uma composição simples. Nestes casos, instrumentações sofisticadas e ferramentas matemáticas são recomendadas na tentativa de solucionar problemas onde a complexidade da matriz se torna o fator limitante do processo analítico<sup>[1]</sup>.

Na última década, a cromatografia em fase líquida (HPLC) e cromatografia em fase gasosa (CG) acoplada a espectrometria de massa (MS) ou em tandem MS (MS<sup>2</sup>) tornaram-se técnicas de primeira escolha na análise de rotina de amostras complexas, pois o detector MS oferece seletividade e sensibilidade adequadas para se obter métodos analíticos robustos, que fornecem o peso molecular e a estrutura de analitos, ajudando a identificar compostos. No entanto, um aspecto crítico na análise quantitativa com detecção por MS é a ocorrência de efeitos de matriz (ou seja, supressão ou, menos frequentemente, o aumento do sinal do analito), que pode levar a uma diferença significativa nas respostas de uma amostra quando comparadas a uma solução dos padrões puros, principalmente quando se trabalha com ionização por pressão atmosférica (API) e ionização por electrospray (ESI).<sup>[2]</sup>

Os inconvenientes principais envolvidos no tratamento deste problema são a natureza e a quantidade destes compostos que podem ser bastante variáveis entre as amostras, de tal modo que os efeitos de matriz também podem ser altamente variáveis e difíceis de serem previstos<sup>[3]</sup>. Embora diferentes estratégias tenham sido propostas para reduzir ou para compensar os efeitos de matriz<sup>[4,5]</sup>, diversas vezes esse problema não pode ser evitado, afetando a sensibilidade e a confiabilidade dos resultados<sup>[3]</sup>.

Em função destes problemas, esforços adicionais são necessários para garantir resultados mais confiáveis. No caso de técnicas de detecção menos sofisticadas, o esforço acaba sendo dobrado. Uma técnica que vem sendo amplamente utilizada é obter dados de segunda ordem (ou de ordem mais elevadas), tais como matrizes de emissão e de excitação de fluorescência, o pH ou a informação espectral cineticamente modulada ou dados de técnicas combinadas, obrigatoriamente acoplados aos algoritmos de calibração multivariada envolvendo a vantagem de segunda ordem.<sup>[2]</sup>

A vantagem de segunda ordem possibilita a quantificação precisa de múltiplos analitos utilizando amostras de calibração contendo dois ou mais compostos químicos sem a



necessidade do conhecimento dos componentes interferentes que possam estar presentes na amostra a ser analisada <sup>[6]</sup>. Essas técnicas tem sido exploradas em diversos sistemas reais, e portanto, complexos <sup>[7]</sup>.

Entre as abordagens quimiométricas que envolvem a vantagem de segunda ordem é possível destacar:

- GRAM (rank de aniquilação generalizada) <sup>[8]</sup>;
- DTLTD (decomposição trilinear direta) <sup>[9]</sup>;
- SWATLD (decomposição trilinear autoponderada alternada) <sup>[10]</sup>;
- APTLD (decomposição trilinear de penalidade alternada) <sup>[11]</sup>;
- PARAFAC (análise fatorial paralelo) <sup>[12]</sup>,
- MCR-ALS (Resolução curva multivariada alternando mínimos quadrados) <sup>[13]</sup>;
- BLLs (mínimos quadrados bilineares) <sup>[14]</sup>;
- U-PLS / RBL (mínimos quadrados parciais desdobrados / bilinearização residual) <sup>[15,16]</sup>
- ANN / RBL (redes neurais artificiais, seguido por bilinearização residual) <sup>[17]</sup>.

Estas metodologias, são as mais utilizadas atualmente para resolver problemas relacionados à alta complexidade de matriz, tendo em conta não só os algoritmos clássicos e bem estabelecidos (PARAFAC e MCR-ALS), mas também os mais recentemente desenvolvidos (BLLs e U-PLS / RBL) e o promissor ANN/RBL.

Em geral, a determinação de poluentes orgânicos em amostras complexas, tais como águas superficiais, requer a aplicação de diferentes metodologias de modo a obter seletividade frente aos inúmeros poluentes que podem estar presentes, bem como para lidar com efeitos de matriz anteriormente citados. Nestes casos, métodos univariados, tais como, a construção de uma curva de calibração a partir das amostras de analito puro não irá fornecer uma determinação adequada <sup>[18]</sup>.

Como descrito anteriormente, uma técnica analítica que gera dados de segunda ordem é a fluorimetria no modo emissão-excitação. No entanto, um problema inerente da técnica é a absorção de radiação de excitação e/ou emissão por espécies dissolvidas fluorescentes (ou não) ou pelo próprio fluoróforo <sup>[19]</sup>. Isto é denominado o efeito de autossupressão e conduz a uma variação não só na intensidade, mas também na forma do espectro. Ambos os inconvenientes podem ser corrigidos pelo método de adição padrão, que compensa os efeitos da matriz resultantes da composição da amostra. No entanto, o grande inconveniente ligado a este método de calibração é o elevado número de experimentos necessários, bem como a

necessidade da construção de novas curvas analíticas sempre quando são analisadas novas amostras. Além disso, a fim de obter figuras de mérito aceitáveis, é altamente recomendável que, pelo menos, quatro concentrações diferentes de padrão puro sejam adicionadas à amostra [18-20]. Mesmo com tantos inconvenientes, várias aplicações interessantes têm sido desenvolvidas neste contexto [21-24].

### *1.1.2 Fundamentos da fluorescência no modo matriz emissão-excitação (EEM)*

A espectroscopia de fluorescência molecular em modo de matriz Emissão-Excitação (EEM) é uma técnica analítica relativamente rápida, de baixo custo, de seletividade moderada e elevada sensibilidade, tem sido aplicada para a detecção de uma grande variedade de analitos [25,26]. Em espectroscopia EEM, o espectro de fluorescência total é obtido variando sistematicamente os comprimentos de onda de excitação e emissão e recolhendo a matriz de dados resultante. Devido ao modo adicional, a capacidade de resolução de espectros de fluorescência sobrepostos é favorecida, e isto é amplamente utilizado para a análise de compostos químicos, em concentrações na ordem de  $\mu\text{g L}^{-1}$  [27]. Além disso, a possibilidade de obtenção de uma matriz de dados para cada amostra gera dados de segunda ordem.

Vários métodos de análise de dados são capazes de trabalhar com dados de segunda ordem, permitindo determinar os analitos na presença de diversos interferentes, mesmo que a composição da matriz seja desconhecida e estes interferentes estejam ausentes nas amostras de calibração. Esta propriedade é conhecida como a "vantagem de segunda ordem" [28]. A estrutura, geralmente, trilinear dos dados em EEM torna essa técnica bem compatível com o modelo PARAFAC.

Um aspecto importante na análise de dados EEM é a presença dos espalhamentos Rayleigh e Raman [29]. Esses espalhamentos não seguem uma estrutura trilinear e, conseqüentemente, não podem ser descritos por PARAFAC. Assim, estes efeitos de espalhamento, que não possuem informação analítica relevante sobre os analitos presentes na solução, podem perturbar a modelagem matemática dos compostos químicos. Assim, é aconselhável remover ou reduzir os sinais provenientes destes espalhamentos, tanto quanto possível em etapas que precedem a modelagem.

Existem várias maneiras de remover os espalhamentos Rayleigh ou Raman dos espectros, sendo os mais utilizados: a ponderação da região de dispersão (MILES) [30], modelagem específica de dispersão [31], a subtração de um padrão [32], a aplicação de restrições na decomposição [33], inserindo valores faltantes [34], ou inserir zeros fora da área

dos picos. Entre estes, o mais vulgarmente utilizado consiste em subtrair o espectro na região dos espalhamentos evitando ao máximo o corte no sinal dos analitos <sup>[35]</sup>.

## **I.2. OBJETIVO GERAL**

Estudar a potencialidade do PARAFAC, em relação à determinação de poluentes orgânicos de relevância *via* espectrofluorimetria em matrizes ambientais extremamente complexas.

## **I.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Adaptar e otimizar procedimentos analíticos para a extração e pré-concentração das espécies de interesse a partir das matrizes em estudo, principalmente utilizando-se processos de extração em fase sólida.

Desenvolver e validar modelos de calibração multivariada utilizando-se técnicas de espectroscopia de fluorescência molecular, associadas à rotina de PARAFAC.

Validar os modelos de melhor desempenho na análise de amostras reais, utilizando-se técnicas cromatográficas como controle.

## **I.4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### *I.4.1 Reagentes e insumos*

O Padrão de sulfametoxazol (4-amino-N(5-metil-3-isoxazolil)benzenossulfo- namida) foi fornecido pelo laboratório farmacêutico Far-Manguinhos, da Fundação Oswaldo Cruz, com grau de pureza superior a 99,0%. O estrogênio 17-β-estradiol (E2: estra-1,3,5(10)-trieno-3,17β-diol) foi adquirido de Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany), com grau de pureza superior a 99,0%.

Soluções estoque de 100 mg L<sup>-1</sup> de cada um dos compostos de interesse foram preparadas em acetonitrila, sendo mantidas sob refrigeração e preparadas mensalmente.

Os solventes utilizados foram acetonitrila de grau cromatográfico de pureza (99,99 %, JTBacker) e água ultra-pura obtida em purificador Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA). Outros reagentes (ácidos, bases e solventes), foram de grau analítico PA.

Todos os espectros de fluorescência molecular foram obtidos em um espectrômetro de luminescência Hitachi F4500. O controle analítico foi realizado utilizando-se um cromatógrafo em fase líquida LC (Agilent 1260) equipado com detector UV (DAD) e detector de fluorescência. Em todas as análises foi utilizada uma coluna de sílica C18 (microsorb-MV100-5, 250 x 4,6 mm; 5 µm) e pré coluna C8 da mesma marca.

#### *1.4.2. Desenvolvimento do modelo PARAFAC*

Os espectros de fluorescência no modo matriz emissão-excitação (EEF) foram registrados utilizando uma cubeta multifacetada de quartzo com caminho óptico de 10 mm. As medidas foram realizadas na menor velocidade de aquisição (modo “slow”), utilizando-se fendas de 5 nm na excitação e emissão. As superfícies de EEF foram adquiridas entre os comprimentos de onda de 250-400 nm (excitação) e 250-400 nm (emissão) com passo de 2 nm. Para evitar a interferência de regiões do espalhamento Rayleigh e Raman durante a construção dos modelos PARAFAC, estas regiões foram previamente eliminadas.

Testes preliminares foram realizados para avaliar o efeito do solvente (metanol, acetonitrila, dimetilsulfóxido, etanol, acetona e água) e do pH (2 a 12) na intensidade do sinal de fluorescência das espécies de interesse. Estudos também foram realizados em meio micelar, utilizando-se reagentes oxidantes (ex. peróxido de hidrogênio e ácido perclórico) e surfactantes (Tweem 20, triton X-100 e CTAB). Entretanto, nenhuma dessas alternativas obteve resultados melhores que os observados utilizando-se o solvente acetonitrila, que foi selecionado como meio solvente.

Para o desenvolvimento de modelos univariados convencionais foram elaboradas curvas analíticas individuais (n=18), na faixa de concentração compreendida entre 0,005 e 1,00 mg L<sup>-1</sup> (comprimento de onda de excitação de 280 e 272 nm para E2 e SMz, respectivamente e comprimento de onda de emissão em 350 nm para ambos).

Os modelos multivariados fundamentados no uso de PARAFAC foram desenvolvidos a partir de 7 padrões (P1 a P7) contendo a mistura de E2 e SMz nas concentrações indicadas na Tabela I.1. Quatro amostras adicionais (V1 a V4) foram preparadas do mesmo modo, sendo reservadas como conjunto de validação.

**Tabela I.1.:** Planejamento e níveis de concentração utilizados para construção das curvas de calibração e misturas de validação.

Solução	Espécies de interesse (mg L <sup>-1</sup> )	
	SMz	E2
P1	0,000	0,070
P2	0,020	0,060
P3	0,030	0,050
P4	0,040	0,040
P5	0,050	0,030
P6	0,060	0,020
P7	0,070	0,000
V1	0,068	0,058
V2	0,054	0,067
V3	0,035	0,036
V4	0,040	0,020

P: soluções padrões para a calibração, V: mistura para a validação;

#### *1.4.3. Controle analítico*

As condições cromatográficas de trabalho foram definidas em função de métodos estabelecidos previamente por membros do grupo [36], utilizando uma coluna C18 e sistemas de eluição isocrática. Após a realização de diversos ensaios, as variáveis cromatográficas foram definidas como: eluição isocrática da mistura água (77%), trietanolamina (0,8%) e acetonitrila (22,2%), ajustando-se o pH = 4,0 com ácido fosfórico.

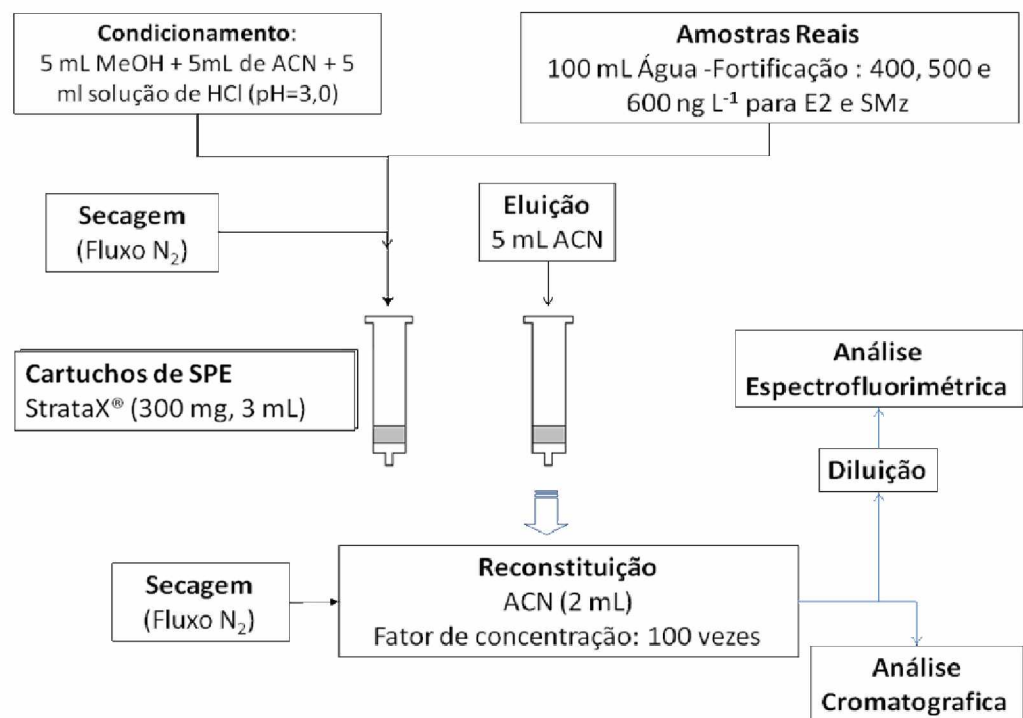
#### *1.4.4. Extração e pré-concentração dos analitos*

Inicialmente, um planejamento fatorial completo (2<sup>3</sup> com triplicata do ponto central) foi utilizado para avaliar as melhores condições de extração e pré-concentração dos analitos em cartuchos Strata X (300 mg, 3 mL). Foram estudados o efeito do solvente no processo de condicionamento dos cartuchos ((-1): MetOH + solução de ácido fórmico 0,1 mol L<sup>-1</sup> (+1): ACN), do solvente da fase de eluição ((-1): MetOH + solução de ácido fórmico 0,1 mol L<sup>-1</sup> (+1): ACN) e do volume de amostra ((-1): 100 a (+1) 300 mL), conforme ensaios mostrados na Tabela I.2.

A partir da definição das condições otimizadas no estudo anterior, todas as amostras passaram pelo procedimento de SPE, cujos detalhes estão evidenciados na Figura I.01.

**Tabela I.2.:** Planejamento fatorial  $2^3$  utilizado para a otimização das condições de extração e pré-concentração para SMz e E2 em cartucho Strata X.

Ensaio	Condicionamento do cartucho SPE	Solvente da fase de eluição	Volume da amostra
01	-1	-1	-1
02	+1	-1	-1
03	-1	+1	-1
04	+1	+1	-1
05	-1	-1	+1
06	+1	-1	+1
07	-1	+1	+1
08	+1	+1	+1
10, 11, 12	0	0	0



**Figura I.01.:** Representação das etapas de extração e pré concentração das amostras após a otimização.

#### *1.4.5. Análise de amostras reais*

Neste trabalho foram testadas amostras de águas superficiais do rio Barigui (1 coleta realizada em maio de 2012), amostras de água de abastecimentos (coletadas na região dos bairros CIC e Jardim das Américas) e amostras de água superficiais em um ponto na nascente e após o aporte de esgoto do rio Belém, todos na região de Curitiba.

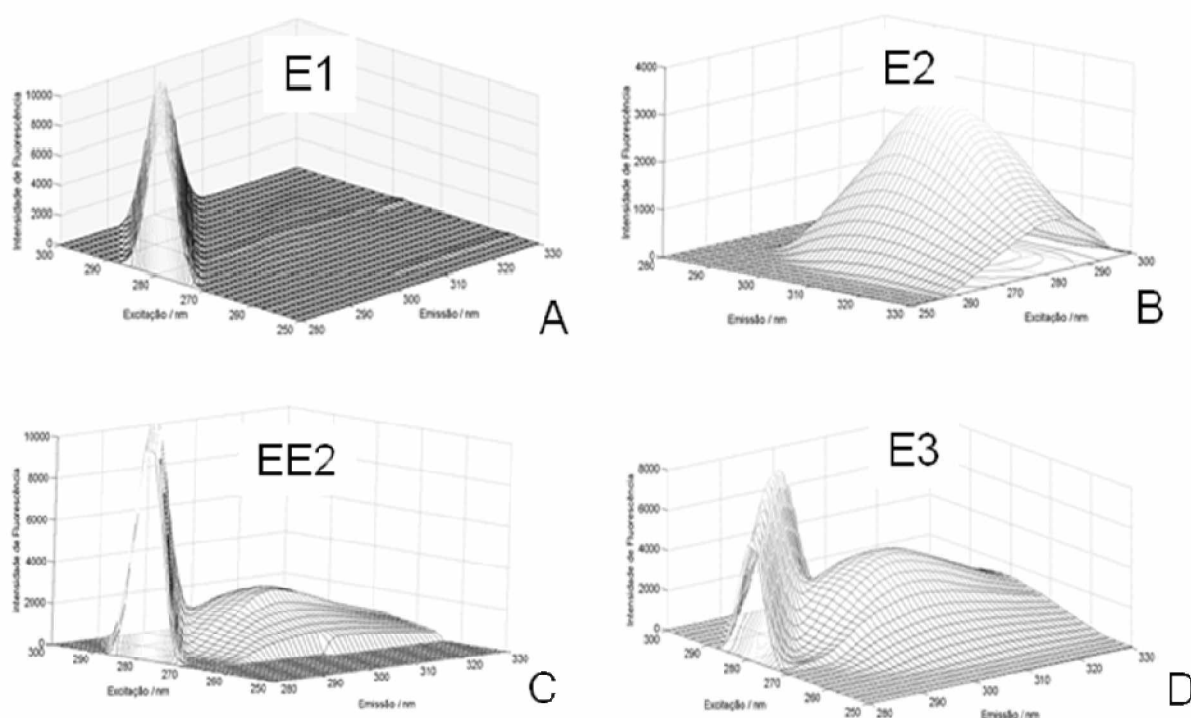
Em todas as coletas, um volume de 4 L foi recolhido em frasco escuro, adicionou-se 2 mL de metanol e acertou-se o pH =3,0, sendo o frasco âmbar estocado a 4°C a fim de preservar a amostra e evitar a proliferação bacteriana.

Todas as amostras foram previamente filtradas em membrana de fibra de vidro com tamanho de poro de 0.60 µm (Carvalhaes, GF-3, Germany) e só então foram submetidas ao procedimento de extração em fase sólida.

### **1.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### *1.5.1 Estudos preliminares*

Estudos preliminares foram realizados para definir os compostos a serem modelados via PARAFAC. Em função da disponibilidade de padrões, foram testados quatro estrogênios (E1, E2, EE2 e E3) solubilizados em acetonitrila. Os perfis da matriz EEF (Figura I.02) se mostram bastante similares, com exceção do correspondente à estrona (Figura I.02(A)) que apresentou intensidade de fluorescência cerca de 1000 vezes menor que os demais estrogênios.



**Figura I.02.** Superfícies de matriz Excitação-Emissão dos padrões puros na concentração de  $5 \text{ mg L}^{-1}$  para: (A) estrona; (B) 17- $\beta$ -estradiol; (C) 17- $\alpha$ -etinilestradiol; (D) estriol.

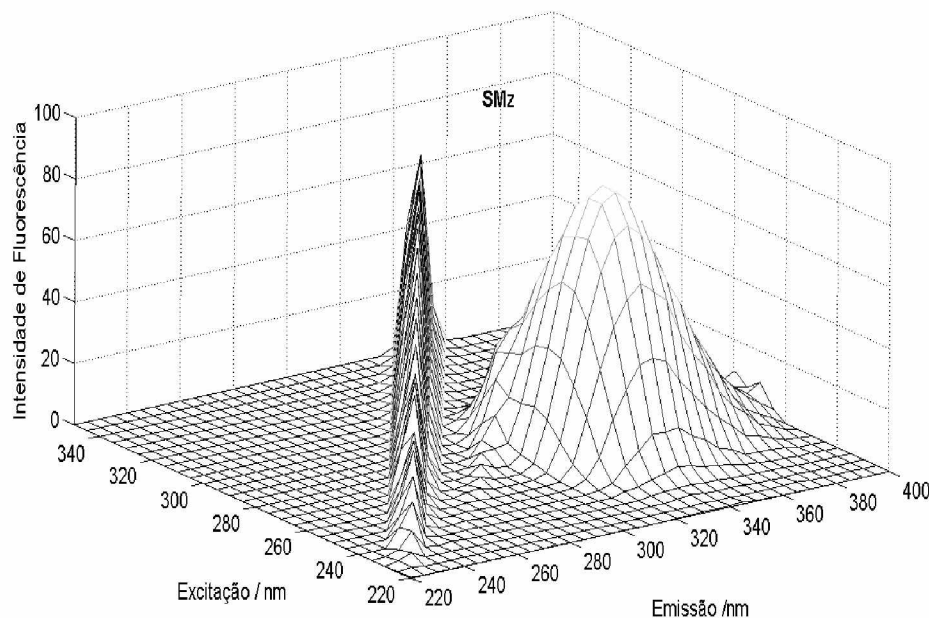
A fluorescência natural dos hormônios E2, EE2 e E3, apresenta um máximo exatamente nos mesmos comprimentos de onda ( $\lambda_{Em} = 306 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{Exc} = 282 \text{ nm}$ ), assim como intensidades igualmente semelhantes. Este fato dificulta a construção de modelos multivariados de segunda ordem, pois a matriz EEf resultante da mistura de E2, EE2 e E3 apresentará sinais para os 3 analitos exatamente nos mesmos comprimentos de onda de emissão e excitação, tornando impossível a recuperação dos espectros das espécies puras. Segundo Sena (2004)<sup>[37]</sup>, estas características inviabilizam a construção de modelos robustos e dificultam a interpretação do modelo.

Por esta razão tornou-se necessária a seleção de apenas um dos hormônios (17- $\beta$ -estradiol) para dar continuidade ao trabalho. Esta seleção foi baseada em razão da sua frequente presença em matrizes ambientais <sup>[38-40]</sup>, da sua estreita relação com a contaminação pelo aporte de esgoto doméstico e da sua notória relevância em relação à atividade estrogênica observada no ambiente <sup>[41]</sup>.

Vários outros compostos foram avaliados para fazer parte da mistura submetida à análise multivariada. Em função da sua elevada intensidade de fluorescência, em regiões



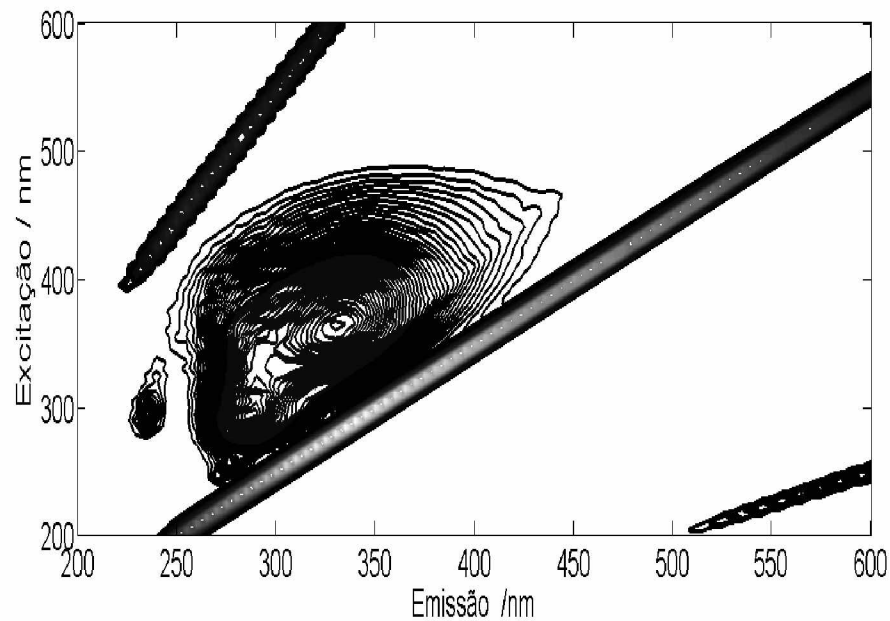
diferentes das apresentadas por E2, foi selecionado sulfametoxazol (SMz) que mostra o perfil fluorimétrico apresentado na Figura I.3.



**Figura I.03.** Superfícies de Excitação-Emissão do padrão puro de SMz na concentração de  $50 \mu\text{g L}^{-1}$ .

Em função da sua composição química, as matrizes ambientais costumam ser bastante complexas. Isto é particularmente importante nas amostras de águas superficiais que se caracterizam por apresentar, além de resíduos metabólicos naturais (ex. hormônios), elevadas concentrações de produtos de higiene e limpeza, fármacos e hormônios sintéticos, muitos dos quais fluorescem intensamente.

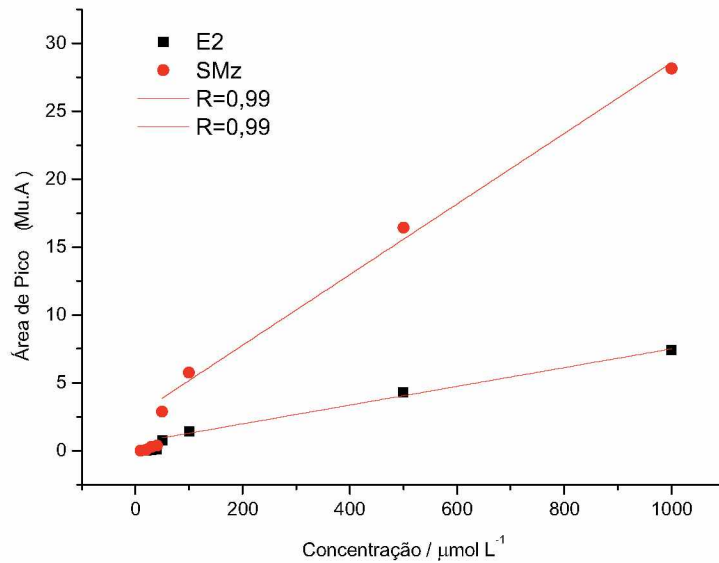
O perfil fluorimétrico da amostra de água superficial do rio Barigui após a acidificação (pH=3) e filtração é apresentado na Figura I.04. O intenso sinal observado em uma ampla faixa de comprimento de ondas de emissão e excitação inviabiliza determinações simultâneas de E2 e SMz por métodos univariados de calibração, em função da intensa sobreposição de sinais.



**Figura I.04.** Projeção de curvas de nível para uma amostra de água superficial da bacia do rio Barigui após acidificação e filtração.

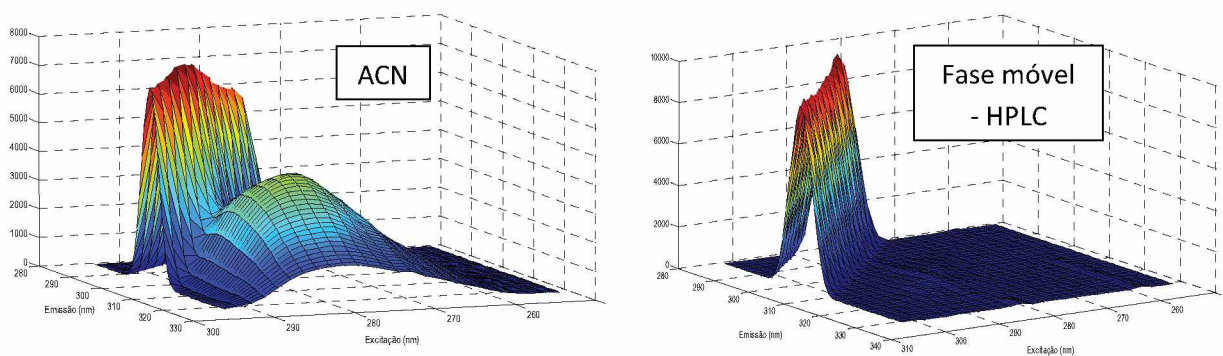
### *1.5.2 Desenvolvimento do método cromatográfico e extração em fase sólida*

O método cromatográfico foi desenvolvido baseado em trabalhos anteriores do nosso grupo. As condições adotadas propiciaram uma boa resolução entre os picos da mistura de SMz e E2, permitindo a sua identificação em tempos de corrida inferiores a 35 minutos, mostrando boa seletividade do método. Curvas analíticas apresentadas na Figura I.05 foram construídas na faixa de concentração de 0,002 a 1,000 mg L<sup>-1</sup> para ambos os analitos.



**Figura I.05.:** Curvas analíticas construídas para a quantificação de SMz e E2 via HPLC-FLU.

Cabe ressaltar que, boas intensidades de fluorescência são obtidos em meio de ACN, porém a fase móvel utilizada no método cromatográfico é composta por (77%), trietanolamina (0,8%) e acetonitrila (22,2%), ajustando-se o pH = 4,0 com ácido fosfórico, nestas condições o sinal dos analitos é consideravelmente menor, conforme pode ser observado na Figura I.06 (A) e (B).



