

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ALEXANDRE DELLA FLORA

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA
PARA DETERMINAÇÃO DE ATRAZINA E SEUS
PRINCIPAIS PRODUTOS DE TRANSFORMAÇÃO NAS
ÁGUAS SUPERFICIAIS DA BACIA HIDROGRÁFICA DO
PARANÁ 3**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Porto Alegre, março de 2018.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ALEXANDRE DELLA FLORA

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA
DETERMINAÇÃO DE ATRAZINA E SEUS PRINCIPAIS
PRODUTOS DE TRANSFORMAÇÃO NAS ÁGUAS SUPERFICIAIS
DA BACIA HIDROGRÁFICA DO PARANÁ 3**

Dissertação apresentada como requisito parcial
para obtenção do grau de Mestre em Química

Profa. Dra. Carla Sirtori
Orientadora

Profa. Dra. Marcela Boroski
Co-orientadora

A presente dissertação foi realizada inteiramente pelo autor, exceto as colaborações as quais foram devidamente citadas nos agradecimentos. O trabalho foi desenvolvido no período entre Março/2016a Março/2018, no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, no Laboratório de Ambiental da Itaipu Binacional e no Laboratório de Cromatografia da Universidade Federal da Integração Latino-Americana sob Orientação da Professora Doutora Carla Sirtori e co-orientação da Professora Doutora Marcela Boroski. A dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Química pela seguinte banca examinadora:

Comissão Examinadora:

Dr. Alessandro Dallegrave – UFRGS

Profa. Dra. Andreia Neves Fernandes – PPGQ/UFRGS

Prof. Dr. Marco Flôres Ferrão – PPGQ/UFRGS

Alexandre Della Flora

AGRADECIMENTOS

À UFRGS por todo o ensino que foi me transmitido, à UNILA por ter me acolhido para o desenvolvimento do projeto, à Itaipu Binacional pela logística e suporte nas coletas e à Fundação Parque Tecnológico de Itaipu pela bolsa de mestrado concedida.

À Prof. Dr. Carla Sirtori por ela ter me aceitado nesse difícil projeto, além da ajuda e orientação no desenvolvimento do trabalho.

À Prof. Dr. Marcela Boroski, pela confiança que me passou para poder desenvolver o projeto em segurança, além de me orientar no período desenvolvido em Foz do Iguaçu.

Às Prof. Dr Aline Theodo Toci e Prof. Dr. Gilcélia Cordeiro por terem me recebido de braços abertos em Foz do Iguaçu, e por proporcionarem um aumento de meus conhecimentos nas partes técnicas do trabalho.

Às MSc.Simone Frederigi Benassi e Dr. Jussara Elias de Souza por toda ajuda que disponibilizaram para o desenvolvimento do presente trabalho.

Aos colegas de laboratório multiusuários: Natalie Toyama, Renata Gabardo e Ronan Exterkoetter, pelas risadas e pela ajuda no dia a dia.

SUMÁRIO

Índice de Tabelas.....	vii
Índice de Figuras.....	x
Índice de Apêndices	xiv
Glossário de Siglas e Abreviaturas.....	xv
Resumo.....	xviii
Abstract.....	xix
1 Introdução.....	1
2 Objetivo.....	3
2.1 Objetivo Geral.....	3
2.2 Objetivos específicos.....	3
3 Revisão bibliográfica.....	4
3.1 Presença de agrotóxicos no meio ambiente.....	4
3.2 Atrazina e seus produtos de transformação.....	5
3.3 Técnicas Analíticas para a avaliação de agrotóxicos em matrizes ambientais aquosas.....	9
3.4 Metodologias de Extração e Pré-concentração.....	12
3.4.1 Microextração em Fase Sólida (SPME).....	12
3.4.2 Extração em Fase Sólida (SPE).....	14
3.4.3 Microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME).....	20
3.5 Planejamento Multivariado – matriz Doehlert.....	22
3.6 Técnicas Cromatográficas	24
4 Parte Experimental.....	29
4.1 Área de estudo.....	29
4.2 Amostragem.....	31
4.3 Reagentes, padrões analíticos e materiais.....	32
4.3.1 Preparo das soluções estoque, intermediária, trabalho e água sintética.....	32
4.4 Métodos.....	33
4.4.1Preparação da amostra: técnicas de extração e/ou pré- concentração.....	33
4.4.2 Microextração em Fase Sólida (SPME).....	34
4.4.3 Extração em Fase Sólida (SPE).....	35

4.4.4 Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME).....	35
4.4.4.1 Escolha do solvente extrator e solvente dispersor.....	36
4.4.4.2 Planejamento experimental Doehlert.....	36
4.5 Validação do método de DLLME.....	37
4.5.1 Seletividade.....	38
4.5.2 Linearidade	38
4.5.3 Limite de detecção e Limite de quantificação.....	38
4.5.3.1 Limite de Detecção.....	38
4.5.3.2 Limite de Quantificação.....	39
4.5.4 Precisão.....	41
4.5.5 Exatidão.....	42
4.5.6 Recuperação.....	42
4.5.7 Robustez.....	42
4.5.8 Efeito de Matriz.....	43
4.5.9 Estabilidade.....	44
4.6 Análise cromatográfica em fase gasosa acoplada a espectrômetro de massas (GC-MS).....	44
5. Resultados e Discussão	46
5.1 Cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrômetro de massas com analisador do tipo quadrupolo (GC-MS).....	46
5.2 Preparo de amostra	47
5.2.1 Microextração em Fase Sólida (SPME).....	47
5.2.2 Extração em Fase Sólida (SPE).....	50
5.2.3 Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME).....	53
5.2.3.1 Escolha do solvente dispersor e solvente extrator.....	53
5.2.3.2 Planejamento Experimental	54
5.3 Validação da metodologia	60
5.3.1 Seletividade do método	61
5.3.2 Linearidade.....	61
5.3.3 Limite de Detecção e Limite de Quantificação.....	62
5.3.3.1 Limite de Detecção.....	62
5.3.3.2 Limite de Quantificação.....	63
5.3.4 Precisão.....	64

5.3.5 Exatidão.....	65
5.3.6 Efeito de matriz.....	67
5.3.7 Robustez.....	70
5.3.8 Estabilidade.....	71
5.4 Avaliação de custo e da demanda temporal na etapa de extração dos analitos.....	72
5.5 Análise das amostras de água superficial da Bacia do Paraná 3.....	75
5.5.1 Primeira campanha de coleta.....	75
5.5.2 Segunda campanha de coleta.....	80
5.5.3 Mapa do estudo da presença de micropoluentes na BP3.....	83
6 Conclusões.....	85
Referências.....	87

ÍNDICE DE TABELAS

Quadro I. Estudos sobre o monitoramento de ATZ, DEA e DIA em águas superficiais e subterrâneas.....	7
Quadro II. Propriedades físicas e químicas da ATZ, DEA e DIA.....	8
Quadro III. Aplicações do método de SPE para análise de ATZ, DIA e DEA em matrizes aquosas.....	18
Quadro IV. Representação dos ensaios codificados para planejamento Doehlert de três variáveis.....	23
Quadro V. Publicações que utilizam diferentes técnicas cromatográficas para determinação de ATZ, DEA e DIA.....	26
Quadro VI. Microbacias da BP3 que foram selecionadas como pontos de amostragem para o estudo.....	29
Quadro VII. Níveis selecionados para otimização da DLLME empregando matriz Doehlert, modelo quadrático.....	37
Tabela I: Tempos de retenção e fragmentos mais intensos identificados no modo <i>scan</i> para os analitos e padrão interno.....	47
Tabela II. Valores das áreas* e o DPR para os analitos estudados na SPME empregando-se diferentes fibras	48
Tabela III. Valores das áreas* para os analitos estudados nas extrações por SPE para as três matrizes aquosas avaliadas.....	52
Tabela IV. Razão dos valores de áreas* dos analitos pela área do padrão interno nas extrações por SPE para as três matrizes aquosas avaliadas.....	52
Tabela V. Valores das áreas* dos analitos no estudo da escolha do par solvente extrator/solvente dispersor em DLLME.....	53
Tabela VI. Níveis de cada uma das variáveis selecionadas e as respostas obtidas para o planejamento Doehlert.....	55
Tabela VII. Análise de variância (ANOVA) para a extração de ATZ mediante DLLME utilizando matriz Doehlert de modelo linear.....	56
Tabela VIII. Análise de variância (ANOVA) para a extração de ATZ mediante DLLME utilizando matriz Doehlert de modelo quadrático.....	57
Tabela IX. Análise de variância (ANOVA) para a extração do DEA mediante DLLME utilizando matriz Doehlert de modelo quadrático.....	57

Tabela X. Análise de variância (ANOVA) para a extração do DIA mediante DLLME utilizando matriz Doehlert de modelo quadrático.....	58
Tabela XI. Faixa linear, equação da reta e coeficiente de determinação (R^2) para as curvas analíticas da ATZ, DEA e DIA, preparadas em água da matriz	62
Tabela XII. Comparação dos limites de detecção obtidos através de diferentes métodos.....	63
Tabela XIII. Comparação dos Limites de Quantificação para os três diferentes métodos.....	63
Tabela XIV. Parâmetros para avaliação da repetibilidade para os analitos ATZ, DEA e DIA em água da matriz.....	64
Tabela XV. Valores do estudo da precisão intermediária, em três níveis, em análises realizadas em dois dias diferentes, preparados em água da matriz.....	65
Tabela XVI. Erro relativo (%) em três níveis de concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$) para os analitos ATZ, DEA e DIA, em água da matriz.....	66
Tabela XVII. Recuperação (%) em três níveis, realizadas em água da matriz e em triplicatas.....	66
Tabela XVIII. Dados de regressão de curvas analíticas elaboradas para o estudo do efeito matriz.....	67
Tabela XIX. Valores do estudo da robustez para os analitos ATZ, DEA e DIA.....	70
Tabela XX. Estudo da estabilidade dos analitos (ATZ, DEA e DIA) na matriz de água superficial da BP3.....	72
Tabela XXI. Comparação de custos e demanda temporal para a execução das técnicas de extração dos analitos atrazina, DIA e DEA.....	74
Tabela XXII. Resultados de atrazina, DIA e DEA em amostras de águas superficiais na BP3 referentes ao primeiro período de coleta em 2017.....	78
Tabela XXIII. Resultados de atrazina, DIA e DEA em amostras de águas superficiais na BP3 referentes aos eventos de precipitação durante o primeiro período de coleta em 2017.....	79
Tabela XXIV. Resultados de atrazina, DIA e DEA em amostras de águas superficiais na BP3 referentes ao segundo período de coleta em 2017.....	82
Tabela XXV. Resultados de atrazina, DIA e DEA em amostras de águas	

superfícias na BP3 referentes aos eventos de precipitação durante o segundo período de coleta em 2017	83
Tabela XXVI. Valores de t_{calc} para cada matriz avaliada nesse estudo.....	113
Tabela XXVII. Amostras de eventos de precipitação da primeira campanha de coleta.....	114
Tabela XXVIII. Amostras de eventos de precipitação da segunda campanha de coleta.....	116

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Etapas fundamentais da avaliação da presença de agrotóxicos em amostras aquosas. Fonte: o autor.....	9
Figura 2. Figura 2. Emprego das técnicas de GC e HPLC em relação às propriedades físicas e químicas de volatilidade e polaridade do analito a ser analisado. Fonte: Adaptada de Silva e Collins ⁵³	10
Figura 3. Aumento do número de publicações, durante a última década, relacionadas com técnicas cromatográficas para ATZ. Fonte: <i>www.sciencedirect.com</i> ; palavras-chave utilizadas: “gas chromatography” e “atrazine; “liquid chromatography” e “atrazine”; Consulta realizada em Agosto de 2017	11
Figura 4. Etapas envolvidas no procedimento de SPME. A) a fibra de SPME é exposta na amostra, essa exposição pode ser realizada tanto por imersão direta ou por <i>Headspace</i> . B) A dessorção dos analito ocorre dentro do injetor cromatográfico. Fonte: Adaptado de Toxicologia Analítica ⁶⁰	13
Figura 5. Etapas envolvidas no procedimento de SPE: a) Condicionamento; b) Introdução da amostra; c) Lavagem do cartucho, eliminação de interferentes; d) Eluição do analito. [Adpatado de Macherey-Nagel] ⁶³	15
Figura 6. Etapas do processo de separação envolvendo a DLLME. a) Injeção da mistura do solvente dispersor e solvente extrator na amostras. b) formação da emulsão, microgotas. c) solvente extrator e o analito já extraído. d) recolhimento da fase sedimentada após a centrifugação. Fonte: Adaptado de Caldas ⁶²	20
Figura 7. Mapa de uso do solo e destaques para algumas das microbacias pré-selecionadas. A BP3 está localizada no oeste do estado do Paraná.. Fonte: Adpato de ITAIPU BINACIONAL ⁸⁹	30
Figura 8. Ilustração da determinação do LQ através dos parâmetros analitos da curva. Fonte: Adaptado de Ribeiro e colaboradores (2008) ⁹¹	40
Figura 9. Representação gráfica do gradiente de temperatura usado na separação cromatográfica da ATZ, DEA, DIA, e o padrão interno.....	46
Figura 10. Cromatograma do estudo de SPME comparando-se três fibras:	

CAR/PDMS (linha preta), PA (linha azul) e PDMS/DVB (linha vermelha). Extração realizada por imersão direta das fibras em uma solução de água ultrapura a pH 7,00 contendo 0,35 g mL ⁻¹ de NaCl, 2,0µg L ⁻¹ de ATZ e Etion, e 5,0µg L ⁻¹ do DIA e do DEA por 1 hora a 25° C. Dessorção da fibra a 250,0 °C por 5 minutos.....	49
Figura 11. Cromatograma referente a SPE. Amostra de água ultra pura (200,0 mL) fortificada com 2,0 µg L ⁻¹ para ATZ e Etion, 5,0 µg L ⁻¹ para DEA e DIA, extraída com cartucho Oasis [®] HLB, e o seu extrato final em 1,0 mL de diclorometano.....	51
Figura 12. Gráficos de probabilidade normal sobre os efeitos de cada variável - 1 – solvente extrator, 2 – solvente dispersor e 3- força iônica para:(A) ATZ; (B) DEA e (C) DIA	59
Figura 13. Representação das superfícies de resposta para a interação entre solvente dispersor e solvente extrator obtidas para o planejamento Doehlert na otimização das condições da DLLME para: (A) ATZ; (B) DEA; (C) DIA.....	60
Figura 14. Cromatograma da extração por DLLME em matriz de água da nascente. I, cromatograma de cor vermelha representa a matriz fortificada com ATZ, DEA e DIA nas concentrações de 5,0µg L ⁻¹ e o padrão interno (etion) em concentração de 2,0µg L ⁻¹ . II, cromatograma de cor azul representa a matriz não fortificada, e. As condições da extração foram: 163,0µL de diclorometano, 550,0µL de acetona, 0,10 g mL ⁻¹ de cloreto de sódio em 5,0 mL de amostra a pH 7,00.....	61
Figura 15. Estudo do efeito de matriz comparando-se a inclinação da curva analítica em quatro diferentes soluções aquosas fortificadas com ATZ a diferentes concentrações. A cor azul indica água ultra pura, a cor laranja indica água sintética e a cor amarela indica a água da matriz.....	68
Figura 16. Estudo do efeito de matriz comparando-se a inclinação da curva analítica em quatro diferentes soluções aquosas fortificadas com DEA a diferentes concentrações. A cor azul indica água ultra pura, a cor laranja indica água sintética e a cor amarela indica a água da matriz	69
Figura 17. Estudo do efeito de matriz comparando-se a inclinação da curva	

analítica em quatro diferentes soluções aquosas fortificadas com DIA a diferentes concentrações. A cor azul indica água ultra pura, a cor laranja indica água sintética e a cor amarela indica a água da matriz	69
Figura 18. Cromatograma referente amostra do evento de precipitação do PA17 do dia 22/02/2017. Extração realizada em DLLME, 5 mL de amostra em concentração de 0,1 g mL ⁻¹ de NaCl, 163 µL de Diclorometano (solvente extrator) e 550 µL de Acetona(solvente dispersor), em pH 7. ATZ em concentração de 2,89 ± 0,17, DEA 0,80 ± 0,02 e DIA 1,22 ± 0,01 µg L ⁻¹ , o padrão interno (etion) em concentração de 2 µg L ⁻¹	77
Figura 19. Mapa da presença de microcontaminantes na BP3.....	84
Figura 20. Espectro de massas da ATZ.....	97
Figura 21. Espectro de massas do DEA.....	97
Figura 22. Espectro de massas do DIA.....	98
Figura 23. Espectro de massas do Etion.....	98
Figura 24. Planilha referente ao planejamento Doehlert de modelo quadrático para Atrazina.....	99
Figura 25. Gráfico da regressão dos valores estimados pelos valores observados do modelo quadrático para ATZ.....	100
Figura 26. Gráfico da distribuição dos resíduos do modelo quadrático para ATZ.....	100
Figura 27. Gráfico referente a Probalidade normal da ATZ.....	100
Figura 28. Planilha referente ao planejamento Doehlert de modelo quadrático para DEA.....	101
Figura 29. Gráfico da regressão dos valores estimados pelos valores observados do modelo quadrático para DEA.....	101
Figura 30. Gráfico da distribuição dos resíduos do modelo quadrático para DEA.....	102
Figura 31. Gráfico referente a Probalidade normal da DEA.....	103
Figura 32. Planilha referente ao planejamento Doehlert de modelo quadrático para DIA.....	104
Figura 33. Gráfico da regressão dos valores estimados pelos valores observados do modelo quadrático para DIA.....	105
Figura 34. Gráfico da distribuição dos resíduos do modelo quadrático para	

DIA.....	105
Figura 35. Gráfico referente a Probabilidade normal da DIA.....	105
Figura 36. Representação da superfície de resposta para a interação entre força iônica e solvente extrator obtidas para o planejamento Doehlert na otimização das condições da DLLME para ATZ.....	107
Figura 37. Representação da superfície de resposta para a interação entre força iônica e solvente dispersor obtidas para o planejamento Doehlert na otimização das condições da DLLME para ATZ.....	107
Figura 38. Representação da superfície de resposta para a interação entre força iônica e solvente extrator obtidas para o planejamento Doehlert na otimização das condições da DLLME para DEA.....	108
Figura 39. Representação da superfície de resposta para a interação entre força iônica e solvente dispersor obtidas para o planejamento Doehlert na otimização das condições da DLLME para DEA.....	108
Figura 40. Representação da superfície de resposta para a interação entre força iônica e solvente extrator obtidas para o planejamento Doehlert na otimização das condições da DLLME para DIA.....	109
Figura 41. Representação da superfície de resposta para a interação entre força iônica e solvente dispersor obtidas para o planejamento Doehlert na otimização das condições da DLLME para DIA.....	109
Figura 42. Curva analítica de 0,075 – 3,00 ($\mu\text{g L}^{-1}$) para ATZ em água da matriz....	110
Figura 43. Curva analítica de 0,075 – 3,00 ($\mu\text{g L}^{-1}$) para DEA em água da matriz.	110
Figura 44. Curva analítica de 0,50 – 4,00 ($\mu\text{g L}^{-1}$) para DIA em água da matriz.....	110
Figura 45. Gráfico de Resíduo para curva de ATZ.....	111
Figura 46. Gráfico de Resíduo para curva de DEA.....	111
Figura 47. Gráfico de Resíduo para curva de DIA.....	112

ÍNDICE DE APÊNDICES

Apêndice I.....	96
Apêndice II.....	97
Apêndice III.....	99
Apêndice IV.....	106
Apêndice V.....	110
Apêndice VI.....	113
Apêndice VII.....	114

GLOSSÁRIO DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- \bar{x} – Valor médio das concentrações
- \bar{y} – Valor médio do sinal analítico
- a_0 – Coeficiente linear
- a_1 – Coeficiente angular
- ACN – Acetonitrila
- ADAPAR – Agência de Defesa Agropecuária do Paraná
- ANOVA – Análise de variância
- ATZ– Atrazina
- b – Intercepto
- BP3– Bacia Hidrográfica do Paraná 3
- C_0 – Concentração inicial
- CAR/PDMS – Carboxen/polidimetilssiloxano
- C_f – Concentração final
- CMD– Concentração Máxima Detectada
- C_p – Concentração predita
- C_t – Concentração teórica
- DACT– Diaminaclorotriazina
- DAD– Detector de arranjo de diodos
- DCM – Diclorometano
- DEA– Deetilatrazina
- DIA– Deisopropilatrazina
- DL50– Dose letal para matar 50 % de uma população.
- DLLME– Microextração dispersiva líquido– líquido, em inglês – *dispersive liquid-liquid microextraction*
- DLLME– SFO– Microextração dispersiva líquido– líquido solidificação da fase orgânica, em inglês *Dispersive Liquid-Liquid Microextraction – Solidification Fase Orgânica*.
- dp – Desvio padrão da curva analítica
- DPR – Desvio padrão relativo
- ECD– Detector por captura de elétrons, em inglês – *Electron Capture Detector*
- EPA– Agência de proteção ambiental, em inglês – *Environmental Protection Agency*
- F_{calc} – Valor de F calculado
- FE– Fator de enriquecimento

FID– Detector de ionização em chama, em inglês – *Flame Ionization Detector*

FV– Fonte de Variação

GC– Cromatografia em fase gasosa, em inglês – *Gas Chromatography*

GC– MS– Cromatografia em fase gasosa seguido do analisador de massas, em inglês –
Gas Chromatography Mass Spectrometry

HA – Hidroxiatrazina

HLB– Balanço Hidrofílico Lipofílico

K_{oc} – Coeficiente de partição de carbono orgânico

Kow – Coeficiente de partição octanol agua

LC– MS– Cromatografia em fase líquida acoplado ao analisador de massas, em inglês
– *Liquid Chromatography Mass Spectrometry*

LC– MS/QTOF– Cromatografia em fase líquida acoplado ao analisador de massas
tempo de voo, em inglês – *Liquid Chromatography Mass Spectrometry Time of Fly*

LD– Limite de Detecção

LQ– Limite de Quantificação

m/z – Razão massa– carga

MQ– Média Quadrática

MS– espectrômetro de massas

n.d.– não detectado

nGL– Número de Graus de Liberdade

NPD – detector de nitrogênio e fósforo, em inglês – *Nitrogen Phosphoro Detector*

nq – não quantificado

PA – poliacrilato

PDMS/DVB – polidimetilssiloxano/ divinilbenzeno

R^2 – Coeficiente de Determinação

rpm – rotações por minuto

S/N – Relação sinal– ruído

SD – Solvente Dispensor

SE – solvente extrator

SG– Valor Significativo.

SIM – do inglês, *selected ion monitoring*,

SPE– extração em fase sólida, em inglês – *solid phase extraction*

SPME– microextração em fase sólida, em inglês – *solid pahse microextraction*

SQ– Soma Quadrática

s_y – Desvio padrão,

t – Valor da distribuição de t Student

TPs – Produtos de transformação

X_c – Valor da concentração

Y_h – Valor da intensidade de y

ρ – Nível de significância

RESUMO

A Bacia Hidrográfica do Paraná 3 (BP3) situada no oeste do estado do Paraná, apresenta um consumo de agrotóxicos acima da média do estado. A atrazina (ATZ) é um dos principais agrotóxicos utilizados na BP3. Foram avaliadas três técnicas de extração e de pré-concentração: extração em fase sólida (SPE), microextração em fase sólida (SPME) e microextração dispersiva líquido-líquido (DLLME), com o objetivo de avaliar a capacidade de extração de ATZ e seus produtos de transformação (TPs), deisopropilatrizona (DIA) e deetilatrizona (DEA). A DLLME foi realizada a otimização através do planejamento Doehlert. A SPE e SPME foram realizadas a partir de adaptações da literatura. A escolha da técnica de extração foi realizada através da análise de custos e demanda temporal. A DLLME apresentou o menor valor de custo de extração e demanda temporal quando comparada com as outras. Esta técnica foi utilizada como rotina na análise das amostras da BP3. Foram analisadas 407 amostras, sendo que dessas, 23.83 % apresentaram a presença de ATZ, e uma amostra apresentou concentração acima do limite estabelecido na resolução CONAMA 357/2005. Sobre os TPs, 1,22 % das amostras apresentaram o DEA. Já para o DIA, somente em uma amostra esse analito foi quantificado.