A

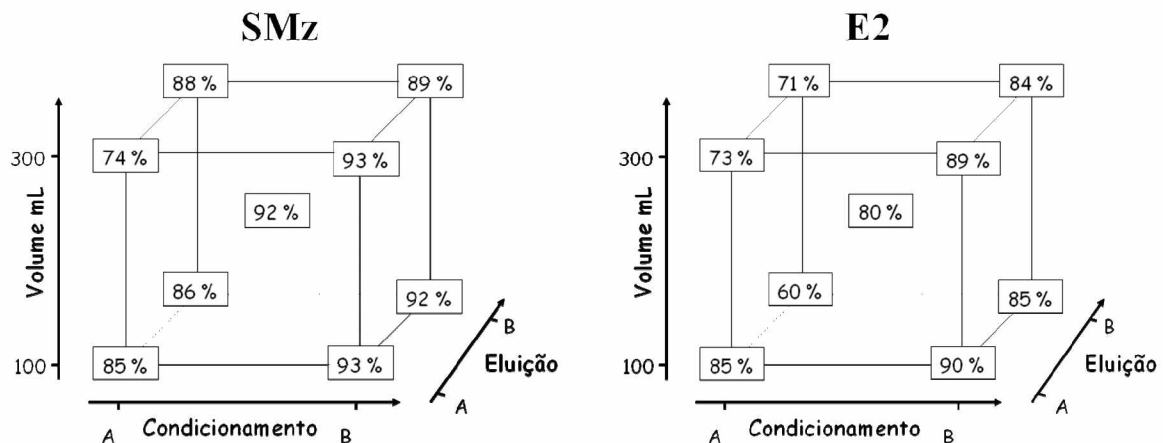
B

**Figura I.06.:** Espectros de matriz de Emissão-Excitação para Sulfametoxazol e 17 $\beta$ -estradiol na concentração de 5,0 mg L<sup>-1</sup> em meio (A) Acetonitrila; (B) Água/Acetonitrila/trietanolamina – pH=4,0.

O método cromatográfico apresentou limites de quantificação de  $0,040 \text{ mg L}^{-1}$  e  $0,030 \text{ mg L}^{-1}$  para SMz e E2, respectivamente, o que obrigou realizar ensaios de recuperação de modo que os níveis de concentração dos analitos estivessem dentro da faixa linear cromatográfica, logo, foi necessário fazer diluições apropriadas para que a concentração dos analitos nestes ensaios estivessem dentro da faixa de concentração onde foi desenvolvido o modelo PARAFAC.

A otimização da extração em fase sólida foi realizada através de um planejamento fatorial  $2^3$  completo, sendo que os resultados representados na Figura I.07, evidenciam pequenas melhoras no rendimento de extração com o uso de ACN durante o condicionamento e na eluição de ambos os analitos.

Possíveis fatores que favorecem a acetonitrila podem estar relacionados com a sua maior polaridade (3,92D) e maior constante dielétrica (37,5).

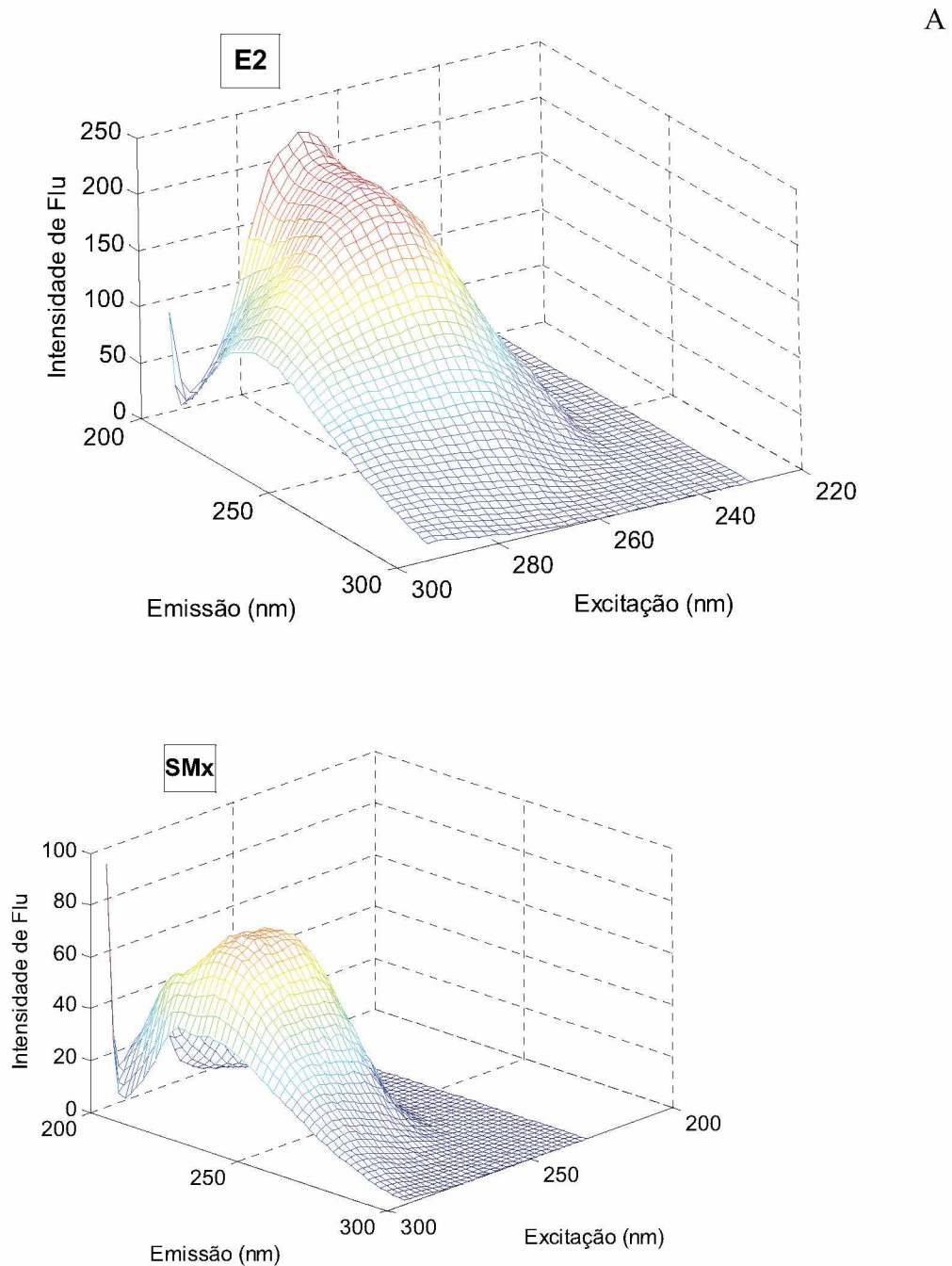


**Figura I.07:** Representação geométrica do planejamento fatorial para a otimização das condições de extração em fase sólida para SMz e E2 utilizando cartuchos Stracta X (300 mg).

### 1.5.3. Modelo multivariado (PARAFAC)

Para a construção dos modelos tridimensionais foi selecionada a região compreendida entre 306-380 nm (emissão) e 250-286 nm (excitação), excluindo-se a região de espalhamentos Rayleigh e Raman. Nas Figuras I.08 A e B são apresentadas as superfícies obtidas para a matriz espectral de água superficial do rio Barigui após a etapa de pré concentração, cujas amostras foram dopadas com a maior concentração de cada um dos

analitos, nas quais é possível observar o sinal espectral característico, parcialmente sobreposto.

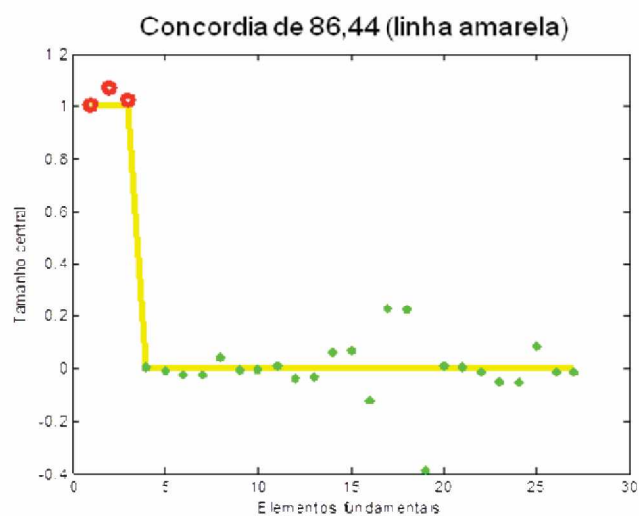


**Figura I.08.:** Superfície de fluorescência de águas superficiais do Rio Barigui após pré-concentração e dopagem com (A) E2 na concentração de  $600 \text{ ng L}^{-1}$ ; (B) SMz na concentração de  $600 \text{ ng L}^{-1}$ .

Os dados foram agrupados em um arranjo tridimensional (7 amostras x 38 comprimentos de onda de excitação x 19 comprimentos de onda de emissão). Vários modelos foram desenvolvidos (empregando-se diferentes tipos de transformação de dados), entretanto, os melhores modelos foram elaborados sem nenhum tipo de pré-tratamento.

Os modelos não restritos foram desenvolvidos utilizando-se de um até cinco fatores para a decomposição. O melhor número de componentes foi selecionado com base na porcentagem do ajuste (%Fit), parâmetro que representa a capacidade do modelo para reproduzir os dados experimentais. Em todos estes os modelos construídos foram obtidas concentrações negativas na etapa de previsão, o que obrigou à construção de modelos com restrição de não-negatividade. Assim, o melhor modelo PARAFAC foi construído sob restrição de não negatividade nas três dimensões dos dados, pois não se esperam valores negativos de concentração ou fluorescência. Além disso, foi utilizada iniciação por valores aleatórios ortogonais e critério de convergência igual a  $1 \times 10^{-6}$  (parâmetros indicados pelo próprio programa).

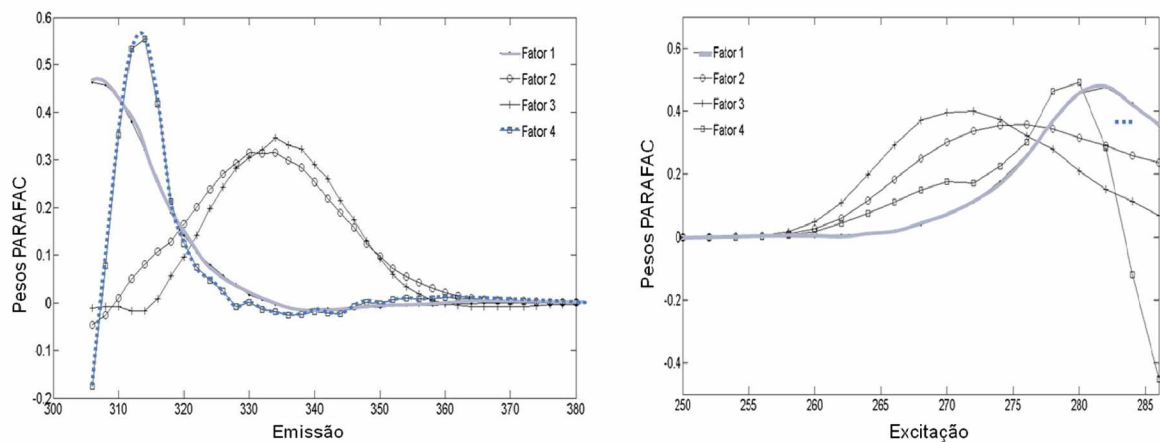
A etapa mais crítica da modelagem por PARAFAC está na escolha do número de fatores (Sena, 2004)<sup>[37]</sup>. Neste caso, um modelo com quatro fatores produziu resultados que foram coerentemente interpretados, permitindo a representação de 99,1% da variância original dos dados e um valor de CONCORDIA (COrre CONcistency DIAgnostic) de 86,4%, o que garante a sua consistência trilinear (Figura I.09). É importante ressaltar que um valor de CONCORDIA próximo a 100% indica estrutura trilinear dos dados, enquanto que valores abaixo de 50% indicam deficiência neste parâmetro.



**Figura I.09.:** Gráfico do parâmetro Concordia para o modelo PARAFAC construído com 4 fatores.

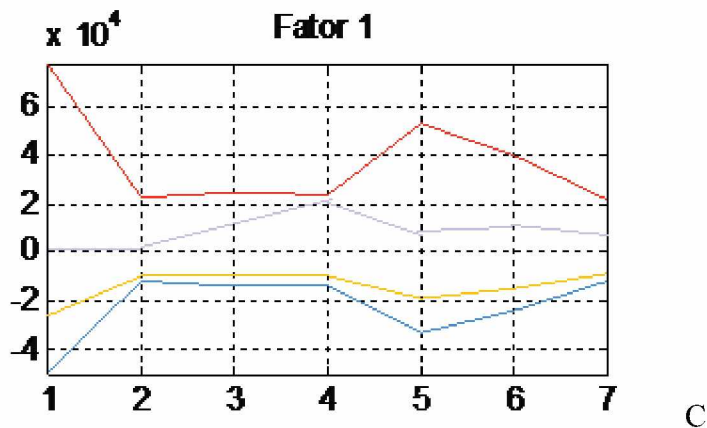
Modelos com 5 e 6 fatores não apresentaram melhor capacidade de previsão e, portanto, se mostraram inadequados.

A Figura I.10 mostra os principais resultados do modelo PARAFAC desenvolvido com quatro fatores. Os pesos obtidos para o fator 1 e 3 da segunda dimensão (espectros de excitação) e da terceira dimensão dos dados (espectros de emissão) são bastante semelhantes aos espectros dos analitos puros, o que sugere uma modelagem fundamentada em regiões espectrais consistentes.



A

B



C

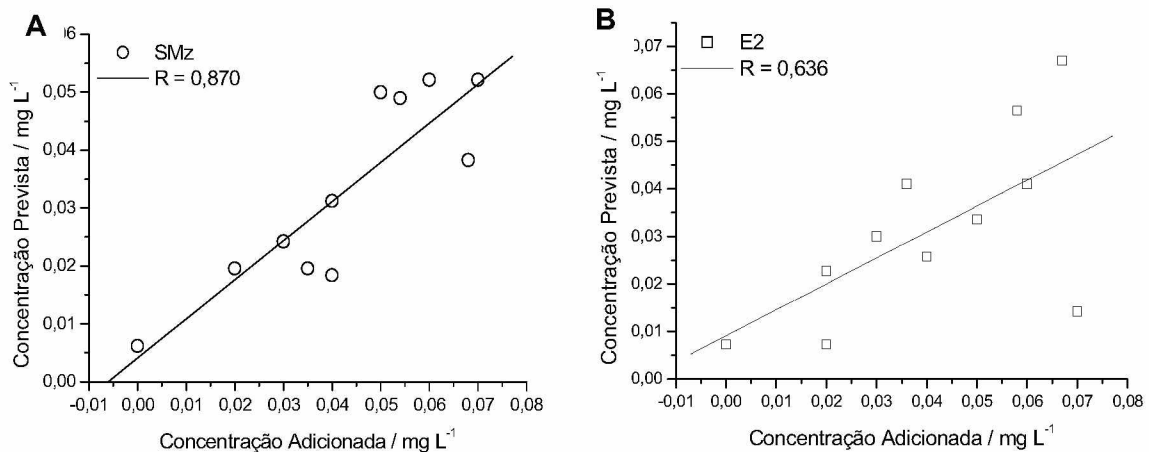
**Figura I.10.** Espectro de fluorescência deconvoluídos, obtidos através dos pesos do modelo PARAFAC para (A) excitação; (B) emissão;(C) Concentração

O resultado da determinação nas 11 amostras utilizadas no estudo (7 amostras de calibração e 4 amostras de validação) e o erro relativo médio é apresentado na Tabela I.3.

**Tabela I.3.** Concentrações obtidas em  $\text{mg L}^{-1}$  pelo modelo PARAFAC desenvolvido com 4 fatores.

Amostra	Concentração Real ( $\text{mg L}^{-1}$ )		Concentração Prevista ( $\text{mg L}^{-1}$ )		Erro relativo (%)	
	SMz	E2	SMz	E2	SMz	E2
	P1	0,000	0,070	0,006	0,014	0,00
P2	0,020	0,060	0,019	0,041	-2,25	-31,66
P3	0,030	0,050	0,024	0,033	-19,25	-32,90
P4	0,040	0,040	0,031	0,026	-21,98	-35,69
P5	0,050	0,030	0,050	0,030	0,00	0,00
P6	0,060	0,020	0,052	0,007	-13,12	-63,77
P7	0,070	0,000	0,052	0,007	-25,53	0,00
V1	0,068	0,058	0,038	0,056	-43,73	-2,61
V2	0,054	0,067	0,049	0,067	-9,34	0,00
V3	0,035	0,036	0,019	0,041	-44,14	13,89
V4	0,040	0,020	0,018	0,023	-54,04	13,31
<b>Erro Relativo Médio</b>					<b>21,24</b>	<b>24,87</b>

Os mesmos resultados apresentados na tabela estão representados na Figura I.11, na forma de gráficos de valores reais *versus* valores previstos pelo modelo de regressão. É possível observar um menor coeficiente de correlação para a determinação de E2 decorrente de maiores discordâncias entre o valor real e o previsto na análise deste poluente.



**Figura I.11.** Valores reais *versus* previstos pelo modelo PARAFAC para (A) SMz e (B) E2.



Em função destes resultados é possível admitir que, apesar das boas características do modelo em termos de variância explicada e de valores de CONCORDIA, a capacidade preditiva do modelo PARAFAC deixa a desejar. Os altos valores de erro de previsão para algumas das amostras, provavelmente está relacionada à baixa concentração dos analitos.

#### *1.5.4 Aplicação do modelo PARAFAC em amostras reais*

O método descrito foi, inicialmente, aplicado para a determinação de SMz e E2 em amostras de águas superficiais do rio Barigui. A análise inicial de fluorescência molecular das amostras submetidas às etapas de pré-concentração evidenciou a presença de inúmeros compostos com sinal fluorescente na mesma região dos analitos conforme foi mostrado anteriormente na Figura I.6.

Foram realizadas dopagens em três níveis de concentração, porém a previsão dessas concentrações via modelo PARAFAC, não apresentou valores satisfatórios. Todos os erros relativos obtidos foram superiores a 100%. Buscou-se ainda construir um novo modelo PARAFAC utilizando o método de adição de padrão, mas em virtude da baixa capacidade de previsão (erros relativos superiores a 70%), concluiu-se que esta amostra apresenta interferentes, que impossibilitaram a obtenção dos espectros puros dos analitos pelo modelo PARAFAC.

Buscando determinar a capacidade de previsão do modelo PARAFAC para as espécies de interesse, e tentando minimizar os efeitos de matriz, avaliou-se sua aplicabilidade em amostras de águas de abastecimento que foram coletadas em dois bairros distintos da região de Curitiba. Esta iniciativa possibilitou a obtenção de amostras oriundas dos dois rios que abastecem a região. Ambas as amostras também foram fortificadas com SMz e E2 em três níveis de concentração e foram analisadas em triplicata. Os resultados foram sumarizados na Tabela I.4.

**Tabela I.4.** Resultados previstos pelo modelo construído para determinação de E2 e SMz em amostras de águas de abastecimento, comparados com valores obtidos por análise cromatográfica das mesmas amostras.

Dopagem (ng L <sup>-1</sup> )	Cromatografia		Modelo PARAFAC		Erro relativo		
	SMz (ng L <sup>-1</sup> )	E2 (ng L <sup>-1</sup> )	SMz (ng L <sup>-1</sup> )	E2 (ng L <sup>-1</sup> )	SMz (%)	E2 (%)	
0	0	0	0	0	0	0	
Amostra A	400	-	301	423	457	100	51,8
	500	498	575	512	515	2,8	-10,4
	600	603	621	599	606	-0,7	-2,4
0	0	0	0	0	0	0	
Amostra B	400	-	-	415	453	100	100
	500	519	532	508	506	-2,1	-4,9
	600	600	589	613	614	2,2	4,2

Estes resultados demonstraram excelente concordância entre os valores de concentração obtidos pelo modelo PARAFAC construído com as concentrações determinadas via cromatografia em fase líquida. Além disso, é possível observar uma diminuição no erro relativo da determinação com o aumento da concentração das espécies de interesse em ambas as amostras. Este tipo de métodos já foi aplicado com sucesso no monitoramento on-line e em tempo real em diversos tipos de tratamento de água<sup>[42,43]</sup>.

Além disso, o modelo PARAFAC também foi avaliado aplicando-se o mesmo procedimento em amostras do rio Belém, porém nesse caso, a coleta foi realizada em dois pontos. No primeiro, a coleta foi realizada em uma das nascentes, buscando evitar contaminação antropogênica. No segundo, a coleta foi realizada após um provável aporte de esgoto hospitalar, o que poderia ser uma fonte de contaminação pelos analitos estudados. Os resultados foram sumarizados na Tabela I.5.

**Tabela I.5.** Resultados previstos pelo modelo construído para determinação de E2 e SMz em amostras de águas superficiais oriundas da bacia do rio Belém, comparados com valores obtidos por análise cromatográfica das mesmas amostras.

Dopagem (ng L <sup>-1</sup> )	Cromatografia		Modelo PARAFAC		Erro relativo	
	SMz (ng L <sup>-1</sup> )	E2 (ng L <sup>-1</sup> )	SMz (ng L <sup>-1</sup> )	E2 (ng L <sup>-1</sup> )	SMz (%)	E2 (%)
0	0	0	52	84	100	100
Nascente	400	624	543	517	9,0	-17,1
	500	587	560	549	-0,7	-6,5
	600	654	648	639	4,0	-2,3
0	0	0	112	19	100	100
Ponto 1*	400	565	496	498	13,5	-11,8
	500	563	582	591	2,3	5
	600	618	673	651	8,0	5,3

\*Ponto 1: Águas superficiais coletadas após o aporte de esgoto hospitalar

Apesar da alta interferência da composição da matriz, o modelo apresentou boa capacidade preditiva, quando comparado ao método de cromatografia em fase líquida, com erros relativos inferiores a 17%. Neste caso, é menos evidente, mas há uma tendência de diminuição dos erros com o aumento da concentração dos analitos.

## I.6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos indicam claramente que a utilização de espectroscopia de fluorescência molecular (EEM) acoplada à técnica de calibração multivariada de segunda ordem (PARAFAC), permite determinar diferentes analitos como o antibiótico sulfametoxazol e o hormônio 17 $\beta$ -estradiol em matrizes ambientais desde que a matriz ambiental apresente baixos valores de fluorescência nas regiões de sinal dos analitos.

Os resultados também sugerem que, a análise de SMz e E2 em amostras de água de abastecimento, podem ser realizadas com sucesso utilizando o método desenvolvido com erros relativos inferiores a 5%.

O trabalho proposto apresenta importância analítica, não apenas por representar uma metodologia alternativa aos métodos cromatográficos, mas também por possibilitar o desenvolvimento de um método que quantifique compostos de características químicas completamente diferentes, superando problemas de interferência da matriz.

## I.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] DE JUAN, A., TAULER, R. Multivariate Curve Resolution (MCR) from 2000: Progress in Concepts and Applications. *Crit. Rev. Anal. Chem.*, **2006**, v.36, 163.
- [2] GALERA, M.M., GIL GARCÍA, M.D., GOICOECHEA, H.C.. The application to wastewaters of chemometric approaches to handling problems of highly complex matrices, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **2007**, v. 26(11), 1032-1042.
- [3] KLOEPFER, A., QUINTANA, J.B., REEMSTMA, T., Operational options to reduce matrix effects in liquid chromatography–electrospray ionization–mass spectrometry analysis of aqueous environmental samples. *J. Chromatogr A*, **2005**, v. 1067, 153.
- [4] STÜBER, M., REEMSTMA, T., Evaluation of three calibration methods to compensate matrix effects in environmental analysis with LC-ESI-MS. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2004**, v. 378, 910.
- [5] GROS, M., PETROVIC, M., BARCELÓ, D., Occurrence and behaviors of fluorescence EEM-PARAFAC components in drinking water and wastewater treatment systems and their applications: a review. *Talanta*, **2006**, v. 70, 678.
- [6] BOOKSH, K.S., KOWALSKI, B.R., Theory of analytical chemistry. *Analytical Chemistry*, **1994**, v. 66, 782A.
- [7] ESCANDAR, G.M., FABER, N.M., GOICOECHEA, H.C., MUÑOZ DE LA PEÑA, A., OLIVIERI, A.C., POPPI, R.J., Second- and third-order multivariate calibration: data, algorithms and applications. *Trends Anal. Chem.*, **2007**, V. 26, 752.
- [8] SÁNCHEZ, E., KOWALSKI, B.R., Generalized rank annihilation factor analysis. *Anal. Chem.*, **1986**, v. 58, 496.
- [9] SÁNCHEZ, E., KOWALSKI, B.R., Tensorial resolution: A direct trilinear decomposition. *J. Chemometrics*, **1990**, 29.
- [10] CHEN, Z.P., WU, H.L., JIANG, J.H., LI, Y., YU, R.Q., A novel trilinear decomposition algorithm for second-order linear calibration. *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, **2000**, v. 52, 75.

- [11] XIA, A.L., WU, J.L., FANG, D.M., PING, Y.J., HU, L.Q., YU, R.Q., Alternating penalty trilinear decomposition algorithm for second-order calibration with application to interference-free analysis of excitation-emission matrix fluorescence data. *J. Chemometrics*, **2005**, v.19, 65 .
- [12] BRO, R. PARAFAC: Tutorial and applications. *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, **1997**, v. 38, 149.
- [13] TAULER, R. Multivariate curve resolution applied to second order data. *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, **1995**, v.30, 133.
- [14] LINDER, M., SUNDBERG, R., Second-order calibration: Bilinear least squares regression and a simple alternative. *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, **1998**, v. 42, 159.
- [15] WOLD, S., ESBENESEN, G.P.K., ÖHMAN, J., Multi-way principal components-and PLS-analysis. *J. Chemometrics*, **1987**, v. 1, 41.
- [16] OLIVIERI, A.C., On a versatile second-order multivariate calibration method based on partial least-squares and residual bilinearization: Second-order advantage and precision properties. *J. Chemometrics*, **2005**, v. 19, 253.
- [17] OLIVIERI, A.C., A combined artificial neural network/residual bilinearization approach for obtaining the second-order advantage from three-way non-linear data. *J. Chemometrics*, **2005**, v. 19, 615.
- [18] DANZER, K., CURRIE, L.A., Guidelines for Calibration in Analytical Chemistry Part 1: Fundamentals and Single Component Calibration. *Pure Appl. Chem.*, **1998**, v. 70, 993–1014
- [19] LAKOWICZ, J.R. Principles of Fluorescence Spectroscopy. Plenum Press, New York (**1983**) 44.
- [20] CASTELLS, R.C., CASTILLO, M.A., Systematic errors: detection and correction by means of standard calibration, Youden calibration and standard additions method in conjunction with a method response model. *Anal. Chim. Acta*, **2000**, v.423, 179–185.
- [21] NEPOTE, A.J., OLIVIERI, A.C., Simultaneous spectrofluorometric determination of oxatomide and phenylephrine in the presence of a large excess of paracetamol. *Anal. Chim. Acta*, **2001**, v.439, 87–94
- [22] SILVA, E.C., MARTINS, V.L., ARAÚJO, A.F., ARAÚJO, M.C.U., Implementation of a generalized standard addition method in a flow injection system using merging-zones and gradient exploitation. *Anal. Sci.*, **1999**, v.15, 1235–1240.
- [23] SILVA, E.C., ARAÚJO, M.C.U., HONORATO, R.S., COSTA LIMA, J.L.F., ZAGATTO, E.A.G., BRIENZA, S.M.B., Standard additions in flow injection analysis

- based on merging zones and gradient exploitation: application to copper determination in spirits. *Anal. Chim. Acta*, **1996**, v. 319, 153–158.
- [24] HONORATO, F.A., HONORATO, R.S., PIMENTEL, M.F., ARAUJO, M.C.U., Analytical curve or standard addition method: how to elect and design—a strategy applied to copper determination in sugarcane spirits using AAS. *Analyst*, **2002**, v. 127, 1520–1525
- [25] JIJI, R.D., COOPER, G.A., BOOKSH, K.S., Excitation–emission matrix fluorescence based determination of carbamate pesticides and polycyclic aromatic hydrocarbons. *Anal. Chim. Acta*, **1999**, v.397, 61–72.
- [26] STEDMON, C.A., MARKAGER, S., BRO, R., Tracing dissolved organic matter in aquatic environments using a new approach to fluorescence spectroscopy. *Mar. Chem.*, **2003**, v. 82, 239–254.
- [27] ANDRADE-EIROA, A., CANLE, M., CERDÁ, V., Environmental applications of excitation–emission spectrofluorimetry: an in-depth review II. *Appl. Spectrosc. Rev.*, **2013**, v. 48, 77–141.
- [28] ARANCIBIA, J.A., BOSCHETTI, C.E., OLIVIERI, A.C., ESCANDAR, G.M., Screening of oil samples on the basis of excitation–emission room-temperature phosphorescence data and multiway chemometric techniques. Introducing the second-order advantage in a classification study. *Anal. Chem.*, **2008**, v. 80, 2789–2798.
- [29] LAKOWICZ, J.R., Principles of Fluorescence Spectroscopy. (3rd ed.)Springer Science + Business Media, New York (**2006**).
- [30] BRO, R., SIDIROPOULOS, N.D., SMILDE, A.K. , Maximum likelihood fitting using simple least squares algorithms. *J. Chemom.*, **2002**, v. 16, 387–400.
- [31] RINNAN, Å., BOOKSH, K., BRO, R., First order Rayleigh as a separate component in the decomposition of fluorescence landscapes. *Anal. Chim. Acta*, **2005**, v. 537, 349–358.
- [32] MCKNIGHT, D.M., BOYER, E.W., WESTERHOFF, P.K., DORAN, P.T., KULBE, T., ANDERSEN, D.T., Spectrofluorometric characterization of dissolved organic matter for indication of precursor organic material and aromaticity. *Limnol. Oceanogr.*, **2001**, v. 46, 38–48.
- [33] CHRISTENSEN, J., POVLSSEN, V.T., SØRENSEN, J., Application of fluorescence spectroscopy and chemometrics in the evaluation of processed cheese during storage. *J. Dairy Sci.*, **2003**, v. 86, 1101–1107.
- [34] THYGESEN, L.G., RINNAN, A., BARSBERG, S., MØLLER, J.K.S., Stabilizing the PARAFAC decomposition of fluorescence spectra by insertion of zeros outside the data area. *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, **2004**, v.71, 97–106.

- [35] MUNCK, L., NØRGAARD, L., ENGELSEN, S.B., BRO, R., ANDERSSON, C.A., Chemometrics in food science—a demonstration of the feasibility of a highly exploratory, inductive evaluation strategy of fundamental scientific significance. *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, **1998**, v. 44, 31–60.
- [36] LIZ, M. V. Estudo da potencialidade da fotocatalise heterogênea (TiO<sub>2</sub> e ZnO) e dos processos fenton para remediação de águas contaminadas pelos estrogênios estrona, 17β-estradiol e 17α- etinilestradiol, tese de doutorado, Universidade Federal do Paraná, **2013**.
- [37] SENA, M. M.; FERNANDES, J. C. B.; ROVER, L. ; POPPI, R. J.; KUBOTA, L. T.; Application of two- and three-way chemometric methods in the study of acetylsalicylic acid and ascorbic acid mixtures using ultraviolet spectrophotometry. *Anal. Chim. Acta*, **2004**, v.409, 159-167.
- [38] SODRÉ F.F., PESCARA I.C., MONTAGNER C.C., JARDIM, W.F., Assessing selected estrogens and xenoestrogens in Brazilian surface waters by liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Microchemica Journal*, **2010**, v. 96, 92-98.
- [39] PAILLER J.Y., KREIN A., PFISTER, L., HOFFMANN L., GUIGNARD C., Solid phase extraction coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of sulfonamides, tetracyclines, analgesics and hormones in surface water and wastewater in Luxembourg, *Science Total Environmental*, **2009**, v. 407, 4736–4743.
- [40] HOSOGIA J., TANAKA H., FUJITA K., KUWABARA T., IKEGAWA S., KOBAYASHI N., MANOD N., GOTO J., LC–MS/MS coupled with immunoaffinity extraction for determination of estrone, 17-β-estradiol and estrone 3-sulfate in human plasma, *Journal of Chromatografic B*. **2010**, vol. 878, 222–227.
- [41] FATOKI O. S., NOMA A., SPE method for selective determination of phthalate esters in the aquatic environment, *Water, Air, Soil Pollutants*, **2002**, v.140, 85-98.
- [42] HAMBLY, A.C., HENDERSON, R.K., STOREY, M.V., BAKER, A., STUETZ, R.M., KHAN, S.J., Fluorescence monitoring at a recycled water treatment plant and associated dual distribution system – implications for cross-connection detection. *Water Res.*, **2010**, vol144 (18), 5323–5333.
- [43] MURPHY, K.R., HAMBLY, A., SINGH, S., HENDERSON, R.K., BAKER, A., STUETZ, R., KHAN, S.J., Organic matter fluorescence in municipal water recycling

schemes: toward a unified PARAFAC model. *Environ. Sci. Technol.*, **2011**, v. 45 (7), 2909–2916.



# CAPÍTULO II

QUANTIFICAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO  
POR GASOLINA EM AMOSTRAS DE  
SOLO E MONITORAMENTO DAS  
PROPRIEDADES DO SOLO APÓS  
TRATAMENTO FENTON UTILIZANDO  
ESPECTROSCOPIA NO  
INFRAVERMELHO (DRIFT), REGRESSÃO  
POR MÍNIMOS QUADRADOS PARCIAIS  
(PLSR) E ANÁLISE DE COMPONENTES  
PRINCIPAIS (PCA).

## II.1 INTRODUÇÃO

### *II.1.1. A Espectroscopia por refletância difusa no infravermelho médio com transformada de Fourier (DRIFT) para análise de solos.*

A técnica de espectroscopia por refletância difusa no infravermelho médio com transformada de Fourier (DRIFT) tem sido aplicada com sucesso para a discriminação de tipos de solo, <sup>[1-3]</sup> para a caracterização das propriedades do solo <sup>[4,5]</sup>, identificando propriedades importantes na agricultura <sup>[6,7]</sup>, rastreando fontes de sedimentos durante inundações <sup>[8]</sup> e para monitoramento do carbono orgânico do solo <sup>[9]</sup>.

Apesar da boa capacidade do DRIFT de fornecer análises rápidas e não-destrutivas em solo, existem poucos exemplos da aplicação desta técnicas para análise da composição dos mesmos <sup>[4,10,11]</sup>. A técnica DRIFT tem sido utilizada extensivamente em estudos sobre compostos orgânicos no solo, visto que, uma simples leitura no MIR é capaz de mostrar uma grande variedade de bandas características correspondentes a diversas estruturas / grupos funcionais <sup>[11,12]</sup>. Além disso, a análise de DRIFTS de solo também pode ser utilizada para avaliar sua composição em termos da matéria orgânica (MO) <sup>[4]</sup>, com uma mínima preparação de amostras necessitando apenas da remoção de umidade e homogeneização da amostra <sup>[12,13]</sup>.

A maneira mais direta para estudar os estados vibracionais de uma molécula é a espectroscopia no infravermelho médio (MIR). O MIR pode identificar o tipo de movimentos moleculares ou grupos funcionais presentes na amostra, uma vez que cada frequência corresponde a uma dada quantidade de energia e um movimento molecular específica (por exemplo, o estiramento, deformação, etc.), o que permite a caracterização de sistemas complexos como os componentes do solo. O espectro obtido pode ser considerado como uma impressão digital de um composto específico. A intensidade de cada banda é relacionada com o momento de dipolo elétrico da ligação durante a vibração, de modo que alterações com maiores momento de dipolo (por exemplo, OH, NH, C = O, CO) geram bandas de maior intensidade. Adicionalmente, a intensidade de uma banda é afetada pela concentração do grupo funcional ou sua abundância numa mistura de compostos. Desta forma, MIR pode ser usado como uma técnica quantitativa <sup>[14]</sup>.

O princípio da técnica DRIFT baseia-se na dispersão da luz incidente em todas as direções quando é absorvida pelo pó e/ou uma superfície áspera. Uma parte da radiação

incidente é refletida na superfície dos sólidos para produzir a Reflectância Fresnel (espelhado), enquanto a outra parte passa pela amostra, interage com ela e é refletida em muitas direções. Esta absorção e dispersão da luz em muitas direções é conhecida como reflectância difusa [15].

As técnicas quimiométricas, tais como, Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLSR), Análise de Componentes Principais (PCA) e Redes Neurais Artificiais (ANN), foram aplicadas a uma grande quantidade trabalhos reportados na literatura para estimar as propriedades do solo. Essas ferramentas, são os procedimentos quimiométricos mais populares para a determinação quantitativa de vários componentes do solo [16-18]

Tanto a PCA quanto o PLSR fundamentam-se na conversão de um conjunto de variáveis altamente correlacionadas (variáveis independentes) usando transformações lineares; com o objetivo de reduzir a dimensionalidade dos dados. No caso particular do PLSR, combina-se essa característica de redução do espaço dimensional dos dados com os fundamentos da regressão múltipla.

### II.1.2 Contaminação de solo por gasolina

A contaminação de solos e águas subterrâneas pela presença de diesel ou gasolina pode resultar em sérios problemas ambientais e de saúde. A identificação da fonte de contaminação, e, a gestão e tratamento desse tipo de poluentes são ainda um grande desafio [19].

A contaminação por gasolina geralmente é devida a derrames acidentais e, principalmente, por vazamentos de antigos tanques de armazenamento comuns a todos os postos de gasolina. Os compostos oriundos deste tipo de poluição são geralmente encontrados adsorvidos no solo (quimicamente ou fisicamente), ou ainda são lixiviados para águas subterrâneas [20].

A técnica amplamente utilizada para a degradação destes poluentes *in situ* é a oxidação, que está baseada na injeção de um oxidante forte diretamente no solo [21]. Dentre as técnicas mais difundidas é possível citar a reação fenton.

A reação de fenton consiste na combinação de peróxido de hidrogênio e um catalisador solúvel (Fe (II) ou Fe (III)), gerando um oxidante forte, tal como o radical hidroxila ( $E^{\circ} = 2,73 \text{ V}$ ), que possui a capacidade de oxidar uma grande variedade de compostos orgânicos. Apesar disso, a aplicação da reação de Fenton em possui algumas limitações: (i), os radicais hidroxila possuem curta duração; [21] (ii) poderia haver excessivo

consumo do oxidante devido a reações não-produtivas entre o peróxido de hidrogênio e compostos do solo <sup>[22, 23]</sup> e, (iii) é necessária a adição de compostos quelantes para evitar a perda de catalisador, devido à precipitação de ferro na forma de  $\text{Fe}(\text{OH})_3$  em valores de pH próximos ao neutro, condição geralmente encontrada na maioria solos <sup>[24, 25]</sup>.

Além das inúmeras dificuldades em realizar a degradação deste tipo de contaminante, é importante destacar a necessidade do monitoramento em todas as etapas do processo, que, atualmente, é realizado por técnicas cromatográficas. O objetivo deste trabalho é a avaliação da aplicabilidade do uso de espectroscopia por refletância difusa no infravermelho médio com transformada de Fourier (DRIFT) acoplada a ferramentas de calibração multivariada, pois, além das vantagens relacionadas ao baixo custo e rapidez de análise, essa técnica necessita de poucas etapas no preparo de amostra.

## **II.2 OBJETIVO GERAL**

O principal objetivo deste trabalho está representado pelo estudo da potencialidade do uso da espectroscopia por refletância difusa no infravermelho médio com transformada de Fourier (DRIFT) acoplada a métodos quimiométricos como ferramenta para o controle analítico durante a remediação de solos paranaenses contaminados por gasolina.

## **II.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Desenvolver um protocolo de análise utilizando espectroscopia por refletância difusa no infravermelho médio com transformada de Fourier (DRIFT) acoplada a Análise de Componentes Principais (PCA) e/ou Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLSR) de modo a identificar e/ou quantificar subprodutos de degradação de gasolina nos sistemas de tratamento propostos.

Estudar a degradação de gasolina, utilizando processos Fenton em escala de bancada.

Avaliar a eficiência dos processos Fenton na remediação de solos em sistemas de colunas.

## II.4 MATERIAIS E MÉTODOS

### *II.4.1. Reagentes e insumos*

Amostras de gasolina comum foram adquiridas em 05 postos de combustível de diferentes bandeiras, localizados na região de Curitiba.

As amostras de solo (latossolo vermelho distroférico) foram gentilmente cedidas pelo prof. Dr. Gilberto Abate. Este solo foi amostrado no município de Pato Branco, sudoeste do Estado do Paraná, em região sob plantio direto de milho. As amostras foram secas a 40°C, separadas em fração granulométrica menor que 2 mm e conservadas a 4°C, conforme procedimentos usualmente descritos na literatura.

### *II.4.2. Metodologia*

Estudos preliminares foram realizados para avaliar a reprodutibilidade na aquisição dos espectros infravermelho, em função da granulometria das amostras. Para cumprir este objetivo, a amostra de solo foi fracionada em peneiras de nylon (Nitaplast, Curitiba-Pr) com tamanho de poro equivalente a 61, 100 e 390 mesh. Com base neste estudo foram estabelecidas as condições gerais de trabalho, que consistiram no uso de amostras de solo secas ao ar, destorroadas, moídas, peneiradas, homogeneizadas, desumidificadas em estufa a 50 °C e conservadas em frascos âmbar.

Os modelos multivariados foram realizados a partir de 10 amostras de solo, artificialmente contaminadas com gasolina de acordo com os antecedentes apresentados na Tabela II.1. Com este propósito, amostras de 50 mg de solo foram fortificadas com gasolina em quantidade suficiente para resultar em concentrações entre 5 e 20 mg Kg<sup>-1</sup>.

Os espectros infravermelho foram registrados em um espectrômetro Bruker –Vertex, utilizando o acessório de refletância difusa (DRIFT). As medidas foram realizadas na faixa de número de onda de 4.000 a 400 cm<sup>-1</sup>, utilizando resolução de 8 cm<sup>-1</sup> e acumulação de 128 varreduras. Os espectros foram obtidos utilizando-se 50±0,3 mg de amostra sólida após moagem.

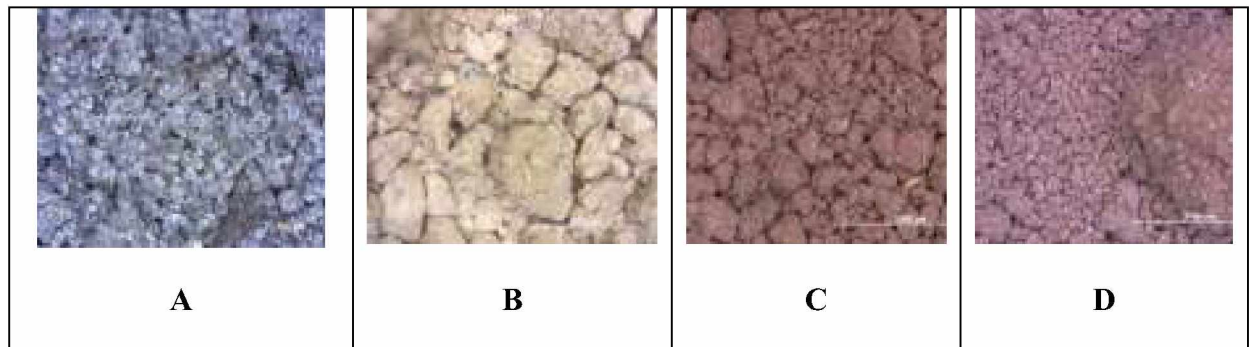
**Tabela II.1.** Concentrações finais de gasolina nas amostras de solo fortificado utilizadas como conjunto de calibração e validação externa para a construção dos modelos multivariados

Amostras do conjunto de calibração			Amostras do conjunto de validação		
Ensaio	Amostra de Gasolina	Concentração (mg Kg <sup>-1</sup> )	Ensaio	Amostra de Gasolina	Concentração (mg Kg <sup>-1</sup> )
01	A	5	12	A	15,0
02	A	5	13	A	15,0
03	B	10	14	B	7,0
04	B	10	15	B	7,0
05	C	15	16	C	5,0
06	C	15	17	C	5,0
07	D	20	18	D	19,5
08	D	20	19	D	19,5
09	E	5	20	E	6,5
10	E	5	21	E	6,5

#### *II.4.3. Análise de Solo contaminado por gasolina após tratamento por Fenton.*

Esta etapa do trabalho foi realizada em colaboração com a aluna de mestrado Alecsandra dos Santos. Toda a otimização e aplicação do processo Fenton fará parte da dissertação de mestrado da supracitada. O presente trabalho visa desenvolver estratégias para o controle analítico das etapas que antecedem e procedem as degradações por Fenton. Os solos que fazem parte deste estudo apresentam propriedades físicas e químicas diferentes, o que pode influenciar de forma também diferente a disseminação do contaminante no meio e a eficiência das técnicas de remediação.

Para tanto, foram utilizados 04 tipos de solo do estado do Paraná, os quais apresentam algumas diferenças bastante evidentes, como a cor e a textura evidenciada microscopicamente (Figura II.01). Os principais parâmetros geotécnicos e físico-químicos estão apresentados na Tabela II.2.



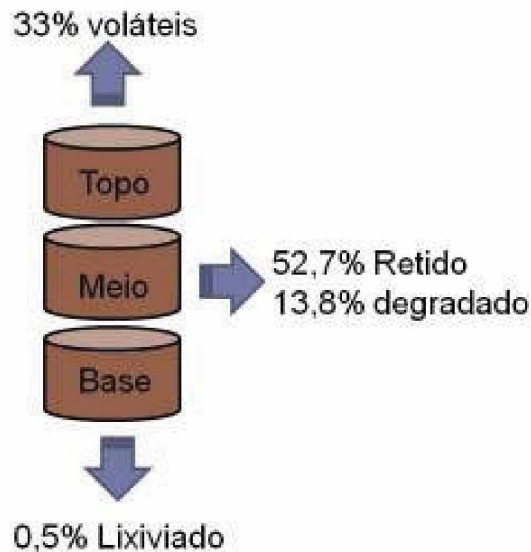
**Figura II.01.** Foto microscópica (aumento 75X) dos solos Litoral (A), Karst (B), Serra geral (C) e Caiuá (D).

**Tabela II.2.** Principais parâmetros físico-químicos e geotécnicos dos solos em estudo.

Parâmetros	Caiuá	Karst	Litoral	Serra Geral	
Sedimentos (%)	Ag	20	4	76	
	Ar	71	95	6	
	Si	9	31	1	18
Classe textural	Franco arenoso	Franco argiloso	Areia	Muito argiloso	
	M	18,79	6,22	39,48	31,57
Porosidade (%)	$\mu$	22,15	43,86	12,00	39,23
	$\eta$	40,94	50,08	51,48	70,80
pH (água)	4,60	6,90	5,30	4,90	
SE ( $m^2 g^{-1}$ )	36,10	8,70	8,00	86,40	
CO ( $g Kg^{-1}$ )	1,57	1,18	2,22	1,70	
MO (%)	2,70	2,03	3,83	2,93	
Sr (%)	32,30	60,00	35,20	38,30	
Cor	Vermelho	Amarelo avermelhado	Cinza	Vermelho escuro	
Classificação	Argissolo			Latossolo	
	Vermelho eutrófico	Argissolo vermelho amarelo distróficos	espodossolo	Vermelho distroférico	

Ag= argila; Ar = areia; Si = silte; M= macroporosidade,  $\mu$ = microporosidade;  $\eta$ = porosidade total; SE= superfície específica; CO= carbono orgânico; MO= matéria orgânica; Sr= grau de saturação.

Os estudos de remediação por processos Fenton foram conduzidos em um sistema de coluna, formado de 3 segmentos de vidro de aproximadamente 10 cm de diâmetro interno por 10 cm de comprimento, acoplados por um sistema de flanges (Figura II.2). As colunas foram montadas pela Mineropar simulando um perfil de 30 cm, sendo recheada com 200 g de solo.



**Figura II.02.:** Representação gráfica das colunas utilizadas para o sistemas de fenton que possibilitam avaliar a lixiviação de gasolina por meio de análise do solo em seus vários segmentos.

Cada coluna foi contaminada com quantidade suficiente de gasolina de forma que a concentração final ficou em  $10 \text{ mg Kg}^{-1}$ , e, posteriormente adicionou-se quantidade suficiente para que a concentração final de peróxido de hidrogênio ficasse na ordem de 1%. As amostras foram coletadas após 24 h de processo Fenton. Coletou-se cerca de 1 g de solo de cada segmento de cada uma das colunas, homogeneizou-se, com o auxílio de um almofariz de vidro e separou-se a fração granulométrica selecionada utilizando uma peneira de 390 mesh.

Estudos anteriores realizados no grupo evidenciaram perdas de cerca de 30% da gasolina adicionada por volatilização, 0,5% por lixiviação, conforme anteriormente representado na Figura II.2.

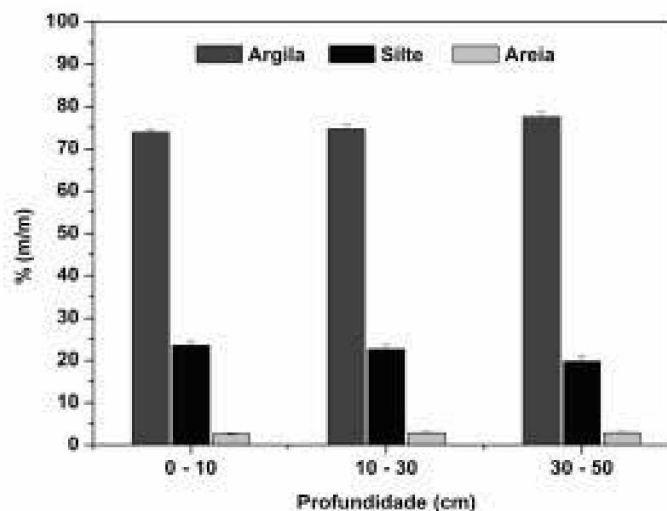


## II.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### II.5.1. Estudos preliminares

As amostras de solo utilizadas nos experimentos iniciais correspondem a um Latossolo Vermelho Distrófico, sob plantio direto de trigo no inverno, e soja e milho no período de verão, sendo isento de contaminação por combustíveis. A coleta foi realizada em uma área de 100 m<sup>2</sup> pertencente ao Instituto Agrônomo do Paraná (IAP, Pato Branco-PR), em profundidades de 0 – 10 cm, 10 – 30 cm e 30 - 50 cm.

De maneira geral, admite-se que algumas características físico-químicas do solo, como textura, pH, teor de matéria orgânica, dentre outras, sejam um dos principais fatores que governam a mobilidade e persistência de contaminantes neste ambiente [26,27]. Assim, uma das primeiras etapas do trabalho foi avaliar algumas destas características, obtendo-se os resultados apresentados na Figura II.03.

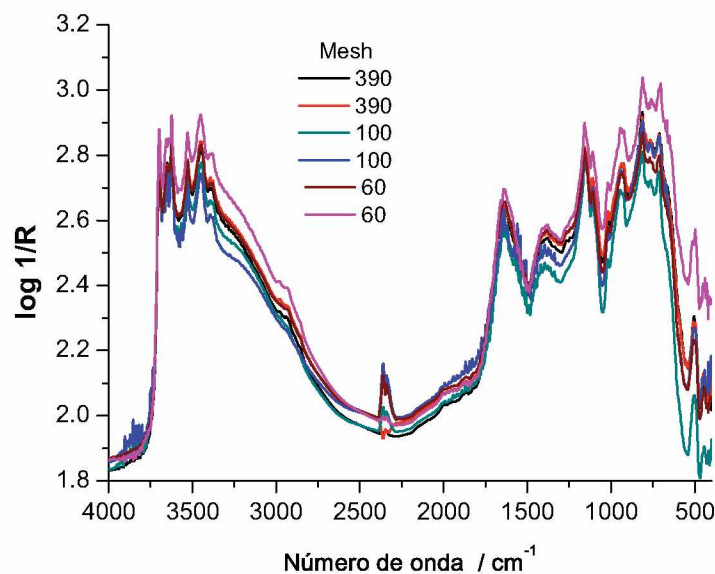


**Figura II.03.** Concentrações percentuais de argila, silte e areia nos diferentes perfis do solo analisado.

De acordo com os antecedentes apresentados na Figura II.1, o solo em estudo apresenta um elevado teor de argila (aproximadamente 76%), teores médios de silte (aproximadamente 21%) e baixos teores de areia (aproximadamente 3%), o que permite a sua classificação como solo argiloso, que se caracteriza por uma alta capacidade de retenção de água, elevada compactação e baixo coeficiente de permeabilidade. É possível constatar ainda, uma boa uniformidade em relação aos valores percentuais de argila, silte e areia nas três profundidades estudadas.

A escolha da técnica para a quantificação da contaminação do solo por combustíveis levou em consideração a redução do tempo de análise, a possibilidade de análise direta (sem tratamento prévio das amostras e, portanto, sem geração de resíduos), à não destruição da amostra, além do baixo custo, características estas que viabilizariam a demanda diária de análises por parte de órgãos fiscalizadores.

Inicialmente foi avaliada a reprodutibilidade das medidas (DRIFT), utilizando-se várias frações granulométricas dos solos coletados na profundidade de 30 - 50 cm. Como pode ser observado na Figura II.04, a diminuição do tamanho de partícula melhora significativamente a linha base dos espectros DRIFT, em razão da maior homogeneidade da superfície submetida à análise. Embora este fracionamento granulométrico represente alguma dificuldade operacional, optou-se por utilizar amostras fracionadas em peneira de 390 mesh, que permite a passagem das partículas de tamanho inferior a 46  $\mu\text{m}$ .



**Figura II.04.** Comportamento espectral de amostras de solo em diferentes frações granulométricas.

Em geral, a homogeneidade das amostras é um importante fator a ser considerado na análise direta de amostras de solo via DRIFT. Assim, mesmo que trabalhosos procedimentos de moagem e separação granulométrica devam ser considerados.

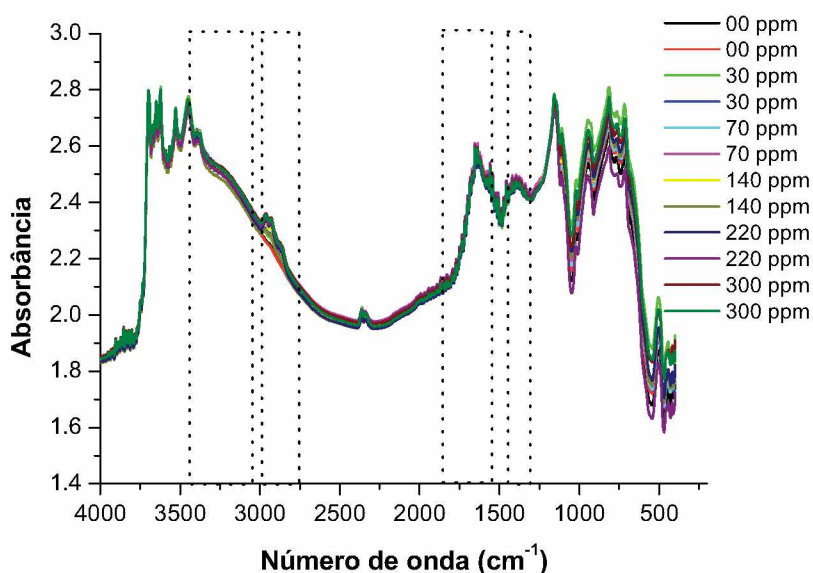
### II.5.2. Análise de componentes principais (PCA)

Objetivando-se verificar as regiões espectrais relevantes para a quantificação da contaminação por gasolina em amostras de solo foi realizada uma análise exploratória de dados *via* PCA.

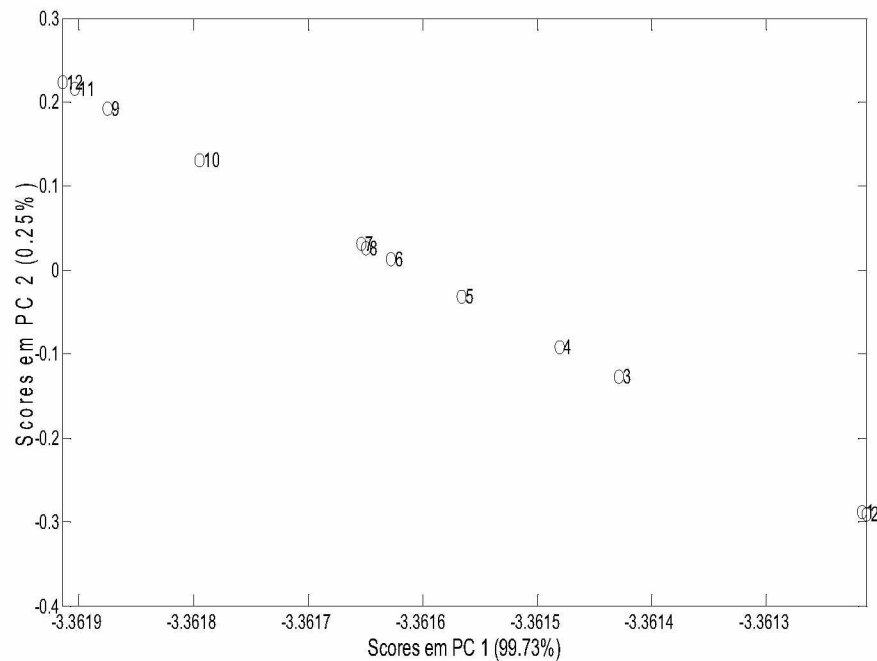
Neste estudo, 6 amostras (em duplicata) foram contaminadas com concentrações crescentes de gasolina e caracterizadas por DRIFT (Figura II.05). O estudo *via* PCA foi aplicado nos dados espectrais pré-processados por MSC (processo que permite a correção do sinal em relação ao fenômeno de espalhamento), utilizando-se duas componentes principais (CP) que representam praticamente toda a informação espectral.

Analisando de forma conjunta os gráficos de *scores* e *loadings* (resultados não apresentados) foi possível identificar regiões espectrais de maior relevância para a classificação das amostras de acordo com o teor de gasolina. Assim, a região espectral considerada nos estudos foi de 4.000 a 2.700 e de 2.000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ , regiões que permitiram a classificação apresentada na Figura II.06. Nesta representação é possível observar uma boa equivalência entre as duplicatas e uma separação entre amostras com maior e menor teor de gasolina, propiciada basicamente pela segunda componente principal (PC2).

Estes resultados sugerem que a informação contida nas regiões espectrais selecionadas contém informação que pode ser utilizada na elaboração de um modelo multivariado para avaliar o teor de gasolina.



**Figura II.05.** Espectros de DRIFT de amostras de solo fortificadas com gasolina. As linhas pontilhadas representam regiões onde observou-se grandes alterações espectral de acordo com o aumento na concentração de gasolina.



**Figura II.06.** Gráfico de Scores da PC1 vs. PC2 para modelo PCA otimizado.

### II.5.3. Desenvolvimento de modelo multivariado para a quantificação de Gasolina em solo

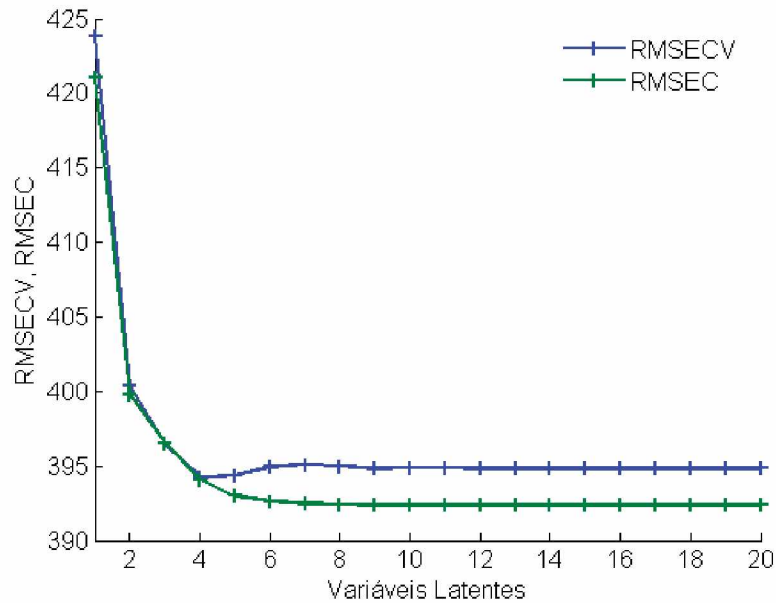
No desenvolvimento de um modelo PLS para estimar a contaminação do solo por gasolina foram utilizadas as regiões espectrais selecionadas pela Análise de Componentes Principais (4.000 a 2.700 e 2.000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ )

Os estudos foram desenvolvidos com 54 amostras de solo contaminadas com gasolina de 09 diferentes postos de combustíveis, utilizando-se três níveis de concentração (5, 10 e 20  $\text{mg Kg}^{-1}$ ). Das 42 amostras, 2 amostras sem adição de gasolina mais 20 constituíram o conjunto para calibração e as 20 restantes foram reservadas para a validação do modelo.

O modelo de melhor desempenho para previsão do teor de gasolina foi estabelecido a partir de espectros pré-processados por MSC e centrados na média, recurso este último que minimiza flutuações na linha base.