ABSTRACT

The Paraná 3 Hydrographic Basin (BP3), located in the western part of the state of Paraná, shows a consumption of pesticides above the state average. Atrazine (ATZ) is one of the main pesticides used in BP3. Three extraction and preconcentration techniques were used: solid phase extraction (SPE), solid phase microextraction (SPME) and dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME), with the objective of evaluating the extraction capacity of ATZ and its transformation products (TPs), deisopropylatrazine (DIA) and deethylatrazine (DEA). The DLLME was optimized through Doehlert planning. SPE and SPME were carried out based on adaptations of the literature. The extraction technique was chosen through the analysis of costs and time demand. DLLME presented the lowest value of extraction cost and temporal demand when compared to the others. This technique was used routinely in the analysis of BP3 samples. A total of 407 samples were analyzed, of which, 23.83% presented the presence of ATZ, and one sample presented concentration above the limit established in CONAMA Resolution 357/2005. On the TPs, 1.22% of the samples presented the DEA. For the DIA, only in one sample this analyte was quantified.

1 INTRODUÇÃO

Dados recentes sobre o consumo e uso de agrotóxicos no Brasil evidenciam o amplo uso dessas substâncias na agricultura nacional. O consumo de agrotóxicos no Brasil é tão intenso, que no ano de 2008, alcançou a marca de 673,9 mil toneladas, tornando o Brasil o maior consumidor de agrotóxicos do mundo¹. No ano de 2009, o Brasil superou a sua própria marca e chegou a consumir, aproximadamente, um milhão de toneladas de agrotóxicos, representando um consumo médio de 5,2 kg de agrotóxico por habitante/ano. Devido à repercussão negativa do Brasil ter sido campeão mundial no consumo de agrotóxicos, em 2010 não foram divulgados dados sobre o consumo, mas apenas o faturamento obtido com a venda dessas substâncias que chegou a 7,2 bilhões de dólares². Em 2011, houve um aumento de 16,3% nas vendas de agrotóxicos, alcançando 8,5 bilhões de dólares, e 80% do valor das vendas está representado pelo uso de agrotóxicos usados nas lavouras soja, milho, algodão e cana-de-açúcar³.

Nesse contexto, o estado do Paraná é o terceiro maior consumidor de agrotóxicos do Brasil. No ano de 2011 o estado consumiu 96,3 mil toneladas de agrotóxicos, uma média de 9,6 kg ha⁻¹ano⁻¹. Os pontos de maior consumo de agrotóxico estão concentrados em regiões onde predominam as culturas de milho e soja, ou seja, nas Bacias Hidrográficas do Alto Ivaí, Baixo Iguaçu, Paraná 2, Paraná 3 e Piquiri. O consumo de agrotóxicos da Bacia Hidrográfica do Paraná 3 (BP3) é de 11,5 kg ha⁻¹ano⁻¹, estando acima da média do estado que é de 10 kg ha⁻¹ano⁻¹³. Adicionalmente, outro dado importante diz respeito ao recolhimento das embalagens de agrotóxicos. No ano de 2013, foram coletadas 4,5 mil toneladas de embalagens nas Bacias hidrográficas do Paranapanema 1, Paranapanema 2 e Paraná 3, sendo um indicativo indireto do alto consumo de agrotóxicos nessas Bacias³.

Do ponto de vista legal, desde 1990, foi estabelecida a obrigatoriedade do monitoramento de agrotóxicos na água destinada ao consumo humano, através da publicação da Portaria do Ministério da Saúde (MS)/GM nº 36/1990⁴. Tal diretriz continuou a ser revisada e atualizada pelas Portarias subsequentes: Portaria MS nº 1469/2000⁵, Portaria MS nº 518/2004⁶ e na atual Portaria MS nº 2.914/2011⁷. Contudo, para águas superficiais, ou seja, não destinadas ao consumo humano, a Resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente-CONAMA nº 357/2005⁸ dispõe sobre os padrões de qualidade de água, estabelecendo o limite máximo em que os compostos orgânicos legislados podem ser encontrados nos diferentes corpos hídricos. No caso da atrazina (ATZ) a concentração

máxima permitida para água doce (rios de classe 2) é de, 2,0 $\mu\text{g L}^{-1}$. Por sua vez, os produtos de transformação (TPs) da ATZ deisopropilatrizona (DIA) e deetilatrizona (DEA) não são legislados.

Não há dúvidas de que a crescente comercialização e consumo dos agrotóxicos favoreçam a contaminação ambiental e, conseqüentemente, demandem ações avaliativas do impacto, ou seja, a realização de análises periódicas que permitam verificar os níveis de contaminação nos diferentes compartimentos ambientais (água, ar e solo). Além disso, a importância de monitorar os agrotóxicos não é uma preocupação recente, visto que nos últimos 30 anos, muitas metodologias analíticas foram publicadas. Porém, a necessidade de se determinar agrotóxicos em matrizes cada vez mais complexas, nas quais mais de um agrotóxico e seus produtos de transformação podem estar presentes e onde uma diversidade de interferentes pode ser encontrada, faz desta temática um assunto extremamente atual.

Na Bacia Hidrográfica do Paraná 3 destacam-se as culturas de milho, soja e trigo ³. Em especial, nas culturas de milho, o principal agrotóxico utilizado é a ATZ, sendo também empregada nas lavouras de abacaxi, cana-de-açúcar, pinus, seringueira, sisal e sorgo ⁹.

A ATZ é um herbicida aplicado na lavoura para o combate de ervas daninhas. Alguns estudos realizados no Brasil indicam que a ATZ foi encontrada em águas superficiais no Rio Grande do Sul em concentrações de 0,48 a 0,82 $\mu\text{g L}^{-1}$, no Mato Grosso em concentrações de 4,92 $\mu\text{g L}^{-1}$ a 18,90 $\mu\text{g L}^{-1}$ em águas superficiais e subterrâneas, respectivamente, e em reservatórios de água no Ceará em concentração de 15 $\mu\text{g L}^{-1}$ ^{10,11,12}. Nenhum estudo foi realizado até o presente momento para a avaliação de ATZ e seus TPs na BP3.

A identificação e quantificação de ATZ e seus TPs tem sido realizada mediante o emprego de técnicas de separação, destacando-se a cromatografia em fase líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS) ^{13,14,15} e cromatografia em fase gasosa seguido de espectrometria de massas (GC-MS) ^{16,17,18}. Anteriormente à análise cromatográfica, devido à baixa concentração da ATZ e de seus TPs na maioria das amostras de água superficiais, uma etapa prévia de pré-concentração dos analitos de interesse é requerida antes da separação cromatográfica. Na literatura, as técnicas de extração em fase sólida (do inglês: *solid-phase extraction*, SPE) ^{13,14,19,20,21,22} e de microextração em fase sólida (do inglês: *solid-phase microextraction*, SPME) ^{23,24,25} são as mais amplamente utilizadas, principalmente devido ao baixo consumo de solventes orgânicos, no caso da SPE, ou por não requerer o emprego de solventes, no caso da SPME. Recentemente, alternativas estão sendo estudadas, principalmente no que diz respeito às técnicas de extração e pré-concentração miniaturizadas. Assim, a microextração líquido-líquido dispersiva (do inglês: *dispersive liquid-liquid*

microextraction, DLLME) ^{26,27} vem ganhado destaque, por ser uma técnica que emprega microlitros de solventes orgânicos, além da rapidez e simplicidade de execução e por apresentar baixo custo, principalmente se comparada à SPE, no qual os cartuchos de extração comerciais ainda apresentam um elevado custo para aquisição.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

A presente dissertação tem como objetivo estabelecer metodologia analítica para detecção e quantificação de ATZ, DEA e DIA em amostras de águas superficiais da Bacia Hidrográfica do Paraná 3, empregando a DLLME como técnica de extração, associada à cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas com analisador do tipo quadrupolo.

2.2 Objetivos Específicos

- Desenvolver e validar a metodologia de DLLME seguido da técnica de cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas com analisador do tipo quadrupolo para análise de ATZ, DEA e DIA presentes em amostras de água, fazendo uso de ferramentas quimiométricas de otimização (matriz Doehlert);
- Avaliar a metodologia de DLLME comparativamente ao uso da SPME e SPE, para extração e/ou pré-concentração da ATZ, DEA e DIA;
- Avaliar a presença de ATZ, DEA e DIA em amostras de águas superficiais da Bacia Hidrográfica do Paraná 3 estabelecendo um mapa de monitoramento.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Presença de agrotóxicos no meio ambiente

A contaminação dos agrotóxicos no meio ambiente, em especial, nas águas superficiais e subterrâneas, é decorrente de alguns fatores que determinaram a mobilidade e a persistência desses princípios ativos nesse compartimento ambiental. São exemplos de fatores, a quantidade de aplicação, sua frequência de uso, forma de aplicação, condições meteorológicas, volume da precipitação, direção e força do vento, características do terreno e as propriedades físico-químicas dos agrotóxicos²⁹. Com relação às propriedades físico-químicas, o percurso dos princípios ativos em águas superficiais dependerá do coeficiente de partição de carbono orgânico (K_{oc}) e da solubilidade. Com relação à contaminação atmosférica, altos valores da constante de Henry que representa a tendência volatilização de cada substância, provocará dispersão pelo vento e chuva²⁸.

Quando o agrotóxico é aplicado nos cultivos, existe a tendência momentânea de apresentar interação com o solo. Esta interação é medida pelo coeficiente de partição de carbono orgânico (K_{oc}). Valores acima de 1000 determinam que o agrotóxico fique adsorvido fortemente ao solo, valores entre 300 e 500, indicam que os pesticidas terão escoamento pelo solo²⁸. Nos períodos em que ocorre precipitação, a solubilidade é uma propriedade importante, pois determina o grau em que o agrotóxico será lixiviado do solo para o lençol freático ou para os corpos d'água mais próximos. Em geral, agrotóxicos com solubilidades inferiores a $1,0 \text{ mg L}^{-1}$, tendem a permanecer no solo em eventos de chuvas, mas quando os valores de solubilidade estão acima de $30,0 \text{ mg L}^{-1}$, ocorre a lixiviação e escoamento dos mesmos²⁸.

Nesse contexto, o tempo de meia vida do agrotóxico também é uma variável importante de ser observada, pois indicará se a substância é persistente na natureza. Um agrotóxico é classificado como não persistente para valores de tempo de meia vida abaixo de 30 dias, moderadamente persistente entre 30 a 100 dias e persistente acima de 100 dias²⁸.

O agrotóxico no meio ambiente está sujeito ao intemperismo causado pelo contato com solo, ar e água, o que ocasiona processos de transformação. Os produtos deste processo podem ser inertes ao meio ambiente. Entretanto, outros produtos de transformação (TPs), que em geral são a maior parte dos casos, podem apresentar toxicidade igual ou superior ao próprio agrotóxico e/ou uma persistência superior ao princípio ativo de origem²⁸.

Os TPs dos agrotóxicos são gerados por processos químicos e/ou biológicos, sendo essencialmente fotoquímicos e por ações de microrganismos ²⁸. A degradação fotoquímica ocorre por diferentes tipos de reações, como a hidrólise, oxirredução e ionização. Esta ocorre com a quebra da molécula através de fótons provenientes da luz solar. Essa degradação é mais suscetível quando o agrotóxico ainda se encontra em contato de uma cobertura viva (plantas) ou uma cobertura morta (palhada), por apresentar uma exposição maior a luz solar ²⁸. A biodegradação ou degradação microbiológica é resultado da ação de bactérias, fungos ou outros microrganismos que atuam sobre os agrotóxicos frequentemente no solo, mas também podem atuar na água, assim formando os metabólitos. Isso acontece, quando o microrganismo usa o agrotóxico como fonte de carbono e energia, ou seja, uma forma alternativa de alimento, gerando o(s) metabólito(s) como resíduo(s).

Apesar dos esforços das agências de controles e fiscalizações não há uma forma efetiva de evitar-se a contaminação dos agrotóxicos no meio ambiente. A única forma seria realizar o banimento dos agrotóxicos e mudar a prática de cultivo para uma agricultura sustentável. Assim, atualmente a única forma de verificar os níveis das contaminações advindas do uso massivo de agrotóxicos é realizando o monitoramento ambiental dessas substâncias nos diferentes compartimentos ambientais e observar se as concentrações encontradas estão de acordo com os limites estabelecidos pela legislação vigente ³⁰.

3.2 Atrazina e seus produtos de transformação

Em geral, a ATZ é aplicada após o plantio da cultura, ou seja, no período pré-emergencial, e o seu mecanismo de ação ocorre através das raízes, local em que essa substância é absorvida, e então, levada pelo xilema até a membrana do cloroplasto onde interrompe o fluxo de elétrons. A ATZ pode, também, ser aplicada no período pós-emergencial, entrando em contato direto com as folhas onde é absorvida e penetra rapidamente nos cloroplastos, atuando de forma direta. Sob o ponto de vista bioquímico, a ATZ se fixa ao local da ligação Q_B , proteína D1 do fotossistema II, bloqueando o fluxo de elétrons entre Q_A e Q_B , interrompendo a fixação do CO_2 e a produção de ATP e $NADPH_2$, elementos essenciais para o desenvolvimento da planta ³¹.

A avaliação da toxicidade de uma substância é determinada por experimentos em organismos vivos para identificar o valor da dose letal (DL_{50}). Esse valor é obtido através de

aplicações de doses da substância em questão, onde se avalia qual a concentração das doses testadas é capaz de matar ou afetar a função fisiológica de 50% da população de organismos empregados no bioensaio. As doses selecionadas para determinar o DL₅₀ podem ser administradas por via oral, cutânea e/ou inalação. O valor de DL₅₀ administrado por via oral de ATZ, testado em ratos de ambos os sexos, foi determinado em 3,517 g kg⁻¹. Os valores de DL₅₀ para os TPs da ATZ variaram conforme o sexo dos organismos testados. Assim, o DL₅₀ para o DEA foi de 1,890 g kg⁻¹ e 0,668 g kg⁻¹ para machos e fêmeas, respectivamente. Já para o DIA, os DL₅₀ determinados foram de 2,290 g kg⁻¹ e 0,810 g kg⁻¹ para machos e fêmeas, respectivamente, sendo que as doses foram subministradas por via oral em ambas as populações de ratos ³².

Alguns estudos têm sido realizados para averiguar os efeitos nocivos decorrentes da exposição continuada à ATZ. Um estudo realizado na Índia demonstrou a relação entre a exposição à ATZ e nascimentos de bebês com baixo peso corporal ³³. Os autores revisaram os dados de mais de 24 mil nascimentos na Índia e de sua localização. Foi identificada a presença de ATZ em concentrações acima 0,7 µg L⁻¹ nas águas de torneira das residências das gestantes, sendo este associado ao aumento significativo de bebês que nasceram com baixo peso corporal. Em outro estudo, foram investigados os efeitos dos produtos de transformação (TPs) da ATZ, DEA, DIA e diaminaclorotriazina (DACT) em ratos. Os resultados apontaram que os TPs afetavam diretamente o progresso da puberdade e do desenvolvimento do sistema reprodutor dos ratos ³⁴.

Observa-se que o monitoramento da ATZ, em diferentes matrizes aquosas, é um tema recorrente, abordado em diferentes estudos (Quadro I) nos últimos anos. Todavia, o monitoramento dos TPs não possui a mesma frequência (Quadro I).

Quadro I. Estudos sobre o monitoramento de ATZ, DEA e DIA em águas superficiais e subterrâneas.

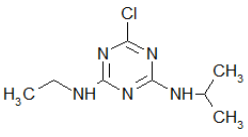
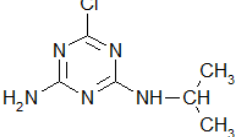
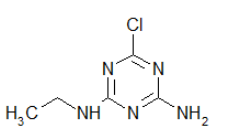
Local	Matriz de água	ATZ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	DEA ($\mu\text{g L}^{-1}$)	DIA ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Referência
Argentina	Superficiais	0,434	-*	-*	Bonasea e Colaboradores ³⁵
Argentina	Superficiais	1,400	-*	-*	Geronimo e Colaboradores ³⁶
Brasil-CE	Superficiais	15,000	-*	-*	Sousa e Colaboradores ¹²
Brasil-CE	Superficiais	0,960	-*	-*	Milhomee Colaboradores ³⁷
	Subterrâneas	1,450	-*	-*	
Brasil-MT	Superficiais ^a	9,300	NQ	-*	Nogueira e Colaboradores ¹¹
	Subterrâneas ^a	18,900	n.d.	-*	
	Superficiais ^b	4,920	1,260	-*	
Brasil-SP	Superficiais	0,320	-*	-*	Machado C e Colaboradores ³⁸
Brasil-RS	Superficiais	0,820	-*	-*	Bortoluzzie Colaboradores ¹⁰
Brasil **	Superficiais	0,019	-*	-*	Machado e Colaboradores ³⁹
China	Superficiais	0,780	0,652	-*	Mae Colaboradores ⁴⁰
China	Superficiais	10,83	n.d.	n.d.	Min e Colaboradores ²¹
Espanha	Subterrâneas	0,130	0,240	0,120	Nevado e Colaboradores ²²
Espanha	Superficiais	0,0186	0,0972	0,0302	Masiáe Colaboradores ¹³
Espanha	Subterrâneas	0,756	0,813	0,761	Köck-Schulmeyer e Colaboradores ⁴¹
EUA	Superficiais	0,840	1,150	0,910	Jiang e Colaboradores ⁴²
EUA	Superficiais	49,300	-*	-*	Rocha e Colaboradores ⁴³
EUA	Superficiais	6,600	-*	-*	Target e Colaboradores ⁴⁴
EUA	Superficiais	0,302	0,0568	-*	Elliott & VanderMeulen ⁴⁵
Grécia	Superficiais	0,230	0,090	-*	Lambropoloue Colaboradores ²⁵
França	Pluviais	0,794	0,498	n.d.	Sauret-Szczepanski Colaboradores ⁴⁶
França	Subterrâneas	0,224	1,072	0,170	Hu e Colaboradores ²⁴
Portugal	Subterrâneas	29,00	-*	-*	Cerejeira e Colaboradores ⁴⁷

*Analito não investigado. ** Estudo realizado em 21 capitais e o Distrito Federal do Brasil. n.d.: não detectado; NQ: não quantificado; a: referente à região de Campo Verde-MT; b: referente à região Lucas do Rio Verde-MT.

Na Comunidade Europeia, a Diretiva 2008/105/CEE ⁴⁸ que estabelece Normas de Qualidade Ambiental para águas superficiais, define que a concentração máxima admissível de ATZ é de 2,0 µg L⁻¹ e a média aritmética dos 12 meses de ocorrência não pode ser superior a 0,6 µg L⁻¹. Valores similares são encontrados na legislação brasileira, em especial na resolução CONAMA n° 357 de 2005 ⁸ que estabelece que em água doce (rios, classe 2) a concentração máxima permitida para a ATZ é de 2,0 µg L⁻¹. Os TPs DEA e DIA não são legislados tanto na União Europeia como no Brasil. Tal situação reflete um quadro preocupante uma vez que a degradação da ATZ no meio ambiente ocorre naturalmente por processos físicos e/ou químicos e/ou biológicos, e também pelo fato destes TPs apresentarem DL₅₀ inferiores a da ATZ e solubilidades maiores que a ATZ (Quadro II), facilitando o transporte nos diferentes compartimentos do meio ambiente.

A formação do DEA e do DIA ocorre por N-dealquilação, removendo as cadeias laterais da molécula da ATZ. Por sua vez, a hidrólise da ligação cloro-carbono produz a hidroxiatrazina (HA) ⁴⁹. O Quadro II apresenta as principais propriedades físico-químicas da ATZ, DEA e DIA.

Quadro II. Propriedades físicas e químicas da ATZ, DEA e DIA.

	ATZ	DEA	DIA
Estrutura Química			
CAS	1912-24-9	6190-65-4	1007-28-9
Formula molecular	C ₈ H ₁₄ ClN ₅	C ₆ H ₁₀ ClN ₅	C ₅ H ₈ ClN ₅
Massa molar (g mol⁻¹)	215,68	187,63	173,60
Pressão de vapor (mm Hg a 25° C)	2,89x10 ⁻⁷	9,33x10 ⁻⁵	2,11 x10 ⁻⁴
Solubilidade em água (mg L⁻¹)	34,7 (26,0°C)	3200 (22,0°C)	670 (22,0°C)
log Kow	2,61	1,51	1,15
pKa	1,71	1,65	1,58

Fonte: <http://www.chemspider.com/> palavras chaves utilizadas: "Atrazine-desisopropyl"; "Atrazine-desethyl"; "Atrazine".

3.3 Técnicas Analíticas para a determinação de agrotóxicos em matrizes ambientais aquosas

A determinação de agrotóxicos em amostras ambientais constitui um desafio analítico, pois requer a identificação e quantificação destes compostos em matrizes complexas em níveis de concentração muito baixos, e ainda na presença de outros compostos que podem atuar como interferente. Adicionalmente, pode representar uma difícil tarefa em virtude das diferentes características destas substâncias (polaridade, massas molares, sensibilidade térmica). Por conseguinte, para realizar a correta quantificação desses compostos é necessário empregar técnicas analíticas de separação que sejam simultaneamente sensíveis, seletivas e robustas; tal como são as técnicas cromatográficas de análise. Neste contexto, o desenvolvimento de metodologias baseadas na cromatografia em fase gasosa e/ou líquida possibilita a determinação de agrotóxicos em níveis de ng L^{-1} ou inferiores.

A avaliação da presença de agrotóxicos em matrizes aquosas de relevância ambiental requer a execução de várias etapas analíticas (Figura 1). A amostragem é a etapa inicial e considerada crucial para se obter dados representativos que permitam a correta avaliação da contaminação e/ou presença dos analitos de interesse.

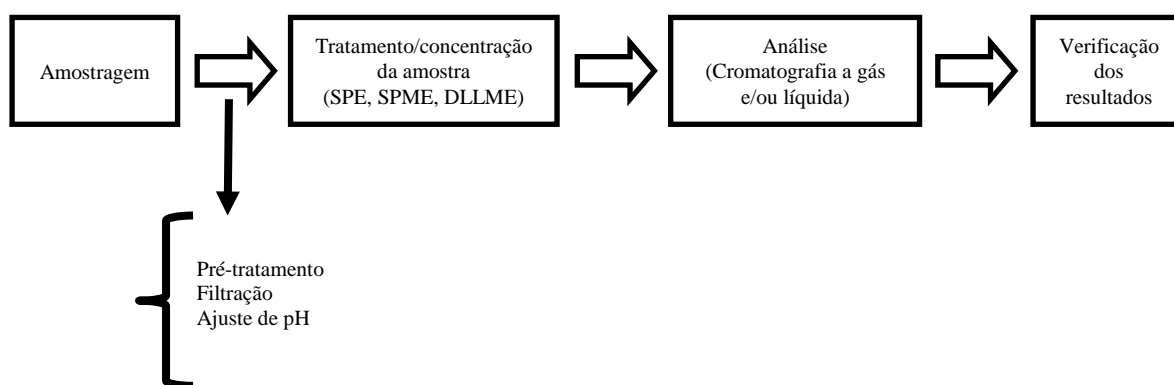


Figura 1. Etapas fundamentais na análise de agrotóxicos em amostras aquosas.