Para definir o melhor número de variáveis latentes (VLs) foi utilizada uma rotina de validação cruzada, particularmente o sistema *Leave one out*. Neste procedimento, um espectro é retirado do conjunto de calibração, sendo utilizado como elemento de previsão. Esta operação é repetida tantas vezes quanto necessário, de maneira a garantir que todos os elementos do conjunto de calibração participem como elemento de previsão. Os erros que

surtem desta previsão são apresentados como a Raiz Quadrada do Erro Médio Quadrático de Validação Cruzada (RMSECV) em função do número de VLs (Figura II.07).

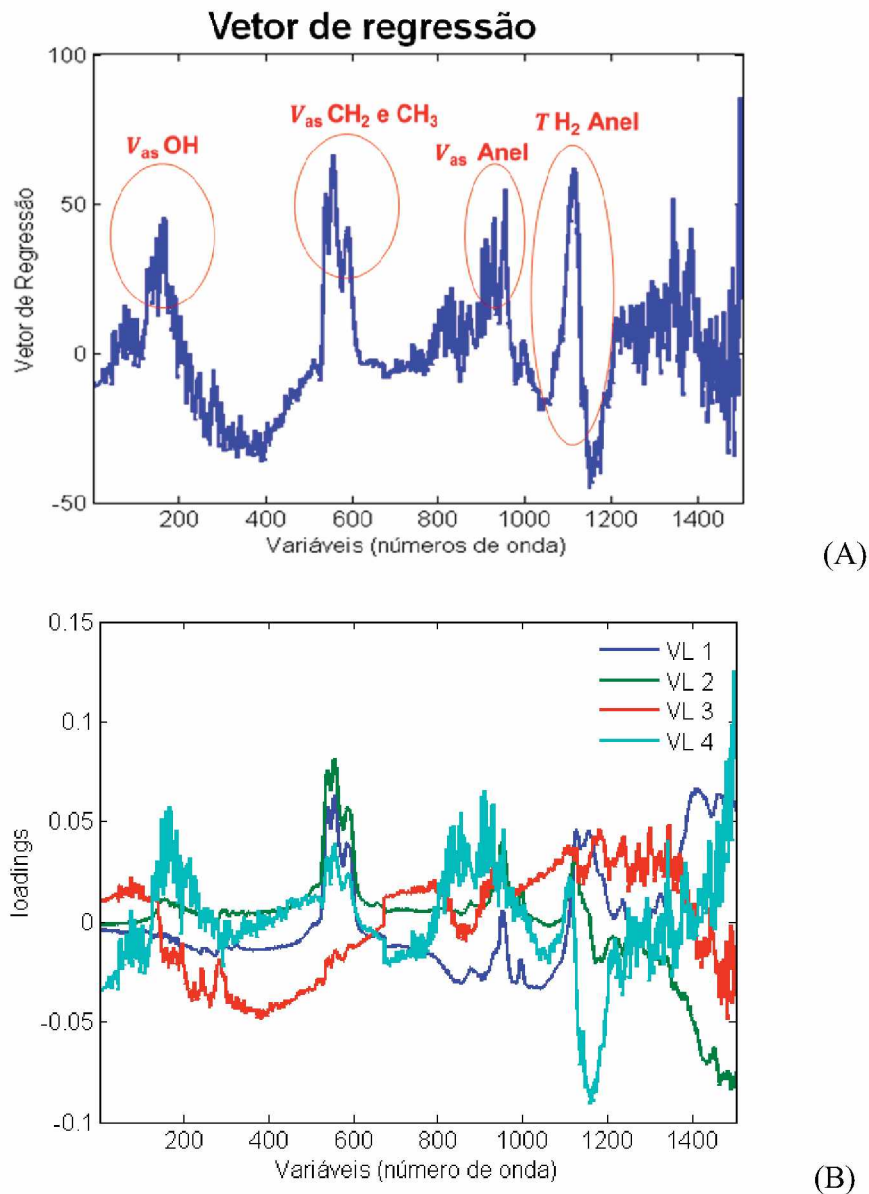


**Figura II.07.** Evolução dos valores de RMSECV em função do número de variáveis latentes

Modelos elaborados com 4 VLs permitiram representar 100% da variância da matriz de espectros (X) e 99,39% da matriz de concentração de gasolina (Y). Nestas condições o RMSECV apresenta um valor mínimo, da ordem de  $3,6 \text{ mg Kg}^{-1}$ .

Em geral, o número de VLs deve ser próximo do número de parâmetros determinados. Assim, o uso de 4VLs evidencia as dificuldades de modelagem associadas à complexidade da matriz e do sinal correspondente.

A Figura II.08(A) mostra o vetor de regressão obtido para este modelo multivariado, o que indica que praticamente todas as regiões espectrais foram consideradas relevantes para estabelecer a correlação desejada, especialmente regiões correlacionadas a deformação assimétrica para OH, CH<sub>2</sub> e CH<sub>3</sub> e anel aromático, bem como o sinal de deformação angular assimétrica fora do plano também para anel aromático, conforme destaca-se na figura. Por outro lado, o gráfico de “loadings” apresentado na Figura II.8(B) indica que grande parte da informação analítica relevante é considerada na elaboração da primeira VL, ao passo que ruídos instrumentais são introduzidos pela terceira e quarta VL. Em função desta constatação, modelagens foram realizadas após alisamento do sinal. Porém, melhorias não foram observadas na modelagem.

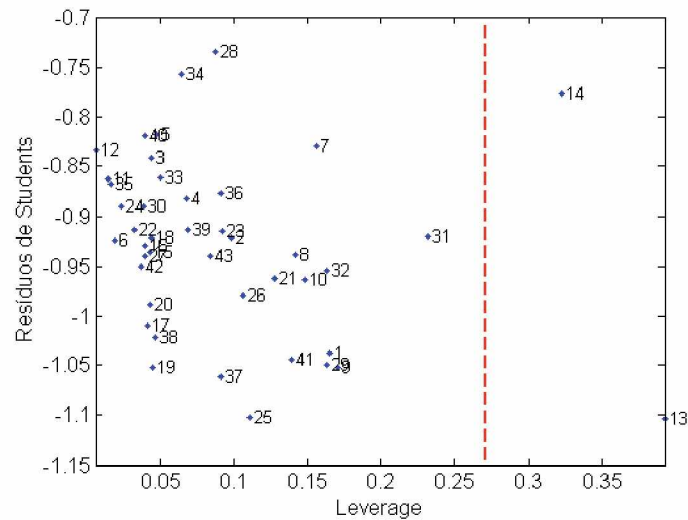


**Figura II.08.** Gráfico do (A) vetor de coeficientes de regressão e dos (B) loadings das 4 CPs utilizadas na elaboração do modelo multivariado

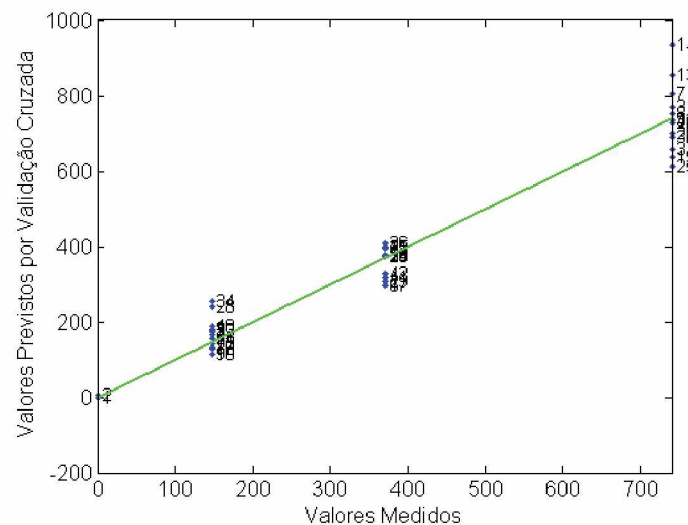
A Figura II.09(A) apresenta o gráfico de resíduos de Student vs. *Leverage* para a verificação de anomalias no conjunto de calibração. Os resíduos de Student indicam se as amostras estão incluídas na distribuição normal, considerando-se um intervalo de confiança de 95%, enquanto que o *Leverage* representa a distância entre cada espectro e o centróide do conjunto.

Por definição, os valores máximos permitidos para estes parâmetros são  $\pm 2,5$  para os Resíduos de Student e 0,27 para o *Leverage* (considerando-se  $3*VL/N$ , onde VL representa o

número de variáveis latentes (04) utilizadas na construção deste modelo, e N o número de amostras do conjunto de calibração (44)). Embora as amostras 13 e 14 se encontrem fora do limite de *leverage* (0,27), os valores dos resíduos de Student são bastante pequenos. Desta forma, referidas amostras não foram retiradas do conjunto de calibração. A Figura II.9(B) ilustra os valores reais vs os valores previstos pelo modelo de regressão durante o processo de validação cruzada. Como é possível observar, o modelo apresentou boa capacidade preditiva, demonstrada pelo alto coeficiente de correlação obtido ( $R^2_{CV} = 0,97$ ). Conforme pode ser observado, as amostras 13 e 14 apresentaram altos valores de *leverage*, bem como ficam distantes do modelo no gráfico de valores reais vs previstos por validação cruzada, provavelmente por se tratar de uma amostra de gasolina aditivada, oriunda do mesmo posto de gasolina.



(A)



(B)

**Figura II.09.** (A) Resíduos de Students vs leverage para o modelo multivariado construído; (B) Valores previstos na validação cruzada vs valores reais.

A capacidade de previsão foi confirmada frente ao conjunto de validação externa (conjunto de misturas sintéticas que não foram utilizadas na etapa de calibração) obtendo-se os resultados apresentados na Tabela II.3. Erros relativos inferiores a 10% e desvios inferiores a 20% foram considerados satisfatórios, principalmente levando-se em consideração a heterogeneidade da matriz e a baixa concentração relativa do poluente estudado.

**Tabela II.3.** Resposta prevista e desvio padrão obtidos pelo modelo multivariado PLSR para a previsão externa de gasolina em amostras de solo.

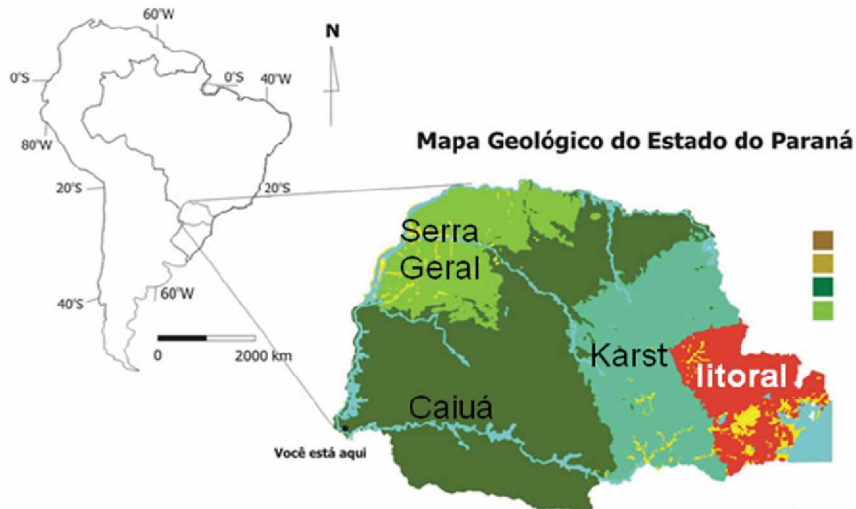
Amostras	Concentração Adicionada (mg Kg <sup>-1</sup> )	Concentração Prevista (mg Kg <sup>-1</sup> )	Erro Relativo (%)
1 e 2	15,0	13,6	9,53
3 e 4	7,0	6,45	7,86
5 e 6	5,0	4,49	10,2
7 e 8	19,5	19,7	-1,02
9 e 10	6,5	6,24	4,00

Em função dos resultados apresentados é possível concluir que a associação entre a espectroscopia (DRIFT) e a calibração multivariada representa uma excelente alternativa para este tipo de análise, destacando características como rapidez e baixo custo.

*II.5.3. Utilização de espectroscopia por refletância difusa no infravermelho médio com transformada de Fourier (DRIFT) e modelos de calibração multivariada como controle analítico durante procedimento de Fenton em solo contaminado por gasolina*

Nesta etapa foram analisados 4 tipos diferentes de solo que são predominantes no estado do Paraná e estão distribuídos conforme o mapa apresentado na Figura II.10:

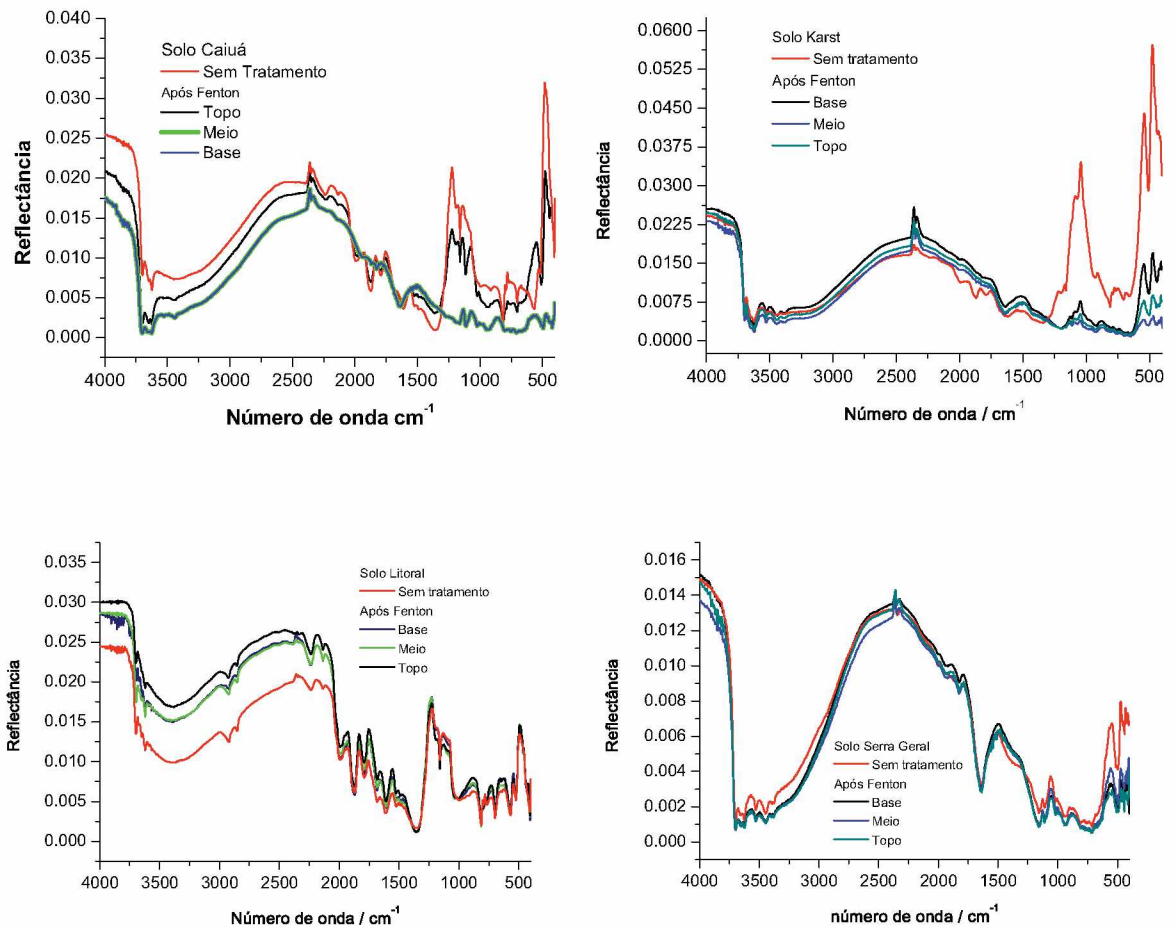




**Figura II.10.:** Mapa geológico do Paraná contendo as regiões onde predominam tipos de solo: Litoral, Karst, Caiuá e Serra geral. Fonte: Mineropar<sup>[33]</sup>

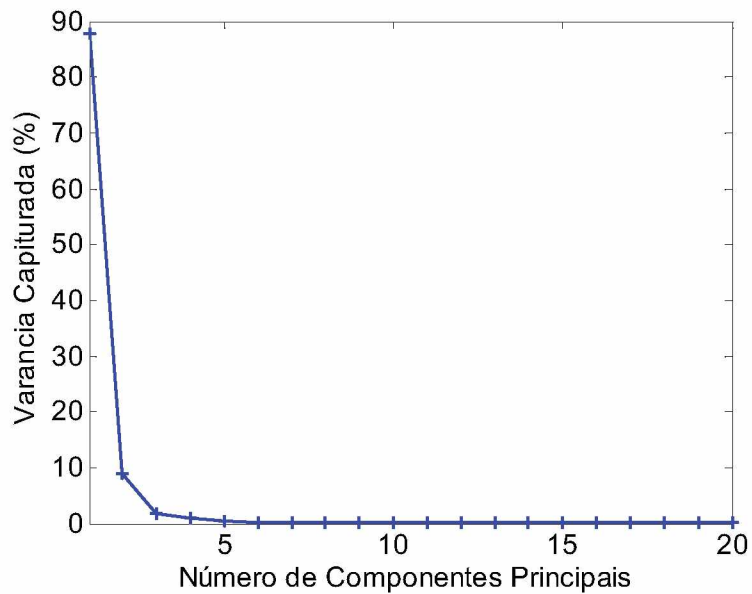
Inicialmente, foram realizados ensaios preliminares visando identificar as mudanças espectrais do solo contaminado por  $10 \text{ mg Kg}^{-1}$  de gasolina, após processo Fenton mediados por peróxido de hidrogênio a 1% durante 24 h.

Pode-se observar nos espectros de refletância difusa (Figura II.11), que após o tratamento Fenton, os sinais tornam-se completamente diferentes do espectro inicial, especialmente nas regiões anteriormente selecionadas para a construção do modelo, bem como não manteve a linha base anteriormente observada, essas alterações geraram erros de previsão muito altos, inviabilizando a quantificação de gasolina utilizando o modelo DRIFT-PLS anteriormente construído.



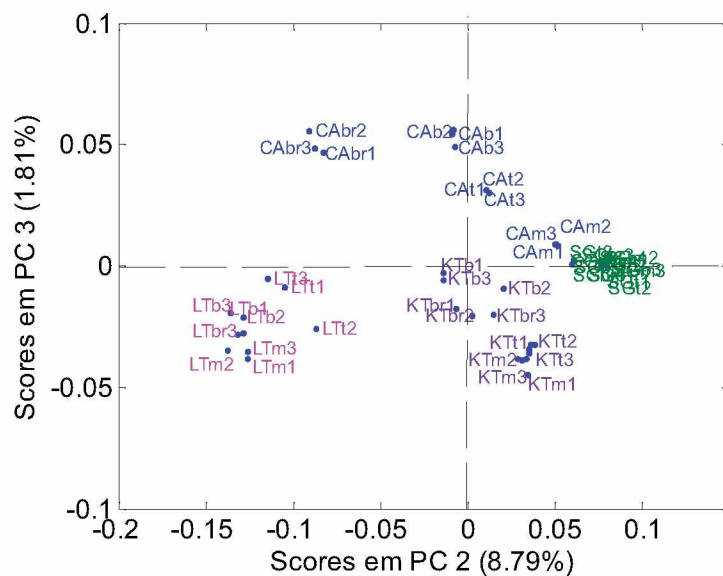
**Figura II.11.:** Espectros de refletância dos 04 solos estudados em três amostras retiradas do Topo, meio e base das colunas, antes e após o tratamento Fenton.

Com o objetivo de classificar e identificar possíveis diferenças ocorridas após o tratamento Fenton para cada um dos solos analisados foram construídos vários modelos PCA, sendo que os melhores resultados foram obtidos utilizando dados centrados na média e MSC utilizando 3 componentes principais explicando 98,34% da variância dos dados (Figura II.12).



**Figura II.12.:** Evolução dos valores de variância capturada em função do número de componentes principais.

Como pode-se observar na Figura II.13, a análise dos Scores para PC3 e PC2 demonstram que o modelo PCA é capaz de agrupar as amostras de acordo com o tipo de solo, observa-se também que com exceção do solo Serra Geral, os demais solos foram agrupados de acordo com a porção da coluna em que foram realizadas as amostras (topo, meio, base, sem tratamento).



**Figura II.13.:** Scores de PC2 vs PC3 para o modelo PCA construído; As amostras em Rosa referem-se ao solo litoral; Roxo: solo Karst; Verde: Serra Geral e Azul: Caiuá

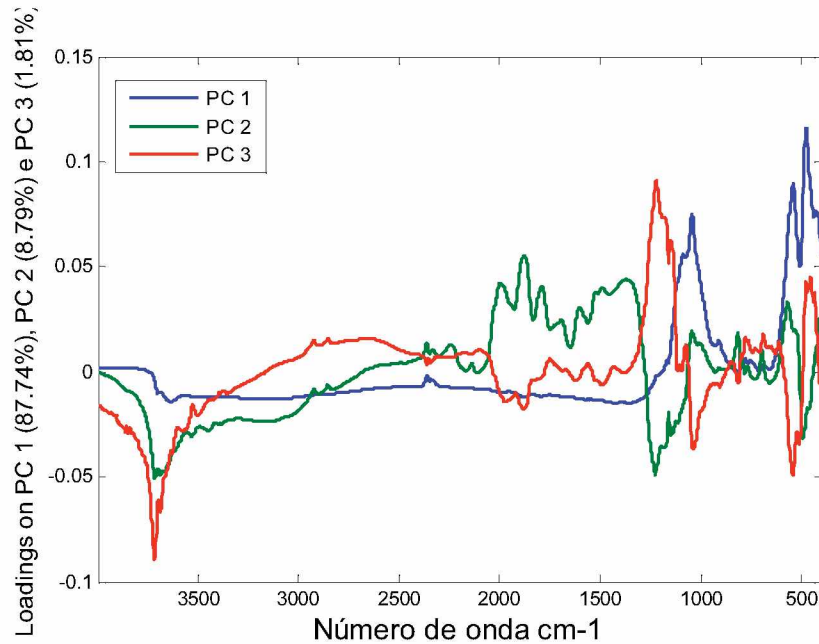
A análise dos loadings apresentados na Figura II.14 mostram que praticamente toda região espectral é necessária para classificação das amostras, e, portanto, não é necessário a eliminação de parte do espectro para a construção de modelos de regressão. Observando-se os espectros de infravermelho apresentados anteriormente na Figura II.11, observa-se que maior quantidade de sinais foi observada na amostra litoral, que será utilizada como referência para atribuição do sinal para todos os tipos de solo. Absorções em torno de  $3700\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$  (1) são referentes a grupos O-H livres de ligações de hidrogênio, que podem ser provenientes de O-H de minerais como caulinita e gibsitita [28].

A banda larga e intensa centrada em  $3390\text{ cm}^{-1}$  é característica de ligação de hidrogênio, principalmente em água [28,29]. Em  $2930$  e  $2854\text{ cm}^{-1}$  são observadas absorções características de deformações no plano de C-H de estruturas alifáticas, enquanto que em  $2360\text{ cm}^{-1}$  se observa um sinal característico da deformação da ligação O-H do COOH [30]. As absorções em  $2000$  e  $1160\text{ cm}^{-1}$  (5) são provenientes de deformações de C-O de polissacarídeos. Em  $1490\text{ cm}^{-1}$  (6) se observa um sinal que pode ser associado à deformação de C-H de aromático ou ao estiramento de N=O [30]. Em  $1354\text{ cm}^{-1}$  (7) aparece somente neste solo, uma banda que pode ser atribuída à deformação C-H em CH<sub>2</sub> e CH<sub>3</sub> alifáticos, estiramento C-OH em OH fenólico e estiramento COO- [30,31].

Em  $1030\text{ cm}^{-1}$  pode-se observar um sinal característico de deformação axial da ligação Si-O [28,32], enquanto que várias absorções características do mineral quartzo (Q) foram observadas em  $2240$ ;  $2123$ ;  $1793$ ;  $1870$ ;  $700$ ;  $569$  e  $526\text{ cm}^{-1}$ .

O perfil espectroscópico dos solos Karst, Serra Geral e Caiuá é bastante similar ao anterior, observando-se, entretanto, ausência dos sinais referentes a C-H alifático e à presença de elevadas concentrações de quartzo.

Na caracterização dos solos da Serra Geral, destaque deve ser dado ao sinal centrado em  $1640\text{ cm}^{-1}$ , normalmente associado a ligações C=C de aromáticos, C=O de COO-, deformação angular de água e à presença de grupos funcionais característicos de matéria orgânica e ao sinal observado em  $920\text{ cm}^{-1}$ , característico da ligação Fe-O de hematita [28].



**Figura II.14.:** Gráfico de *loadings* para o modelo construído com 3 componentes principais

Modelos de regressão foram construídos buscando a determinação de benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos, bem como fenóis totais, mas não foram obtidos resultados satisfatórios até o presente momento.

## II.6 CONCLUSÃO

A utilização da metodologia de DRIFT-PLS mostrou-se satisfatória para a determinação de gasolina em amostra de solo, essa técnica apresenta muitas vantagens em relação às técnicas tradicionais utilizadas, por ser rápida, de baixo custo e não-destrutiva, necessitando de poucas etapas no preparo das amostras.

Os modelos de PCA construídos são capazes de discriminar primeiramente pequenas variações na contaminação de solo por gasolina, permitem identificar os quatro tipos de solo predominantes no estado do Paraná e demonstram as diferenças entre os segmentos das colunas após a aplicação do processo Fenton.

Em virtude da intensa oxidação sofrida pelo solo durante a etapa de fenton, modelos de PLSR construídos a partir de solo contaminados por gasolina não apresentaram boa capacidade de previsão da concentração de gasolina nesse tipo de amostra.

A análise de DRIFT acoplada a métodos de calibração multivariada mostrou grande potencial de aplicabilidade mesmo em grande a variação na composição do solo. Todavia, para melhorar a capacidade de previsão dos modelos de quantificação necessita-se de dados

adicionais (maior número de tipo de solo) para permitir a caracterização mais precisa e detalhada da variabilidade do solo.

## II.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] BAUMGARDNER, M.F.; SILVA, L.F.; BIEHL, L.L.; STONER, E.R. Reflectance properties of soils. *Adv. Agron.* **1985**, v. 38, 1–44.
- [2] COLEMAN, T.L.; AGBU, P.A.; MONTGOMERY, O.L. Spectral differentiation of surface soils and soil properties: Is it possible from space platforms? *Soil Sci.* **1993**, v. 155, 283–293.
- [3] PALACIOS-OREUTA, A.; USTIN, S.L. Remote sensing of soil properties in the Santa Monica mountains. I. Spectral analysis. *Remote Sens. Environ.* **1998**, v.65, 170–183.
- [4] SHEPHERD, K.D.; WALSH, M.G. Development of reflectance spectral libraries for characterization of soil properties. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **2002**, v. 66, 988–998.
- [5] LULEVA, M.I.; VAN DER WERFF, H.; JETTEN, V.; VAN DER MEER, F. Can infrared spectroscopy be used to measure change in potassium nitrate concentration as a proxy for soil particle movement? *Sensors* **2011**, v. 11, 4188–4206.
- [6] ROSSEL, R.A.V.; MCBRATNEY, A.B. Soil chemical analytical accuracy and costs: Implications from precision agriculture. *Aust. J. Exp. Agric.* **1998**, v. 38, 765–775.
- [7] THOMASSON, J.A.; SUI, R.; COX, M.S.; AL-RAJEHY, A. Soil reflectance sensing for determining soil properties in precision agriculture. *Trans. ASAE* **2001**, v. 44, 1445–1453.
- [8] POULENARD, J.; LEGOUT, C.; NÉMERY, J.; BRAMORSKI, J.; NAVRATIL, O.; DOUCHIN, A.; FANGET, B.; PERRETTE, Y.; EVRARD, O.; ESTEVES, M. Tracing sediment sources during floods using diffuse reflectance infrared fourier transform spectrometry (DRIFTS): A case study in a highly erosive mountainous catchment (Southern French Alps). *J. Hydrol.* **2012**, v. 11, 452–462.
- [9] POST, W.M.; IZAURRALDE, R.C.; MANN, L.K.; BLISS, N. Monitoring and verifying changes of organic carbon in soil. *Clim. Chang.* **2001**, v. 51, 73–99.
- [10] LEUE, M.; ELLERBROCK, R.H.; GERKE, H.H. DRIFT Mapping of organic matter composition at intact soil aggregate surfaces. *Vadose Zone J.* **2010**, v. 9, 317–324.
- [11] ELLERBROCK, R.H.; GERKE, H.H.; BÖHM, C. In situ DRIFT characterization of organic matter composition on soil structural surfaces. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **2009**, v. 73, 531–540.

- [12] NIEMEYER, J.; CHEN, Y.; BOLLAG, J.-M. Characterization of humic acids, composts, and peat by diffuse reflectance Fourier-transform infrared spectroscopy. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **1992**, v. 56, 135–140.
- [13] DEMYAN, M.S.; RASCHE, F.; SCHULZ, E.; BREULMANN, M.; MÜLLER, T.; CADISCH, G. Use of specific peaks obtained by diffuse reflectance Fourier transform mid-infrared spectroscopy to study the composition of organic matter in a Haplic Chernozem. *Eur. J. Soil Sci.* **2012**, v. 63, 189–199.
- [14] GRIFFITHS, P.R., DE HASETH, J. A., *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*. (2007) Wiley-Interscience, New Jersey.
- [15] GRIFFITHS, P.R., FULLER, M.P., Mid infrared spectrometry of powdered samples. In: R.J., Clark, R.E., Hester, eds. (1982) *Advances in Infrared and Raman Spectroscopy* Heyden and Son, London, 63-129.
- [16] D'ACQUI, L.P., PUCCI, A., JANIK, L.J., Soil properties prediction of western Mediterranean island with similar climatic environments by means of mid infrared diffuse reflectance spectroscopy. *European Journal of Soil Science*, **2010**, v. 61(6), 865-876.
- [17] REEVES, J.B., SMITH, D.B., The potential of mid- and near-infrared diffuse reflectance spectroscopy for determining major-and trace-element concentrations in soils from a geochemical survey of North America. *Appl. Geochem.*, **2009**, v. 24, 1472-1481.
- [18] VISCARRA ROSSEL, R.A., WALVOORT, D.J.J., MCBRATNEY, A.B., JANIK, L.J., SKJEMSTAD, J.O., Visible, near infrared, mid infrared or combined diffuse reflectance spectroscopy for simultaneous assessment of various soil properties. *Geoderma*, **2006**, v. 131 (1-2), 59-75.
- [19] Diesel and gasoline spills, Oklahoma Department of Environmental Quality (2012).
- [20] Soil Contamination, United States Environmental Protection Agency (August 2011).
- [21] NEWELL CJ, ACREE SD, ROSS RR AND HULING SG, Light Nonaqueous Phase Liquids. US Environmental Protection Agency Ground Water Issue Paper, R.S. Kerr Environmental Research Laboratory, Ada OK. EPA/540/S-95/500, **1995**.
- [22] WATTS RJ AND TEEL AL, Treatment of contaminated soils and groundwater using ISCO. *Pract Periodical Hazard Toxicol Radioact Waste Manage*, **2006**, v.10, 2–9.
- [23] KONG, S.H., WATTS, R.J., CHOI, H., Treatment of petroleum-contaminated soils using iron mineral. Catalyzed hydrogen peroxide. *Chemosphere*, **1998**, v. 37, 1473–1482.
- [24] VILLA, R.D., TROVOA, G., UPONOGUEIRA, R.F., Diesel degradation in soil by Fenton process. *J Braz Chem Soc.* **2010**, v.21, 088–1095.

- [25] LEMAIRE J, CROZE V, MAIER J AND SIMONNOT MO, Is it possible to remediate a BTEX contaminated chalky aquifer by in situ chemical oxidation? *Chemosphere*, **2011**, v. 84, 1181–1187.
- [26] LANGENBACH, T.; SCHROLL, R. & SCHEUNERT, I. Fate of the <sup>14</sup>C-terbutylazine in Brazilian soils under various climatic conditions. *Chemosphere*, **2001**, v. 45, 387-398.
- [27] NEURATH, S.K.; SADEGHI, A.M.; SHIRMOHAMMADI, A.; ISENSEE, A.R. & TORRENTS, A. Atrazine distribution measured in soil and leachate following infiltration conditions. *Chemosphere*, **2004**, v. 54, 489-496.
- [28] FERREIRA, A. Caracterização química e espectroscópica de ácidos húmicos e sedimentos retirados da baía de Guaratuba-Pr e avaliação do nível de poluição ambiental. Dissertação (Mestrado em Química) Universidade Federal do Paraná, Curitiba, **2006**.
- [29] GUIMARÃES, E.; TOMAZONI, J.C.; DENARDIN, G.G. a influência da decomposição da matéria orgânica no aumento do efeito estufa em solos cultivados e não cultivados. *Synergismus Scyentifica UTFPR*, v.4, n.1, **2009**.
- [30] SALES, K.R.R. Qualidade do carbono em frações da matéria orgânica e classes de agregados de solos sob sistemas agroflorestais de cacau por espectroscopia na região do infravermelho. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal). Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Campos dos Goytacazes, **2012**.
- [31] FONTANA, A. Fracionamento da matéria orgânica e caracterização dos ácidos húmicos e sua utilização no sistema brasileiro de classificação de solos. Tese (Doutorado em Ciências). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica, **2009**.
- [32] FERRARESI, T.M.; SILVA, W.T.L.; NETO, L.M.; SILVEIRA, P.M.; MADARI, B.E. Espectroscopia de infravermelho na determinação da textura do solo. *R. Bras. Ci. Solo*, **2012**, v. 36, 1769-1777.
- [33] disponível em:  
[http://www.mineropar.pr.gov.br/arquivos/File/publicacoes/relatorios\\_concluidos/12\\_2\\_relatorios\\_concluidos.pdf](http://www.mineropar.pr.gov.br/arquivos/File/publicacoes/relatorios_concluidos/12_2_relatorios_concluidos.pdf), acesso dia 29 de maio de 2015.



# Capítulo III

Determinação de fenol e subprodutos da sua  
degradação fotocatalítica utilizando  
espectroscopia UV-Vis e PLS.

### III. 1. INTRODUÇÃO

#### *III.1.1. Importância do monitoramento ambiental de fenol e seus principais subprodutos*

Compostos fenólicos são frequentemente encontrados em elevadas concentrações em efluentes de indústrias petroquímicas, refinarias e gaseificadoras de coque.<sup>[1,2]</sup> Espécies fenólicas estão listados entre os mais relevantes contaminantes ambientais, principalmente em função de efeitos tóxicos, carcinogênicos, mutagênicos e teratogênicos bem conhecidos.

Mesmo em baixos níveis de concentração ( $0,002 \text{ mg L}^{-1}$ ), a presença de fenol e derivados no meio aquático afeta significativamente as propriedades organolépticas da água.<sup>[3,4]</sup> Além disso, estudos demonstram que estes contaminantes reagem facilmente durante o processo de cloração da água para consumo, produzindo compostos ainda mais carcinogênicos, como clorofenóis e policlorofenóis.<sup>[5,6]</sup>

Em função destas características, a resolução CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente) nº 430/11 manteve as normatizações contidas na resolução 357/05, fixando em  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  a concentração máxima de fenóis totais permitida para lançamento de efluentes em corpos de água receptores, valor este expresso como  $\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$ .<sup>[7]</sup> Infelizmente, à baixa biodegradabilidade das espécies fenólicas dificulta o cumprimento desta norma com o uso de rotinas de tratamento fundamentadas em processos de natureza biológica. Sendo assim, novas tecnologias de tratamento são necessárias para a remediação de resíduos e, eventualmente, para permitir o seu reuso.<sup>[1]</sup>

Recentemente, processos de oxidação avançada (POAs) foram investigados para tratamento de águas residuais contendo altas concentrações de fenol, incluindo técnicas eletroquímicas e catalíticas.<sup>[8-15]</sup>

#### *III.1.2. Utilização de Processos Avançados de Oxidação (POA's) para degradação de fenol*

Resíduos contendo compostos fenólicos são tratados convencionalmente por meio de processos biológicos,<sup>[16]</sup> de extração,<sup>[17]</sup> e adsorção.<sup>[18]</sup> Entretanto, além de representarem um elevado custo de tratamento, estas técnicas possuem limitações para aplicação em sistemas de

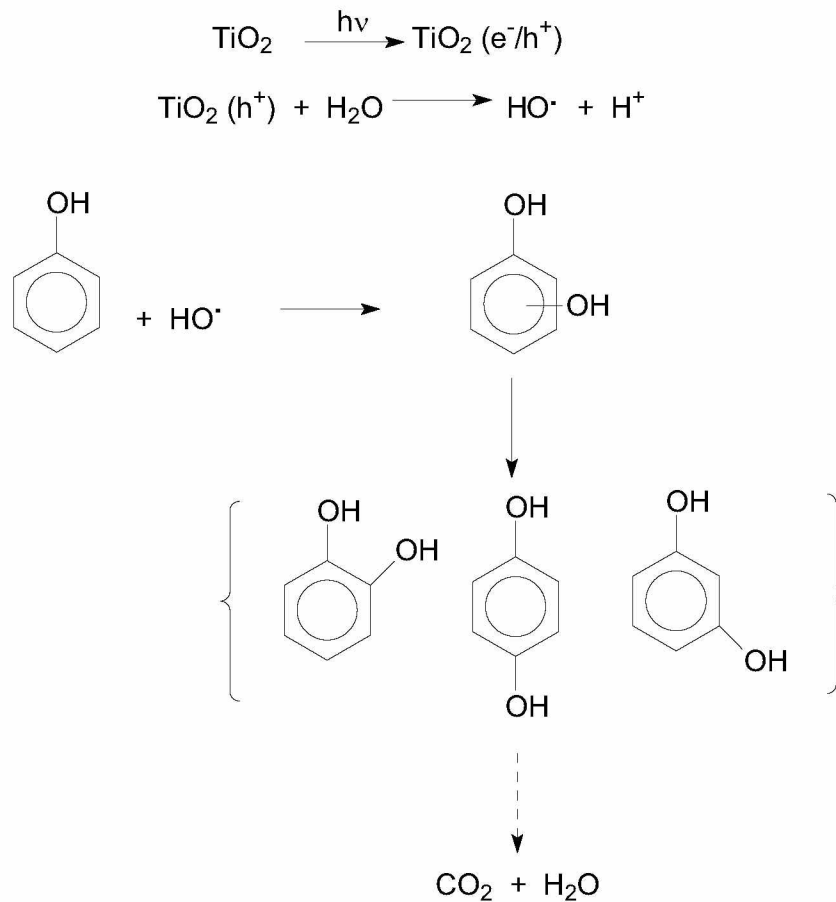
concentrações intermediárias e em presença de multicomponentes fenólicos.<sup>[19]</sup> Dessa forma, o uso de tecnologias avançadas de oxidação catalítica vem se consolidando como uma das melhores opções de tratamento deste tipo de poluente.

Dentre os sistemas avançados de oxidação é possível destacar a fotocatalise heterogênea, particularmente com o uso de TiO<sub>2</sub> como fotocatalisador. Trata-se de um semicondutor de elevada atividade fotocatalítica que permite a degradação de inúmeros poluentes resistentes, com custos relativamente baixos.<sup>[19-22]</sup>

Particularmente na degradação de fenol, a fotocatalise apresenta algumas dificuldades, dentre as que destacam a mineralização incompleta do composto alvo e a formação de subprodutos de elevada toxicidade. Adicionalmente, a presença de sequestrantes de radical hidroxila, tipicamente ânions inorgânicos como carbonato, sulfato, cloreto e nitrato, podem reduzir a eficiência de degradação do processo, o que minimiza a capacidade de mineralização do sistema.<sup>[21,22]</sup>

A degradação fotocatalítica como uma ferramenta para o tratamento de água contendo poluentes industriais é de interesse considerável no campo da catálise, e muitos estudos têm sido feitos para desenvolvimento de catalisadores e condições que permitam aumentar a eficiência o processo.<sup>[23-25]</sup> Para uma completa avaliação da eficiência de degradação, entretanto, são necessárias ferramentas analíticas que permitam determinar, não apenas o composto alvo, mas também os subprodutos formados no processo de degradação. Com este objetivo, é relativamente comum o uso de sistemas de extração/pré-concentração, seguidos de quantificação por métodos cromatográficos em fase gasosa<sup>[26,27]</sup> ou líquida de alta eficiência<sup>[27,28]</sup>

De acordo com estudos de Mylonas et al. (1996)<sup>[28]</sup>, a degradação fotocatalítica de fenol leva à geração de espécies poli-hidroxiladas (hidroquinona e catecol), por hidroxilação preferencial nas posições *orto* e *para* do anel aromático (Figura III.01). Em função da reação na posição *meta* ser menos favorecida, o resorcinol é produzido em baixas concentrações.<sup>[24,27]</sup>



**Figura III.01.** Etapas da oxidação do fenol durante o processo de fotocatalise.

Fonte: Adaptação de Mylonas et al. (1996) <sup>[28]</sup>

### III.1.3. Métodos de determinação simultânea de fenol e seus principais subprodutos

Embora os métodos de análise fundamentados em cromatografia permitam a determinação de subprodutos em baixíssimas concentrações, a sua natureza é incompatível com o conceito de análise em tempo real, que é cada vez mais necessário para o controle on-line de processos. Deste ponto de vista, os métodos espectroscópicos se mostram vantajosos, pois permitem a rápida detecção de inúmeras espécies químicas, em concentrações compatíveis com muitas necessidades analíticas.<sup>[29]</sup> Assim, métodos espectrofotométricos são considerados padrão para a quantificação de compostos fenólicos, como o método da 4-aminoantipirina que permite a determinação de fenóis totais em águas residuais, naturais e de abastecimento.

Infelizmente, a baixa seletividade dos métodos espectrofotométricos na região do ultravioleta e do visível impede a análise simultânea de espécies de natureza química similar, o que, afortunadamente, pode ser contornado com o uso de ferramentas de análise multivariada.

### **III.2. OBJETIVO GERAL**

Avaliar a potencialidade da utilização de espectroscopia UV-Vis associada à regressão por mínimos quadrados parciais para a determinação de fenol e seus principais subprodutos durante um processo de fotocatalise heterogênea.

### **III.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Estabelecer um método espectroscópico multivariado para a quantificação de fenol, catecol, hidroquinona, resorcinol e p-benzoquinona durante um processo de degradação fotocatalítica de fenol.

Estabelecer um método cromatográfico em fase líquida para avaliação comparativa dos resultados.

### **III.4. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### *III.4.1 Reagentes e soluções*

Fenol (Sigma-Aldrich, mínimo de 99% de pureza), hidroquinona e resorcinol (Synth, mínimo de 99% de pureza), p-benzoquinona (Merck, mínimo de 98% de pureza) e pirocatecol foram adquiridos em grau analítico de pureza.

Como fotocatalisador foi utilizado dióxido de titânio (TiO<sub>2</sub>) Degussa P25, contendo 80% de fase anatase, 20% de fase rutilo e área superficial de aproximadamente 50 m<sup>2</sup>g<sup>-1</sup>.

Os solventes utilizados no processo de preparo das amostras e nas determinações cromatográficas dos substratos em estudo (metanol e acetonitrila) foram de grau cromatográfico de pureza (JTBaker). A água utilizada no preparo das soluções e nas determinações cromatográficas foi de grau ultra-puro (Millipore-Simplicity UV, condutividade de 18 mΩ).

### III.4.2. Equipamentos

As medidas espectrofotométricas foram realizadas em um espectrofotômetro Cary 50 (Varian), utilizando-se cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico. Os espectros foram registrados na faixa de comprimento de onda compreendida entre 200 e 800 nm.

Determinações cromatográficas foram realizadas em cromatógrafo em fase líquida LC-920 (Varian), equipado com detector UV (DAD). Em todas as análises foi utilizada uma coluna de sílica C18 (microsorb- MV100-5, 250 x 4,6 mm; 5  $\mu$ m), pré coluna C8 da mesma marca e software GALAXIE v 1.9.

### III.4.3 Metodologia

#### III.4.3.1. Desenvolvimento do modelo multivariado

Os modelos multivariados foram desenvolvidos a partir de um conjunto de calibração formado por 44 amostras contendo fenol e subprodutos (HQ, PC, p-BQ, RS), nas concentrações apresentadas na Tabela III.01. Para simulação de um processo de degradação, as misturas foram preparadas com uma maior concentração relativa de fenol, enquanto que, para não extrapolar a faixa linear de trabalho, a concentração total de cada mistura foi mantida em 30 mg L<sup>-1</sup>.

A elaboração dos modelos envolveu o uso de diversos sistemas de pré-processamento de sinais, assim como de diversos números de variáveis latentes. Os modelos de melhor desempenho foram selecionados utilizando-se como critério a minimização do erro de previsão na validação cruzada, processada por uma rotina de *leave-one-out*.

A avaliação final dos modelos envolveu a verificação de anomalias, utilizando-se os parâmetros de resíduos de Student e leverage, e a comparação de resultados com os obtidos por aplicação do método cromatográfico de referência, utilizando-se o conjunto de validação externa como elementos de previsão.

**Tabela III.1.** Conjunto de calibração para a quantificação de fenol e seus principais subprodutos

Amostra	Concentração (mg L <sup>-1</sup> )				
	Fenol	Hidroquinona	Pirocatecol	Resorcinol	p-Benzoquinona
01	30	0	0	0	0
02	28	2	0	0	0
03	28	0	2	0	0
04	28	0	0	2	0
05	28	0	0	0	2
06	28	0,5	0,5	0,5	0,5
07	26	4	0	0	0
08	26	0	4	0	0
09	26	0	0	4	0
10	26	0	0	0	4
11	26	1	1	1	1
12	24	6	0	0	0
13	24	0	6	0	0
14	24	0	0	6	0
15	24	0	0	0	6
16	24	1,5	1,5	1,5	1,5
17	22	8	0	0	0
18	22	0	8	0	0
19	22	0	0	8	0
20	22	0	0	0	8
21	22	2	2	2	2
22	20	10	0	0	0
23	20	0	10	0	0
24	20	0	0	10	0
25	20	0	0	0	10
26	20	2,5	2,5	2,5	2,5
27	18	12	0	0	0
28	18	0	12	0	0
29	18	0	0	12	0
30	18	0	0	0	12
31	18	3	3	3	3
32	16	14	0	0	0
33	16	0	14	0	0
34	16	0	0	14	0
35	16	0	0	0	14
36	16	3,5	3,5	3,5	3,5
37	14	16	0	0	0
38	14	0	16	0	0
39	14	0	0	16	0
40	14	4	4	4	4
41	12	18	0	0	0
42	12	0	18	0	0
43	12	0	0	18	0
44	12	4,5	4,5	4,5	4,5

### *III.4.2.2 Degradação de fenol utilizando processo de fotocatalise heterogênea mediada por TiO<sub>2</sub> e radiação UVA*

Os estudos de fotodegradação foram realizados em um reator fotoquímico de bancada de 250 mL de capacidade, equipado com camisa de refrigeração por água e sistema de agitação magnética. A radiação foi proporcionada por uma lâmpada a vapor de mercúrio (125 W), inserida na solução com a ajuda de um bulbo de vidro. Todos os ensaios de fotocatalise foram realizados em pH 5,5, que corresponde ao pH natural de soluções aquosas de fenol.

Neste reator, soluções aquosas de fenol (200 mL, 30 mg L<sup>-1</sup>) foram adicionadas de 100 mg de TiO<sub>2</sub> e irradiadas por tempos de até 120 min. Amostras foram coletadas a cada 15 min, filtradas em membrana de acetato de celulose de 0,45 µm (Millipore) e submetidas a análise espectrofotométrica. Posteriormente as amostras foram diluídas, tipicamente 10 vezes, e analisadas por cromatografia em fase líquida.

### *III.4.2.3. Controle analítico*

Para determinação cromatográfica de fenol e sub-produtos foi estabelecida uma rotina fundamentada em métodos descritos na literatura.<sup>[30]</sup> Para tanto, a fase móvel consistiu de uma mistura de água ultrapura (solvente A) e acetonitrila (solvente C), utilizada conforme o programa descrito a seguir:

- 0-10 min: 15% C (isocrática)
- 10-16 min: 15-60% C (gradiente linear)
- 16-22 min: 60-100% C (gradiente linear)
- 22-26min: 100%C (isocrática)
- 26-27 min: 100-15%C (gradiente linear)
- 27- 36 min: 15%C (isocratica).

As condições cromatográficas foram: vazão de 0,6 mLmin<sup>-1</sup>; volume de injeção de 50 µL; e detector UV foi utilizado no comprimento de onda de 212 nm para quantificar hidroquinona, resorcinol, catecol e fenol e 247 nm para a p-benzoquinona. Curvas analíticas individuais foram preparadas a partir de padrões puros, na faixa compreendida entre 0,005 a 5,00 mg L<sup>-1</sup>.

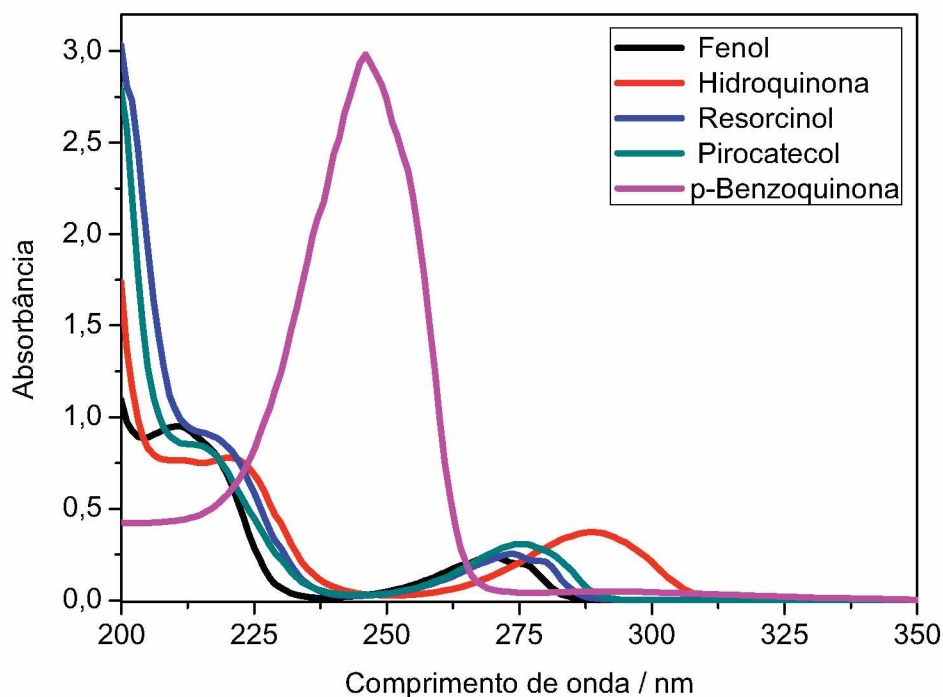


### III.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### III. 5.1 Determinação de fenol e subprodutos de degradação fotocatalítica.

A determinação de fenol e subprodutos *via* espectrofotometria UV-vis é uma alternativa interessante, em razão do baixo custo dos equipamentos, da rapidez na aquisição de resultados e das claras possibilidades de automação para controle on-line. Entretanto, o fato do sinal espectrofotométrico se dar na forma de bandas largas implica frequentes problemas de interferência espectral na análise de misturas de natureza química similar.

Neste caso, fenol e os principais subprodutos da sua degradação fotocatalítica apresentam um intenso sinal na região ultravioleta (Figura III.02), com um grau de sobreposição espectral que inviabiliza qualquer sistema de calibração convencional e sugere a necessidade de sistemas de calibração que operem adequadamente em sistemas de informação difusa, como a regressão por mínimos quadrados parciais (PLS).



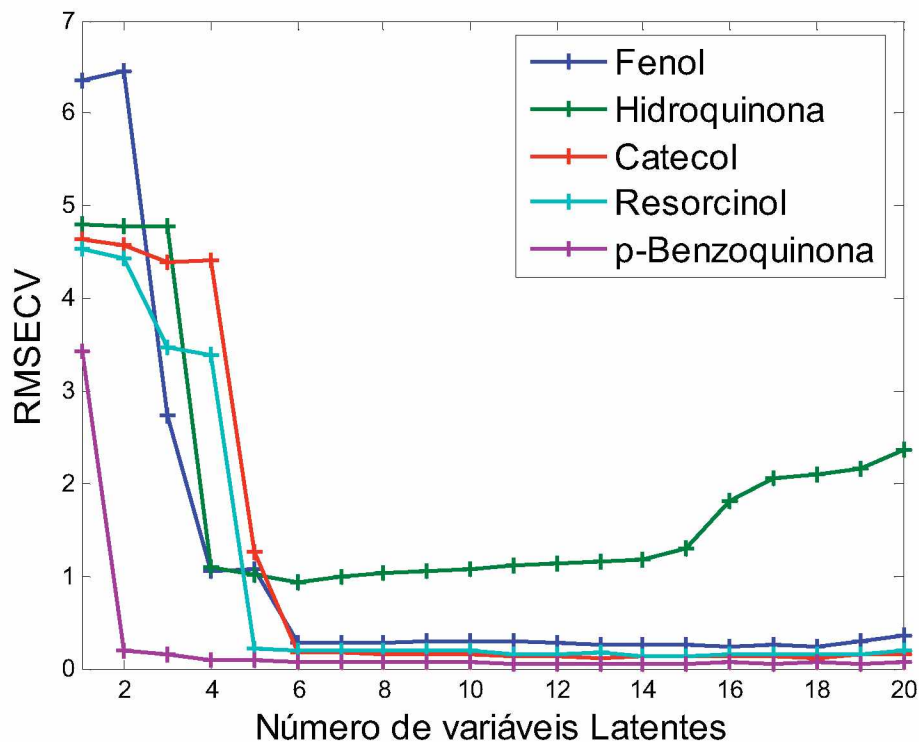
**Figura III.02.** Espectros de absorção de fenol e a seus principais subprodutos (hidroquinona , resorcinol , pirocatecol , p- benzoquinona ) na concentração de 15 mg L<sup>-1</sup>.

Utilizando-se o conjunto de calibração formado por 44 misturas sintéticas foram desenvolvidos modelos multivariados de calibração, utilizando-se os espectros de absorção

registrados entre 206 e 350 nm, previamente submetidos a alisamento pelo algoritmo de Savitzky-Golay (janela móvel).

Utilizando-se o recurso da validação cruzada (sistema *leave-one-out*) foi possível observar que o uso de 6 variáveis latentes (VLs) permite a minimização do erro de previsão (RMSECV: Root Mean Square Error of Cross Validation), levando-se em consideração a determinação simultânea de todas as espécies em estudo (Figura III. 03).

De acordo com os valores de variância capturada apresentados na Tabela III.2, a primeira VL representa grande parte da variância global dos dados espectrais (89,51%), sem, no entanto, permitir uma boa modelagem da mistura de compostos (elevado valor de RMSECV). Desta forma, a inclusão de novas VLs se justifica, principalmente para a previsão das concentrações de pirocatecol e resorcinol, que diminuem significativamente o valor de RMSECV com a inclusão de uma sexta VL. Embora esta última VL capture uma variância desprezível do bloco de dados espectrais (X), observa-se que contribui de maneira importante (0,37%) com a modelagem da concentração (matriz Y), estendendo a variância acumulada a valores de 99,86%.



**Figura III.03:** Evolução dos valores de RMSECV pelo número de variáveis latentes.

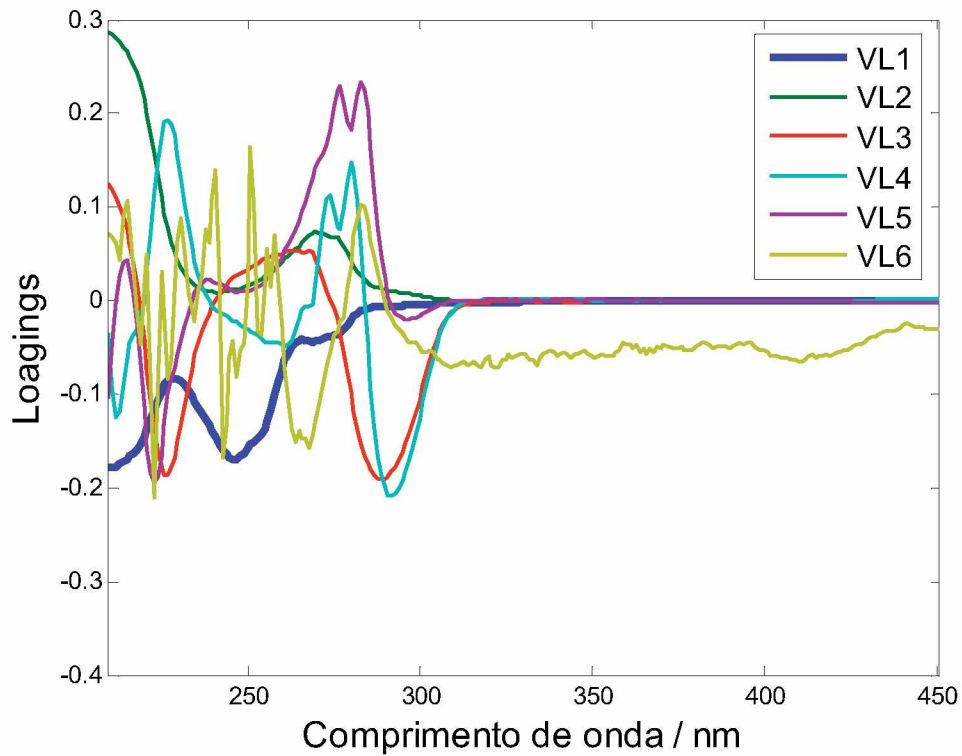
**Tabela III.2.** Porcentagem de variância capturada pelo modelo construído utilizado alisamento em 5 pontos e 6 variáveis latentes.

VL	Bloco X		Bloco Y	
	Esta VL	Cumulativa	Esta VL	Cumulativa
1	89,51	89,51	79,54	79,54
2	9,64	99,15	2,56	82,10
3	0,47	99,61	8,10	90,20
4	0,35	99,96	4,72	94,92
5	0,04	100	4,57	99,49
6	0,00	100	0,37	99,86
7	0,00	100	0,03	99,86

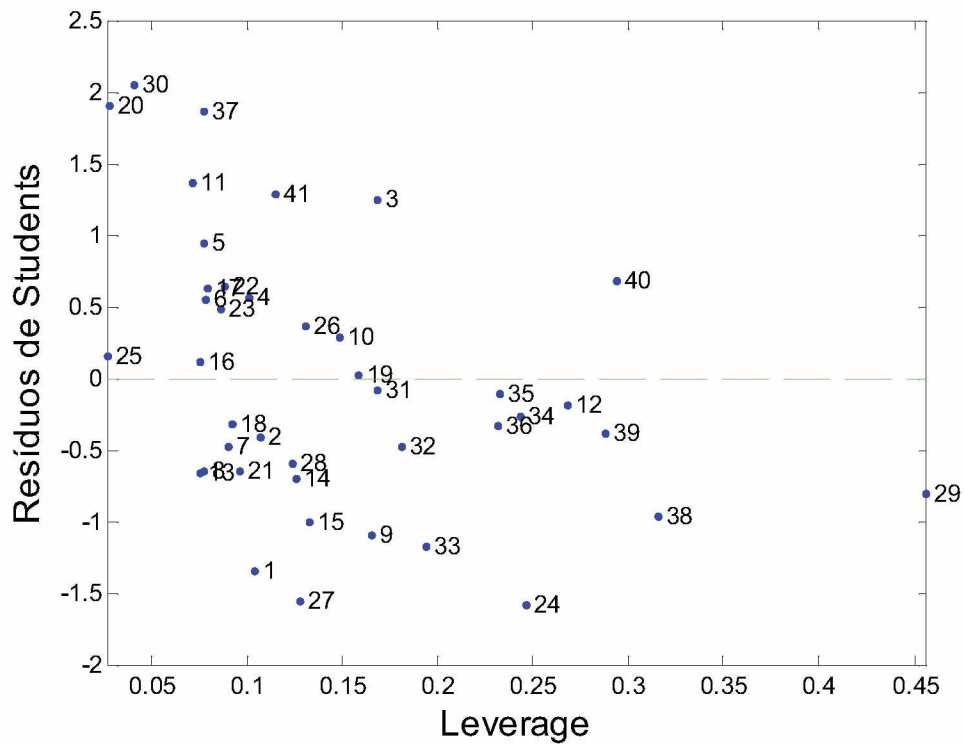
É interessante salientar que cada amostra do conjunto de calibração é representada por aproximadamente 240 valores de absorvância, registrados em igual número de comprimentos de onda. A primeira etapa do procedimento multivariado demonstra que grande parte da variância dos dados pode ser representada por um pequeno número de novas variáveis (VL), as quais surgem da combinação linear das variáveis originais. Se um pequeno número de VL é utilizado para representar a variância registrada nos espectros, o desenvolvimento de um modelo de calibração fica extremamente facilitado.