Fonte: o autor

Uma vez aplicado no meio ambiente, ocorre o espalhamento do agrotóxico nos vários compartimentos ambientais (água, solo e ar), o que pode refletir em baixa concentração. Desta forma, o uso de técnicas de extração e pré-concentração faz-se necessário, como é o caso da Extração em Fase Sólida (SPE), da Microextração em Fase Sólida (SPME) e da

Microextração Líquido Dispersiva (DLLME)^{26,35,50,51}. Adicionalmente, uma etapa de pré-tratamento pode ser necessária e, para tanto, a filtração e o ajuste de pH prévios à etapa de extração podem ser requeridos. Para realizar a determinação qualitativa e/ou quantitativa dos agrotóxicos no extrato final obtido, utilizam-se técnicas cromatográficas para separar cada analito da mistura complexa que constitui a amostra.

A cromatografia em fase gasosa - GC (do inglês, *gas chromatography*) pode ser utilizada na determinação de compostos voláteis ou semivoláteis. Métodos baseados no uso da cromatografia líquida de alta ou ultra eficiência – HPLC ou UPLC (do inglês *high or ultra performance liquid chromatography*) são adequados para uma variedade de compostos orgânicos que apresentam polaridade mais alta e volatilidade mais baixa ou ainda elevada instabilidade térmica. Diagramas de polaridade-volatilidade, como o representado na Figura 2, podem esquematizar de forma simplificada qual das técnicas de separação é recomendada em cada situação, de acordo com as propriedades físicas e químicas de volatilidade e polaridade do analito a ser analisado⁵².

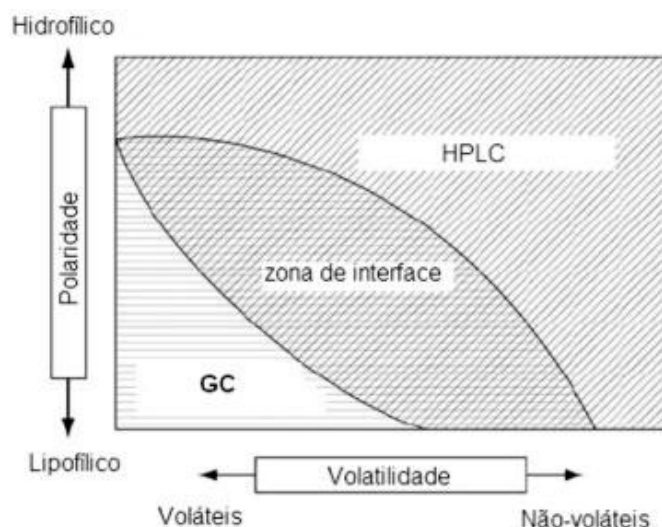


Figura 2. Emprego das técnicas de GC e HPLC em relação às propriedades físicas e químicas de volatilidade e polaridade do analito a ser analisado. Fonte: Adaptada de Silva e Collins⁵³.

As separações por GC podem utilizar detectores universais como detector de ionização em chama – FID (do inglês, *Flame Ionization Detector*) ou ainda, dependendo da estrutura dos analitos de interesse, detectores de maior sensibilidade e seletividade, como o detector por captura de elétrons – ECD (do inglês, *Electron Capture Detector*) ou detector de nitrogênio e fósforo – NPD (do inglês, *Nitrogen-Phosphorus Detector*). A detecção utilizando

espectrômetro de massas – MS (do inglês, *Mass Spectrometry*) e ionização por impacto de elétrons tornou-se a mais utilizada, devido a sua sensibilidade em limites de detecção em níveis traços ou ultratraços e às possibilidades de utilização de softwares de tratamento de dados com bibliotecas contendo milhares de espectros de massas para confirmação das estruturas dos compostos analisados. Os analisadores MS vêm sendo os mais utilizados para determinação de poluentes orgânicos voláteis ou semivoláteis por GC ⁵³. Publicações dos últimos 11 anos demonstram o crescimento do emprego da técnica de GC e HPLC para a determinação de ATZ (Figura 3).

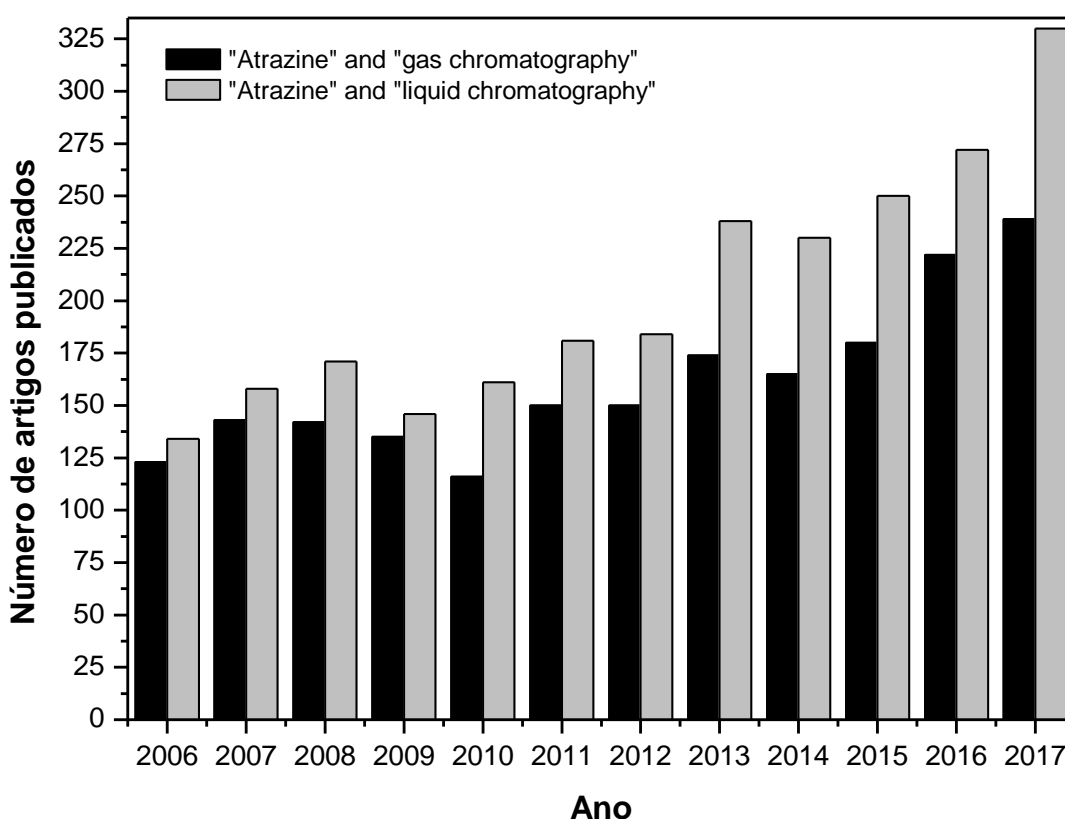


Figura 3. Aumento do número de publicações, durante a última década, relacionadas com técnicas cromatográficas para ATZ. Fonte: *www.sciencedirect.com*; palavras-chave utilizadas: “gas chromatography” e “atrazine”; “liquid chromatography” e “atrazine”; Consulta realizada em Agosto de 2017.

A metodologia analítica para a determinação de agrotóxicos está, todavia, em evolução e o número de métodos descritos na literatura cresceu consideravelmente na última década (Figura 3). A melhoria nas técnicas analíticas segue tendências em duas direções:

1. Obtenção de métodos de análise muito sensíveis e seletivos que permitam obter limites de detecção na faixa de ng L^{-1} – $\mu\text{g L}^{-1}$, para a identificação e quantificação de agrotóxicos em amostras ambientais.
2. Incremento da versatilidade dos métodos de análise para poder analisar simultaneamente uma ampla variedade de compostos com diferentes propriedades físicas e químicas (ex. $\log K_{ow}$, solubilidade em água, pKa , peso molecular).

Pela sua complementaridade, a combinação entre HPLC e GC é a melhor estratégia para uma completa caracterização de contaminantes orgânicos presentes em amostras aquosas ambientais, como se vê refletido em diversos trabalhos científicos^{16,54,55,56,57}.

É possível destacar algumas perspectivas para a área de cromatografia aplicada ao estudo de agrotóxicos, entre elas:

1. A necessidade de desenvolver métodos analíticos sensíveis, seletivos e robustos que alcancem limites de detecção e quantificação ainda menores para que a presença destes poluentes no meio ambiente seja avaliada de acordo com a legislação vigente, como é o caso dos agrotóxicos;
2. A identificação de produtos de transformação, associado ao aprofundamento dos ensaios biológicos e de toxicidade, para avaliação do potencial tóxico desses compostos, com vistas à elaboração de futuras bases jurídicas que permitam controlar/limitar também a presença destes;
3. A ampliação de metodologias analíticas que associem simplicidade, viabilidade econômica, sensibilidade e seletividade para monitorar de forma constante, diferentes amostras ambientais⁵³.

Finalmente, cabe destacar que, independente da técnica de separação e do detector/analizador utilizados, um requisito para caracterizar a eficiência dos métodos de análise e assegurar a qualidade dos resultados proporcionados é dispor de métodos que tenham sido submetidos ao processo de validação analítica.

3.4 Metodologias de Extração e Pré-concentração

3.4.1 Microextração em Fase Sólida (SPME)

A preocupação com a utilização de grandes volumes de solventes e o aumento de sensibilidade levaram ao surgimento de diferentes técnicas de microextração, sendo a mais

antiga a microextração em fase sólida (SPME) que foi desenvolvida por Pawliszyn & Arthur⁵⁸. Essa técnica baseia-se em dois princípios: adsorção dos analitos na superfície do sorvente e desorção dos analitos sob alta temperatura (Figura 4). A estrutura da SPME é constituída por uma fibra de sílica fundida recoberta por um material sorvente, cuja função é reter, em sua superfície, os analitos alvo. A extração dos analitos pode ser realizada por dois métodos: um por imersão direta da fibra na amostra (Figura 4a), e o outro por exposição da fibra na fase vapor da amostra, que é denominado por *Headspace*⁵⁹. Com a utilização da análise por GC, a desorção térmica dos analitos ocorre dentro do injetor (Figura 4b), devido à alta temperatura, e junto com o gás de arraste são direcionados à coluna cromatográfica, onde ocorre sua separação e detecção⁵⁹.

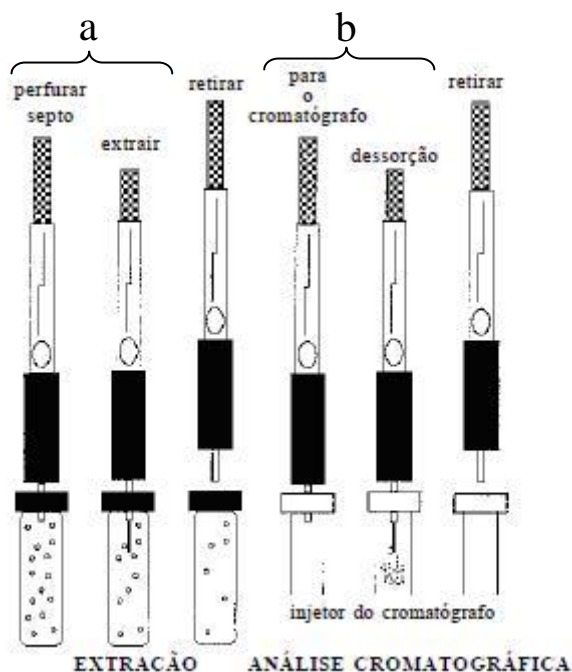


Figura 4. Etapas envolvidas no procedimento de SPME. a) a fibra de SPME é exposta na amostra, essa exposição pode ser realizada tanto por imersão direta ou por *Headspace*. b) A desorção dos analito ocorre dentro do injetor cromatográfico. Fonte: Adaptado de Toxicologia Analítica⁶⁰.

A eficiência da técnica de SPME depende de vários fatores, tais como: a temperatura e o tempo de extração, o efeito da força iônica, características da fibra e o volume da amostra. A otimização dessas variáveis é uma estratégia que pode permitir elevar a eficiência da técnica e, assim, justificar as vantagens que ela detém, tais como: redução do volume da amostra; simplicidade e um rápido processo de análise sem a necessidade de equipamentos ou

ferramentas especiais; eliminação do uso de solventes, diminuindo os custos; e alta sensibilidade⁵⁹. Por outro lado, as principais desvantagens são: não apresentar a possibilidade de eliminação de interferentes; fragilidade da fibra durante os processos de extração; e dificuldade de desorção de alguns componentes⁶¹.

No estudo realizado por Sauret-Szczepanski e Colaboradores⁴⁶ foram determinadas as concentrações de ATZ, DEA e DIA em águas pluviais utilizando fibra de 85 µm de poliacrilato. Nesse trabalho foram avaliados o tempo de adsorção, temperatura da amostra, força iônica, pH e temperatura de desorção, levando a otimização dos melhores parâmetros: volume de 3,0 mL de amostra, tempo de adsorção de 40 min, temperatura de adsorção de 50,0 °C, pH em 6,00, concentração de NaCl em 70% (m/v), e a desorção térmica a uma temperatura de 290 °C durante o período de 5 minutos. Após a otimização da técnica foram realizadas análises de amostras pluviais. A máxima concentração encontrada para ATZ foi de 0,794 µg L⁻¹, para DEA foi de 0,498 µg L⁻¹ e o DIA não foi detectado.

Em outro estudo de Hu e Colaboradores²⁴ avaliaram a extração de ATZ, DEA e DIA, em três tipos de fibras comercialmente disponíveis, como: PDMS/DVB (Polidimetilsiloxano/Divinilbenzeno), CW/DVB (Carbowax/Divinilbenzeno) e DVB/CAR/PDMS (Divinilbenzeno/Carboxen/Polidimetilsiloxano). A metodologia de extração utilizada empregou 4 mL de amostra, 0,35 g mL⁻¹ de cloreto de sódio para ajuste da força iônica, a temperatura de extração foi de 25°C e pH neutro. A desorção dos analitos foi realizada dentro do injetor cromatográfico em uma temperatura de 250 °C por 5 minutos. A fibra DVB/CAR/PDMS foi escolhida para análise dos analitos, e com isso, foi realizado a validação do método. Para a ATZ foi obtido um LQ de 7 ng L⁻¹ e para DEA e DIA foram obtidos 27 e 44 ng L⁻¹, respectivamente. Tal metodologia foi aplicada para análise de águas subterrâneas, onde se encontraram concentrações de 0,224 µg L⁻¹ para ATZ, 1,072 µg L⁻¹ para DEA e 0,170 µg L⁻¹ para DIA.

3.4.2 Extração em Fase Sólida (SPE)

A SPE é uma técnica de separação líquido-sólido que está baseada nos fenômenos de partição do analito entre as fases presentes. A extração tem como objetivo isolar os analitos e concentrá-los em um material sorvente. É utilizada para a determinação de poluentes,

presentes em baixos níveis de concentração em diversos tipos de amostras, dentre elas, as de interesse ambiental como as amostras de águas superficiais e efluentes.

Para o isolamento e pré-concentração de compostos orgânicos, em SPE, a amostra aquosa é percolada por um cartucho contendo o sorvente, onde os analitos são retidos para posterior eluição com uma pequena quantidade de solvente orgânico adequado (Figura 5). As etapas da extração consistem na ativação do sorvente (Figura 5a), percolação da amostra/sorção dos analitos no sorvente (Figura 5b), eliminação dos interferentes da matriz (etapa de *clean up*) (Figura 5c), eluição dos analitos (Figura 5d) e, posterior concentração do composto de interesse. A escolha do tipo e quantidade de sorvente, pH da amostra e do eluente, volume de amostra e de solvente para ativação dos cartuchos e para a eluição dos analitos são alguns parâmetros que devem ser considerados ⁶².

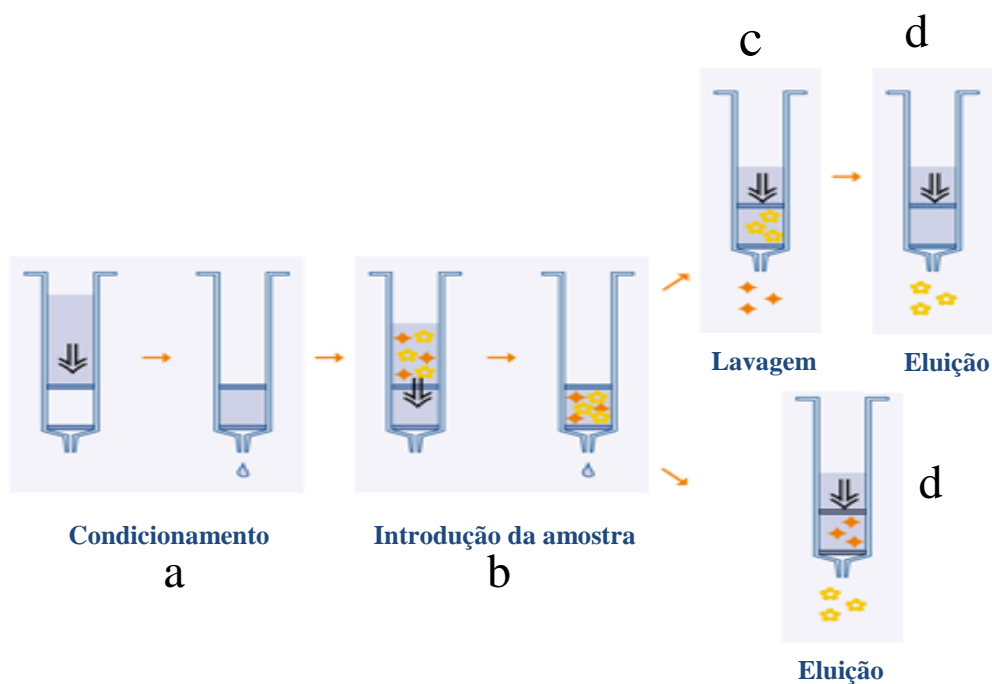


Figura 5. Etapas envolvidas no procedimento de SPE: a) Condicionamento; b) Introdução da amostra; c) Lavagem do cartucho, eliminação de interferentes; d) Eluição do analito. [Adaptado de Macherey-Nagel] ⁶³.

Por ser uma técnica consolidada, a SPE é a opção mais selecionada na etapa de pré-concentração em análises de ATZ e de seus TPs. Masiá e Colaborares ¹³ utilizaram o cartucho da OASIS[®] com o sorvente HLB (balanço hidrofílico lipofílico) em seus estudos. Na etapa de condicionamento a ativação do material sorvente foi realizada utilizando 5,0 mL de uma solução contendo diclorometano-metanol (50:50, v/v) seguidos por 10,0 mL de água

deionizada. Posteriormente, foi percolada a amostra com um volume total de 200,0 mL em um fluxo de 10,0 mL min⁻¹ sob sistema a vácuo. Com o término da passagem da amostra, os cartuchos foram secos a vácuo durante 10,0 min e o analito foi eluído com 10,0 mL da mesma solução utilizada na etapa de ativação do material sorvente. Para a concentração, o solvente foi evaporado utilizando fluxo de gás N₂ e temperatura controlada em 40,0°C. Finalmente, a amostra foi recomposta em 1,0 mL de metanol, sendo que 5,0 µL dessa solução foram empregadas na análise mediante LC-QTOF MS. Foi realizada a validação da extração e foram determinados os valores de LD para ATZ, DEA e DIA em 1,3, 2,0 e 2,0 ng L⁻¹, respectivamente. Também foram obtidos valores de LQ para ATZ, DEA e DIA de 4,0, 6,0 e 6,0 ng L⁻¹, respectivamente (Quadro I).

Em outro estudo realizado por Jiang e Colaboradores⁴² foram utilizados cartuchos de SPE de forma conjugada, isto é, primeiro foi utilizado um cartucho Oasis[®] MCX contendo 150,0 mg de material sorvente e, sequencialmente, um cartucho ENVI-Carb de carbono grafitado contendo 500,0 mg de sorvente. Os cartuchos foram ativados com 25,0 mL de metanol e posteriormente com 25,0 mL de água deionizada em um fluxo de 3,0 mL min⁻¹ sob vácuo. Um volume de 125,0 mL de amostra foi passado pelos cartuchos num fluxo de 3,0 mL min⁻¹. Depois da extração, os cartuchos foram secos com ar por um período de 30,0 min. Após, os cartuchos foram separados e foram eluídos individualmente com 5,0 mL de metanol seguidos por 25,0 mL de diclorometano em um fluxo de 1,5 mL min⁻¹. Os extratos foram combinados e evaporados com fluxo de gás N₂ em uma temperatura controlada de 37,0°C. Logo após a esse processo, foram recuperados com 200,0 µL de acetona e 50,0 µL de um padrão de terbutilazina foi adicionado. A análise foi realizada empregando GC-MS fazendo uso de 2,0 µL da solução pré-concentrada. Os resultados estão apresentados no Quadro I.

A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA, em inglês: *Environmental Protection Agency*), recomenda a metodologia de extração em fase sólida com o uso do cartucho OASIS[®] HLB para análise de poluentes orgânicos, como etapa de pré-concentração de amostras^{64,65}.

Um estudo publicado por D'Archivio e Colaboradores²⁰ realizou a comparação de 5 cartuchos comerciais para análise de 16 pesticidas. Os cartuchos comerciais avaliados foram: LiChrolut EM[®] 3,0 mL 200,0 mg; Supelcoclean ENVI-Carb[®] 3,0 mL, 250,0 mg; Oasis[®] HLB 6,0 mL 200,0 mg; Strat X[®] 6,0 mL 200,0 mg; Isolute SPE C18[®] 3,0 mL 200,0 mg. Os cartuchos que obtiveram as melhores recuperações e eficiências para os 16 pesticidas avaliados dentre os citados foram os Oasis[®] HLB e Strata X[®]. Entretanto, a ATZ, DEA e DIA

apresentaram recuperações melhores com o cartucho Oasis[®] HLB, 95% (± 7), 90% (± 1), 90% (± 5) respectivamente, quando comparado com o Strata X[®], onde as recuperações foram de: 90% (± 4), 92% (± 1), 82% (± 2), respectivamente.

Assim como nos exemplos acima, outros estudos relacionados com ATZ e seus TPs empregam a técnica de SPE (Quadro III). As principais vantagens do uso da SPE como técnica de extração e pré-concentração está na quantidade de solvente empregado o qual geralmente não ultrapassa algumas unidades de mililitros, a capacidade de eliminação de interferentes em poucas etapas, podendo até mesmo ser realizada em uma única etapa e pela possibilidade de retenção de compostos polares (caso de alguns TPs). Entretanto, a SPE é uma técnica que exige maior quantidade de tempo em suas etapas de preparação, apresentando elevada complexidade no manuseio (principalmente no que diz respeito ao controle das vazões) e também é onerosa, dado o alto valor comercial dos cartuchos, independente da fase usada como sorvente e da marca comercial utilizada ⁶⁶.

Quadro III. Aplicações do método de SPE para análise de ATZ, DIA e DEA em matrizes aquosas.