Analisando-se o peso (*loadings*) de cada variável original na elaboração das variáveis latentes (Figura III.04) é possível observar uma boa semelhança entre o perfil deste parâmetro e os espectros individuais anteriormente apresentados (Figura III.02). Trata-se de uma observação de extrema relevância, uma vez que demonstra a correspondência existente entre VLS e dados espectrais, assim como o caráter complementar de cada uma delas.

Na Figura III.05 são apresentados os dois critérios de maior importância para a verificação de anomalias no conjunto de calibração, os resíduos de Student e os valores de Leverage. Por definição, os valores máximos permitidos para estes parâmetros são 2,5 e 0,41 (3 VL/N), respectivamente.<sup>[31]</sup> Utilizando-se estes argumentos, observa-se que a amostra 29 possui altos valores de *leverage*, o que implica algum tipo de incoerência no seu comportamento espectral. Não apresentando uma composição que pudesse justificar um comportamento espectral diferenciado, referida amostra foi retirada do conjunto de calibração.

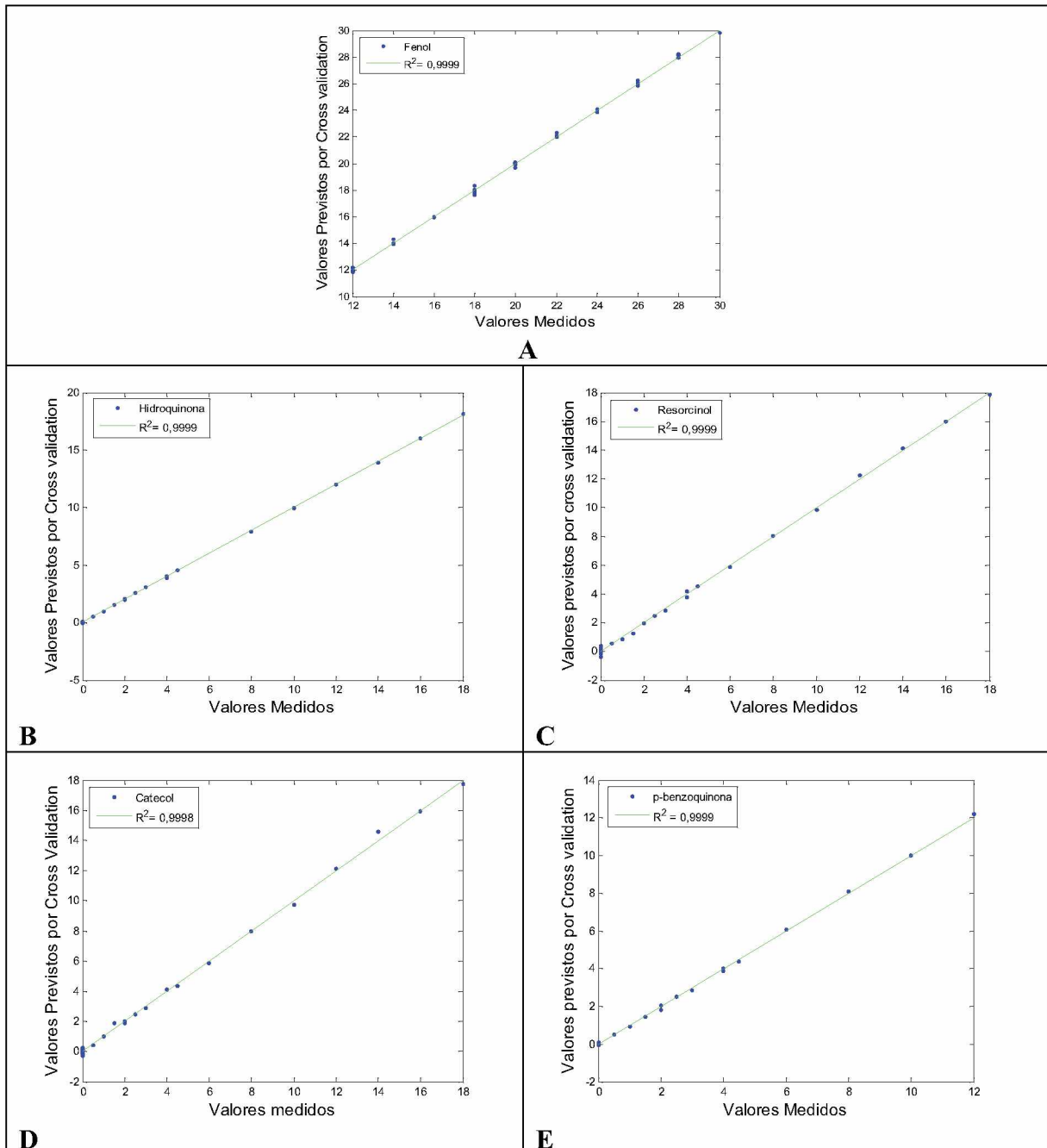


**Figura III.04.** Gráfico de Loadings para as 6 variáveis latentes do modelo construído



**Figura III.05.** Gráfico dos resíduos de *students versus Leverage* para o modelo construído com 06 variáveis latentes.

A seguir, foi avaliada a capacidade de previsão do modelo no processo de validação cruzada, observando-se os resultados apresentados na Figura III.06. observa-se neste gráfico que existe uma coerência perfeita entre valores reais e previstos ( $R^2 > 0,99$ ), o que, pelo menos antecipadamente, permite prever uma boa capacidade de previsão do modelo multivariado desenvolvido.



**Figura III.06.** Gráfico dos valores reais versus valores previstos por validação cruzada (Cross Validation – Leave one out) para (A) Fenol; (B) Hidroquinona; (C) Resorcinol; (D) Catecol; (E) p-Benzoquinona

Finalmente, a capacidade de previsão do modelo foi avaliada frente ao conjunto de validação externa (conjunto de misturas sintéticas que não foram utilizadas na etapa de calibração), obtendo-se os resultados apresentados na Tabela III.3. Estes resultados mostram erros relativos médios de previsão inferiores a 5%, assim como baixos valores de estimativa de desvio padrão entre replicatas, o que, em primeira análise, sugere uma boa potencialidade da associação entre espectrofotometria e calibração multivariada para os fins pretendidos.

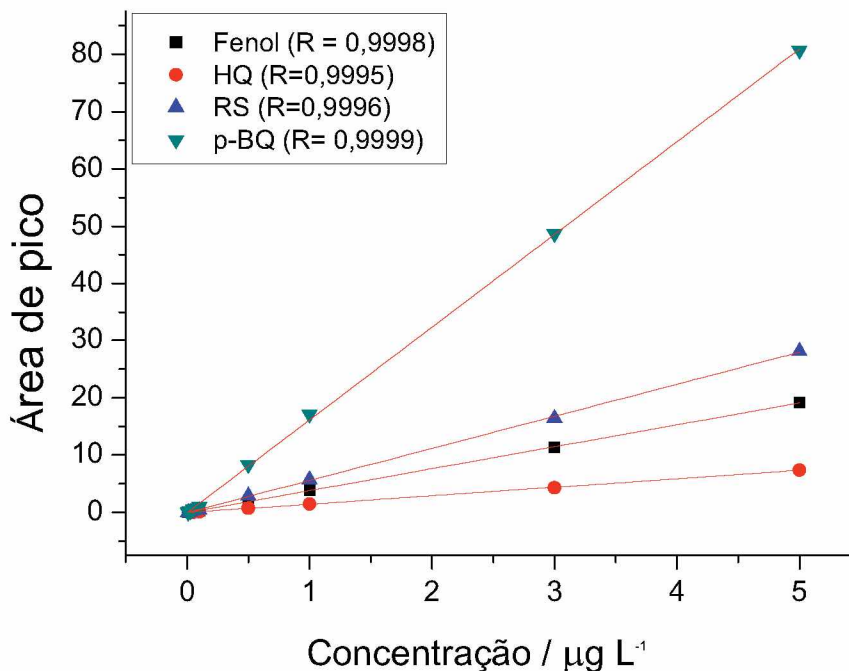
A capacidade de previsão do modelo multivariado proposto foi avaliada em amostras oriundas de um processo de degradação fotocatalítica de fenol, utilizando-se um método cromatográfico como referência. Referido método cromatográfico mostrou excelente linearidade (Figura III.7), na faixa de concentração compreendida entre 5 e 5000  $\mu\text{g L}^{-1}$  para fenol, 25 e 5000  $\mu\text{g L}^{-1}$  para hidroquinona e 7,5 e 5000  $\mu\text{g L}^{-1}$  para resorcinol e p-benzoquinona. É importante salientar que catecol não pode ser determinado nas condições cromatográficas estabelecidas, o que é usual em métodos cromatográficos similares.

Nos resultados apresentados na Tabela III.4 é possível observar uma aproximação relativamente boa entre o método multivariado e o método de cromatográfico de referência, uma vez que ambos indicam concentrações da mesma ordem de grandeza. Maiores discrepâncias foram observadas apenas nas determinações de catecol e resorcinol, basicamente devido às limitações da rotina cromatográfica, visto que o catecol não pôde ser determinado nas condições cromatográficas adotadas e os níveis de concentração de resorcinol gerados durante o processo estiveram abaixo dos limites de quantificação cromatográficos.

Estes resultados estão em conformidade com resultados apresentados por Sobczynski et al (2004), que relatou concentrações de HQ da ordem de 4  $\text{mg L}^{-1}$  durante a degradação fotocatalítica de fenol em condições similares às deste trabalho, monitorando o processo por CG-MS.

**Tabela III.3.** Resposta prevista e erros obtidos pelo modelo multivariado PLSR para a previsão de Fenol, hidroquinona, catecol, resorcinol e p-Benzoquinona.

Valor Real					Valor previsto					Erro absoluto					Erro relativo				
Fenol	HQ	CT	RS	p-BQ	Fenol	HQ	CT	RS	p-BQ	Fenol	HQ	CT	RS	p-BQ	Fenol	HQ	CT	RS	p-BQ
23,00	1,75	1,75	1,75	1,75	22,97	1,61	1,74	1,79	1,71	- 0,03	- 0,14	-0,01	0,04	- 0,04	- 0,14	-7,85	- 0,83	2,01	- 2,17
23,00	1,75	1,75	1,75	1,75	23,10	1,62	1,64	1,75	1,68	0,10	-0,13	-0,11	0,00	- 0,07	0,44	- 7,46	- 6,10	- 0,07	- 3,78
17,00	3,25	3,25	3,25	3,25	17,00	3,23	3,21	3,26	2,85	0,0	- 0,02	- 0,04	0,01	- 0,40	0,0	-0,55	- 1,19	0,43	- 12,21
17,00	3,25	3,25	3,25	3,25	16,98	3,22	3,20	3,15	3,21	- 0,02	- 0,03	- 0,05	0,10	- 0,04	-0,12	-0,88	- 1,55	- 3,14	- 1,18
15,00	3,75	3,75	3,75	3,75	15,20	3,79	3,75	3,72	3,70	0,20	0,04	0,00	0,03	-0,05	1,36	1,20	0,07	- 0,85	- 1,25
15,00	3,75	3,75	3,75	3,75	15,26	3,73	3,77	3,48	3,64	0,26	- 0,02	0,02	0,27	- 0,11	1,71	- 0,65	0,51	- 7,13	- 3,01
25,00	1,25	1,25	1,25	1,25	25,22	1,13	1,38	1,20	1,23	0,22	- 0,12	0,13	0,05	- 0,02	0,88	- 9,78	10,10	-3,86	-1,90
25,00	1,25	1,25	1,25	1,25	25,16	1,31	1,27	1,29	1,11	0,16	0,06	0,02	0,04	- 0,14	0,62	4,97	1,33	3,31	-11,31
<b>ERRO RELATIVO MÉDIO</b>															<b>0,66</b>	<b>4,17</b>	<b>2,71</b>	<b>2,60</b>	<b>4,60</b>



**Figura III.07.** Curvas analíticas obtidas pela análise cromatográfica de fenol, hidroquinona, resorcinol e p-benzoquinona.

**Tabela III.4.** Concentração de fenol e seus principais subprodutos de degradação previstos pelo modelo multivariado.

Tempo (min)	Concentração (mg L <sup>-1</sup> )									
	Modelo UV-Vis/PLSR					HPLC				
	FN	HQ	PC	RS	pBQ	PH	HQ	PC	RS	pBQ
0	26,09	-	-	6,09	-	34,37	<LQ	-	<LQ	<LQ
5	18,92	4,00	-	6,33	0,23	24,79	3,82	-	<LQ	0,73
10	18,87	3,80	0,31	4,44	0,19	23,66	4,26	-	<LQ	0,56
30	18,67	3,54	0,54	4,05	0,17	23,56	2,24	-	<LQ	1,32
60	17,28	4,15	0,01	3,80	0,22	22,16	2,75	-	<LQ	1,67
120	9,33	6,49	0,43	1,86	0,34	11,02	7,25	-	<LQ	1,36



### III.6. CONCLUSÕES

Modelos multivariados fundamentados em espectroscopia ultravioleta e regressão por mínimos quadrados parciais permitem a quantificação simultânea de fenol e dos principais subprodutos observados durante a sua degradação fotocatalítica, o que representa uma boa alternativa aos métodos cromatográficos, tradicionalmente utilizados com este objetivo.

Características como rapidez, simplicidade operacional e baixo custo são marcantes nesta associação, o que sugere inúmeras aplicações neste tipo de monitoramento, desde que os principais subprodutos de degradação sejam conhecidos

### III.7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] BARRAULT, J, BOUCHOULE. C., TATIBOUËT. J.-M., ABDELLAOUI. M., MAJESTÉ. A., LOULOUDI. I. , PAPAYANNAKOS. N., GANGAS. N.H., Catalytic wet peroxide oxidation over mixed (Al-Fe) pillared clays. In: Avelino Corma. Francisco V. Melo. Sagrario Mendioroz and José Luis G. Fierro. Editor(s). *Studies in Surface Science and Catalysis. Elsevier*. **2000**. v.130, 749-754.
- [2] PHU., N.H., HOA, T.T.K., TAN, N.V., THANG, H.V., HA. P.L., Characterization and activity of Fe-ZSM-5 catalysts for the total oxidation of phenol in aqueous solutions. *Applied Catalysis B: Environmental*. **2001**, v. 34.(4), 267-275.
- [3] ZHOU, G.M; HERBERT H.P., Co-degradation of phenol and m-cresol in a UASB reactor. *Bioresource technology*, **1997**, v. 61, 47-52.
- [4] GUERRA. R., Ecotoxicological and chemical evaluation of phenolic compounds in industrial effluents. *Chemosphere*, **2001**, v.44(8) 1737-1747.
- [5] GENNARO. M. C.. An electrochemical process for the degradation of sulfonate-and phenol-derivatives in industrial effluents. *Journal of Environmental Science & Health Part A*, **1997**, v. 32(3), 735-747.
- [6] COLARIETI, TOSCANO.G., GRECO, G., Soil-catalyzed polymerization of phenolics in polluted waters. *Water research*, **2002**, v. 36.12, 3015-3022.

- [7] Disponível em :  
[http://www.legislacao.mutua.com.br/pdf/diversos\\_normativos/conama/2011\\_CONAMA\\_RES\\_430.pdf](http://www.legislacao.mutua.com.br/pdf/diversos_normativos/conama/2011_CONAMA_RES_430.pdf). Acesso em: 20 de março de 2015.
- [8] LI. M., FENG. C.P., HU. W.W., ZHANG. Z.Y. N. Sugiura Electrochemical degradation of phenol using electrodes of Ti/RuO<sub>2</sub>-Pt and Ti/IrO<sub>2</sub>-Pt *J. Hazard. Mater.* **2009**, v.162, 455–462.
- [9] COMNINELLIS, C., NERINI, A., Anodic oxidation of phenol in the presence of NaCl for wastewater treatment *J. Appl. Electrochem.* **1995**, v. 25, 23–28.
- [10] KORBAHTI, B.K., TANYOLAC, A., Continuous electrochemical treatment of phenolic wastewater in a tubular reactor, *Water Res.*, **2003**, v.37, 1505–1514.
- [11] RAJKUMAR, D., PALANIVELU, K., Electrochemical treatment of industrial wastewater, *J. Hazard. Mater.*, **2004**, v. 113, 125–131.
- [12] WANG, K.H., HSIEH Y.H., CHEN, L.J., The heterogeneous photocatalytic degradation. intermediates and mineralization for the aqueous solution of cresols and nitrophenols, *J. Hazard. Mater.*, **1998**, v. 59, 251–260.
- [13] CHIOU. C., WU. C., JUANG R., Photocatalytic degradation of phenol and m-nitrophenol using irradiated TiO<sub>2</sub> in aqueous solutions. *Sep. Purif. Technol.*, **2008**, v. 62, 559–564.
- [14] WANG, Y.Z., HU. C., TANG, H.X., Photocatalytic oxidation of phenol on TiO<sub>2</sub> particle *J. Environ. Sci.* **1995**, v. 15, 472–479.
- [15] SOBCZYNSKI, A., DUCZMAL, L., ZMUDZINSKI W., Phenol destruction by photocatalysis on TiO<sub>2</sub>: an attempt to solve the reaction mechanism *J. Mol. Catal. A: Chem.* **2004**, v. 213, 225–230
- [16] CASTILLO, I.D., HERNÁNDEZ, P., LAFUENTE, A., RODRÍGUEZ-LLORENTE, I.D., CAVIEDES, M.A., PAJUELO, E., Self-bioremediation of cork-processing wastewaters by (chloro)phenol-degrading bacteria immobilised onto residual cork particles, *Water Research*, **2012**, v. 46(6), 1723-1734.

- [17] PRAVEEN, P., LOH, K., Solventless extraction/stripping of phenol using trioctylphosphine oxide impregnated hollow fiber membranes – Experimental & modeling analysis, *Chemical Engineering Journal*, **2014**, v. 255, 641-64.
- [18] D. HANK, Z. AZI, S. AIT HOCINE, O. CHAALAL, A. HELLAL, Optimization of phenol adsorption onto bentonite by factorial design methodology, *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, **2014**, v. 20(4), 2256-2263.
- [19] BRITTO, J.M., RANGEL, M.C. Processos avançados de oxidação de compostos fenólicos em efluentes industriais. *Química Nova*, **2008**, v. 31(1), 114-122.
- [20] WANG, K.H., HSIEH. L.J. Chen The heterogeneous photocatalytic degradation. intermediates and mineralization for the aqueous solution of cresols and nitrophenols *J. Hazard. Mater.*. **1998**, v. 59, 251–260.
- [21] CHIOU, C., WU, C., JUANG R., Photocatalytic degradation of phenol and m-nitrophenol using irradiated TiO<sub>2</sub> in aqueous solutions *Sep. Purif. Technol.*. **2008**, v. 62, 559–564
- [22] WANG, Y.Z., HU, C., TANG, H.X., Photocatalytic oxidation of phenol on TiO<sub>2</sub> particle., *J. Environ. Sci.*. **1995**, v. 15, 472–479.
- [23] SOBCZYNSKI, A., DUCZMAL, L., ZMUDZINSKI, W., Phenol destruction by photocatalysis on TiO<sub>2</sub>: an attempt to solve the reaction mechanism *J. Mol. Catal. A: Chem.*. **2004**, v. 213. 225–230.
- [24] FERNÁNDEZ-IBÁÑEZ. P.. MALATO. S.. DE LAS NIEVES. F.J. Relationship between TiO<sub>2</sub> particle size and reactor diameter in solar photoreactors efficiency , *Catalysis Today*, **1999**, v. 54 (2-3), 195-204.
- [25] LITTER. M.I. Heterogeneous photocatalysis: Transition metal ions in photocatalytic systems., *Applied Catalysis B: Environmental*. **1999**, v. 23 (2-3) 89-114.
- [26] HOFFMANN, M.R., MARTIN, S.T., CHOI, W., BAHNEMANN, D., Environmental Applications of Semiconductor. *Photocatalysis Chem. Rev.*. **1995**, v. 95, 69.

- [27] KARTAL, Ö.E., EROL. M., OĞUZ. H., Photocatalytic Destruction of Phenol by TiO<sub>2</sub> Powders. *Chem. Eng. Technol.* **2001**, v. 24, 645.
- [28] MYLONAS. A.. PAPACONSTANTINO. E.. ROUSSIS. V. Photocatalytic degradation of phenol and p-cresol by polyoxotungstates. Mechanistic implications *Polyhedron*. **1996**, v. 15 (19). 3211-3217.
- [29] SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. Princípios de Análise Instrumental.6 edição. Porto Alegre - RS: Bookman, **2009**. 1055 p.
- [30] CESARINO. I.; MORAES. F.C.; FERREIRA. T.C.R.; LANZA.M.R.V.;MACHADO.S.A.S. Real-time electrochemical determination of phenolic compounds after benzene oxidation. *Journal of Electroanalytical Chemistry.*, **2012**, v. 672., 34-39.
- [31] FERREIRA. M. M. C.; ANTUNES. A. M.; MELGO. M. S.; VOLPE. P. L. O.; Quimiometria I: Calibração multivariada. um tutorial. *Quim. Nova*. **1999**, v. 22.. 724.

# Capítulo IV

Estudo da correlação entre a presença de poluentes orgânicos em águas superficiais e as alterações na expressão gênica de *E. coli*.

## IV.1. INTRODUÇÃO

### *IV.1.1 Análise do efeito dirigido (EDA)*

De maneira geral, percebe-se que a análise química orientada à determinação de poluentes orgânicos específicos não contribui com respostas que possam ser correlacionadas com o risco biológico real, em razão de efeitos sinérgicos que são frequentes em amostras ambientais de caráter complexo. Desta forma, a observância dos limites estabelecidos pela legislação, internacionalmente fundamentada em listas de poluentes prioritários, nem sempre garante a inocuidade e a segurança, em virtude da ausência de espécies que podem contribuir com a toxicidade global da amostra, mas são negligenciados em programas de monitoramento.<sup>[1]</sup> Além disso, deve-se levar em conta o surgimento frequente de novas substâncias químicas, cujas propriedades toxicológicas não são estudadas antes de serem colocadas em circulação.

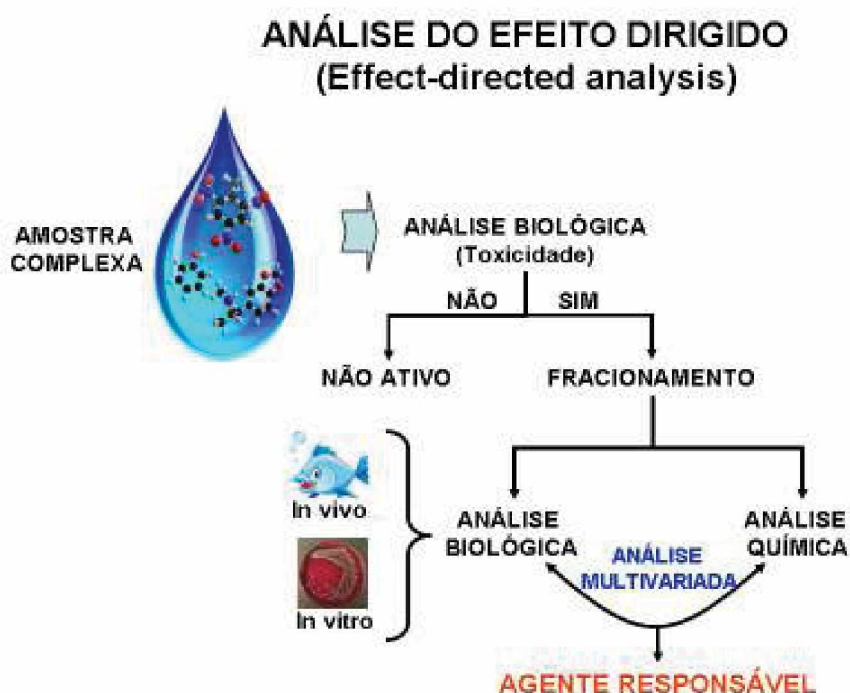
Ainda que a presença e a quantidade dos poluentes orgânicos em um compartimento ambiental sejam conhecidas, a avaliação do risco biológico associado à exposição a estas misturas complexas de poluentes é ainda um grande desafio.<sup>[2,3]</sup> Métodos mais abrangentes são, portanto, extremamente necessários para avaliar esse tipo de risco e para desvendar as relações entre causas e efeitos. Investigações integradas, tais como o análise de efeito-dirigido (EDA)<sup>[4-6]</sup>, podem oferecer uma abordagem racional para a identificação de agentes tóxicos conhecidos e desconhecidos em amostras ambientais, bem como estabelecer a ligação entre a presença destes compostos e os efeitos toxicológicos mensuráveis.<sup>[7]</sup>

A análise efeito-dirigido (EDA), também conhecida como análise química dirigida por bioensaio<sup>[8]</sup>, tem como objetivo estabelecer um correlação de causalidade entre as substâncias químicas e os efeitos biológicos em amostras ambientais<sup>[1,9]</sup>, sendo baseado em um conceito conhecido como "Avaliação e identificação de toxicidade", que foi introduzido pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (US EPA) na década de 1980.<sup>[10,11]</sup>

A ideia básica da EDA é reduzir progressivamente a complexidade das amostras ambientais através da remoção componentes não tóxicos, de modo a facilitar a identificação dos poluentes tóxicos restantes. Ela envolve a separação dos extratos de amostras em pedaços coerentes, chamados frações, que contêm compostos químicos orgânicos de funcionalidade ou polaridade semelhante. A potencialidade tóxica das frações é então testada aplicando-se

bioensaios e os resultados obtidos são usados para concentrar a análise química somente para as frações mais tóxicas. <sup>[1,12]</sup> Esta abordagem bioanalítica foi demonstrada como uma ferramenta valiosa para a identificação de toxicidade em vários tipos de matrizes ambientais, tais como solos, sedimentos, ar, e efluentes das águas subterrâneas. <sup>[9, 13-16]</sup>

EDA é composto por sucessivos ciclos de fracionamento (*in vitro* ou *in vivo*), que consistem basicamente em bioensaios e análises quantitativas de compostos orgânicos. O processo inicia-se com a extração e a remoção de impurezas de matriz (*clean up*), seguido de bioensaios. Os extratos das amostras que mostram efeitos adversos nos bioensaios selecionados são então fracionados, para reduzir a complexidade a um número limitado de compostos “candidatos”, visando melhorar a possibilidade de desvendar a sua identidade química (Figura IV.01). A confirmação é dada por análise cromatográfica (confirmação química) e a comprovação do potencial tóxico no bioensaio utilizado (confirmação toxicológica). Este passo de confirmação é comparado também a toxicidade observada inicialmente na amostra, e, ao final, procura-se a correlação dos efeitos com mistura de substâncias identificadas. <sup>[1]</sup>



**Figura IV.01.:** Representação gráfica da Análise do efeito-dirigido (EDA), que é um procedimento iterativo para análise biológica e de fracionamento, seguido por análises químicas para identificar candidatos contaminantes ( "suspeitos") em extratos de amostras ambientais complexas.

### VI.1.2. Expressão gênica de *E. Coli* como bioensaio em Análise do efeito dirigido

Atualmente, diversos testes *in vitro* [4, 5] e *in vivo* [6, 7] podem ser usados como ferramentas de alerta para detectar efeitos no nível celular, antes que sejam manifestados nos ecossistemas. Além disso, muitos sistemas *in vitro* baseados em células oferecem a oportunidade de estudar o mecanismo molecular individual de toxicidade de cada poluente, incluindo parâmetros específicos, reativos e não específicos, bem como analisar várias respostas ao stress pela presença concomitante de vários poluentes orgânicos [4].

A reprodutibilidade das respostas, a quantidade de trabalhos já publicados utilizando este bioensaio, a dimensão do banco de dados referentes a testes frente à fontes de stress, bem como a facilidade operacional são pré-requisitos para selecionar o micro-organismo que será utilizado na bateria de bioensaios [4]. Só recentemente ensaios de expressão gênica se tornaram disponíveis como sistemas bioensaios em EDA. Estes sistemas de teste são capazes de analisar simultaneamente as alterações na transcrição de genes envolvidos em vários processos celulares [8, 9].

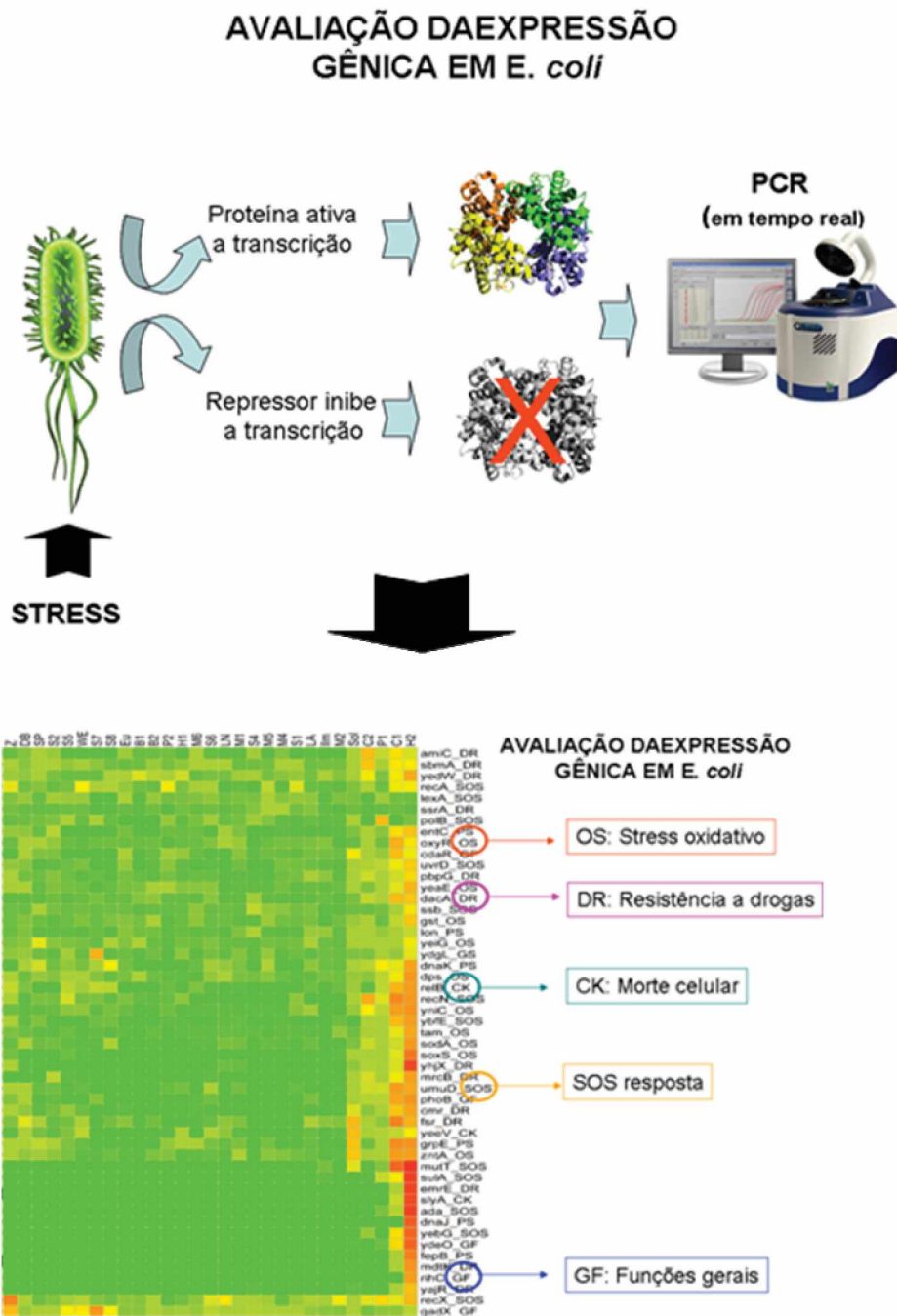
O perfil da expressão gênica dos organismos submetidos a stress pode ser determinada em tempo real, por meio de medições de fluorescência contínuas. Devido ao amplo conhecimento do material genético, a sensibilidade frente às condições ambientais sobre a expressão de alguns genes e o baixo volume de amostra necessário para a análise, bactérias como *Escherichia Coli* são utilizadas como uma ferramenta promissora na detecção das vias mais afetadas por poluentes ambientais e para a diferenciação dos efeitos. A matriz de células vivas de *E.Coli* pode decifrar o mecanismo de toxicidade e demonstrar efeitos subletais que afetam potencialmente o organismo, seu crescimento e reprodução.