Matriz	Analitos	Cartucho	Metodologia	Técnica de Separação Analítica	LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Referência
Águas superficiais e subterrâneas	ATZ, DIA, DEA e outros.	Oasis [®] HLB 6,0 mL, 60 mg	6,0 mL Acetato de Etila; 6,0 mL MeOH; 1,0 mL H ₂ O; 200,0 mL de Amostra; Vácuo 20 min; 5,0 mL Acetato de Etila:MeOH (1:1); 4,0 mL Acetato de Etila; Evaporado com N ₂ ; Reconstituído com 250,0 μL de Acetato de Etila;	GC-MS	-	ATZ:0,01 DIA: 0,01 DEA: 0,01	Hildebrandt e Colaboradores ⁶⁷
Águas superficiais	ATZ, DIA e DEA e outros.	Oasis [®] HLB 6,0 mL 200,0 mg	5,0 mL ACN:DCM (1:1, v/v); 5,0 mL MeOH; Condicionado com água ultrapura a pH 2; 200,0 mL de Amostra a pH 2; 5,0 mL de água ultra pura pH 2. Vácuo por poucos minutos; 3,0 mL ACN:DCM (1:1) Evaporado com N ₂ ; Reconstituído com 1,0 mL ACN:H ₂ O (1:1, v/v)	LC-MS	ATZ:0,006 DIA: 0,004 DEA: 0,008	ATZ:0,012 DIA: 0,011 DEA: 0,027	Gervais e Colaboradores ⁶⁸

Matriz	Analitos	Cartucho	Metodologia	Técnica de Separação Analítica	LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Referência
Sedimentos de águas superficiais	ATZ, DIA, DEA e outros.	Oasis [®] HLB 6,0 mL 500,0 mg	5,0 mL MeOH:DCM (1:1, v/v); 5,0 mL H ₂ O; 20,0 mL de Amostra 5,0 mL H ₂ O; 4,0 mL MeOH:DCM (1:1, v/v) Evaporado com gás N ₂ . Reconstituído para um volume final de 5,0 mL com MeOH	LC-MS/MS	ATZ :0,05 DIA: 0,51 DEA: 0,15	ATZ :0,016 DIA: 1,68 DEA: 0,50	Kock-Schulmeyer e Colaboradores ⁴¹
Águas superficiais	ATZ, DIA, DEA e outros.	Oasis [®] HLB 6mL 200mg	5,0 mL DCM:MeOH(1:1, v/v) 10,0 mL H ₂ O; 200,0 mL de Amostra; Vácuo 10 min; 10,0 mL DCM:MeOH(1:1, v/v); Evaporado com N ₂ ; Ressuspendido em 1,0 mL de MeOH	LC-MS	ATZ :0,00006 DIA: 0,00010 DEA: 0,00010	-	Masiá e Colaboradores ¹³
Água superficial	ATZ, DIA, DEA e outros.	Bakerbond C18 1000,0 mg 8,0 mL	10,0 mL MeOH 10,0 mL H ₂ O 500,0 mL amostra pH 6,5 -7,5 10,0 mL de Acetato de etila e hexano (7:3, v/v) 5,0 mL de Hexano	GC-MS	ATZ: 0,03 DIA: 0,17 DEA: 0,06	ATZ: 0,20 DIA: 0,84 DEA: 0,84	Nogueira e Colaboradores ¹¹

Sendo: ACN: acetonitrila, DCM: diclorometano e MeOH: metanol

3.4.3 Microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME)

Um método simples e rápido para extração e pré-concentração de compostos orgânicos em amostras aquosas foi desenvolvido, recentemente, por Rezaee e colaboradores (2006)⁵⁰. Este se baseia no equilíbrio líquido-líquido de um sistema com componentes ternários envolvidos em uma fase aquosa, um solvente miscível polar em água (solvente dispersivo) e um solvente imiscível não polar em água (solvente extrator). O princípio básico da técnica é a dispersão de um solvente extrator (imiscível com água) e um solvente dispersor (miscível em água e no solvente extrator) em uma solução aquosa (Figura 6), o que proporciona grande área de contato entre a fase aquosa e o solvente extrator. Uma mistura apropriada do solvente dispersor e do solvente extrator é injetada rapidamente, com auxílio de uma seringa, na solução aquosa (Figura 6 a). Após leve agitação, uma solução turva com microgotas é formada (Figura 6 b). As microgotas consistem no solvente extrator mais o analito já extraído (Figura 6 c). Após centrifugação, ocorre a sedimentação das microgotas formando uma fase sedimentada, que é retirada com o auxílio de seringa (Figura 6 d). Posteriormente, a quantificação dos analitos é realizada por técnicas apropriadas⁶⁹.

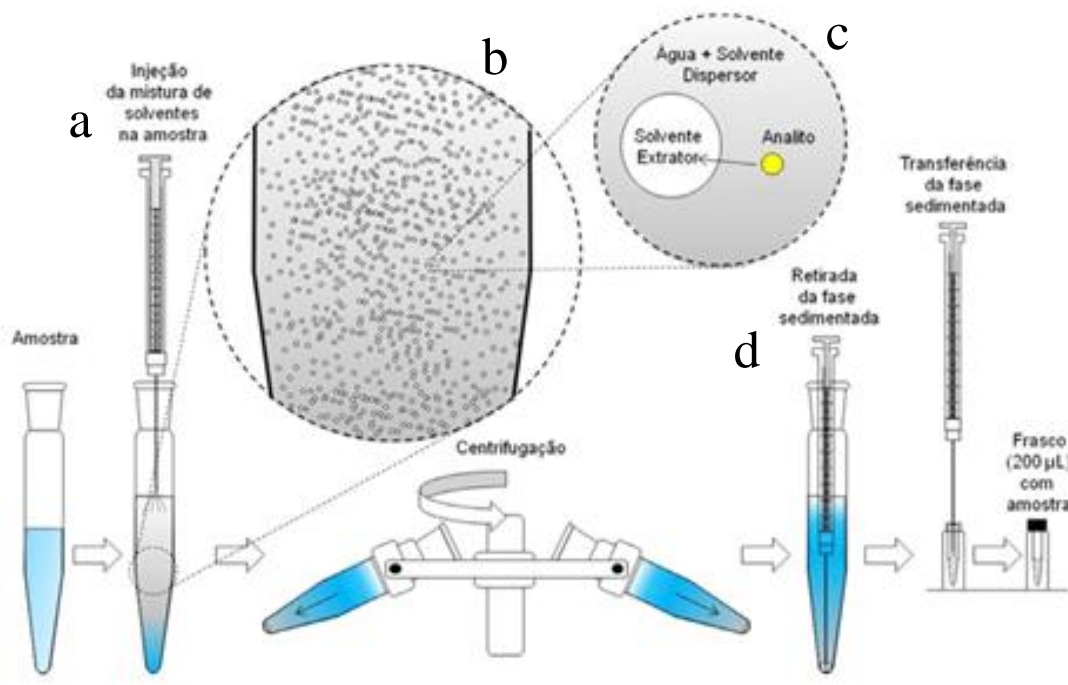


Figura 6. Etapas do processo de separação envolvendo a DLLME. a) Injeção da mistura do solvente dispersor e solvente extrator na amostras. b) Formação da emulsão, microgotas. c) Solvente extrator e o analito já extraídos. d) Recolhimento da fase sedimentada após a centrifugação. Fonte: Adaptado de Caldas⁶².

A principal característica do solvente dispersor é sua solubilidade no solvente extrator e ser miscível na fase aquosa, proporcionando a "ponte" para que o solvente extrator consiga extrair o analito da fase aquosa. Esta "ponte" ocorre com a formação de microgotas, formada por pequenas partículas presentes na solução turvada, no qual o solvente extrator está mesclado no solvente dispersor. Destacam-se os solventes dispersores metanol, acetonitrila e acetona.

A escolha do solvente extrator é a etapa fundamental dessa técnica, pois é onde o analito vai estar localizado após a extração e também como será delineado o procedimento de remoção da fase aquosa. Um solvente extrator ideal para a DLLME deve apresentar propriedades físico-químicas únicas, por exemplo, apresentar uma baixa solubilidade em fase aquosa, massa específica superior a da fase aquosa, ser totalmente miscível com o solvente dispersor e ter a capacidade de separar os analitos de interesse. Os solventes que detém essas características são os organoclorados, tais como o clorobenzeno, diclorometano, triclorometano, tetracloreto de carbono e tetracloro etileno. Entretanto, eles são muito tóxicos ao meio ambiente e ao operador, mesmo sendo utilizadas pequenas quantidades (μL)^{70,71,72,73}. Uma alternativa proposta por Leong & Huang⁷⁴ como variação da metodologia publicada por Rezaee e Colaboradores⁵¹ é a utilização de solventes com massa específica inferior à da água, e ao invés de serem separados na parte inferior, são separados pela solidificação da fase orgânica flutuante (do inglês *solidification floating organic, SFO*). A diferença da DLLME-SFO para DLLME encontra-se na utilização de solventes extratores e no procedimento de separação da fase orgânica, que ao invés de serem retirados com uma seringa, são retirados por solidificação, refrigerando a solução a uma temperatura adequada, que promoverá a mudança de fase do solvente extrator para o estado sólido e que pode ser removido com auxílio de uma espátula.

Sanagi e Colaboradores⁷⁵ aplicaram o método DLLME-SFO. No seu estudo, foram selecionados os solventes 1-dodecanol, 1-undecanol e n-hexadecano para extração de compostos triazínicos. O 1-undecanol apresentou um fator de enriquecimento (FE) para ATZ de 322, sendo a melhor opção entre os três solventes estudados. Os autores também aplicaram a técnica à amostras reais, sendo utilizados os seguintes parâmetros: 10,0 μL de 1-undecanol, 100,0 μL de acetonitrila como solvente dispersor, 5% (m/v) NaCl para controle da força iônica do meio e tempo de 3 minutos de centrifugação (4000 rpm). Nesse caso, foi detectada

uma concentração de $0,12 \mu\text{g L}^{-1}$ de ATZ presente na água superficial, utilizando GC-MS como técnica instrumental.

3.5 Planejamento Multivariado – matriz Doehlert

Muitas são as variáveis ou parâmetros que devem ser controlados nos diferentes processos de extração e pré-concentração para se alcançar a potencialidade de cada uma das técnicas descritas. Nesse sentido, a utilização de planejamentos multivariados, permite trabalhar com mais de uma variável simultaneamente e, também, com um número de experimentos menores quando comparado ao delineamento univariado (onde somente uma das variáveis é alterada enquanto as outras permanecem fixas). Assim, pode-se ganhar tempo nas análises e diminuir os custos de operação. Além disso, os modelos de planejamento multivariados permitem estimar as variáveis relevantes para cada sistema estudado, pois as interações significativas das variáveis e os seus efeitos podem ser determinados. Outro ponto positivo desse tipo de planejamento é que o mesmo pode ser usado em conjunto com a metodologia de superfície de resposta para modelar o sistema estudado, uma vez que na construção da superfície de respostas se utilizam os efeitos significativos para indicar a região ótima do processo ou sistema em estudo^{76,77}.

O planejamento Doehlert ou matriz Doehlert foi proposto por David H. Doehlert em 1972. Esse planejamento apresenta uma distribuição dos pontos uniforme em um domínio circular para duas variáveis, esférico para três variáveis e hipersférico para mais que três variáveis. A principal vantagem desse planejamento é o número de níveis que podem ser trabalhados, por exemplo: um modelo de terceira ordem apresenta um número de níveis de 5, 7 e 3, permitindo um trabalho mais detalhado, das variáveis importantes e dessa forma gerando um total de experimentos $k^2 + k + PC$, onde k é o número de variáveis e o PC é o ponto central^{78,79}. O Quadro IV exemplifica o planejamento Doehlert de três variáveis com os valores codificados.

Quadro IV. Representação dos ensaios codificados para planejamento Doehlert de três variáveis.

Ensaio	Variável 1	Variável 2	Variável 2
1	1,000	0	0
2	0,500	0,866	0
3	0,500	0,289	0,817
4	-1,000	0	0
5	-0,500	-0,866	0
6	-0,500	-0,289	-0,817
7	0,500	-0,866	0
8	0,500	-0,289	-0,817
9	-0,500	0,866	0
10	0	0,577	-0,817
11	-0,500	0,289	0,817
12	0	-0,577	0,817
13	0	0	0

Adicionalmente, o tratamento estatístico para validar o planejamento é uma etapa fundamental para poder afirmar que a otimização proposta é válida. Nesse caso, a análise de variância (ANOVA) é utilizada como ferramenta estatística para validar cada modelo. Um modelo válido é aquele que apresenta uma regressão significativa e uma falta de ajuste não significativa. Além disso, é fundamental que o planejamento apresente a distribuição dos resíduos com homocedasticidade, ou seja, que apresente uma distribuição de frequência de padrão regular e que o valor de R^2 seja o mais próximo de 1, pois assim melhor será o ajuste ao modelo explicado ⁷⁸.

Infelizmente, o planejamento Doehlert ainda é pouco empregado no âmbito das ciências ambientais, mais concretamente na otimização de condições reacionais ou mesmo das variáveis experimentais de métodos de extração e/ou pré-concentração. Nesse sentido, a literatura recente apresenta poucos estudos. Um deles, realizado por Silveira e Colaboradores⁸⁰ empregou planejamento fatorial com ponto central 2^4 e a matriz Doehlert para otimizar as técnicas de extração do clorpirifos presente em águas naturais no município de Ouro Branco-MG mediante a extração líquido-líquido com baixa temperatura e

microextração em fase sólida (SPME), seguida de análise mediante cromatografia em fase gasosa com detector de captura de elétrons (GC-ECD).

Outro relato do uso da matriz Doehlert foi realizado por Bartolomé e Colaboradores ⁸¹ no desenvolvimento de um método rápido e simples de extração líquido-líquido com membrana microporosa para a determinação de níveis traço de compostos dinitrofenólicos em amostras de água. Nesse estudo os autores utilizaram uma matriz Doehlert de três variáveis, envolvendo o comprimento da fibra, a quantidade de óxido de trioctilfosfina na fase aceitadora e o tempo de extração como variáveis. A técnica instrumental empregada para realizar a quantificação dos compostos dinitrofenólicos foi a cromatografia a líquido com detector de arranjo de diodos ⁸¹.

3.6 Técnicas Cromatográficas

Dentre os métodos de análise de poluentes orgânicos, a cromatografia é uma das técnicas com melhores resultados, devido à facilidade em separar, identificar e quantificar diferentes espécies químicas, mesmo quando presentes em matrizes complexas ⁸². Para as análises de ATZ, DEA e DIA, as principais técnicas são a cromatografia em fase gasosa ^{21,23,24,40,83} acoplada à espectrômetro de massas; e a cromatografia em fase líquida ^{13,14,19,20} com detecção por arranjo de fotodiodos (DAD) ou acoplamento com espectrômetro de massas. O Quadro V apresenta um resumo das principais técnicas cromatográficas utilizadas na determinação da ATZ e seus TPs em matrizes ambientais bem como as técnicas de extração e pré-concentração empregadas nas análises.

A cromatografia em fase gasosa é ajustada inicialmente para promover a volatilização dos analitos dentro do sistema de injeção, devido à alta temperatura, possibilitando a transição de fase do analito em fase aquosa para o estado gasoso. O volume de solvente volatilizado dentro do sistema de injeção cromatográfica deve ser o suficiente para prevenir perdas do vapor do gerado. Essas perdas acontecem quando o volume de vapor é muito maior do que o volume que o *liner* pode suportar. Para se ter uma ideia, o volume de 1,0 µL de diclorometano após a vaporização, ocupa um volume de 332,0 µL a 250,0°C e, 1,0 µL de água, ocupa um volume de 1180,0 µL a 250,0 °C ⁸⁴. O volume do *liner* pode variar entre 35,0 a 990,0 µL, dependendo da técnica de injeção (*Split/Splitless*) utilizada ⁸⁵. A eficiência da separação cromatográfica está relacionada a fatores como a composição da coluna, fluxo da fase móvel e a rampa de aquecimento da coluna, sendo que os dois últimos são as principais variáveis na

técnica de cromatografia em fase gasosa, e o controle destas variáveis pode favorecer a separação dos analitos de interesse.

Para análises em GC-MS o fluxo de gás de arraste normalmente utilizado quando são empregadas colunas que apresentam diâmetros de 0,25 ou 0,32 mm é de 1,0 mL min⁻¹. Isso ocorre em função do diâmetro dado que a coluna cromatográfica com as dimensões acima especificadas pode suportar esse valor de fluxo de gás de arraste, sem comprometer o sistema de vácuo exigido e empregado no espectrômetro de massas. Fluxos maiores são possíveis em colunas com diâmetros iguais ou superiores a 0,53mm⁸⁶.

Em um estudo publicado por Hu e Colaboradores²⁴ foi utilizada a técnica de GC-MS para separação e quantificação de ATZ, DEA e DIA de amostras de água subterrânea na França. Durante a análise, o sistema de injeção foi mantido em 250,0°C para dessorção dos analitos previamente extraídos por SPME. O tempo de contato para dessorção térmica foi de 5 min. O gás de arraste utilizado foi gás Hélio a uma velocidade linear de 1,0 mL min⁻¹ em modo *splitless*. A coluna capilar modelo HP-1MS (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm) foi utilizada nessa análise. A temperatura do forno foi programada, inicialmente a 85,0 °C por 2 min seguida de um rápido aquecimento de 15,0 °C min⁻¹ até chegar aos 140,0 °C. Em seguida foi programado um aquecimento de 1,0 °C min⁻¹ até 158,0 °C, e após de 15,0 °C min⁻¹ até chegar aos 290,0 °C. Os tempos de retenção para ATZ, DEA e DIA nesse método cromatográfico foram de: 21,11 min, 16,45 min e 15,64 min, respectivamente. O espectrômetro de massas foi operado em modo SIM (do inglês, *selected ion monitoring*) e os íons selecionados apresentavam as seguintes relação massa/carga (*m/z*): 200, 215 e 173 (ATZ); 172, 187, 174 (DEA) e 173, 158, 145 (DIA). A fonte de ionização empregada foi uma fonte por impacto de elétrons (70 eV).

Quadro V. Publicações que utilizam diferentes técnicas cromatográficas para determinação de ATZ, DEA e DIA.

Analito	Matriz	TC	LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	CMD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Coluna	TE/PC	CONDIÇÕES EXTRAÇÃO Cartuchos/ Fibras / Solventes	Fase Móvel	Detector/ analisador	Referência
ATZ DEA DIA	ASP	LC	0,0100 0,0400 0,0200	- - -	0,2400 0,1200 0,2300	Spherisorb ODS-2 (20x0,46cm x 5 μm)	SPE	10x2,0 mm <i>styrene divinylbenzene copolymer</i> (Spark Holland)	Metanole Acido Acético	DAD	Aguilar e Colaboradores ¹⁹
ATZ DEA	ASP	GC	0,0020 0,0050	- -	0,3100 0,5260	007 Quatrex- Methyl 5% phenylsilicone (30,0m x 0,32 mm0,5 μm)	SPE	C18 (J.T. Baker) <i>poly(styrene-divinylbenzene)</i> discos com 47mm diâmetro e 0,5 mm de espessura contendo 500,0 mg de material adsorvente.	GásHélio	MS, FID, ECD	Albanis e Colaboradores ⁸³
ATZ	ASP	GC	0,0011	0,0035	0,4339	VF-5 (30m x 0,25 mm x 0.25 μm)	SPE e SPME	SPE: Lichrolut C18 e Strata X; SPME: PDMS, PA, CAR- PDMS e CAR-PDMS-DVB	Gás Hélio	MS	Bonanse e Colaboradores., ³⁵
ATZ	AM ASP ASB	GC	0,0004	0,0020	0,0100	SAPIENS- 5MS(20 m x 0,10 mm x 0,10 μm)	SPE	C18, 500,0 mg ,Varian	GásHélio	MS	Cherta e Colaboradores ⁸⁷

Analito	Matriz	TC	LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	CMD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Coluna	TE/PC	CONDIÇÕES EXTRAÇÃO Cartuchos/ Fibras / Solventes	Fase Móvel	Detector/ analisador	Referência
ATZ DEA DIA	ASP	LC	0,0030 0,0030 0,0030	0,0090 0,0090 0,0090	- - -	Gemini C18 (250mm×4.6mm x 5 μm)	SPE	LiChrolut EN, 3,0 ml, 200,0 mg (Merck); ENVI–Carb, 3,0 ml, 250,0mg (Supelco); Oasis [®] HLB, 6,0 ml, 200,0 mg (Waters); Strata X, 6,0 ml, 200,0 mg(Phenomenex); C18 (EC), 3,0 ml, 200,0 mg (International Sorbent Technology).	Acetona e Água	DAD	D'Archivio e Colaboradores ²⁰
ATZ DEA DIA	ASP	GC	- - -	0,0070 0,0270 0,0440	0,2240 1,0740 0,1700	HP-1MS (30 m x 0.25 mm x 0.25 μm)	SPME	65 μm of PDMS/DVB; 65 μm of CW/DVB; 50/30 μm of DVB/ CAR/PDMS.	GásHélio	MS	Hu e Colaboradores ²⁴
ATZ DEA DIA	ASP	LC	0,0040 0,0060 0,0030	0,0130 0,0180 0,0100	<LQ - -	Poroshell 120 EC-C18 (50 mm x 4.6 mm x 2.7 μm)	SPE	Oasis [®] HLB (500,0 mg, 6,0 mL)	Acetato de amônia e Acetronitrila	MS	Hurtado-Sanches e Colaboradores ¹⁴
ATZ DEA	ASP	GC	0,0200 0,0150	- -	0,1170 0,0700	DB-5-MS (30m x, 0.25 mm x 0,25 μm)	SPME	(PDMS, 100,0 μm) supelco; C18 discos.	Gás Hélio	MS	Lambropoulou e Colaboradores ²⁵

Analito	Matriz	TC	LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	CMD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Coluna	TE/PC	CONDIÇÕES EXTRAÇÃO Cartuchos/ Fibras / Solventes	Fase Móvel	Detector/ analisador	Referência
ATZ DEA DIA	ASP	GC	0,038 0,038 -	- - -	0,780 0,652	DB-5 (30 x 0.25mm x 0.25 μm)	SPE	C18 (360,0 mg) Waters.	Gás Hélio	MS	Ma e Colaboradores ⁴⁰
ATZ DEA DIA	ASP	LC	0,0013 0,0020 0,0020	0,0040 0,0040 0,0060	0,0186 0,0970 0,0302	Luna C18 (15.0 cm x 0.21 cm x 3 μm)	SPE	Oasis [®] HLB 200,0mg, 6,0 mL (Waters)	Água (amônio, ácido fórmico) emetanol (amônio, ácido fórmico)	MS	Maisá e Colaboradores 2013 ¹³
ATZ	ASP	GC	0,0600	-	-	DB-5 column (30 m, 0,25 mm 0,25 μm)	DLLME	Acetona como Solvente Dispensor e Cloro Benzeno como Solvente Extrator	GásHélio	MS	Nagarujo e Colaboradores. ²⁶
ATZ	ASP	LC	0,1000	-	-	VP-ODS C18 (250 x 4,6 mm x 5 μm)	DLLME	Metanol como Solvente Dispensor e Tetracloroeto de Carbono como Solvente Extrator	Acetonitrila e água	DAD	Zhaoe Colaboradores ²⁷

TC: Técnica de Cromatografia; LD: Limite de Detecção; LQ: Limite de Quantificação; CMD: Concentração Máxima Detectada; TE: Técnica de Extração; PC: Pré-Concentração; ASP: Água Superficial; ASB: Água Subterrânea; AM: Água Mineral, GC: Cromatografia em fase gasosa; LC: Cromatografia em fase Líquido; SPE: Extração em Fase Sólida; SPME: Microextração em Fase Sólida; DLLME: Microextração Líquido-Líquido Dispersiva, DAD: Detector de Arranjo de Fotodiodos; FID: Detector de Ionização em Chama; MS: Espectrômetro de Massas; ECD: Detector de Captura de Elétrons.

4 PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Área de estudo

A seleção das microbacias monitoradas na Bacia Hidrográfica do Paraná 3 (BP3), localizada na região oeste do estado do Paraná, ficou sob responsabilidade do quadro técnico da empresa Itaipu Binacional. Esse estudo contou com o monitoramento de 21 microbacias, distribuídas em 13 municípios no âmbito da BP3, em rios de primeira, segunda e terceira ordem. Por definição, entende-se que um rio de primeira ordem corresponde a uma nascente, desta maneira o caudal do rio é de baixo volume ⁸⁸. Por sua vez, um rio de segunda ordem consiste em na junção de dois rios de primeira ordem e, um rio de terceira ordem na junção de um rio de segunda ordem com outro rio de segunda ordem ⁸⁸. O Quadro VI apresenta os nomes de cada microbacia selecionada para o estudo, ordenados pelo município de localização. A Figura 7 representa os pontos de coleta dentro da BP3.

Quadro VI. Microbacias da BP3 que foram selecionadas como pontos de amostragem para o estudo, ordenadas pelo município de localização.

Nome da microbacia	Município de localização	Código da microbacia	Ordem do Rio
Sanga Memoria I	Toledo	PA01	Primeira ordem
Sanga Memoria II	Toledo	PA02	Primeira ordem
Água Palmito	Toledo	PA15	Segunda ordem
Alto Rio Toledo	Toledo	PA14	Segunda ordem
Córrego Guarani	Toledo	PA13	Segunda ordem
Córrego Peaberu	Toledo	PA17	Primeira ordem
Sanga Taturi	Cascavel	PA10	Primeira ordem
Sanga Buriti	Itaipulândia/Missal *	PA05	Segunda ordem
Lajeado Santa Rosa	Marechal Cândido do Random	PA19	Primeira Ordem
Sanga Arujicaba	Marechal Cândido do Random	PA16	Terceira Ordem
Sanga Tapena	Maripá	PA20	Primeira Ordem
Sanga Pinhal	Matelândia	PA06	Terceira Ordem
Córrego Belmonte	Mercedes	PA18	Segunda Ordem
Afluente do Rio Azul	Ouro Verde do Oeste	PA11	Segunda Ordem
Córrego Lajeado	Ouro Verde do Oeste	PA12	Segunda Ordem
Rio Pacuri	Santa Helena	PA08	Primeira Ordem

Nome da microbacia	Município de localização	Código da microbacia	Ordem do Rio
Rio Moreninha	Santa Helena	PA09	Segunda Ordem
Sanga Shangri-lá	Santa Terezinha do Itaipu	PA03	Primeira Ordem
Rio Bonito	Santa Terezinha do Itaipu	PA07	Segunda Ordem
Córrego Água Fria	São Miguel do Iguazu	PA04	Primeira Ordem
Córrego Tamanduá	Terra Roxa	PA22	Terceira Ordem
Alto Taturi	Terra Roxa	PA21	Segunda ordem

* Ponto localizado na divisa dos municípios.

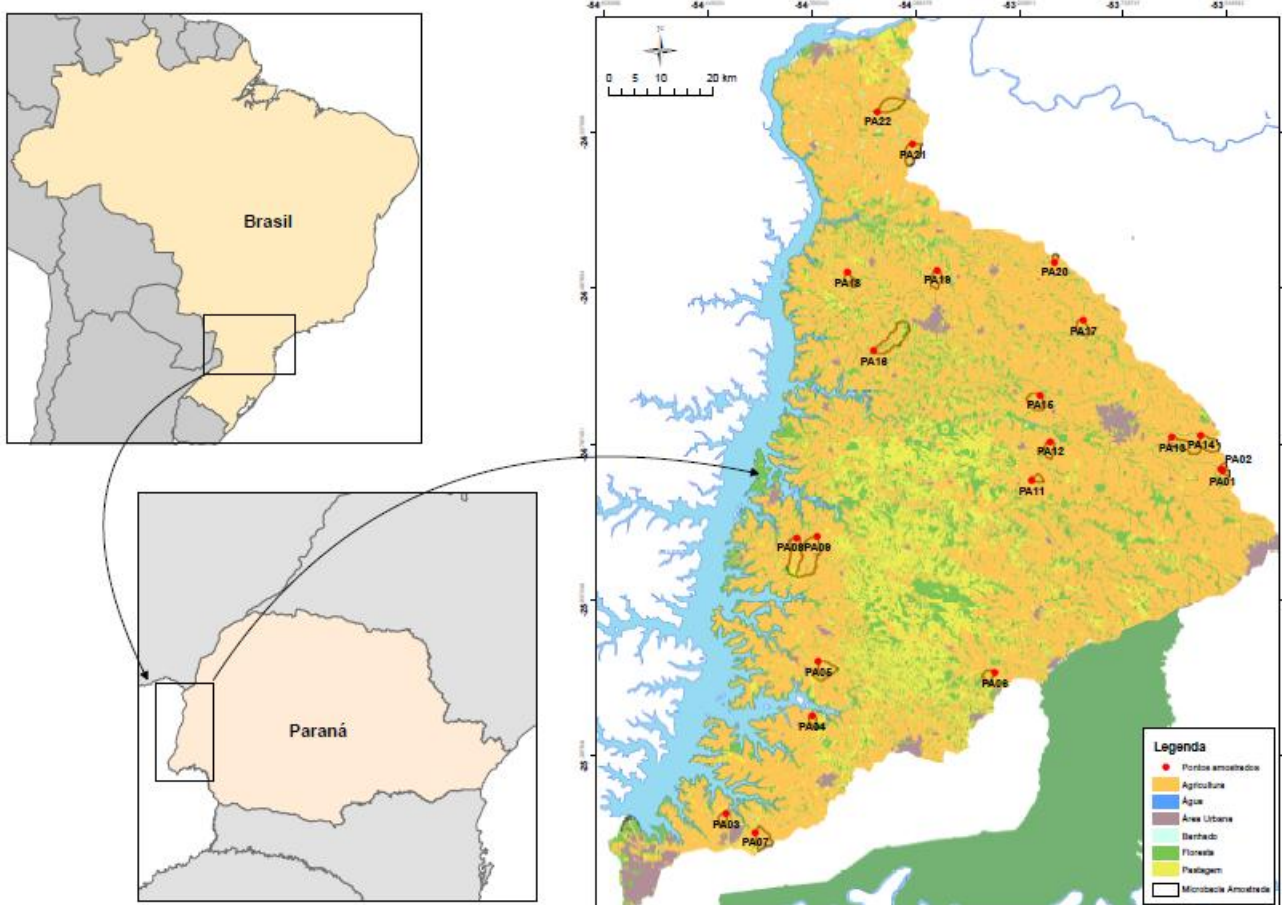


Figura 7. Mapa de uso do solo e destaques para algumas das microbacias pré-selecionadas. A BP3 está localizada no oeste do estado do Paraná. Fonte: ITAIPU BINACIONAL.

4.2 Amostragem

O período de coleta das amostras de água superficial foi determinado com base no calendário agrícola da região, onde os principais cultivos são milho e soja. Esse calendário de coleta foi fornecido pela ITAIPU Binacional através de um estudo prévio na região de estudo. A primeira etapa de amostragem foi realizada entre os dias 16 de janeiro e 06 de março de 2017, período da colheita da soja e início do plantio de milho (safrinha). As amostras foram coletadas nos 21 pontos de amostragem durante seis semanas consecutivas, sendo estabelecida uma frequência semanal nas coletas.

O calendário de amostragem da segunda etapa levou em conta o vazio sanitário da soja, que foi estabelecido pela Agência de Defesa Agropecuária do Paraná (Adapar) (Portaria nº 202, de 19 de julho de 2017) como sendo entre as datas de 10 de junho e 10 de setembro de 2017. Desta forma, o segundo período de amostragem foi realizado entre 03 de setembro de 2017 até 14 de outubro de 2017⁹⁰. A segunda coleta seguiu a mesma frequência semanal de amostragem, sendo coletadas amostras durante um período de seis semanas consecutivas. Além dessas coletas pré-definidas, foram realizadas amostragens adicionais, quando registrada a ocorrência de eventos de precipitação acima de 10mm, em cada um dos 21 pontos estudados. Nessa circunstância, a amostragem da água superficial foi realizada 30 minutos após o término do evento de precipitação.

Devido ao grande número de pontos a serem amostrados e às distâncias entre os pontos foi necessário realizar uma divisão das microbacias. Para aquelas próximas da cidade de Foz do Iguaçu, a coleta foi realizada pela equipe interna do projeto (bolsistas de projetos correlatos e a equipe de colaboradores da Itaipu Binacional). Foram selecionadas 6 microbacias, a Sanga Memoria I e II por serem duas propriedades modelo da Itaipu Binacional e as microbacias Sanga Shangri-lá, Córrego Água Fria, Sanga Buriti e Sanga Pinhal. As coletas das microbacias restantes foram realizadas pelos agricultores, moradores próximos dos pontos de coleta. Estes receberam um treinamento prévio orientado sobre a importância e o protocolo de realização da coleta, armazenamento e transporte, organizado pela Itaipu Binacional. A entrega dos frascos de coleta foi realizada por funcionários da Itaipu Binacional. Os gestores da Itaipu buscavam as amostras nas residências dos agricultores e transportavam até o Laboratório Ambiental da Itaipu Binacional. As fichas de coleta que foram empregadas durante a etapa de amostragem podem ser vistas no Apêndice I.

As amostras de águas superficiais foram coletadas próximas da superfície, utilizando um recipiente plástico com capacidade de 3,0 L e, após estas eram transferidas para dois frascos de vidro âmbar de capacidade de 1,0 L. Depois de realizada a coleta, estas foram transportadas sob refrigeração a 4 °C em caixas térmicas até o laboratório. Em seguida as amostras foram filtradas em membranas de acetato de celulose de porosidade 0,45 µm, acondicionadas em frascos de vidro âmbar, e após serem filtradas, foram congeladas a -20,0 °C até a análise.

4.3 Reagentes, padrões analíticos e materiais

Os padrões utilizados foram: atrazina (ATZ) (Sigma-Aldrich, grau de pureza 99,1%), deisopropilatrazina (DIA) (Sigma-Aldrich, grau de pureza 97,5%), deetilatrazina (DEA) (Sigma-Aldrich, grau de pureza 99,5%) e etion (Sigma-Aldrich, grau de pureza 97,2 %).

Os solventes utilizados foram: acetona (Dinâmica, grau HPLC 99,9%), acetonitrila (PANREAC, grau HPLC 99,9%), diclorometano (Vetec, grau HPLC 99,9%), metanol (Dinâmica, grau HPLC 99,9%), tetracloreto de carbono (Dinâmica, P.A. 99,5%), triclorometano (Vetec, grau HPLC 99,9%), tetracloreto de carbono (Vetec, grau HPLC 99,9%), clorobenzeno (Dinâmica, grau HPLC 99,5%), n-hexano (Dinâmica, grau HPLC 95,0%), isopropanol (Neon, P.A. 99,8%) e água ultra pura (ELGA, Purelab Option Q) cuja resistividade foi monitorada e mantida em 18,2MΩ.cm. Além dos solventes, foram empregados demais reagentes e materiais como: bicarbonato de sódio (Neon, P.A. 99,0 %), cloreto de potássio (Synth, P.A. 99,0 %), cloreto de sódio (Synth, P.A. 99,0%), sulfato de cálcio (Dinâmica, P.A. 99,0 %), sulfato de magnésio (Dinâmica, P.A. 98,0 %), sulfato de sódio anidro (Dinâmica, P.A. 99,0%), ácido nítrico (Neon, P.A. 65%), cartuchos Oasis[®] HLB 500 mg 6cc (Waters) e as fibras de sílica fundida: poliacrilato (PA) 65µm (Sigma-Aldrich), carboxen/polidimetilssiloxano (CAR/PDMS) 75 µm (Sigma-Aldrich) e polidimetilssiloxano/divinilbenzeno (PDMS/DVB) 65 µm (Sigma-Aldrich), todas com comprimento de 1 cm. O gás Hélio grau de pureza 99,999% (5.0) foi fornecido pela empresa White Martins.

4.3.1 Preparo das soluções estoque, intermediária, trabalho e água sintética

As soluções padrão de estoque foram preparadas a partir dos padrões de ATZ, DEA e DIA. Os três padrões foram pesados individualmente (10,0 mg de cada analito) e, após, os

mesmos foram dissolvidos separadamente, cada qual em um balão de 10,0 mL utilizando-se acetoneitrila como solvente. A concentração final de cada analito na respectiva solução estoque foi de 1,0 g L⁻¹. Uma vez preparadas, essas soluções padrão de estoque foram mantidas a uma temperatura de -20,0°C por um período máximo de 30 dias. Paralelamente, com o auxílio de uma microseringa cromatográfica, foi recolhido um volume de 6 µL do padrão interno Etion e, este diluído em 10 mL de acetoneitrila.

A solução intermediária foi preparada a partir das soluções padrão de estoque de cada analito estudado. Foram preparadas soluções de concentrações 0,50 mg L⁻¹ para cada analito, a partir da solução padrão de estoque. Estas foram acondicionadas em frascos âmbar e mantidas sob refrigeração a 4,0 °C durante, no máximo, uma semana. A solução de trabalho foi preparada diariamente a partir das soluções intermediárias. Nelas foram adicionados os três analitos de interesse em concentrações fixas ou variáveis de acordo com o interesse, além de uma concentração fixa do padrão interno. Os pontos selecionados para a construção da curva de calibração em solvente foram preparados a partir da solução de trabalho.

A preparação da água sintética moderadamente dura foi realizada utilizando a metodologia da EPA ⁹¹. A dissolução de 60,0 mg de MgSO₄, 96,0 mg de NaHCO₃ e 4,0 mg KCl foi realizada em 900,0 mL de água ultra pura, a qual foi deixada sob repouso durante 12 h. Em um frasco separado foi dissolvido 60,0 mg de CaSO₄.2H₂O em 100,0 mL até a dissolução completa e depois, essa solução, foi acrescida na solução que continha os outros sais. A solução ficou em repouso novamente por mais 24 h antes do uso.

4.4 Métodos

4.4.1 Preparação da amostra: técnicas de extração e/ou pré-concentração

Foram comparadas três técnicas de extração/pré-concentração na análise de ATZ e seus TPs. Nos estudos preliminares da SPME compararam-se três fibras de diferentes naturezas químicas, utilizando-se condições adaptadas do método previamente publicado por Hu e colaboradores ²⁴. Considerando o grande número de estudos já realizados que empregam a SPE como método de extração, optou-se por realizar uma adaptação do método publicado previamente por Masià e Colaboradores ¹³. Já para a DLLME foi realizado um estudo preliminar para escolha do par solvente dispersor/solvente extrator que melhor se adaptasse à extração de ATZ e seus TPs. Uma vez determinada à natureza dos solventes anteriormente

mencionados, foi realizado um planejamento Doehlert (modelo quadrático com três variáveis) para otimizar os demais parâmetros que influenciavam diretamente esta técnica de extração.

O padrão interno (Etion) foi empregado nas extrações das três metodologias em estudo, e sua escolha se deve pela disponibilidade deste padrão no laboratório. O uso do padrão interno permite minimizar incertezas, por exemplo, introduzidas na etapa injeção da amostra. Essa estratégia permite realizar análises com maior precisão e exatidão. Na cromatografia em fase gasosa a relação entre a área de cada um dos analitos de interesse e a área do padrão interno é usada como resposta analítica ⁹³.

Assim, foi possível realizar uma avaliação comparativa das três técnicas estudadas em relação aos custos e demanda temporal para execução das análises de ATZ, DIA e DEA. Baseando-se nos resultados apontados por essa avaliação foi possível escolher a técnica de extração/pré-concentração mais adequada para a análise das amostras de água superficial. A validação do método de análise incluiu a etapa de extração que apresentou melhor resultado. A seguir, são descritas detalhadamente as metodologias de extração utilizadas no presente estudo.

4.4.2 Microextração em Fase Sólida (SPME)

No desenvolvimento da metodologia de extração por SPME, conforme indica Plotka-Wasyłka e colaboradores ⁵⁹ é fundamental conhecer e controlar parâmetros importantes ao processo de extração, sendo estes: a composição química da fibra, o efeito da força iônica do meio, a temperatura da amostra durante o procedimento de extração, e o tempo em que a fibra fica exposta à amostra.

Três fibras disponíveis comercialmente e usualmente empregadas em estudos de micropoluentes ^{46,94,95} foram testadas: sílica fundida/poliacrilato (PA), carboxen/polidimetilssiloxano (CAR/PDMS) e polidimetilssiloxano/divinilbenzeno (PDMS/DVB). Antes de iniciar o procedimento de extração, cada fibra foi ativada conforme recomendação do fabricante. Dessa forma, a fibra PA foi exposta durante 2 h a 300 °C, a fibra PDMS/DVB por 30 min a 250 °C e a fibra CAR/PDMS permaneceu por 2 h a 300 °C.

O método de extração foi adaptado de Hu e Colaboradores ²⁴. O modo de extração foi realizado utilizando imersão direta da fibra de SPME na solução por um período de 60 min e a temperatura da solução foi mantida em 25 °C. Além disso, foi utilizada uma concentração de 0,35 g mL⁻¹ de NaCl para controlar a força iônica do meio, um volume de amostra de 4,0 mL

e o valor do pH em 7,00. A metodologia de dessorção dos analitos foi realizada dentro do injetor cromatográfico, em temperatura de 250 °C por 5 min, acrescidos de 7 min para limpeza da mesma, nesta temperatura. Para estes ensaios as soluções foram preparadas em água ultrapura perfazendo-se concentrações finais de 5,0 µg L⁻¹ de DEA e DIA, 2,0 µg L⁻¹ de ATZ e 2,0 µg L⁻¹ para o etion. O experimento foi realizado em triplicatas. Como resposta analítica para comparar a eficiência da extração por SPME, utilizou-se a área do pico cromatográfico de cada um dos analitos em razão da área do padrão interno (etion).

4.4.3 Extração em Fase Sólida (SPE)

Para estudo da SPE foi selecionado o cartucho Oasis[®] HLB com 500,0 mg de material sorvente e volume de 6,0 mL. A metodologia para realizar a extração foi adaptada de Masiá e colaboradores¹³. A primeira parte do procedimento de extração consistiu em ativar o cartucho com 5,0 mL de uma mistura de diclorometano:metanol (1:1, v/v) e, em seguida, percolar 10,0 mL de água ultra pura. Um volume de 200,0 mL de amostra foi percolado no cartucho a um fluxo de 5,0 mL min⁻¹. Para estes ensaios empregou-se uma solução contendo os analitos DEA e DIA em concentrações de 5,0 µg L⁻¹, ATZ e Etion em concentrações de 2,0 µg L⁻¹ num volume total de 200,0 mL. Em seguida realizou-se uma etapa de secagem do cartucho. Para tanto, o mesmo foi submetido a vácuo por, no mínimo, 60 minutos até eliminação completa da água residual. Finalizada essa etapa, foi realizada a eluição, por gravidade, com um volume de 10,0 mL da mistura de diclorometano:metanol (1:1, v/v). Na sequência, os solventes foram eliminados com um fluxo suave de gás nitrogênio com aquecimento a 35,0 °C. A ressuspensão foi realizada com 1,0 mL de diclorometano.

Foi verificada a capacidade de extração da SPE em três tipos de matrizes aquosas: a primeira em água ultra pura, a segunda em água sintética moderadamente dura⁹¹ e a água de matriz (água superficial real sem a presença de ATZ, DIA DEA e Etion). Todas as amostras foram fortificadas com concentração de 2,0 µg L⁻¹ para ATZ e 5,0 µg L⁻¹ para DEA e DIA e a concentração do padrão interno foi de 2,0 µg L⁻¹. As extrações empregando SPE foram realizadas em triplicata.

4.4.4 Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME)

Para o desenvolvimento da metodologia DLLME foram selecionadas as variáveis que influenciam diretamente a extração da ATZ, DEA e DIA, sendo elas: natureza do solvente extrator (SE), natureza do solvente dispersor (SD), força iônica do meio, volume do SE e volume do SD.

4.4.4.1 Escolha do solvente extrator e solvente dispersor

No desenvolvimento da DLLME foi necessário realizar um estudo preliminar para selecionar a melhor combinação de solventes (SE/SD) para aumentar a eficiência de extração dos analitos. Os solventes foram escolhidos com base no estudo de Nagaraju & Huang²⁶. Assim, foram testados os pares: clorobenzeno e acetonitrila, clorobenzeno e metanol, clorobenzeno e acetona, tetracloreto de carbono e acetonitrila, diclorometano e acetonitrila, diclorometano e acetona, diclorometano e metanol, tetracloreto de carbono e acetona, tetracloreto de carbono e acetonitrila, triclorometano e acetonitrila, empregados como solvente extrator e solvente dispersor, respectivamente. Os pares foram avaliados em termos de eficiência de extração dos analitos e os ensaios realizados em uma única replicata. Para estes ensaios uma alíquota de 5,0 mL solução contendo os analitos DEA e DIA nas concentrações de 5,0 µg L⁻¹ e ATZ em concentração de 2,0 µg L⁻¹ foi adicionada em um tubo de vidro para centrifuga de volume 15,0 mL e com fundo cônico. Os volumes dos solventes extratores e solventes dispersores foram, inicialmente, fixados em 100,0 e 400,0 µL, respectivamente⁶⁹. O solvente extrator foi recolhido com auxílio de uma microseringa até completar o volume de 100,0 µL. Em seguida, foi recolhido o solvente dispersor (400,0 µL), realizando-se a mistura dos solventes dentro da microseringa até completar o volume de final de 500,0 µL. Na sequência, a mistura dos solventes foi dispersada rapidamente na alíquota de 5,0 mL da amostra. Nessa etapa observou-se a formação de uma emulsão instantânea (microgotas). A emulsão foi centrifugada a 2000 rpm durante 5 min. A fase sedimentada foi recolhida com auxílio de uma microseringa e transferida diretamente para um *insert* (300,0 µL).

4.4.4.2 Planejamento experimental Doehlert

Uma vez definida a natureza do SD/SE, foi empregado o planejamento experimental Doehlert de três variáveis para o estabelecimento dos volumes dos SD e SE, além do ajuste da força iônica do meio. Para esse estudo foram utilizadas planilhas eletrônicas desenvolvidas por Teófilo & Ferreira⁷⁸. Os diferentes volumes de SE foram avaliados em cinco níveis, na faixa entre 50,0 e 200,0 μL , o SD foi avaliado em sete níveis, compreendendo o intervalo de volumes entre 50,0 e 800,0 μL , e a força iônica foi avaliada em três níveis, de 0 a 0,10 g mL^{-1} de NaCl. O Quadro VII representa os níveis do planejamento Doehlert utilizados para otimizar as condições para a DLLME.

Quadro VII. Níveis selecionados para otimização da DLLME empregando matriz Doehlert, modelo quadrático.

Variáveis	Níveis da variável 1						
SE		-1	-0,5	0	0,5	1	
		50,0	87,5	125,0	162,5	200,0	
SD	Níveis da variável 2						
	-0,866	-0,577	-0,289	0	0,289	0,577	0,866
	50,0	175,0	300,0	425,0	550,0	675,0	800,0
Força Iônica	Níveis da variável 3						
		-0,817	0	0,817			
		0,0	0,05	0,10			

Em que: Solvente Extrator (SE) e Solvente Dispensor (SD) em μL e a força iônica em g mL^{-1} de NaCl.

4.5 Validação do método de DLLME

A validação da metodologia desenvolvida nesse trabalho empregando DLLME para detecção e quantificação da ATZ, DEA e DIA foi realizada utilizando as planilhas eletrônicas de validação desenvolvidas por Ribeiro e colaboradores⁹⁶ para estimar as principais figuras de mérito. Nesse estudo foram avaliados: seletividade, linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), precisão intermediária, repetibilidade, robustez, recuperação, efeito de matriz e estabilidade. O efeito de matriz foi avaliado em água ultra pura, água moderadamente dura⁹¹ e água da matriz (água superficial isenta dos analitos de interesse e

padrão interno). O software utilizado para o tratamento dos dados foi o *Microsoft Office Excel 2013*.

4.5.1 Seletividade

A seletividade de um método é a identificação e quantificação dos analitos em estudo, na presença de outros analitos (interferentes) ⁹⁷. Avaliação da seletividade foi realizada preparando as amostras diretamente na água da matriz com e sem adição dos analitos de interesse e padrão interno.