A técnica de PCR em tempo real (PCR, do inglês Polymerase Chain Reaction), possibilita a síntese de fragmentos de DNA, através da enzima DNA-polimerase, enzima essa que é responsável pela replicação do material genético das células. Esta enzima sintetiza uma sequência complementar de DNA chamada cDNA, desde que um fragmento (primer) já esteja ligado a uma das cadeias de DNA no ponto selecionado para o início da síntese delimitando os genes. Esses iniciadores (primers) definem a sequência a ser replicada, resultando na amplificação de uma sequência de DNA com milhões de cópias<sup>[8]</sup>.

O PCR em tempo real permite a quantificação dos ácidos nucleicos (sequência de DNA) de maneira precisa e reprodutível, pois determina esses valores durante a fase exponencial da reação. A resposta monitorada é baseada em medidas de fluorescência usando,



tipicamente os reagentes SYBR Green ou TaqMan, realizada através de um termociclador acoplado a um sistema ótico para excitação da fluorescência. A medida de fluorescência é realizada antes e após a exposição ao stress, todos os genes que mantiverem a fluorescência serão atribuídos o valor 1, todos os genes que tiverem diminuição na expressão (down regulated) serão atribuídos valores menores que 1, já aos genes que tiverem aumento na expressão (up regulated) serão atribuídos valores maiores que 1 na matriz de dados gerada [9]. Um esquema simplificado está representando na Figura IV.02.



**Figura IV.02.:** Representação gráfica da avaliação da expressão gênica de *E.Coli*.

Alguns trabalhos relatados na literatura já analisaram as alterações na transcrição dos genes da *E. Coli* mediante a exposição a produtos químicos individuais [9-13]. Padrões de efeito característico de produtos químicos foram identificados para prever a presença de poluentes ambientais com base nos efeitos sobre a transcrição [15, 16]. Recentemente, as primeiras correlações entre efeitos sobre a transcrição e informação química foram determinadas em amostras ambientais [14]. Embora promissor, ensaios baseados em células microbianas ao vivo raramente foram testados para a aplicabilidade às misturas ambientais complexas e ainda não foram aplicados no monitoramento dos recursos hídricos.

Devido à conservação evolutiva de muitas respostas ao estresse e outras vias de bactérias aos vertebrados e a importância das vias microbianas em ciclos metabólicos e, portanto, funções do ecossistema, os resultados dos ensaios de gene repórter microbiana podem fornecer informações relevantes para organismos superiores, incluindo vertebrados [9].

Os resultados utilizados nesta etapa foram produzidos pelo grupo de Análises Químicas Direcionadas pelo Efeito Biológico (ADEB), "Effect-directed analysis" (EDA), do instituto Helmholtz Zentrum für Umweltforschung (ufz) localizado na cidade Lísia (Alemanha). É importante salientar que a participação da subscrita neste trabalho foi bem pontual, sendo delimitada ao tratamento e análise estatística dos dados. Em função disto, as abordagens gerais utilizadas na coleta, caracterização química e análise da expressão gênica foram resumidamente apresentadas neste documento.

## **IV.2. OBJETIVO GERAL**

Correlacionar, através de modelos de calibração multivariada, os efeitos observados na expressão gênica de *E. Coli* exposta em águas superficiais da bacia do Rio Elbe (Leipzig – Alemanha) com os poluentes determinados nestas mesmas amostras.

## **IV.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Agrupar, de modo a reduzir a complexidade das matrizes de dados, os poluentes orgânicos determinados nos 31 sítios coletados.

Analisar os dados de expressão gênica, de forma a identificar os principais efeitos e localizar as amostras que causam os efeitos de maior intensidade.

Analisar a capacidade de correlação de modelos multivariados em matrizes de dados de alta complexidade.

## IV.4. MATERIAIS E MÉTODOS

### *IV.4.1 Materiais e equipamentos*

Solventes, como, metanol, acetona e acetato de etila, foram de grau cromatográfico de pureza. Reagentes utilizados nos processos de extração em fase sólida, como acetato de amônia (P.A.), amônia (25% solução aquosa) e ácido fórmico (grau analítico, 98%), foram fornecidos pela Merck. Cloreto de sódio foi fornecido pela Sigma – Aldrich e extrato de levedura e Tryptone foi fornecido pela Oxoid.

A concentração dos 108 compostos foi determinada em amostras de águas superficiais por cromatografia em fase líquida com detecção por espectrometria de massas de alta resolução (LC-HRMS). Os analitos alvos incluem produtos farmacêuticos, pesticidas, surfactantes, produtos químicos de aplicação industrial e adoçantes artificiais, os quais foram selecionados com base em sua presença em amostras de água. <sup>[17-22]</sup>

Os efeitos na expressão gênica em *E.coli* foram realizadas em meio LB-Lennox com 25 mg L<sup>-1</sup> de canamicina tamponada com HEPES 50 mM (pH 7,4).

### *IV.4.2. Preparação das amostras*

As amostras de águas naturais foram submetidas a um processo de extração em fase sólida, utilizando-se procedimento adaptado de Huntscha et al<sup>[23]</sup>. O processo foi aplicado em cartuchos Isolute® ENV + (Biotage) contendo 375 mg de fase polimérica e, como camada inferior, 250 mg de um trocador aniônico fraco (Chromabond® HR- XAW , Macherey Nagel) e 250 mg de um trocador catiônico fraco (Chromabond® HR- XCW , Macherey - Nagel), como camada inferior.

As amostras de água foram inicialmente ajustadas para um pH de 6,5, filtradas através de filtros de fibra de vidro (GF/F, Whatman – 0,45 µm de poro) e extraídas em alíquotas de 1,25 ml no cartucho de SPE. O volume dos eluídos combinados foi reconstituído a 50 µL com acetato de etila. Os extratos foram armazenados a -20 ° C até as leituras.

#### *IV.4.3 Caracterização Biológica das amostras*

As bactérias foram lavadas com meio LB e tingidas. Perdas de bactérias foram examinadas por comparação com os controles centrifugados e não centrifugados. As medidas das expressões gênicas foram realizadas após a centrifugação e 1 hora do tingimento (fluorescência azul – vermelho) com azul de Alamar.

#### *IV.4.4. Análise de dados dos resultados dos ensaios de expressão gênica*

Todas as medições de expressões gênicas foram normalizadas para contabilizar a fluorescência background e/ou da absorção das amostras. Todas as alterações nas medidas mais baixas do que o dobro do desvio padrão dos valores da estirpe sem promotor foram definidas como zero, a fim de remover as alterações na expressão de genes irrelevantes.

Para determinar a alteração máxima, as medições de expressão gênica foram realizadas em triplicata sendo que a variação máxima de dobragem para a combinação do gene - amostra foi calculada a partir de medidas de DMSO como referência.

#### *IV.4.5. Modelos de classificação e modelagem*

Os dados dos compostos químicos analisados foram estruturados em uma matriz X, contendo uma linha por amostra de água superficial (31 linhas) e uma coluna por composto químico (inicialmente, 108 compostos). Valores faltantes (não determinados) no conjunto de dados contendo a concentração dos poluentes foram substituídos pela metade do valor do limite de quantificação.

Os dados de expressão gênica foram estruturados em uma matriz Y, contendo 31 linhas e uma coluna por variável, correspondendo à expressão de 58 genes para 3 quantidades de amostra de água superficial adicionada (total: 174 respostas). Todos os genes que apresentaram alterações em suas expressões no ensaio denominado branco (bactérias tratadas com água ultra-pura) foram sumariamente excluídos. O conjunto de dados de expressão gênica foi processando conforme mostrado em Zhang et al.2011 <sup>[24]</sup>, Su et al. 2012 <sup>[25]</sup> e Su 2013<sup>[26]</sup>.

Estudos de PCA foram realizados com base na matriz X (31 × 108), objetivando determinar agrupamentos (semelhanças) entre as variáveis de resposta.

Posteriormente foram desenvolvidos modelos PLS, buscando encontrar as relações entre os compostos químicos determinados e os efeitos observados na expressão gênica. O PLS foi inicialmente realizado com todos os 108 compostos analisados. Os resultados da análise de PLS foram avaliados em termos de qualidade de ajuste ( $R^2$ ), bem como à capacidade de previsão e aos resultados obtidos por procedimentos de validação cruzada (*cross validation, leave one out*).

## IV.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### *IV.5.1 Localização geográfica das coletas na bacia do rio Elbe*

As amostras foram colhidas no percurso do rio Elbe - Europa, localizado no estado da Saxônia, na região da cidade de Leipzig (Lípsia - Alemanha). Cada amostra foi coletada uma única vez e submetida a análises químicas e bioensaios, conforme metodologia da análise do efeito dirigido.

A Tabela IV.1 apresenta os nomes das amostras, a categoria a qual pertencem e detalhes sobre a localização. Vale a pena ressaltar que cada ponto de coleta foi selecionado sempre após uma estação de tratamento de esgoto.

O mapa de localização das amostras é apresentado na figura IV.3.

Todas as amostras foram aplicadas como agente estressante em bactérias *E.Coli* e analisadas através da técnica de PCR em tempo real. A Tabela IV.2 sumariza os genes avaliados, bem como suas principais funções.

O Quadro IV.1 apresenta os 108 compostos analisados, todos os quais foram determinados em cada um dos 31 pontos de coleta.

**Tabela IV.1.:** Localização, data, estado (AS para Saxônia-Anhalt e S para Saxônia) e categoria das amostras (*O* para amostras de referência, *D* para localizações com aporte de esgoto doméstico, *D\_H* para localizações de aporte de esgoto hospitalar e doméstico e *I* para localizações de aporte de esgoto industrial *U* regiões que não possuem nenhum aporte conhecido.

<b>Código</b>	<b>Local</b>	<b>Estado</b>	<b>Categoria</b>	<b>Coordenadas</b>	<b>Data de amostragem</b>
1- B1	Thale	AS	<i>O</i>	51°44'29.65"N 11° 1'41.62"E	10/11/11
2- B2	Staßfurt	SA	<i>D</i>	51°50'50.85"N 11°42'21.94"E	10/11/11
3- C1	Chemnitz	S	<i>D</i>	50°53'35.79"N 12°53'38.01"E	22/11/11
4- C2	Göritzhein	S	<i>I</i>	50°58'34.54"N 12°47'34.77"E	22/11/11
5- DB	Niederschindmaas	S	<i>I</i>	50°48'30.95"N 12°30'30.16"E	04/01/12
6- Eu	Bad Lausick	S	<i>D_H</i>	51° 8'52.54"N 12°30'37.40"E	22/11/11
7- Gö	Niederschindmaas	S	<i>I</i>	11°23'54.89"E	10/01/12
8- H1	Wernigerode/Silstedt	SA	<i>O</i>	51°51'55.17"N 10°51'13.28"E	10/11/11
9- H2	Wernigerode/Silstedt	SA	<i>D_H</i>	51°51'59.31"N 10°52'47.13"E	10/11/11
10- Ilm	Bad Sulza	T	<i>D_H</i>	51° 6'15.55"N 11°40'3.90"E	06/12/11
11- LA	Leipzig	S	<i>D_I</i>	51°22'24.90"N 12°14'26.83"E	14/12/11
12- LN	Leipzig	S	<i>D_H</i>	51°22'3.48"N 12°18'50.08"E	14/12/11
13- M1	Rautenkranz	S	<i>O</i>	50°27'59.82"N 12°29'39.63"E	04/01/12
14- M2	Zwickau	S	<i>D</i>	50°47'22.00"N 12°30'27.96"E	04/01/12
15- M4	Trebsen	S	<i>I</i>	51°17'16.46"N 12°45'39.03"E	22/11/11
16- M5	Bad Düben	S	<i>D_H</i>	51°35'54.88"N 12°33'53.97"E	08/11/11
17- M6	Bitterfeld	SA	<i>I</i>	51°42'44.94"N 12°17'41.44"E	08/11/11
18- P1	Ebersbrunn	S	<i>U</i>	50°39'29.97"N 12°26'20.77"E	04/01/12
19- P2	Böhlen	S	<i>I</i>	51°12'44.26"N 12°23'12.52"E	22/11/11
20- S1	Eichicht	T	<i>O</i>	50°36'52.93"N 11°25'50.42"E	06/12/11
21- S2	Rudolstadt	T	<i>I</i>	50°43'6.70"N	06/12/11
22- M7	Bitterfeld	SA	<i>I</i>	51°40'59.81"N	08/11/11

## IV.2.: Continuação

23- S4	Weißenfels	SA	<i>D</i>	12°17'38.96"E 51°14'0.95"N 12° 1'10.14"E	29/11/11
24- S5	Leuna	SA	<i>D</i>	51°20'0.55"N 12° 1'3.23"E	29/11/11
25- S6	Schkopau	SA	<i>I</i>	51°25'0.52"N 11°57'9.50"E	29/11/11
26- S7	Halle	SA	<i>I</i>	51°32'0.85"N 11°52'21.06"E	10/01/12
27- S8	Calbe	SA	<i>D</i>	51°54'58.35"N 11°52'27.11"E	10/01/12
28- Sol	Schönebeck	SA	<i>I</i>	52° 2'6.81"N 11°42'42.82"E	10/01/12
29- SP	Bitterfeld	SA	<i>I</i>	51°40'59.81"N 12°17'38.96"E	08/11/11
30- WE	Ostrau	SA	<i>I_H</i>	51° 6'2.11"N 12°11'53.06"E	29/11/11
31- Z	Köthen	SA	<i>I</i>	51°45'38.11"N 11°58'55.51"E	10/01/12

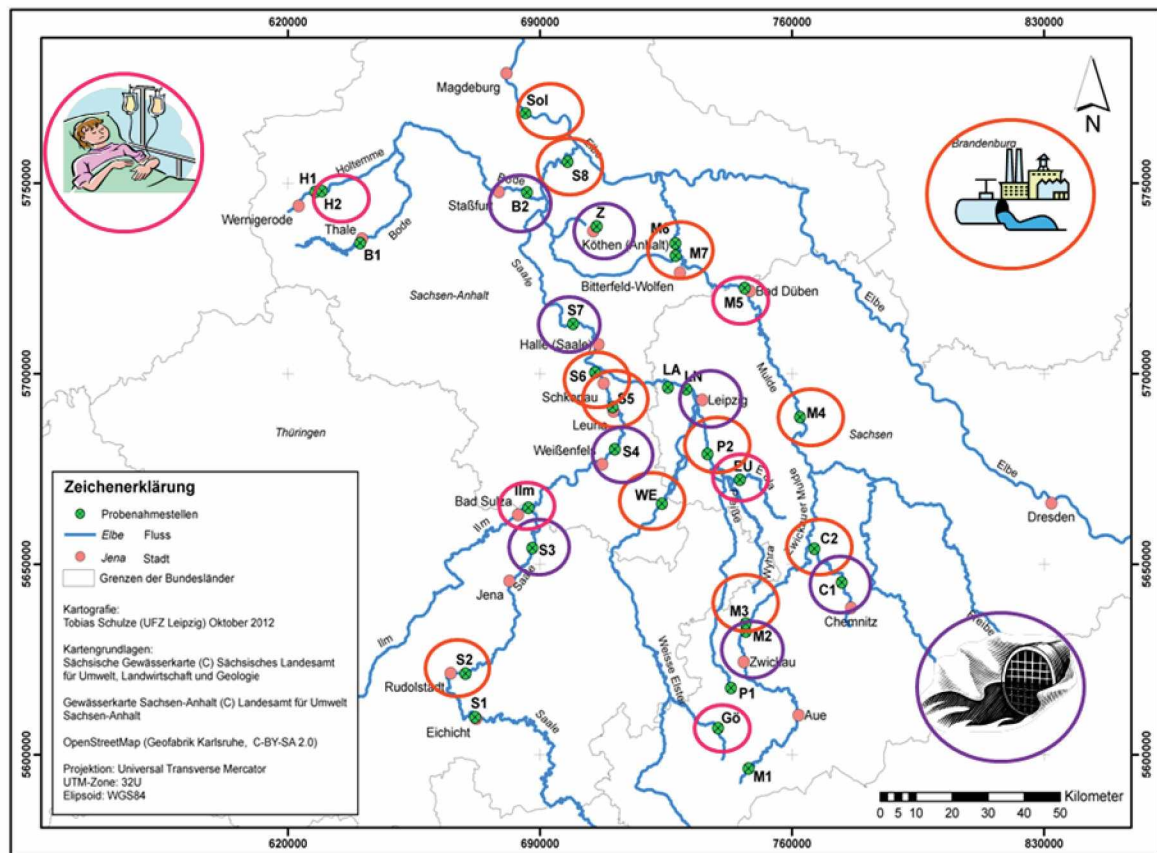


Figura IV.03.: Localização geográfica dos pontos de coleta das amostras de água superficial (Alemanha – 2012).

**Tabela IV.2.:** Genes analisados por ensaios de expressão gênica através de PCR em tempo real, categorias funcionais e conhecidas funções para estes genes.

<b>Categoria</b>	<b>Funções conhecidas</b>	<b>Genes selecionados</b>
Estresse oxidativo	A expressão destes genes esta envolvida na resposta ao estresse oxidativo, que pode causar a (per) oxidação de lipídeos, proteínas e DNA. O estresse oxidativo inclui o aumento no nível de superóxidos ou peróxidos, ou outra condição que mude o potencial redox da célula.	dps, fpr, norR, soxS, tam, yeiG, yniC, inaA, uspB, sodB, ahpC, ahpF, katE, zntA, yeaE, gst, katG, oxyR, sodA, sodC, soxR
Resposta SOS ao estresse do DNA	Genes envolvidos no reparo e correção de ligações cruzadas do DNA (cross-linking) e quebra de fita, dano oxidativo do DNA, inibição da síntese e replicação do DNA, alteração do super enovelamento, alquilação de bases.	uvrA, recX, ada, dinB, dinG, ftsK, mutT, nfo, recN, sbmC, ybfE, sula, yebG, lexA, polB, recA, ssb, umuD, uvrD
Resistencia a drogas/sensibilidade (estresse da membrana)	Genes envolvidos na contenção do estresse induzido. Função ou localização nas membranas internas ou externas. Por ex. bombas de efluxo.	amiC, yedW, dacB, cls, dacA, bacA, emrA, emrE, marC, yhjX, sbmA, mdtK, yajR, cmr, fsr, mrcB, pbpG, ssrA, marR, sanA
Estresse proteico	Involvidos na oxidação de aminoácidos individuais, desnaturação, enrolamento incorrecto, ligação cruzada e alquilação de proteínas, dano proteico.	clpB, cueR, ycgE, entC, fepB, grpE, dnaJ, dnaK, lon, rpoD
Estresse energético	Distúrbios no transporte de eletrons e níveis de ATP na célula.	sdhC, cyoA
Morte celular	Morte celular	dinJ, slyA, yeeV, yfjG, relB
Choque ao frio	Diminuição rápida da temperatura	cspA, cspB
Estresse Geral	Perturbação da homeostase celular	uspA, otsB, ydgL, bolA, rpoE
Função geral	Genes envolvidos nas funções gerais da célula, por ex. captação de fosforo (phoB), regulação de pH (gadX)	crp, cdaR, gadX, ybgI, ydeO, ompC, phoB, rihC



**Quadro IV.1.:** Lista dos 108 poluentes orgânicos determinados em águas superficiais do rio Elbe.

(s)-(-)-(3-Chloro-2-hydroxypropyl)trimethylammoniumchlorid	Carbamazepin	Furosemid	Propiconazol
1,2-Benzisothiazolinon	Chloramphenicol	Hexa(methoxymethyl)melamin	Propyphenazon
1H-Benzotriazol	Chloridazon	Imazalil	p-Toluensulfonamid
1-Methyl-1H-benzotriazol	Chlorotoluron	Isoproturon	Ranitidine
2,3-Epoxypropyltrimethylammoniumchlorid	Cholsäure	Ketoprofen	Roxithromycin
2,4-Dichlorophenoxyessigsäure	Clarithromycin	Koffein	Saccharin
2-Aminobenzimidazol	Cortison	Lauryldiethanolamid	Simetryn
2-Benzoyl-5-methoxy-1-phenyl-4-sulfonsäure	Cybutryn	Lenacil	Sucralose
2-Methyl-4-chlorophenoxyessigsäure	Cyclamat	Linuron	Sulfamethoxazol
2-Naphtalensulfonsäure	Cyclophosphamide	Mecoprop	Sulfapyridin
4-Acetamidoantipyrin	Desethyl-Atrazin	Metazachlor	Tebuconazol
4'-Aminoacetanilid	Desethyl-Terbutylazin	Metformin	Terbutryn/Prometryn
4-Aminobenzamid	Desisopropyl-Atrazin	Metolachlor	Terbutylazin/Sebutylazin/Propazin
4-Amino-N,N-dimethylbenzensulfonamid	Dexamethason	Metoprolol	Thiacloprid
4-Nitrophenol	Diazepam	Naproxen	Tri(butoxyethyl)phosphat
Acesulfam	Dichlorvos	Benzensulfonamid	Triclocarban
Acetaminophen	Diclofenac	n-Butylbenzensulfonamid	Triclosan
Acid Orange 7	Diclofenac	p-Chlorkresol	Triethylcitrat
Ametryn	Diethyltoluamid (DEET)	Pentobarbital	Trimethyloctylammoniumbromid
Atenolol	Diflufenican	Perfluorhexansäure	Triphenylphosphat
Atrazin	Dimethoat	Perfluorhexansäure 2	Triphenylphosphinoxid/Diazolidinylurea
Bendiocarb	Diuron	Perfluoroctansäure	Tris(1,3-dichloro-2-propyl)phosphat
Bentazon	Diuron	Phenazon	Tris(1-chlor-2-propyl)phosphat
Benzophenon-3	Ethofumesat	Phenylbenzimidazolsulfonsäure	Tris(2-chlorethyl)phosphat
Benzophenon-4	Fenuron	Pirimicarb	Vanillin
Bezafibrat	Flusilazol	Pirimidone	Verapamil
Bezafibrat	Flutamid	Prednisolon	

#### *IV.5.2 Análise de componentes principais dos poluentes determinados em águas superficiais*

Inicialmente foi realizada uma análise de componentes principais (PCA), objetivando a discriminação das amostras analisadas em função da concentração e da diversidade de poluentes determinados. Para evitar a supervalorização das variáveis que apresentam maior ordem de grandeza, os dados foram previamente auto-escalados.

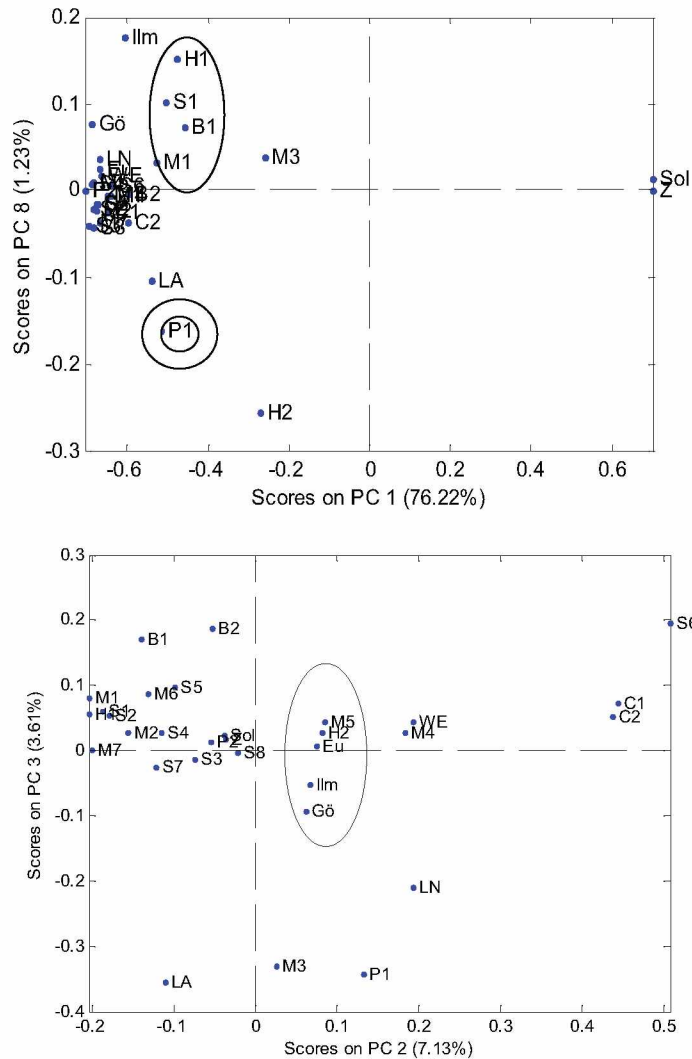
O estudo evidenciou que um conjunto de poucas componentes principais (CPs) permite uma boa representação da variância global dos dados, o que, por sua vez, facilita a visualização de tendências de agrupamento.

As CPs 1 e 8, que representam cerca de 80% da variância total dos dados, permitem discriminar as amostras com menor aporte de esgoto e, conseqüentemente, com menor concentração de praticamente todos os poluentes monitorados (Figura IV.4). A amostra P1, pertencente a este grupo, encontra-se no quadrante negativo da PC8, separada das demais amostras do mesmo grupo. De acordo com as informações disponíveis, esta amostra foi coletada nas proximidades de uma fábrica de alimentos desativada, o que provavelmente contribuiu com elevadas concentrações do adoçante acessulfame, amplamente utilizado na fabricação de alimentos diet. Apesar de ser considerado seguro para a população, este composto é reconhecidamente recalcitrante, não sendo metabolizado e permanecendo durante longos períodos sem qualquer alteração química.

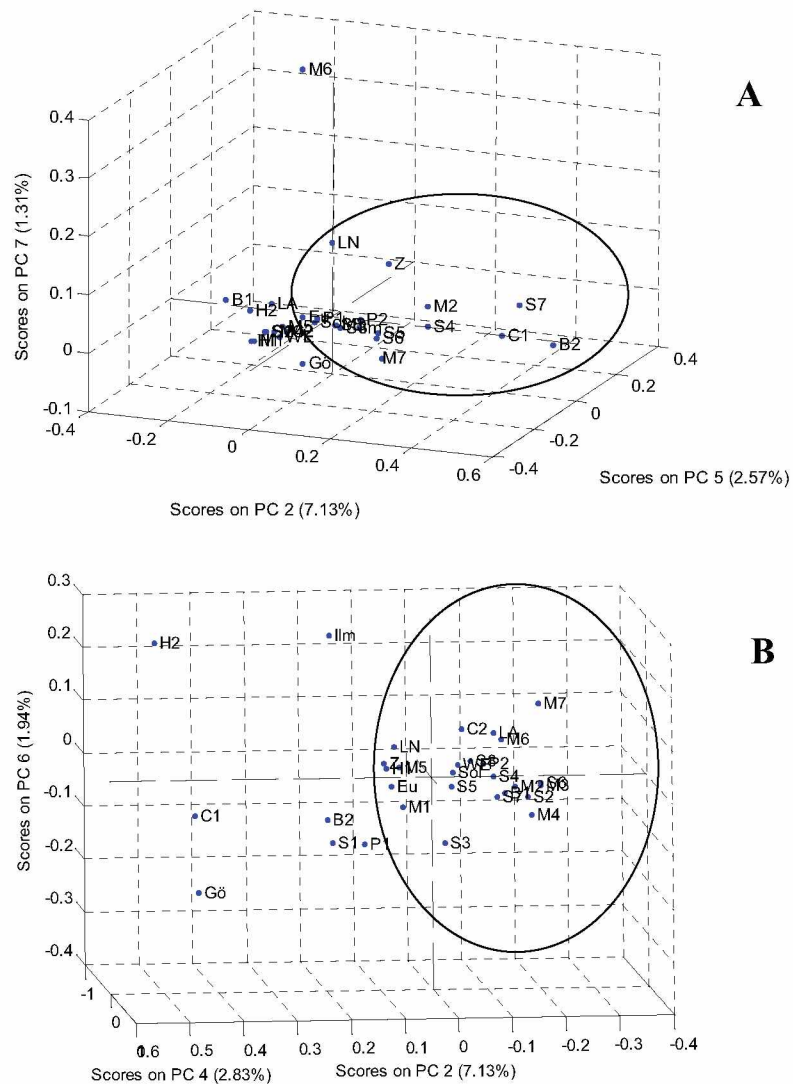
Outro grupo de fácil discriminação está representado por amostras coletadas próximas ao aporte de esgoto hospitalar e de centros de reabilitação. Na Alemanha existe uma rígida legislação para a compra de medicamentos, o que faz com que somente hospitais especializados possam ministrar certos tratamentos da medicina convencional, especialmente anti-inflamatórios e antibióticos, o que reduz drasticamente a concentração de compostos farmacêuticos em esgoto. Este grupo foi discriminado pelas CPs 2 e 3 (Figura IV.04) que representam 7,13% e 3,61% e da variância dos dados, respectivamente.

A grande variabilidade na concentração e natureza dos poluentes analisados dificultou a discriminação de outros grupos. O agrupamento das amostras coletadas nas proximidades das estações de tratamento de esgoto doméstico, por exemplo, somente foi conseguido com a utilização de 3 componentes principais (PC2 (7,13%) versus PC5 (2,5%) versus PC7 (1,31%)), as quais representam aproximadamente 10% da variância total dos dados (Figura IV.05A).