4.5.2 Linearidade

A avaliação da linearidade foi estudada a partir do preparado de seis níveis diferentes de concentração, utilizando a água da matriz, sendo que cada concentração foi avaliada em triplicata. A faixa de concentrações selecionada para o estudo para os analitos ATZ e DEA era de: 0,075, 0,100, 0,250, 1,000, 2,000, 3,000 e 5,000 $\mu\text{g L}^{-1}$, já para o DIA foram empregadas concentrações de: 0,500, 1,000, 2,000, 3,000, 4,000 e 5,000 $\mu\text{g L}^{-1}$. A partir dos resultados obtidos para as concentrações analisadas foram construídas as curvas analíticas. O padrão interno foi adicionado com a concentração de 2,000 $\mu\text{g L}^{-1}$ em todos níveis. Foram avaliados, os coeficientes de determinação (R^2) e os gráficos de resíduos para cada curva analítica.

4.5.3 Limite de detecção e Limite de quantificação

Para os cálculos do limite de detecção e de quantificação foram utilizados três métodos diferentes: o método simplificado, método que utiliza a relação sinal/ruído (S/N) do equipamento e, por fim, o método baseado nos parâmetros da curva analítica ^{96,97,98}.

4.5.3.1 Limite de Detecção

Para a determinação do LD, foram comparados os três métodos anteriormente mencionados. O método simplificado é calculado utilizando a equação 01:

$$LD = 3,3 \frac{s}{b}$$

Equação 01

Onde: “s” é o desvio padrão do menor nível da curva analítica e “b” é o coeficiente angular da curva analítica.

O segundo método utilizado foi estimado a partir da comparação do sinal analítico obtido para uma amostra contendo baixas concentrações da espécie de interesse com o sinal de uma amostra do branco, considerando aceitável uma relação sinal-ruído de 3:1. Para tanto, foram preparadas soluções de concentrações conhecidas que variaram entre 0,050 a 1,000 $\mu\text{g L}^{-1}$, e assim obteve-se a relação de S/N para cada uma das concentrações testadas. A determinação da relação S/N foi realizada selecionando faixa de ruído, antes e depois, do sinal cromatográfico do analito, e assim, realizando uma média desse intervalo. Obtido este valor, o sinal do analito foi dividido pelo ruído da linha de base.

O último método utilizado, baseado nos parâmetros da curva analítica, determina a concentração mínima de uma substância que pode ser medida e informada com 99% ou 95% de confiança. Nesse caso, a estimativa do sinal analítico, a partir da equação de regressão, apresenta um erro padrão, e o produto deste erro pelo valor apropriado de t da distribuição de Student permite calcular o intervalo de confiança da curva analítica, o qual tem a forma de duas linhas hiperbólicas ao redor da curva. O intercepto do limite superior do intervalo de confiança é conhecido por y crítico (y_c) e a sua projeção no limite inferior é uma estimativa da concentração mínima que pode ser medida com um grau de confiança comprovado estatisticamente, ou seja, o limite de detecção do método (LD). Apenas esse terceiro método é calculado, automaticamente, pela planilha eletrônica empregada nesse trabalho ⁹⁶.

4.5.3.2 Limite de Quantificação

Para a determinação do LQ, foram comparados três métodos diferentes: o primeiro é o método que está baseado na relação apresentada na equação 02:

$$LD = 10 \frac{s}{b}$$

Equação 02

Onde, o “s” é o desvio padrão do menor nível da curva analítica e o “b” é o coeficiente angular da curva.

O segundo método utiliza a relação sinal/ruído (S/N) superior a 10/1. Para tanto foram preparadas soluções de concentrações conhecidas entre 0,050 a 1,000 $\mu\text{g L}^{-1}$. A determinação da relação S/N foi realizada selecionando faixa de ruído, antes e depois, do sinal cromatográfico do analito, e assim, realizando uma média desse intervalo. Obtido este valor, o sinal do analito foi dividido pelo ruído.

Por fim, o último método para determinar o LQ está baseado nos parâmetros da curva analítica. Nesse caso, a estimativa do sinal analítico pode ser observada na Figura 8, no qual o X_c é o valor da concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$) por onde a_0 intercepta a reta da regressão até a hipérbole inferior, Y_h é valor da intensidade de y, projetando-se desde X_c até o a hipérbole superior. Com os valores de Y_h e X_c é possível estimar o LQ. Para isso, são utilizados as equações 03, 04 e 05 para o Y_h , X_c e LQ.

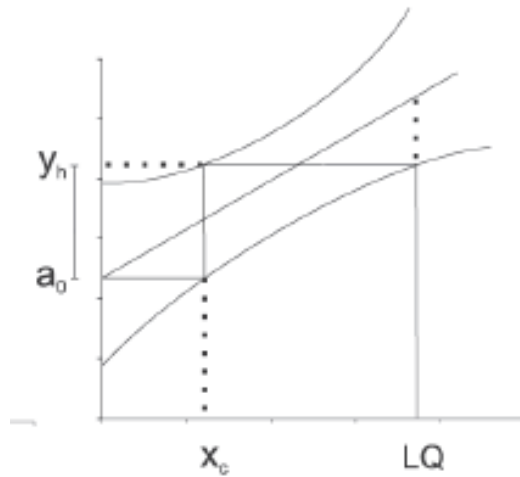


Figura 8. Ilustração da determinação do LQ através dos parâmetros analitos da curva.

Fonte: Adaptado de Ribeiro e colaboradores (2008) ⁹¹

$$Y_h = a_0 + 2s_y t \sqrt{\left(\frac{1}{N}\right) + 1 + \frac{(x_c - \bar{x})^2}{\sum_{i=1}^n (x_c - \bar{x})^2}} \quad \text{Equação 03}$$

$$X_c = \left(\frac{s_y t}{a_1}\right) \sqrt{\left(\frac{1}{N}\right) + 1 + \frac{\bar{x}^2}{\sum_{i=1}^n (x_c - \bar{x})^2}} \quad \text{Equação 04}$$

$$LQ = \left(\frac{y_h - a_0}{a_1}\right) + \left(\frac{s_y t}{a_1}\right) \sqrt{\left(\frac{1}{N}\right) + 1 + \frac{(y_h - \bar{y})^2}{a_1^2 \sum_{i=1}^n (x_c - \bar{x})^2}} \quad \text{Equação 05}$$

Onde: a_0 é o coeficiente linear, a_1 é o coeficiente angular, s_y é o desvio padrão, t é o valor da distribuição de t Student, N é o número de pontos, \bar{x} é o valor médio das concentrações e \bar{y} é o valor médio do sinal analítico.

4.5.4 Precisão

A precisão é a concordância entre determinadas repetições, em ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões em condições já definidas⁹⁸. A precisão de um método é expressa como desvio padrão relativo (DPR). Ela é calculada através da equação 06.

$$DPR(\%) = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad \text{Equação 06}$$

Onde s é o desvio padrão e \bar{x} é a média. Os valores aceitos de DPR segundo a normativa do INMETRO⁹² para concentrações até $10,0 \mu\text{g L}^{-1}$ é de 21% e para concentrações até $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$ é de 30%.

A precisão em validação analítica é avaliada em repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade. Nesse trabalho, foram avaliados a repetibilidade e precisão intermediária, em três níveis de concentração. Para os analitos ATZ e DEA os níveis foram: 0,100, 0,500 e $2,000 \mu\text{g L}^{-1}$, e para o DIA foram 1,000, 2,000 e $3,000 \mu\text{g L}^{-1}$. O padrão interno foi adicionado com a concentração de $2,000 \mu\text{g L}^{-1}$ em todos os casos. A reprodutibilidade não foi avaliada.

Para avaliar a repetibilidade foram preparadas soluções em água da matriz, fortificadas em três níveis de concentração (concentração baixa, concentração média e concentração alta em relação às concentrações da curva de calibração) em sete replicatas de extração, realizadas todas no mesmo dia.

A avaliação da precisão intermediária foi realizada em intervalo de 24 h (dias diferentes), nos mesmos três níveis de concentração avaliados para a repetibilidade, preparando-se soluções novas a cada extração, com cinco replicatas diárias, totalizando 10 replicatas. Foi utilizada a água da matriz no preparo das amostras.

4.5.5 Exatidão

A determinação da exatidão pode ser realizada utilizando, um material de referência certificado, a comparação de métodos, ensaios de recuperação e por adição de padrão^{96, 97, 98}. Nesse trabalho foram preparadas soluções fortificadas em água da matriz, nas quais as concentrações para os ATZ e DEA foram 0,100, 0,500 e 2,000 $\mu\text{g L}^{-1}$, e para o DIA foram 1,000, 2,000 e 3,000 $\mu\text{g L}^{-1}$. O padrão interno foi adicionado em uma concentração de 2,000 $\mu\text{g L}^{-1}$, e assim, foram determinados os erros relativos através da equação 07.

$$E(\%) = \left(\frac{x_a - x_0}{x_0} \right) \times 100 \quad \text{Equação 07}$$

Onde x_a é o valor determinado e o x_0 é o valor teórico.

4.5.6 Recuperação

Os ensaios de recuperação foram realizados em água da matriz, preparando soluções fortificadas nas quais as concentrações para ATZ e DEA foram 0,100, 0,500 e 2,000 $\mu\text{g L}^{-1}$, e para o DIA foram 1,000, 2,000 e 3,000 $\mu\text{g L}^{-1}$. O padrão interno foi adicionado com a concentração de 2,000 $\mu\text{g L}^{-1}$. A recuperação para cada solução foi determinada através da equação 08.

$$\text{Recuperação } R(\%) = \left(\frac{C_1}{C_2} \right) \times 100 \quad \text{Equação 08}$$

Onde, C_1 é a concentração da amostra fortificada e C_2 é a concentração teórica.

4.5.7 Robustez

A avaliação da robustez foi realizada comparando-se duas modificações na metodologia previamente estabelecida: a primeira consistiu na alteração do valor de pH (para pH=6) da amostra antes da DLLME. A segunda modificação foi realizada mediante a utilização de uma nova coluna cromatográfica (TR-5MS) que apresentava as mesmas

características de fase estacionária e dimensões de: comprimento, espessura da fase estacionária e diâmetro interno que a coluna usada anteriormente.

A robustez foi avaliada em dois níveis de concentração. Foram preparadas as amostras em água da matriz, em concentrações para ATZ e DEA de 0,100 e 2,000 $\mu\text{g L}^{-1}$, e para o DIA de 1,000 e 3,000 $\mu\text{g L}^{-1}$. O padrão interno foi adicionado apresentava uma concentração de 2,000 $\mu\text{g L}^{-1}$.

4.5.8 Efeito de Matriz

A estratégia adotada nesse trabalho para avaliar o efeito de matriz foi a de utilizar o método de comparação de curvas analíticas confeccionadas em matrizes aquosas de composição diferente ⁹⁷. Ademais, foram realizados o Teste t de Student (equações 09 a 11) para a verificação das diferenças entre os grupos de valores obtidos, para cada uma das matrizes aquosas avaliadas, sendo as hipóteses utilizadas descritas a seguir:

Hipóteses:

$$H_0 = \mu_1 = \mu_2$$

$$H_1 = \mu_1 \neq \mu_2$$

Em que:

H = Hipóteses

μ = Grupos de dados

Onde a H_0 : não há efeito de matriz; H_1 : elas diferem entre si, portanto deve-se preparar a curva diretamente na matriz.

$$S_{poll} = \sqrt{\frac{(n_1-1)(s_1)^2 + (n_2-1)(s_2)^2}{(n_1+n_2-2)}} \quad \text{Equação 09}$$

$$S_x = \frac{S_{poll}}{\sqrt{(n_1 \cdot n_2)/(n_1 + n_2)}} \quad \text{Equação 10}$$

$$t = \frac{|x_1 - x_2|}{S_x} \quad \text{Equação 11}$$

Assim, foram preparadas duas curvas analíticas em matrizes de: água ultra pura e água moderadamente dura que foram comparadas com a curva obtida na água da matriz. Nessas matrizes, as curvas analíticas foram preparadas empregando seis pontos, cuja as concentrações foram: 0,075, 0,100 e 0,250, 1,000, 2,000 e 3,000 $\mu\text{g L}^{-1}$. O padrão interno foi adicionado na concentração de 2,000 $\mu\text{g L}^{-1}$.

4.5.9 Estabilidade

O teste de estabilidade foi realizado para garantir a precisão e exatidão das amostras em estudo que foram congeladas previamente à análise. Para isso, foi preparada uma solução com concentração de 1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para cada analito, em 1L de água da matriz. Essa solução foi fracionada em alíquotas de 70,0 mL, as quais foram congeladas em frascos de vidro âmbar de 100,0 mL a uma temperatura de -20,0 °C. Após o preparo da solução, uma das alíquotas foi imediatamente extraída e quantificada para, assim, indicar a concentração inicial dos analitos na amostra. Posteriormente, a cada semana (até alcançar a quarta semana), e após isso, a cada mês, as alíquotas eram descongeladas e extraídas para realização da análise de quantificação dos analitos em estudo.

O cálculo empregado para o estudo da estabilidade está representado pela equação 12.

$$(\%) = \frac{C_f}{C_0} \times 100 \quad \text{Equação 12}$$

Onde, C_f é a concentração final e C_0 concentração inicial.

4.6 Análise cromatográfica em fase gasosa acoplada a espectrômetro de massas (GC-MS)

O sistema cromatográfico utilizado foi TRACE 1300 *Gas Chromatograph* (ThermoScientific), equipado com um sistema de amostrador automático TriPlus RSH (ThermoScientific) acoplado a analisador de massas do tipo quadrupolo ISQ *Single Quadrupole MS* (ThermoScientific).

A coluna utilizada nesse trabalho foi a TR-5MS (30m x 0,25mm x 0,25 μm). O fluxo de gás de arraste foi mantido em 1,0 mL min^{-1} . A fase estacionária da coluna é de característica não polar e sua composição é de 5% fenil polisilfenileno-siloxano. Essa coluna

é adequada para análise de agrotóxicos, pois suas características são similares às colunas DB-5, DB-5MS, Sapiens-5MS e VF-5, as quais foram empregadas em estudos similares a esse, como apresentado no Quadro V.

O método de injeção empregado foi do tipo *splitless*, para que toda porção do vapor gerado durante a etapa de injeção, pudesse ser analisado e, assim, aumentasse a sensibilidade de detecção dos analitos em estudo. O método de injeção *splitless* é o mais empregado em estudos para determinar compostos em nível traço ou ultra-traço⁸⁴. Para isso, o volume de injeção de trabalho foi de 2,0 µL de amostra. Além disso, a temperatura de operação do injetor empregada foi de 250 °C.

O gradiente de temperatura da separação cromatográfica foi adaptado de Hu e Colaboradores²⁴ e constava da seguinte programação: no início da separação cromatográfica, a temperatura foi de 50,0 °C, sendo mantida por 2 min. Após esse período, se empregou uma taxa de aquecimento de 15,0 °C min⁻¹ até 140,0 °C, e, posteriormente, 1,0 °C min⁻¹ até 158,0 °C. Na sequência, um aquecimento de 10,0 °C min⁻¹ foi realizado até 250,0 °C e, por fim, uma elevação de 7,0 °C min⁻¹ foi selecionada até alcançar uma temperatura de 290,0 °C. O gás Hélio foi empregado como gás de arraste a um fluxo constante de 1,0 mL min⁻¹. O tempo total de análise foi de 42 min (Figura 9).

A ionização das moléculas dos analitos na técnica de GC-MS pode ocorrer por dois métodos, um por ionização química (CI, no inglês *chemical ionization*) e a outra por ionização por impacto de elétrons (EI, no inglês *electron ionization*). O GC-MS utilizado nesse estudo dispunha somente da possibilidade de empregar a ionização por impacto de elétrons. A energia de ionização que foi selecionada e aplicada nesse estudo foi de 70 eV. Esse valor é, sem dúvida, o mais empregado quando se utiliza a fonte de ionização por EI. A fonte de ionização provê a energia para que ocorra a ionização dos analitos, principalmente sob altas temperaturas, prevenindo assim a condensação dos mesmos⁹⁹. Por essa razão, a temperatura da fonte de ionização que no trabalho de Hu e Colaboradores²⁴ era de 180,0°C foi alterada para 300,0 °C no método aqui desenvolvido. A linha de transferência foi mantida a uma temperatura de 250,0°C. A aquisição de dados foi realizada em modo SIM (*Selected Ion Monitoring*) e tanto para aquisição quanto para o tratamento de dados foi utilizado o software ThermoXcalibur versão 2.2 (ThermoScientific). Para o estudo e desenvolvimento das metodologias foi empregado o composto etion como padrão interno.

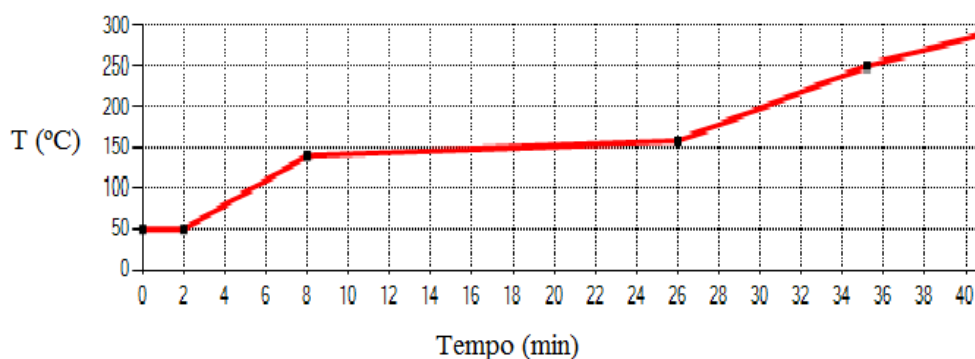


Figura 9. Representação gráfica do gradiente de temperatura usado na separação cromatográfica da ATZ, DEA, DIA e o padrão interno.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrômetro de massas com analisador do tipo quadrupolo (GC-MS)

Inicialmente foram estabelecidas as condições cromatográficas para a análise de ATZ, DEA e DIA. Para isto foram preparadas soluções individuais de cada analito estudado e do padrão interno (Etion) em acetonitrila e, as mesmas, foram analisadas no GC-MS no modo de varredura completa (*scan*) para se obter os tempos de retenção e as razões massa/carga (m/z) mais intensas e características de cada um dos compostos para que, assim, essas razões m/z pudessem ser utilizadas no modo *SIM* (*Selected Ion Monitoring*). Os resultados dessas análises iniciais podem ser vistos na Tabela I e os espectros de massa de cada um dos analitos pode ser consultado no Apêndice II deste trabalho.

As análises foram realizadas em modo de aquisição de dados com o monitoramento seletivo de íons que é a seleção mais adequada quando se está trabalhando com a análise de compostos em nível traço. Nesse modo é possível atingir sensibilidade em ng L^{-1} ⁸⁶. Adicionalmente, para confirmar a detecção dos analitos de interesse nessa técnica, foi necessário monitorar pelo menos 3 diferentes m/z ⁹⁹. Conforme mostrado na Tabela I, as 3 maiores intensidades de m/z , obtidas no modo varredura completa, foram relacionadas com cada um dos analitos de interesse.

Tabela I: Tempos de retenção e fragmentos mais intensos identificados no modo *scan* para os analitos e padrão interno.

Analito	Tempo de Retenção (min)	Íon mais intenso (m/z)	Íons secundários (m/z)
DIA	20,76	173	187* e 145
DEA	21,21	172*	158 e 145
ATZ	26,30	200	215* e, 173
Etion	35,73	231*	153 e 97

* íon molecular, m/z : razão massa/carga

5.2 Preparo de amostra

5.2.1 Microextração em Fase Sólida (SPME)

O estudo da SPME para extração dos analitos selecionados nesse trabalho (ATZ, DEA e DIA) foi realizado utilizando-se três fibras comerciais de diferentes naturezas químicas, com o intuito de se verificar para qual delas se obtinha a maior extração dos compostos em estudo. O pH é um fator que poderia influenciar na extração, entretanto estudos já realizados demonstraram que o pH não apresenta influência na extração dos analitos estudados^{24,46}. Desta forma, o valor de pH igual a $7,0 \pm 0,1$ foi escolhido por ser o mais próximo das amostras reais avaliadas neste estudo. As demais variáveis permaneceram constantes e seguiram a metodologia previamente descrita por Hu e Colaboradores²⁴.

Como resposta analítica para verificar a extração dos analitos nas três fibras avaliadas, utilizou-se a área do pico cromatográfico de cada um dos analitos e a área do padrão interno (Tabela II). As três fibras estudadas permitiram as extrações dos três analitos e, também do padrão interno. Tal fato pode ser observado na Tabela II e Figura 10. Os valores de área superiores para ATZ, DEA e DIA foram obtidos empregando-se a fibra PA. Quando se considera as razões de áreas (área do analito/área do padrão interno) observa-se valores superiores para a fibra CAR/PMDS. Este resultado se deve a menor afinidade do etion à fibra CAR/PDMS ocasionado pela natureza apolar da fibra, apresentando baixa capacidade de extração para o etion, e assim, apresentando a razão de área superior às outras fibras. Desse modo, caso se considerasse apenas os valores das razões entre as áreas, o resultado poderia indicar, equivocadamente, que a fibra em questão seria a mais indicada.

Tabela II. Valores das áreas* e o DPR para os analitos estudados na SPME empregando-se diferentes fibras.

Analito	PA	DPR (%)	PDMS/DVB	DPR (%)	CAR/PDMS	DPR (%)
	(n=3)		(n=3)		(n=3)	
Etion	26,37	14,42	19,60	9,89	0,60	15,80
ATZ	1052,59	11,29	304,35	8,52	69,58	6,27
ATZ/Etion	40,17	6,26	15,69	13,21	118,00	9,48
DIA	91,42	5,80	10,20	10,48	28,02	15,14
DIA/Etion	3,53	12,14	0,53	13,03	46,99	8,76
DEA	524,27	5,62	72,56	12,59	136,23	15,77
DEA/Etion	20,22	11,87	3,75	16,67	227,79	4,28

*Valores médios de áreas normalizadas por 10 000 dos analitos obtidos em triplicata de extração realizada por imersão direta das fibras em um solução preparada em água ultrapura a pH 7,00 com concentrações de 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ de DIA e DEA, 2,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ de ATZ e 2,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o etion contendo 0,35 mL^{-1} de NaCl.

A fibra PA apresenta a maior capacidade de extração para os três analitos quando comparada às demais, possivelmente por sua característica polar que é compatível com a natureza dos compostos avaliados^{46,100}. A fibra CAR/PDMS, foi descartada para a sequência do trabalho por apresentar baixa capacidade de extração do etion e baixa capacidade de extração dos analitos quando comparada à fibra PA. Por sua vez, a fibra PDMS/DVB demonstra a possibilidade de extrair os três analitos em estudo, porém apresenta uma área bastante inferior, quando comparada com a fibra PA (Tabela II e Figura 10). Além disso, Hu e colaboradores indicam que a fibra de PDMS/DVB é uma fibra não polar e por essa razão há uma dificuldade na extração dos analitos DEA e DIA²⁴. Dessa forma, a fibra de PA foi escolhida para realizar a avaliação de custo e da demanda temporal que será apresentado na sequência deste trabalho.

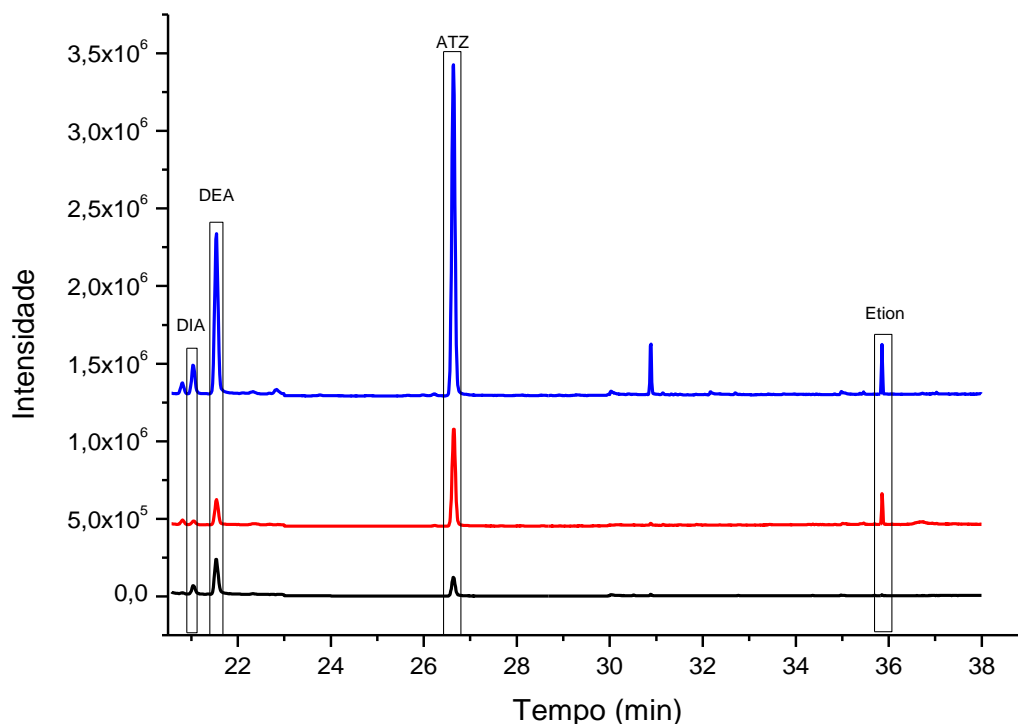


Figura 10. Cromatogramas do estudo de SPME comparando-se três fibras: CAR/PDMS (linha preta), PA (linha azul) e PDMS/DVB (linha vermelha). Extração realizada por imersão direta em 1 h a 25° C das fibras em uma solução de água ultra pura em pH 7,00 contendo 0,35 g mL⁻¹ de NaCl, 2,0 µg L⁻¹ de ATZ e Etion, e 5,0 µg L⁻¹ de DIA e DEA. Dessorção da fibra a 250,0 °C por 5 min.

Em SPME, o tempo de extração é a principal desvantagem da técnica. Essa variável é caracterizada pela duração que ocorre o equilíbrio dos analitos entre a fase aquosa e a fase polimérica, que é determinada pela difusão dos analitos para a superfície da fibra.

Outra variável que afeta diretamente a extração é a força iônica, pois a presença de sais, ou seja, de íons no meio, favorece a solvatação das moléculas de água diminuindo a polaridade da água e resultando na diminuição da solubilidade das moléculas orgânicas nesse meio aquoso, favorecendo a difusão dos analitos para superfície da fibra polimérica⁴⁶.

O último parâmetro que influencia a SPME é a temperatura de dessorção dos analitos dentro do sistema de injeção. Após realizar a extração, os analitos são dessorvidos da fibra empregando-se altas temperaturas. A temperatura ideal é aquela que consegue dessorver completamente os analitos e, além disso, garantir a limpeza completa da fibra para assim

permitir o seu reuso. Problemas de contaminação cruzada em análises que empregam a SPME podem estar relacionados à baixa temperatura do sistema de injeção ou pelo uso de um curto período de tempo de exposição da fibra, permitindo assim que os interferentes não sejam eliminados da fibra. Para avaliar esse parâmetro é necessário realizar a análise de um branco da fibra, após sua extração e dessorção. O resultado esperado é que não contenham nenhum sinal nos tempos de retenção dos analitos. Dessa forma, foi avaliado o tempo de dessorção da fibra a 250,0°C durante 5 minutos no injetor. Além disso, a fibra permaneceu exposta por 7 minutos adicionais para completa limpeza da mesma. Nessas condições, todos os analitos (ATZ, DEA e DIA) foram completamente dessorvidos e não se observou a presença de interferentes após a limpeza da fibra.

5.2.2 Extração em Fase Sólida (SPE)

Por ser uma metodologia de extração já consolidada para a análise de microcontaminantes é, frequentemente, utilizada^{13,41,67,68}. Essa técnica é também empregada na análise de ATZ, DIA e DEA^{11,13,14,20,40,41,67,68}. Assim, como existem inúmeros artigos publicados na literatura atual, no presente trabalho, essa metodologia não foi submetida aos processos de desenvolvimento e validação. Assim, optou-se por adaptar a metodologia estabelecida por Masià e Colaboradores¹³, a qual empregava o cartucho Oasis[®] HLB com 500,0 mg de material sorvente e capacidade de 6,0 mL.

A Figura 11 apresenta um cromatograma obtido para a separação dos analitos em estudo na matriz de água ultra pura. Pode-se observar que uma adequada extração dos analitos e do padrão interno foi oportunizada nesse caso.

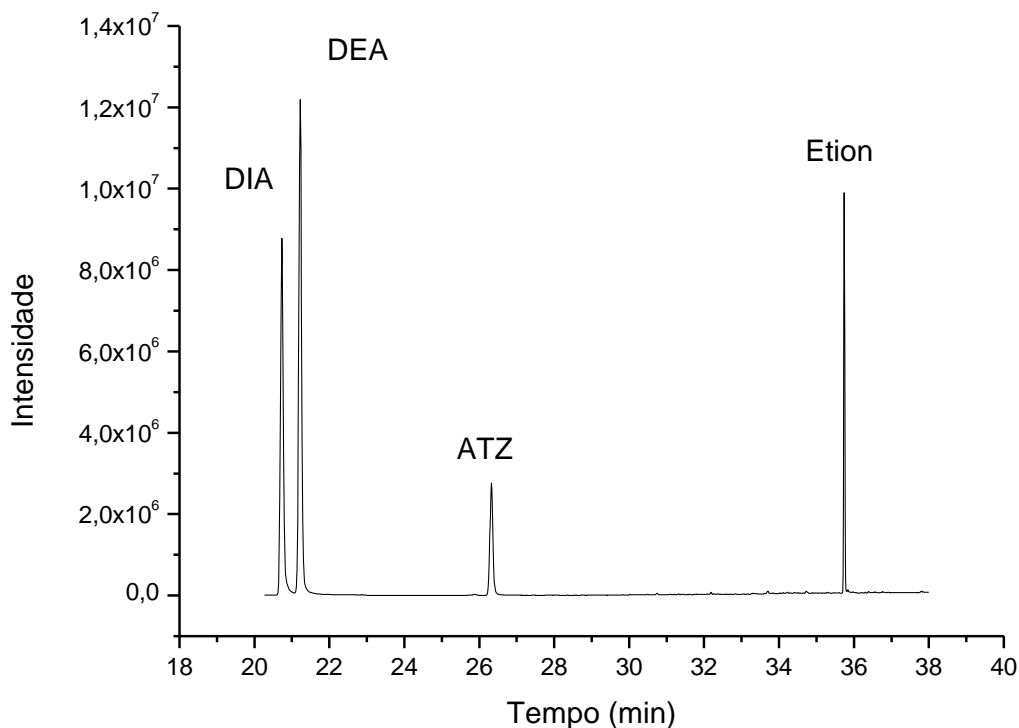


Figura 11. Cromatograma referente à SPE. Amostra de água ultra pura (200,0 mL) fortificadas com $2,0 \mu\text{g L}^{-1}$ para ATZ e Etion, $5,0 \mu\text{g L}^{-1}$ para DEA e DIA, extraída com cartucho Oasis[®] HLB.

Foi verificada a capacidade de extração da SPE em três tipos de matrizes aquosas: a primeira em água ultra pura, a segunda em água sintética moderadamente dura⁸⁸ e a terceira em água da matriz. As extrações empregando SPE foram realizadas em triplicatas e o etion a $2,0 \mu\text{g L}^{-1}$ foi utilizado como padrão interno. Durante a extração podem existir perdas significativas dos analitos, como por exemplo, pela formação de caminhos preferenciais no material sorbente, perdas na etapa de ressuspensão, entre outros fatores que podem constituir fontes de erros no processo de extração. Na tentativa de minimizar estes efeitos utilizou-se a quantificação empregando o padrão interno. A eficiência da extração por SPE foi determinada utilizando como resposta analítica a área do pico cromatográfico de cada um dos analitos em razão da área do padrão interno (etion). A Tabela III apresenta os valores das áreas dos analitos para cada matriz avaliada e a Tabela IV apresenta os valores das razões das áreas do analito/área do padrão interno.

Tabela III. Valores das áreas* para os analitos estudados nas extrações por SPE para as três matrizes aquosas avaliadas.

Analito	Água Ultra Pura	Água Sintética	Água da Matriz
ATZ	1576± 39	1656± 72	2058± 36
DIA	4482± 74	4357± 220	5221± 51
DEA	5897± 135	5870± 285	6443± 108
Etion	854± 12	811± 73	976± 28

*Valores médios de triplicatas de áreas normalizadas por 10 000 ± desvio padrão. Amostras fortificadas com concentrações de 2,0µg L⁻¹ para ATZ e etion, 5,0µg L⁻¹ para DIA e DEA.

Tabela IV. Razão dos valores de áreas* dos analitos pela área do padrão interno nas extrações por SPE para as três matrizes aquosas avaliadas.

Analito	Água Ultra Pura		Água Sintética		Água da Matriz	
	Média* (n=3) u.a.	DPR (%)	Média* (n=3) u.a.	DPR (%)	Média* (n=3) u.a.	DPR (%)
ATZ/Etion	1,850 ^a	1,20	2,050 ^b	12,07	2,110 ^b	2,63
DIA/Etion	5,248 ^a	2,17	5,390 ^a	8,23	5,351 ^a	3,47
DEA/Etion	6,906 ^a	2,79	7,261 ^a	7,40	7,116 ^a	3,98

*Valores médios de triplicata de áreas normalizadas por 10 000. Amostras fortificadas com concentrações de 2,0µg L⁻¹ para ATZ e etion, e 5,0 µg L⁻¹ para DIA e DEA. DPR: desvio padrão relativo. Letras diferentes em uma mesma linha indicam diferenças significativas para as diferentes matrizes (P<0,5).

Ao analisar os valores das razões das áreas apresentadas na Tabela IV, há uma diferença estatisticamente significativa (P<0,5) entre os valores obtidos para as matrizes de água ultra pura e água sintética quando comparadas a água da matriz para o analito ATZ. Já para DEA e DIA, não foram observadas diferenças significativas (P<0,5),

A metodologia proposta para SPE apresentou valores de desvio padrão relativo (DPR) inferiores a 12,07 %. Cabe destacar que de acordo com o INMETRO⁹⁷ o DPR aceitável para analitos na faixa de concentração de 2,0 a 5,0 µg L⁻¹ é de até 20 %.

5.2.3 Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME)

5.2.3.1 Escolha do solvente dispersor e solvente extrator

O estudo da DLLME iniciou com a avaliação da natureza dos solventes extrator e dispersor. Estudos empregando este método de extração, visando à determinação simultânea dos três analitos em estudo são escassos^{26,27,101} e, ainda mais limitados, são os estudos em que se verifica o uso de ferramentas quimiométricas para otimizar esse processo de extração.

No estudo preliminar, da combinação dos pares solvente dispersor e solvente extrator, os pares que demonstraram apresentar a maior eficiência de extração para os analitos de interesse, estão apresentados na Tabela V. As demais combinações testadas não foram eficientes e, portanto, os resultados não foram apresentados.

Vale ressaltar que embora o etion tenha sido utilizado nas diferentes combinações de SE e SD (Tabela V), é evidente que ocorreram diferenças de interação entre este composto e os pares de solvente. Isto se deve à variações na polaridade da mistura dos solventes usados. Logo, optou-se por, selecionar o par SE:SD verificando as áreas dos picos cromatográficos para os analitos de interesse, sem utilizar a razão com a área do padrão interno.

Tabela V. Valores das áreas* dos analitos no estudo da escolha do par solvente extrator/solvente dispersor em DLLME.

Analito	Clorobenzeno e	Diclorometano e	Triclorometano e
	Acetonitrila	Acetona	Acetonitrila
Etion	146,32	251,37	62,72
ATZ	14,34	29,24	15,43
DIA	1,70	15,03	10,47
DEA	18,32	88,50	65,96

* Valores de áreas normalizadas em 10.000. Amostras de água ultrapura fortificadas com DEA e DIA na concentração de $5,0\mu\text{g L}^{-1}$ e ATZ na concentração de $2,0\mu\text{g L}^{-1}$. Extrações realizadas utilizando $100,0\ \mu\text{L}$ de solvente extrator e $400,0\ \mu\text{L}$ de solvente dispersor. Análises realizadas em um única repetição.

Ao observar os resultados das áreas da Tabela V, o par de solventes diclorometano e acetona apresentou a maior eficiência de extração para ATZ, DEA e DIA, o qual foi utilizado

para realizar a otimização mediante planejamento experimental Doehlert das variáveis experimentais que influenciam diretamente a DLLME.

5.2.3.2 Planejamento Experimental

As variáveis selecionadas para o estudo empregando a matriz Doehlert foram: volume do solvente extrator (SE), volume do solvente dispersor (SD) e força iônica do meio. O efeito do pH não foi selecionado para o estudo pois, embora seja uma das variáveis importantes para a DLLME, os analitos avaliados no presente trabalho apresentam valores de pKa muitos baixos (QuadroII), de tal forma, os mesmos não sofrem dissociação, e assim, estão na sua forma molecular durante o procedimento da extração¹⁰². Assim, optou-se por trabalhar com água ultra pura em um pH fixo em 7,00 considerando que as amostras reais apresentavam valores de pH próximos ou igual a esse valor.

O estudo do SE foi avaliado em 5 níveis, variando-se os intervalos entre 50,0 a 200,0 μL , o SD foi avaliado em 7 níveis, compreendo de 50,0 a 800,0 μL e por fim, a força iônica foi avaliada com a adição de NaCl ao meio em 3 níveis de concentração compreendidos entre 0 até 0,10 g mL^{-1} . Como resposta analítica para o planejamento Doehlert, utilizou-se a área do pico cromatográfico de cada um dos analitos em razão da área do padrão interno, o etion. Os níveis de cada uma das variáveis selecionadas e as respostas obtidas para os diferentes ensaios do planejamento estão descritos na Tabela VI.

Além disso, foi realizado o teste Q de Dixon para verificar se os ensaios do ponto central (ensaios 13-19 do planejamento - Tabela VI) apresentavam valores afastados ou discrepantes “*outlier*”. Porém os valores obtidos para as réplicas do ponto central não foram *outliers*.

Tabela VI. Níveis de cada uma das variáveis selecionadas e as respostas obtidas para o planejamento Doehlert.

Ensaio	Variáveis			Respostas		
	Solvente Extrator (µL)	Solvente Dispersor (µL)	NaCl (g mL ⁻¹)	Área DIA/Área Etion	Área DEA / Área Etion	Área ATZ / Área Etion
1	200,0	425,0	0,05	4,95	12,08	4,25
2	163,0	800,0	0,05	4,00	10,82	4,46
3	163,0	550,0	0,10	8,24	18,06	6,19
4	50,0	425,0	0,05	1,73	5,46	2,53
5	88,0	50,0	0,05	3,60	9,40	3,48
6	88,0	300,0	0,00	2,70	8,15	3,82
7	163,0	50,0	0,05	5,27	13,04	4,32
8	163,0	300,0	0,00	4,12	11,08	4,56
9	88,0	800,0	0,05	3,17	9,05	4,08
10	125,0	675,0	0,00	1,92	6,12	3,49
11	88,0	550,0	0,10	5,71	14,02	5,20
12	125,0	175,0	0,10	7,85	17,39	5,82
13	125,0	425,0	0,05	5,34	13,66	5,05
14	125,0	425,0	0,05	5,76	14,28	5,27
15	125,0	425,0	0,05	6,44	16,12	5,88
16	125,0	425,0	0,05	5,56	15,17	5,74
17	125,0	425,0	0,05	5,39	14,14	5,39
18	125,0	425,0	0,05	5,77	15,04	5,64
19	125,0	425,0	0,05	6,55	16,76	6,19

Soluções com concentrações de 5,0 µg L⁻¹ de DEA e DIA, 2,0 µg L⁻¹ de ATZ e 2,0 µg L⁻¹ de etion em água ultra pura.

Ao analisar as respostas na Tabela VI, pode-se identificar que o ensaio número 3, 163,0 µL de SE, 550,0 µL de SD e 0,10g mL⁻¹ de NaCl apresentou a maior extração dos três analitos. A presença de uma elevada quantidade de NaCl no meio auxilia o processo de extração por meio do efeito “*salting out*”. Os ânions cloreto e cátions sódio competem pela solvatação das moléculas de água, induzindo uma diminuição da polaridade da água o que resulta na diminuição da solubilidade das moléculas orgânicas^{26,27,102}. Além disso, a combinação do solvente dispersor (550,0 µL) e do solvente extrator (163,0 µL) proporcionou um aumento da área superficial das microgotas que formam a emulsão no ensaio número 3 em relação aos demais ensaios onde os volumes de ambos solventes eram inferiores aos empregados nessa condição experimental. Tal fato leva ao aumento da eficiência da extração^{69,102}.

A matriz Doehlert foi testada para o modelo linear e quadrático. A resposta gerada pelo modelo linear foi submetida ao teste de ANOVA (Tabela VII). A regressão do modelo

linear não foi significativa, e a falta de ajuste do modelo foi significativa. Com base nestes resultados, o modelo linear não foi adequado. Deste modo, na sequência, foi avaliado o modelo quadrático.

A matriz Doehlert para o modelo quadrático para a ATZ (Tabela VIII) apresentou como resultado na análise de variância (ANOVA) uma regressão significativa e falta de ajuste não significativa. Por apresentar um ajuste adequado, o modelo quadrático foi escolhido e avaliado para o DEA e o DIA, apresentando resultados satisfatórios (regressão significativa e falta de ajuste não significativa (Tabelas IX e X)). Para os três analitos, o ajuste do modelo pôde ser considerado adequado, pois tais modelos apresentaram uma porcentagem de variação explicada acima de 93% e uma porcentagem máxima explicável superior a 95%.

Tabela VII. Análise de variância (ANOVA) para a extração de ATZ mediante DLLME utilizando matriz Doehlert de modelo linear.

FV	SQ	nGL	MQ	Fcalc.		ρ
Regressão	7,50	6	1,250	1,27		0,34
Resíduos	11,77	12	0,981			
Falta de Ajuste	10,88	6	1,813	12,13	SG	0,004
Erro Puro	0,90	6	0,150			
Total	19,27	18				
% Variação Explicada				38,91		
% Máxima variação explicável				95,35		

Sendo: FV: Fonte de Variação; SQ: Soma Quadrática; nGL: Número de Graus de Liberdade; MQ: Média Quadrática; Fcalc: valor de F calculado; ρ: nível de significância; SG: Valor Significativo.

Tabela VIII. Análise de variância (ANOVA) para a extração de ATZ mediante DLLME utilizando matriz Doehlert de modelo quadrático.

FV	SQ	nGL	MQ	Fcalc.	SG	ρ
Regressão	17,97	9	2,00	13,82	SG	0,0003
Resíduos	1,30	9	0,14			
Falta de Ajuste	0,41	3	0,13	0,90		0,4950
Erro Puro	0,90	6	0,15			
Total	19,27	18				
% Variação Explicada				93,25		
% Máxima Variação Explicável				95,34		

Sendo: FV: Fonte de Variação; SQ: Soma Quadrática; nGL: Número de Graus de Liberdade; MQ: Média Quadrática; Fcalc: valor de F calculado; ρ: nível de significância; SG: Valor Significativo.

Tabela IX. Análise de variância (ANOVA) para a extração do DEA mediante DLLME utilizando matriz Doehlert de modelo quadrático.

FV	SQ	nGL	MQ	Fcalc.	SG	ρ
Regressão	234,00	9	26,00	21,29	SG	0,00005
Resíduos	11,00	9	1,22			
Falta de Ajuste	3,53	3	1,18	0,95		0,475
Erro Puro	7,46	6	1,24			
Total	245,00	18				
% Variação Explicada				95,51		
% Máxima Variação Explicável				96,96		

Sendo: FV: Fonte de Variação; SQ: Soma Quadrática; nGL: Número de Graus de Liberdade; MQ: Média Quadrática; Fcalc: valor de F calculado; ρ: nível de significância; SG: Valor Significativo.

Tabela X. Análise de variância (ANOVA) para a extração do DIA mediante DLLME utilizando matriz Doehlert de modelo quadrático.

FV	SQ	nGL	MQ	Fcalc.	SG	ρ
Regressão	55,73	9	6,19	24,80	SG	0,00003
Resíduos	2,25	9	0,25			
Falta de Ajuste	0,83	3	0,28	1,18		0,3921
Erro Puro	1,41	6	0,24			
Total	57,98	18				
% Variação Explicada				96,12		
% Máxima Variação Explicável				97,56		

Sendo: FV: Fonte de Variação; SQ: Soma Quadrática; nGL: Número de Graus de Liberdade; MQ: Média Quadrática; Fcalc: valor de F calculado; ρ: nível de significância; SG: Valor Significativo.

Os gráficos de probabilidade normal (Figura 12) indicam quais das variáveis apresentam a maior influência no processo de extração, revelaram que a variação da força iônica apresenta uma alta influência para o procedimento de extração. Além dela, o volume do solvente extrator, também se mostra relevante para extração dos analitos. A combinação das variáveis volume de solvente dispersor e força iônica, além da interação entre a variável volume de solvente extrator e força iônica, são significativas para o sistema estudado. Por sua vez, a variável volume de solvente dispersor e as demais interações entre as variáveis e combinações de segunda ordem, não apresentam influência sobre a extração, já que se encontram próximas ao zero. Ao observar a Figura 12 há uma evidência que todos os analitos apresentaram comportamento similar para as variáveis avaliadas.

Os resultados das planilhas eletrônicas podem ser vistos em sua integralidade no Apêndice III deste trabalho.

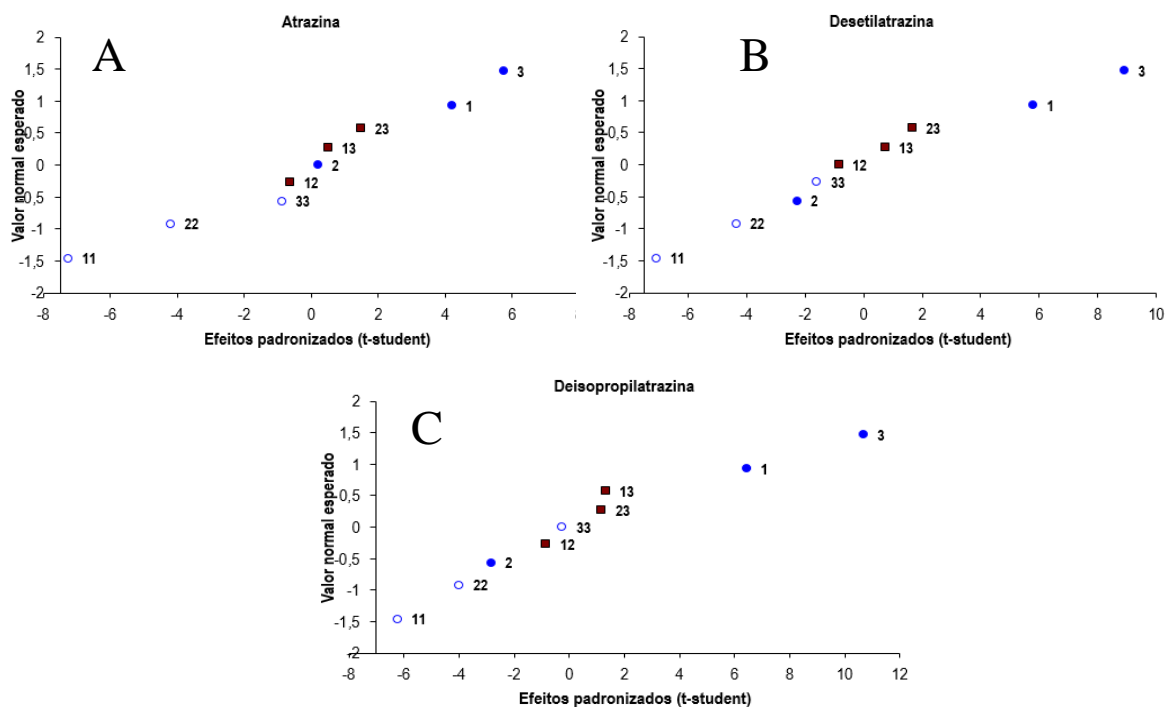


Figura 12. Gráficos de probabilidade normal sobre os efeitos de cada variável - 1 – solvente extrator, 2 – solvente dispensor e 3- força iônica para: (A) ATZ; (B) DEA e(C) DIA.