A mesma dificuldade foi encontrada para agrupar e discriminar as amostras coletadas nas proximidades de indústrias, o que também requereu de 3 componentes principais (PC2, PC4 e PC6), as quais representam 12,3% da variância total da matriz em avaliação (Figura IV.05B).



**Figura IV.04.** Scores do modelo de PCA construído para a matriz de dados de poluentes químicos (A) PC 1 vs PC8 – amostras circuladas são classificadas como referência; (B) PC2 vs PC3 – amostras circuladas são classificadas como de regiões com aporte hospitalar.



**Figura IV.05.** Scores do modelo de PCA construído para a matriz de dados de poluentes químicos (A) PC 2 vs PC7 vs PC5; (B) PC2 vs PC4 vs PC6.

O estudo realizado por PCA contribuiu com a definição dos poluentes que caracterizam cada um dos agrupamentos observados (Tabela IV.3). Assim, foi constatado que 24 espécies químicas permitem a diferenciação dos grupos de amostras utilizadas no estudo (referencia, hospital, cidade e indústria), permitindo resultados análogos aos observados nos estudos envolvendo os 108 compostos monitorados.

**Tabela IV.3.:** Lista dos 24 compostos fundamentais para a separação dos grupos referência (cidade, hospital e indústria) através do modelo PCA (após o nome de cada composto, encontra-se entre parêntese a principal utilização do mesmo).

<b>Referência</b>	<b>Hospital</b>	<b>Cidade</b>	<b>Indústria</b>
Ácido Benzotiazolsulfônico (indústria)	2- 10,11-Dihidro-10,11-dihidroxicarbamazepina (fármaco)	10,11-Dihidro-10,11-dihidroxicarbamazepina (fármaco)	10,11-Dihidro-10,11-dihidroxicarbamazepina (fármaco)
laurilamidopropilbetaine (surfactante)	p-toluenosulfonamida (Indústria)	5-metil-1H-benzotriazol (Indústria)	diclofenaco (fármaco)
2-(metiltio)benzotiazol (indústria)	5-metil-1H-benzotriazol (Indústria)	tramadol (fármaco)	carbamazepina (fármaco)
1H-benzotriazol (indústria)	1H-benzotriazole(Indústria)	diclofenaco (fármaco)	p-toluenosulfonamida (Indústria)
tri-isobutilfosfato (indústria)	tramadol (fármaco)	1H-benzotriazol (Indústria)	bezofibrato (fármaco)
N-acetil-4-aminoantipirina (fármaco)	diclofenaco (fármaco)	carbamazepina (fármaco)	N-Formil-4-aminoantipirina(fármaco)
Triclosan (produto de higiene)	de N-Formil-4-aminoantipirina (fármaco)	Acido 2-Benzotiazolsulfônico (indústria)	N-acetyl-4-aminoantipirine (fármaco)
	carbamazepina (fármaco)	N-acetyl-4-aminoantipirine (fármaco)	sucralose (adoçante)
	4-hidroxibenzotriazol (Indústria)	sucralose (adoçante)	5-metil-1H-benzotriazol (Indústria)
	Triclosan (produto de higiene)	metoprolol (fármaco)	1H-benzotriazol (indústria)
		sotalol (fármaco)	tramadol (fármaco)
		sulfametoxazol(fármaco)	metoprolol (fármaco)
		tri-isobutilfosfato(Indústria)	Acido 2-Benzotiazolesulfônico (Indústria)
		Triclosan (produto de higiene)	sulfametoxazole (fármaco)
			cafeína (fármaco)
			Ácido 2-naftaleno sulfônico (indústria)
			Triclosan (produto de higiene)

#### *IV.5.3. Análise multivariada dos efeitos observados na expressão gênica de E.coli tratadas com as águas superficiais analisadas*

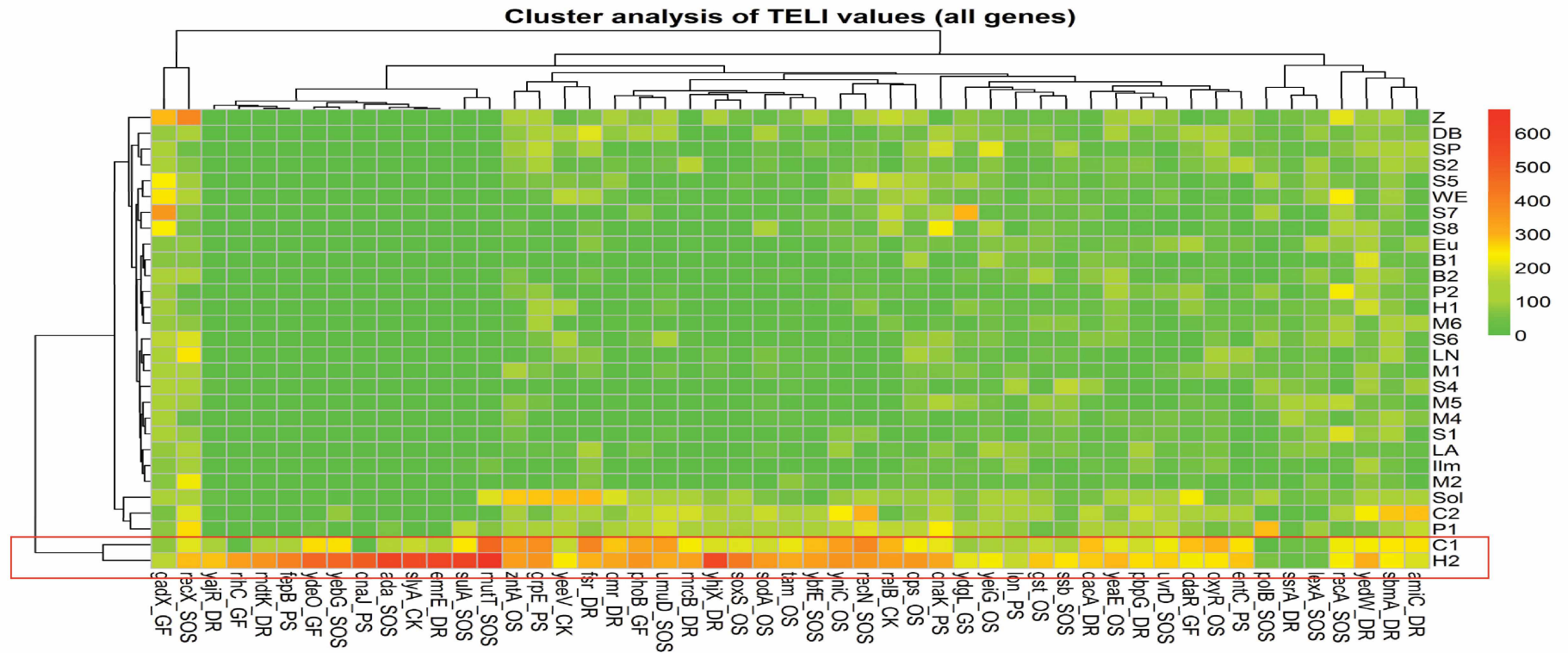
A fim de determinar os efeitos causados pelos poluentes analisados em águas superficiais da região da Saxônia, vários ensaios biológicos foram desenvolvidos, sendo que, neste trabalho, apenas a expressão gênica em *E. coli* foi analisada.

Inicialmente foi estudada a correlação existente entre a presença e concentração de poluentes e a intensidade das mudanças na expressão gênica, incluindo a divergência nos genes afetados. Esta última avaliação foi fundamentada no padrão de resposta transcriptômica, expressa como TELI de genes individuais.

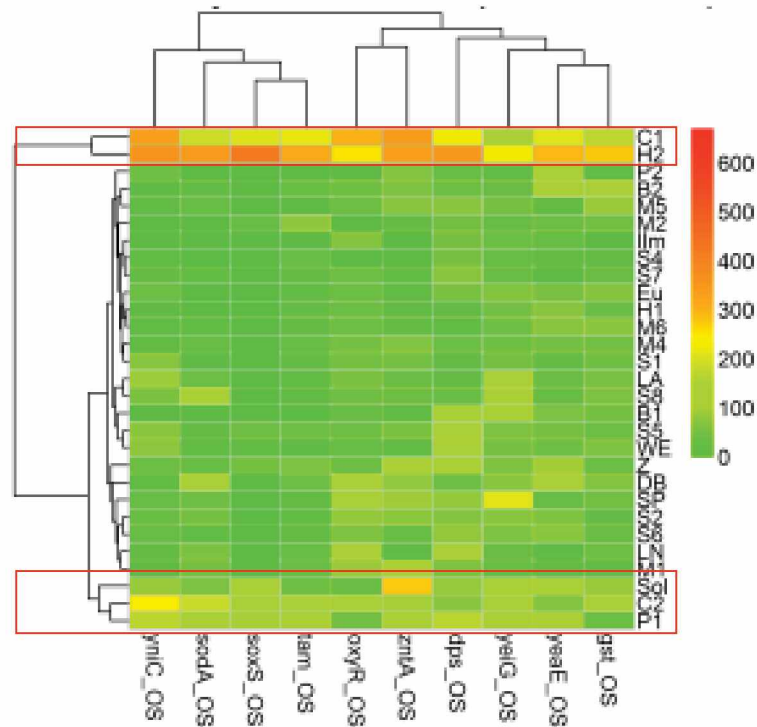
Os valores de TELI da totalidade dos genes investigados e dos subgrupos dos genes pertencentes a vias semelhantes foram usadas para agrupamento hierárquico (Figura IV.6). Esta abordagem confirma estatisticamente a clara diferenciação das amostras H2 de Holtemme, a qual é próxima da estação de tratamento de esgoto Silstedt, e C1 que é próxima a cidade de Chemnitz, onde se encontra a maior estação de tratamento de esgoto doméstico da cidade. Estas duas amostras constituem o cluster que mais se diferencia no conjunto de amostras. Entretanto, outros clusters podem ser observados, o que pode ser mais bem visualizado quando genes de diferentes grupos funcionais são analisados separadamente.

Levando-se em conta os genes que caracterizam a resposta ao stress oxidativo (Figura IV.7), observa-se, novamente, que as amostras H2 e C1 configuram um cluster que se diferencia notoriamente das amostras restantes. Adicionalmente, as amostras C2, P1, e Sol apresentam um padrão semelhante na expressão gênica ao estresse oxidativo, o que permite a sua discriminação em relação às amostras que configuram o segundo grande cluster.

A amostra P1, que contém principalmente compostos que indicam águas residuais domésticas não tratadas (ex. cafeína, acessulfame e cotinina), indicando que foram fortemente afetado pelos compostos contidos em concentrações mais elevadas em águas residuais não tratadas.



**Figura IV.06.** Heatmap da análise de agrupamento dos valores TELI de todas as amostras e todos os genes incluídos na análise estatística com CK para a morte celular, SOS para a resposta SOS e danos no DNA, GF para a função geral, PS para o stress proteína, OS para o stress oxidativo e DR de resistência às drogas. TELI foram determinados para uma concentração de 50 ml de água de superfície/extrato mL



**Figura IV.07.:** Análise de Cluster dos genes envolvidos no stress oxidativo.

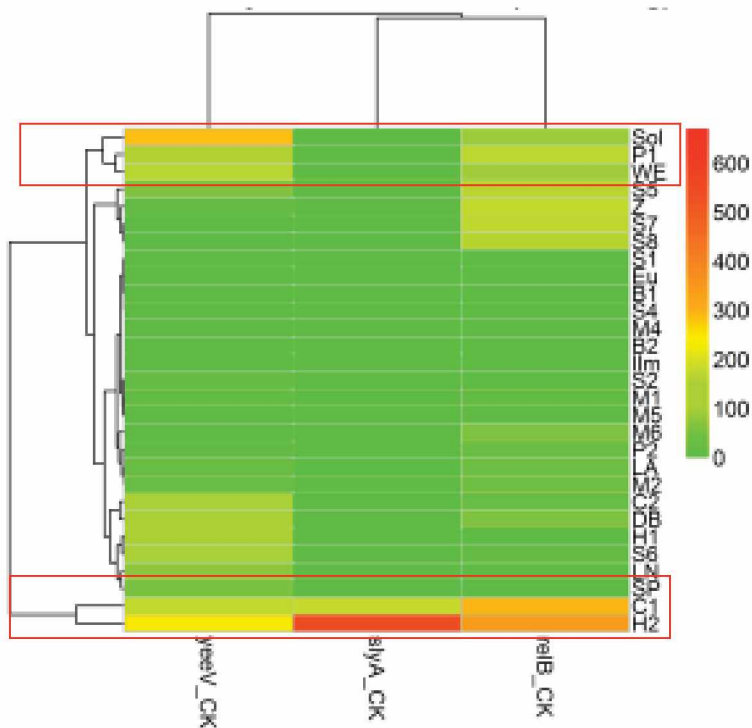
Avaliando a atividade dos genes responsáveis pela morte celular (Figura IV.08), observa-se a clara separação das amostras C1 e H2. Uma mudança particularmente intensa na expressão de genes foi observado para H2 no gene *slyA*. Este gene aumenta a produção de hemolisina <sup>[37]</sup>, a qual é usada para obter energia a partir de outras células por lise. Assim, a forte expressão deste gene indica uma necessidade de energia elevada de bactérias expostas a H2.

As amostras Sol, P1 e WE podem ser diferenciadas do segundo cluster, em razão de possuírem alta concentração do adoçante acessulfame, porém estudos mais aprofundados são necessários para comprovar estes efeitos.

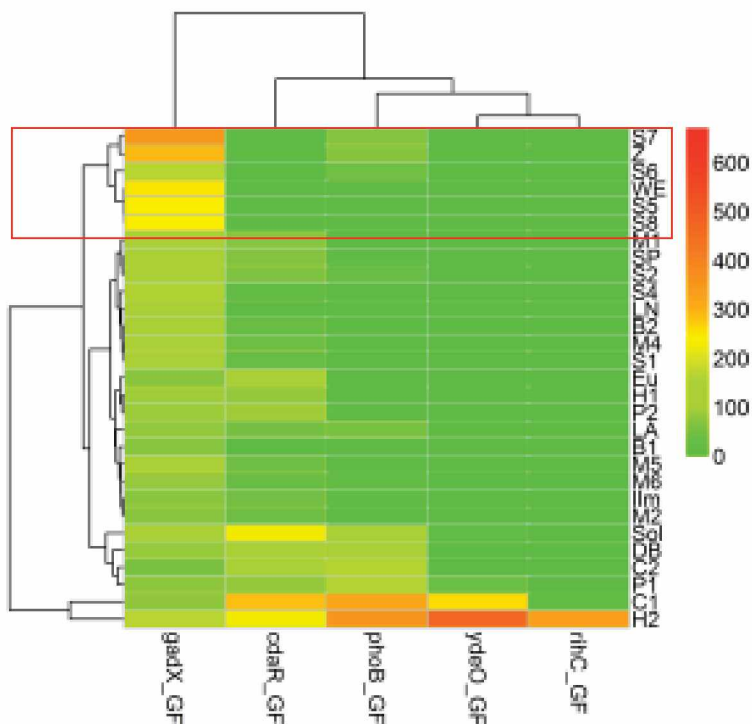
Tomando como base os genes envolvidos em funções gerais da célula, como regulação do pH ou do metabolismo de fosfato (Figura IV.09), observa-se um agrupamento das amostras Sol, P1 e We, principalmente em razão da expressão associada ao gene *GADX*, o qual é regulado para SP, H2 e C1, e, em paralelo, o gene *yedW*, foi regulado para baixo para as demais amostras. As amostras Sol, SP, P1 e We são afetados por estações de tratamento de esgoto industrial localizados nas proximidades dos pontos de coleta. Já as amostras H2 e C1 não há nenhuma evidência atual para a entrada de águas residuais industriais.



A avaliação dos genes envolvidos no complexo stress protéico não conduziu a uma diferenciação adicional das amostras. Os padrões de efeito conseguido após o agrupamento de genes de acordo com as funções comuns permitiu uma melhor resolução e revelaram padrões de efeitos distintos.



**Figura IV.08.:** Análise de Cluster dos genes envolvidos na morte de células.

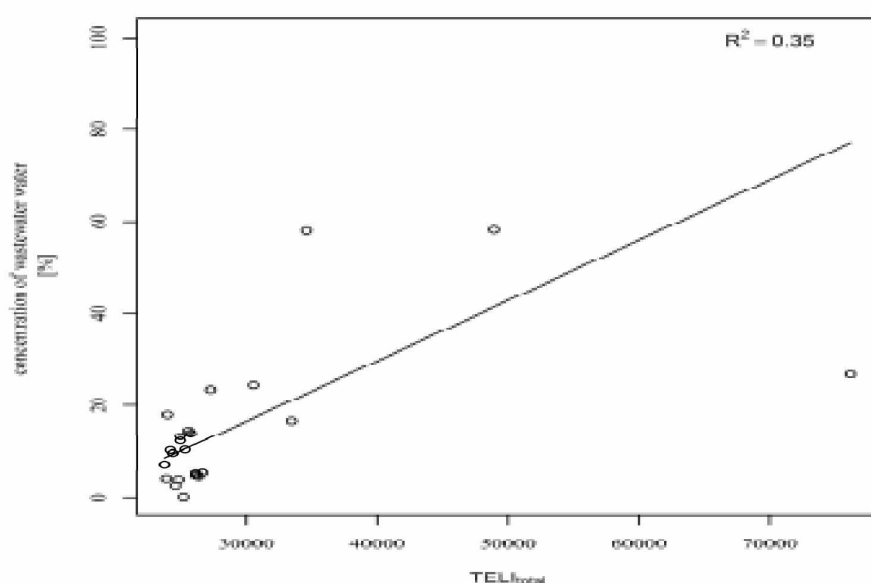


**Figura IV.09.:** Análise de Cluster dos genes envolvidos em funções gerais.

*IV.5.4. Potencialidade de correlação entre efeitos observados na expressão gênica de E. coli e aporte de esgoto.*

Inicialmente, um modelo PLS foi construído a fim de verificar a correlação entre a expressão gênica e os compostos determinados em águas superficiais. Neste estudo, os valores TELItotal exibiram uma correlação pouco significativa ( $R^2 = 0,35$ ,  $p = 0,00047$ ) com a fração de águas residuais nas amostras (Figura IV.10).

A correlação entre TELI e percentual de esgoto é razoável, considerando a incerteza do despejo de esgoto relatado pelas estações de tratamento.



**Figura IV.10.** Correlação ponderada entre o teor de águas residuais e TELItotal (modificações na expressão gênica) de todas as amostras com concentração de águas residuais conhecidas.

*IV.5.5. Análise de correlação da expressão gênica e a presença de poluentes orgânicos.*

Inicialmente, um modelo PLS foi desenvolvido com base na concentração dos 108 compostos químicos analisados e nas 58 respostas de expressão gênica representadas pelo slope das curvas. Embora fosse possível obter um modelo PLS com razoáveis valores de  $R^2$ , a validação cruzada mostrou que o modelo geral de PLS não apresenta boa capacidade de previsão de amostras.

Com base nos resultados obtidos nos estudos preliminares via PCA, o número de variáveis foi reduzido para 24. Assim, novos modelos foram desenvolvidos correlacionando-

se a concentração destas 24 espécies químicas relevantes com 58 dados de expressão gênica. O desempenho do melhor modelo PLS resultante foi aceitável ( $R^2 = 0,85$ ), com 8 variáveis latentes e representação de cerca de 90% da variância total dos dados.

Este modelo PLS foi utilizado apenas para obter indicação de quais grupos de compostos influenciam mais fortemente os genes analisados. De acordo com os *loadings* e os coeficientes de regressão (resultados não apresentados), as variáveis que mais fortemente influenciaram as respostas foram triclosan, 5-metil-1H-benzotriazole, tramadol, 1H-benzotriazol e diclofenaco.

Como em todos os sistemas de teste que abordam os efeitos de toxicidade de misturas, o estabelecimento de relações de causa e efeito pode ser desafiado pelas interações competitivas ou aditivas entre os compostos <sup>[38]</sup>, assim como pela tendência a efeitos inespecíficos para altas concentrações de produtos químicos <sup>[39]</sup>.

#### IV.6. CONCLUSÕES

Os ensaios de expressão gênica podem ser considerados um instrumento sensível para a avaliação de potenciais efeitos associados à presença de poluentes orgânicos em águas superficiais. A PCR em tempo real fornece um biodiagnóstico que pode ser correlacionado com a presença de poluentes, indicando o tipo de efeito que a contaminação pode causar no ecossistema.

Além disso, a expressão gênica, juntamente com ferramentas de análise multivariada, representa um ponto de partida promissor para o desenvolvimento de hipóteses sobre o modo de ação dos contaminantes do meio hídrico. No entanto, seriam necessários mais dados sobre os efeitos dos compostos sobre a expressão gênica, especialmente sobre os efeitos competitivos, o que poderia facilitar o estabelecimento de relações de causa-efeito entre a composição química e os efeitos biológicos.

#### IV.7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] BRACK, W. ,Effect-directed analysis: a promising tool for the identification of organic toxicants in complex mixtures? *Anal. Bioanal. Chem.*, **2003**, v. 377, 397–407,
- [2] BLASCO, C., PICO Y., Prospects for combining chemical and biological methods for integrated environmental assessment, *Trends Anal. Chem*, **2009**, v. 28, 745.

- [3] VAN DER BURG, B., VAN DER LINDEN, S., MAN, H.-Y., WINTER, R., JONKER, L., VAN VUGT-LUSSENBURG, B., A panel of quantitative CALUX® reporter gene assays for reliable high-throughput toxicity screening of chemicals and complex mixtures P. Steinberg (Ed.), *High-Throughput Screening Methods in Toxicity Testing*, Wiley. (2013) ISBN 978-7-118-06563-1.
- [4] HEWITT, L.M., MARVIN, C.M., Analytical methods in environmental effects-directed investigations of effluents, *Mutat. Res.*, **2005**, v. 589, 208.
- [5] BAKKER, J.F., BELZUNCE-SEGARRA, M.J., CASTRO, R., VAN DE HEUVEL-GREVE, M., KLAMER, H.J.C, BRACK, W., Effect directed analysis and toxicity identification evaluation D. Barcelo, M. Petrovic (Eds.), *Sustainable Management of Sediment Resources: Sediment Quality and Impact Assessment of Pollutants*, vol.1, Elsevier B.V. (2007) 163
- [6] HECKER, M., GIESY, J.P., Effect-directed analysis of ah-receptor mediated toxicants, mutagens, and endocrine disruptors in sediments and biota W. Brack (Ed.), *Effect-Directed Analysis of Complex Environmental Contamination*, vol. 15Springer-Verlag Berlin Heidelberg (2011), p. 285 *Handbook Environ Chem*
- [7] WELLER, M.G., A unifying review of bioassay-guided fractionation, effect-directed analysis and related techniques. *Sensors* (Basel), **2012**, v. 12, 9181.
- [8] FERNANDEZ, P., GRIFOLL, M., SOLANAS, A.M., BAYONA, J.M. , ALBAIGES, J. Bioassay-directed chemical analysis of genotoxic components in coastal sediments *Environ. Sci. Technol.*, **1992**, v. 26, 817–829.
- [9] GRUNG, M., LICHTENTHALER, R., AHEL, M., TOLLEFSEN, K.-E., LANGFORD, K., THOMAS, K.V., Effect-directed analysis of organic toxicants in wastewater effluent from Zagreb, Croatia *Chemosphere*, **2007**, v. 67, 108–120.
- [10] MOUNT, D.I., ANDERSON-CARNAHAN, D.M., Methods for Aquatic Toxicity Identification Evaluations. Phase I. Toxicity Characterisation Procedures. EPA/600/3-88/034. US EPA, Duluth, MN, USA. **1988**.
- [11] NORBERG-KING, T.J., DURHAN, E.J., ANKLEY, G.T., ROBERT, E., Application of toxicity identification evaluation procedures to the ambient waters of the colusa basin drain, California *Environ. Toxicol. Chem.*, **1991**, v. 10, 891–900
- [12] SCHEURELL, M., FRANKE, S., HÜHNERFUSS, H., Effect-directed analysis: a powerful tool for the surveillance of aquatic systems *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, **2007**, v. 87, 401–413.

- [13] HANNIGAN, M.P., CASS, G.R., PENMAN, B.W., CRESPI, C.L., LAFLEUR, A.L., BUSBY, W.F., THILLY, W.G., SIMONEIT, B.R.T., Bioassay-directed chemical analysis of Los Angeles airborne particulate matter using a human cell mutagenicity assay, *Environ. Sci. Technol.*, **1998**, v. 32, 3502–3514.
- [14] BRACK, W., SCHIRMER, K., ERDINGER, L., HOLLERT, H., Effect-directed analysis of mutagens and ethoxyresorufin-O-deethylase inducers in aquatic sediments *Environ. Toxicol. Chem.*, **2005**, v. 24, 2445–2458.
- [15] GRUNG, M., LICHTENTHALER, R., AHEL, M., TOLLEFSEN, K.-E., LANGFORD, K., THOMAS, K.V., Effect-directed analysis of organic toxicants in wastewater effluent from Zagreb, Croatia, *Chemosphere*, **2007**, v. 67, 108–120.
- [16] SCHMITT, C., STRECK, G., LAMOREE, M., LEONARDS, P., BRACK, W., DE DECKERE E., Effect directed analysis of riverine sediments—the usefulness of *Potamopyrgus antipodarum* for in vivo effect confirmation of endocrine disruption. *Aquat. Toxicol.*, **2011**, v. 101, 237–243.
- [17] KOLPIN, D.W., Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in US streams, 1999-2000: A national reconnaissance. *Environmental Science & Technology*, **2002**. v. 36(6), 1202-1211.
- [18] LOOS, R., EU-wide survey of polar organic persistent pollutants in European river waters. *Environmental Pollution*, **2009**. v.157(2), 561-568.
- [19] RICHARDSON, S.D. e T.A. TERNES, Water Analysis: Emerging Contaminants and Current Issues. *Analytical Chemistry*, **2011**. v..83(12), 4614-4648.
- [20] TERNES, T.A., Irrigation of treated wastewater in Braunschweig, Germany: An option to remove pharmaceuticals and musk fragrances. *Chemosphere*, **2007**. v. 66(5), 894-904.
- [21] VERLICCHI, P., M. AL AUKIDY, E E. ZAMBELLO, Occurrence of pharmaceutical compounds in urban wastewater: Removal, mass load and environmental risk after a secondary treatment-A review. *Science of the Total Environment*, **2012**. V.429, 123-155.
- [22] LOOS, R., EU-wide monitoring survey on emerging polar organic contaminants in wastewater treatment plant effluents. *Water Research*, **2013**. v.47(17), 6475-6487.
- [23] HUNTSCHA S., Multiresidue analysis of 88 polar organic micropollutants in ground, surface and wastewater using online mixed-bed multilayer solid-phase extraction coupled to high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **2012**. V.1268, 74-83.

- [24] ZHANG, X.W., Assessing the Toxicity of Naphthenic Acids Using a Microbial Genome Wide Live Cell Reporter Array System. *Environmental Science & Technology*, **2011**. 45(5), 1984-1991.
- [25] SU, G.Y., Toxicogenomic Mechanisms of 6-HO-BDE-47, 6-MeO-BDE-47, and BDE-47 in *E. coli*. *Environmental Science & Technology*, **2012**. v.46(2), 1185-1191.
- [26] SU, G.Y., Mechanisms of toxicity of triphenyltin chloride (TPTC) determined by a live cell reporter array. *Environmental Science and Pollution Research*, **2013**. v. 20(2), 803-811.
- [27] SODRÉ F.F., PESCARA I.C., MONTAGNER C.C., JARDIM, W.F., Assessing selected estrogens and xenoestrogens in Brazilian surface waters by liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Microchemica Journal*, **2010**, v. 96, 92-98.
- [28] PAILLER J.Y., KREIN A., PFISTER, L., HOFFMANN L., GUIGNARD C., Solid phase extraction coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of sulfonamides, tetracyclines, analgesics and hormones in surface water and wastewater in Luxembourg, *Science Total Environmental*, **2009**, v. 407, 4736–4743.
- [29] HOSOGIA J., TANAKA H., FUJITA K., KUWABARA T., IKEGAWA S., KOBAYASHI N., MANOD N., GOTO J., LC–MS/MS coupled with immunoaffinity extraction for determination of estrone, 17- $\beta$ -estradiol and estrone 3-sulfate in human plasma, *Journal of Chromatografic B.*, **2010**, v. 878, 222–227.
- [30] FATOKI O. S., NOMA A., SPE method for selective determination of phthalate esters in the aquatic environment, *Water, Air, Soil Pollutants*, **2002**, v.140, 85-98.
- [31] LANGENBACH, T.; SCHROLL, R. & SCHEUNERT, I. Fate of the <sup>14</sup>C-terbutylazine in Brazilian soils under various climatic conditions. *Chemosphere*, **2001**, v.45, 387-398.
- [32] NEURATH, S.K.; SADEGHI, A.M.; SHIRMOHAMMADI, A.; ISENSEE, A.R. & TORRENTS, A. Atrazine distribution measured in soil and leachate following infiltration conditions. *Chemosphere*, **2004**, v. 54, 489-496.
- [33] ONNIS-HAYDEN, A., et al., Prokaryotic Real-Time Gene Expression Profiling for Toxicity Assessment. *Environmental Science & Technology*, **2009**. V.43(12), 4574-4581.
- [34] SHARMA, R., The ATP hydrolytic activity of purified ZntA, a Pb(II)/Cd(II)/Zn(II)-translocating ATPase from *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, **2000**. v. 275(6), 3873-3878.
- [35] HUNTSCHA, S., Multiresidue analysis of 88 polar organic micropollutants in ground, surface and wastewater using online mixed-bed multilayer solid-phase extraction coupled

- to high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **2012**. V.1268, 74-83.
- [36] TRAMONTI, A., Stability and oligomerization of recombinant GadX, a transcriptional activator of the Escherichia coli glutamate decarboxylase system. *Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics*, **2003**. v.1647(1-2), 376-380.
- [37] PYCKE, B. F. G., A. CRABBÉ, W. VERSTRAETE, AND N. LEYS. Characterization of triclosan-resistant mutants reveals multiple antimicrobial resistance mechanisms in Rhodospirillum rubrum S1H. *Appl. Environ. Microbiol.*, **2010**, v. 76, 3116-3123.
- [38] GARCIA-REYERO, N., et al., Behavioral and genomic impacts of a wastewater effluent on the fathead minnow. *Aquatic Toxicology*, **2011**. v.101(1), 38-48.
- [39] GOU, N., ONNIS-HAYDEN, A., GU A.Z., Mechanistic Toxicity Assessment of Nanomaterials by Whole-Cell-Array Stress Genes Expression Analysis. *Environmental Science & Technology*, **2010**. v. 44(15), 5964-5970.