O modelo quadrático foi utilizado para gerar a superfície de resposta, representada pelas equações 13, 14 e 15 para ATZ, DEA e DIA, respectivamente. A variação máxima explicável do modelo para ATZ foi de 95%, para o DEA foi de 97% e para o DIA 97%, demonstrando que o modelo apresenta um ótimo ajuste. Com o planejamento validado foram plotados os gráficos de superfície de resposta para os três analitos (Figura 13) para a interação entre volume de solvente dispensor e volume de solvente extrator. As demais superfícies apresentaram representações gráficas muito semelhantes a estas que são apresentadas na Figura 13 e podem ser consultadas no Apêndice IV.

$$y = 6,32 + 0,16X_1 + 0,64X_2 - 0,27X_1X_2 - 2,20X_1^2 - 1,27X_2^2 \quad \text{Equação 13}$$

$$y = 18,18 + 4,07X_1 + 0,69X_2 - 1,08X_1X_2 - 6,26 X_1^2 - 3,85 X_2^2 \quad \text{Equação 14}$$

$$y = 7,95 + 2,30X_1 - 0,09X_2 - 0,48X_1X_2 - 2,50X_1^2 - 1,60X_2^2 \quad \text{Equação 15}$$

Onde: Y é a intensidade do sinal, X_1 é o volume do solvente extrator e X_2 volume do solvente dispensor.

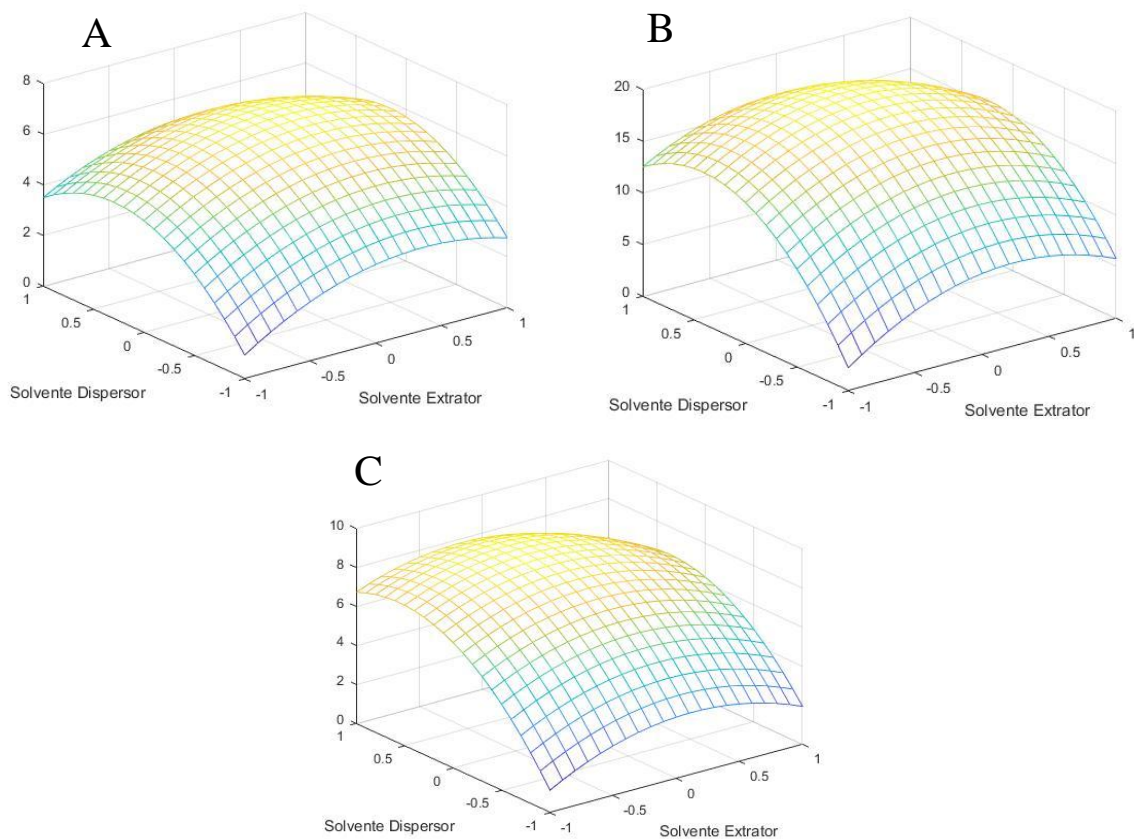


Figura 13. Representação das superfícies de resposta para a interação entre solvente dispersor e solvente extrator obtidas para o planejamento Doehlert na otimização das condições da DLLME para: (A) ATZ;(B) DEA;(C) DIA.

5.3 Validação da metodologia

Uma vez estabelecida às condições instrumentais e de extração por DLLME, seguiu-se a validação da metodologia pela determinação das principais figuras de mérito do método. Os parâmetros selecionados foram avaliados empregando-se a planilha eletrônica de validação desenvolvida por Ribeiro e Colaboradores⁹⁶ que está disponível, de forma gratuita, na rede mundial de computadores.

5.3.1 Seletividade do método

Avaliação da seletividade foi realizada através de extrações em matriz com e sem adição de padrões. Ao observar os cromatogramas da Figura 14, tanto na matriz fortificada quanto na matriz sem adição dos padrões, não houve a presença de interferentes nos tempos de retenção dos compostos, nem a sobreposição de picos.

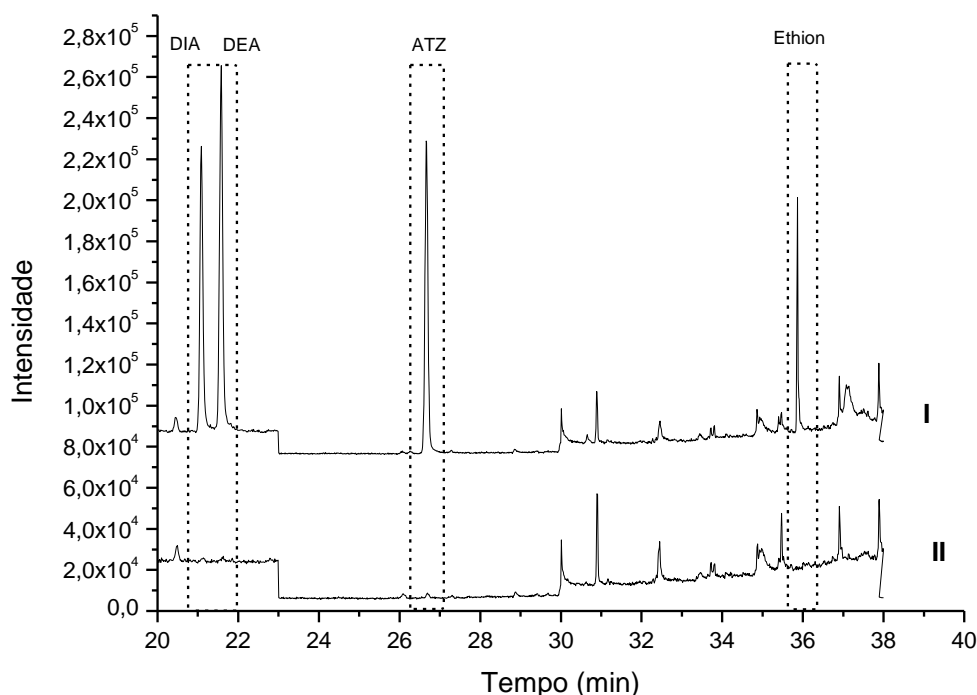


Figura 14. Cromatograma da extração por DLLME em matriz. I) representa a matriz fortificada com ATZ e DEA nas concentrações de $2,0 \mu\text{g L}^{-1}$, DIA nas concentrações de $3,0 \mu\text{g L}^{-1}$ e o padrão interno (etion) em concentração de $2,0 \mu\text{g L}^{-1}$. II) representa a matriz não fortificada. As condições da extração foram: $163,0 \mu\text{L}$ de diclorometano, $550,0 \mu\text{L}$ de acetona, $0,10 \text{ g mL}^{-1}$ de cloreto de sódio em $5,0 \text{ mL}$ de amostra a pH 7,00.

5.3.2 Linearidade

A Tabela XI apresenta a equação da reta e o coeficiente de determinação, obtidos a partir da curva analítica, como resultados do estudo da linearidade.

Tabela XI. Faixa linear, equação da reta e coeficiente de determinação (R^2) para as curvas analíticas da ATZ, DEA e DIA, preparadas em água da matriz.

Analito	Faixa linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Equação da Reta	R^2
ATZ	0,075-3,00	$Y = 3,3888x - 0,10982$	0,996
DEA	0,075-3,00	$Y = 3,7620x - 0,18334$	0,995
DIA	0,50-4,00	$Y = 1,6631x - 0,3973$	0,992

Os valores dos coeficientes de determinação para os analitos nas faixas de estudos foram superiores a 0,99, o que demonstra que as curvas analíticas apresentam uma correlação satisfatória que atende ao estabelecido na resolução do INMETRO ⁹⁷. As curvas analíticas podem ser vistas no Apêndice V.

Cabe destacar ainda que mesmo apresentando valores de correlação satisfatórios pode ser que as curvas analíticas apresentem algum tipo de tendência de geração de resíduos. Para que uma curva analítica possa ser considerada linear, o gráfico de resíduos não deve demonstrar qualquer tendência e sim apresentar homocedasticidade, ou seja, apresentar uma distribuição aleatória dos resíduos. Ao observar os gráficos de resíduos para cada uma das curvas analíticas em questão (vide Apêndice V) se identifica que os mesmos não apresentam tendências.

5.3.3 Limite de Detecção e Limite de Quantificação

Para os cálculos de limite de detecção e de quantificação foram utilizados três métodos diferentes: o método simplificado, método que utiliza a relação sinal/ruído (S/N) do equipamento e por fim, o método da planilha de validação que está baseado nos parâmetros da curva analítica ^{96, 97, 98}.

5.3.3.1 Limite de Detecção

Por definição o limite de detecção (LD) é a menor medida que pode ser detectada, mas não quantificada dentro de um método. Desse modo, os LD para cada um dos métodos foram calculados e são apresentados na Tabela XII.

Tabela XII. Comparação dos limites de detecção obtidos através de diferentes métodos.

Analito	Método Simplificado	Método de relação Sinal	Método dos parâmetros
	($\mu\text{g L}^{-1}$)	Ruído ($\mu\text{g L}^{-1}$)	da curva analítica ($\mu\text{g L}^{-1}$)
ATZ	0,0120	0,050	0,31
DEA	0,0107	0,250	0,35
DIA	0,0258	0,250	0,54

Ao comparar os valores dos LD do método simplificado com os valores da relação S/N para ATZ, DEA e DIA, é perceptível que o do equipamento não demonstra ter sensibilidade adequada para análise nessas concentrações (limite instrumental). Por outro lado, ao observar os valores de LD para o método baseado nos parâmetros da curva analítica se identificam valores superiores em relação ao método S/N, possivelmente pelo grau de confiança em que o presente método está fundamentado. Dessa forma, o método escolhido para o LD foi a relação sinal ruído, pois é a capacidade instrumental do equipamento em se detectar adequadamente os analitos de interesse ⁹⁶.

5.3.3.2 Limite de Quantificação

O limite de quantificação (LQ) é a menor concentração do analito de interesse que pode ser analisada com precisão e exatidão. Para a determinação do LQ, foram comparados três métodos diferentes e os dados são apresentados na Tabela XIII.

Tabela XIII. Comparação dos limites de quantificação para os três diferentes métodos.

Analito	Método Simplificado	Método de relação Sinal	Método dos parâmetros da curva
	($\mu\text{g L}^{-1}$)	Ruído ($\mu\text{g L}^{-1}$)	analítica ($\mu\text{g L}^{-1}$)
ATZ	0,041	0,150	0,48
DEA	0,085	0,500	0,52
DIA	0,036	0,900	0,80

Ao comparar os valores dos LQ obtidos do método da relação S/N (0,150, 0,500 e 0,900 $\mu\text{g L}^{-1}$ para ATZ, DEA e DIA) com os valores do método dos parâmetros da curva analítica (0,480, 0,520 e 0,800 $\mu\text{g L}^{-1}$ para ATZ, DEA e DIA), assim como na determinação do LD, observa-se uma diferença dos valores de LQ para os analitos ATZ e DIA, e para o DEA. O método simplificado foi o que apresentou valores mais díspares se comparados com os valores dos outros dois métodos avaliados. Dessa forma, o método escolhido para determinar os LQ dos analitos em estudo foi o método que utiliza a razão sinal/ruído.

5.3.4 Precisão

As figuras de mérito avaliadas para a precisão foram a repetibilidade e precisão intermediária. A repetibilidade, por definição é a precisão dos resultados obtidos pelo mesmo analista utilizando o mesmo instrumento de análise ^{96,98}. Os dados da repetibilidade estão apresentados na Tabela XIV.

Tabela XIV. Parâmetros para avaliação da repetibilidade para os analitos ATZ, DEA e DIA em água da matriz.

Analito	Nível 1 (n=7)			Nível 2 (n=7)			Nível 3(n=7)		
	C _t ($\mu\text{g L}^{-1}$)	C _p ($\mu\text{g L}^{-1}$)	DPR (%)	C _t ($\mu\text{g L}^{-1}$)	C _p ($\mu\text{g L}^{-1}$)	DPR (%)	C _t ($\mu\text{g L}^{-1}$)	C _p ($\mu\text{g L}^{-1}$)	DPR (%)
ATZ	0,1000	0,0990	5,87	0,5000	0,6769	3,69	2,0000	1,8614	4,23
DEA	0,1000	0,1181	6,03	0,5000	0,7865	3,55	2,0000	1,8917	5,49
DIA	1,0000	1,0197	7,78	2,0000	2,1886	5,01	3,0000	3,2690	4,37

Onde: n: número de extrações; C_t: concentração teórica; C_p: Concentração predita; DPR: desvio padrão relativo.

Os valores aceitos de desvio padrão relativo (DPR) segundo a normativa do INMETRO ⁹², para concentrações até 10,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ são de até 21 % e para concentrações até 1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ são de até 30 %. Assim, todos os valores de DPR, para todas as concentrações testadas, estão dentro da faixa estabelecida na norma, o que indica que a repetibilidade do método está de acordo com o estabelecido pelo INMETRO ⁹⁷.

A precisão intermediária é o estudo da variabilidade dos resultados onde são realizados testes, variando condições, como: diferentes analistas, diferentes dias e ou

diferentes equipamentos instrumentais ^{96,97}. Os dados obtidos para esse parâmetro estão apresentados na Tabela XV. Neste estudo foram realizadas as extrações e análises em dois dias diferentes, em intervalos de 24 h, preparando-se soluções novas para cada extração.

Tabela XV. Valores do estudo da precisão intermediária, em três níveis, em análises realizadas em dois dias diferentes, preparados em água da matriz.

Analito	Nível 1 (n=10)			Nível 2 (n=10)			Nível 3(n=10)		
	C _t (µg L ⁻¹)	C _p (µg L ⁻¹)	DPR (%)	C _t (µg L ⁻¹)	C _p (µg L ⁻¹)	DPR (%)	C _t (µg L ⁻¹)	C _p (µg L ⁻¹)	DPR (%)
ATZ	0,1000	0,0975	2,91	0,5000	0,6186	7,15	2,0000	1,7983	5,64
DEA	0,1000	0,1147	3,48	0,5000	0,6949	8,30	2,0000	1,9240	2,83
DIA	1,0000	0,9856	5,07	2,0000	1,9868	7,49	3,0000	3,2633	2,63

Onde, n: número de extrações; C_t: concentração teórica; C_p: concentração predita; DPR: desvio padrão relativo.

Avaliação da precisão intermediária pode ser realizada utilizando os valores limites do estudo da repetibilidade ⁹⁸. Portanto, os valores, de DPR para a precisão intermediária determinados nesse trabalho estão abaixo de 8,30 %, e, ademais, estão dentro do limite definido como aceitável pelo INMETRO ⁹⁷, que são: para 10,0 µg L⁻¹ até 21 % e para 1,0 µg L⁻¹ até 30 %.

5.3.5 Exatidão

A exatidão é a concordância entre o valor teórico e o valor medido, e está relacionada com o erro relativo. A determinação da exatidão pode ser realizada utilizando-se um material de referência certificado, a comparação de métodos, ensaios de recuperação e por adição de padrão ^{96,97,98}.

A exatidão foi avaliada utilizando soluções fortificadas utilizando água da matriz, em três níveis de concentrações. Os valores de exatidão obtidos estão apresentados na Tabela XVI e estão dentro da faixa de variação estabelecida, -30 a + 20 % do valor referencial ⁹⁷. Dessa forma, o método proposto apresenta uma exatidão aceitável.

Tabela XVI. Erro relativo (%) em três níveis de concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$) para os analitos ATZ, DEA e DIA, em água da matriz.

Analito	Nível 1*		Nível 2*		Nível 3*	
	n=(3)		n=(3)		n=(3)	
	0,100 $\mu\text{g L}^{-1}$ a	1,000 $\mu\text{g L}^{-1}$ b	0,500 $\mu\text{g L}^{-1}$ a	2,000 $\mu\text{g L}^{-1}$ b	2,000 $\mu\text{g L}^{-1}$ a	3,000 $\mu\text{g L}^{-1}$ b
ATZ	-1,00	-	10,99	-	+ 1,37	-
DEA	+ 4,69	-	+ 18,60	-	-0,39	-
DIA	-	-0,62	-	-0,02	-	-6,23

*Valores em percentagem (%). a) Nível de concentração referente aos analitos ATZ e DEA. b) Nível de concentração referente ao analito DIA.

5.3.6 Recuperação

A recuperação foi determinada preparando soluções fortificadas em três níveis de concentração, em triplicata. A tabela XVII apresenta os resultados desse estudo.

Tabela XVII. Recuperação (%) em três níveis, realizadas em água da matriz e em triplicatas.

Analito	Nível 1*		Nível 2*		Nível 3*	
	n=(3)		n=(3)		n=(3)	
	0,100 $\mu\text{g L}^{-1}$ a	1,000 $\mu\text{g L}^{-1}$ b	0,500 $\mu\text{g L}^{-1}$ a	2,000 $\mu\text{g L}^{-1}$ b	2,000 $\mu\text{g L}^{-1}$ a	3,000 $\mu\text{g L}^{-1}$ b
ATZ	99,00	-	110,99	-	101,37	-
DEA	104,69	-	118,60	-	99,61	-
DIA	-	101,12	-	100,80	-	101,60

*Valores em percentagem (%). a) Nível de concentração referente aos analitos ATZ e DEA. b) Nível de concentração referente ao analito DIA.

Segundo a normativa do INMETRO ⁹⁷, o limite de recuperação aceitável para amostras com concentrações de $10,0 \mu\text{g L}^{-1}$ corresponde ao intervalo de 60 – 115 % e para concentrações de até $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$ corresponde ao intervalo de 40 – 120 %. Assim, todos os valores de recuperação (%) obtidos nesse estudo estão dentro do critério de aceitação para recuperação de acordo com o INMETRO ⁹⁷.

5.3.7 Efeito de matriz

A presença de contaminantes ou interferentes pode influenciar direta ou indiretamente no resultado, aumentando ou diminuindo os valores de concentração para um determinado analito. Essa implicação pode ser definida como efeito de matriz ⁹⁷. Foram construídas duas curvas analíticas, em água ultra pura e água sintética e as informações geradas a partir da elaboração delas são apresentadas na Tabela XVIII e nas Figuras 15 a 17.

Tabela XVIII. Dados de regressão de curvas analíticas elaboradas para o estudo do efeito matriz.

Analito	Matriz	Faixa linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	R^2	A	b	Dp	n
ATZ	Água ultra pura	0,075-3,00	0,9936	2,8095	0,0587	0,0356	41
	Água sintética	0,075-3,00	0,9976	2,6055	0,0612	0,0203	41
	Água da matriz	0,075-3,00	0,9956	3,3888	-0,1098	0,0468	24
DEA	Água ultra pura	0,075-3,00	0,9943	2,9491	-0,0183	0,0402	42
	Água sintética	0,075-3,00	0,9975	3,1544	-0,0220	0,0250	41
	Água da matriz	0,075-3,00	0,9947	3,7620	-0,1833	0,0574	24
DIA	Água ultra pura	0,50-4,00	0,99198	1,3298	-0,0478	0,0247	25
	Água sintética	0,50-4,00	0,9906	1,4693	-0,1971	0,0286	25
	Água da matriz	0,50-4,00	0,9917	1,6630	-0,3973	0,0348	20

Onde: R^2 , valor do coeficiente de determinação; a, o coeficiente angular; b, intercepto; dp, desvio padrão da curva analítica; n, número de total de pontos da curva.

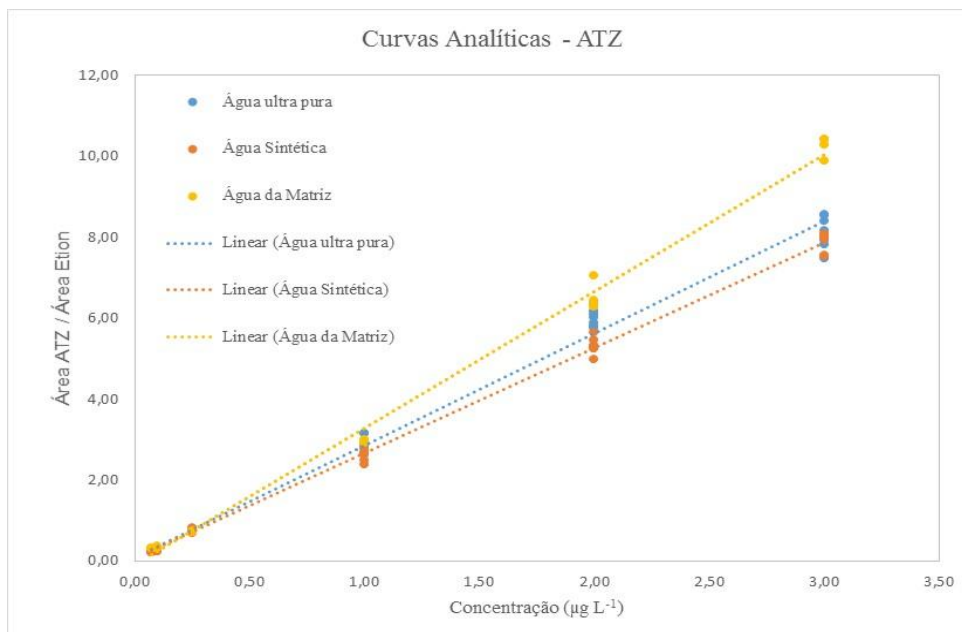


Figura 15. Estudo do efeito de matriz comparando-se a inclinação da curva analítica em quatro diferentes soluções aquosas fortificadas com ATZ a diferentes concentrações. A cor azul indica água ultra pura, a cor laranja indica água sintética e a cor amarela indica a água da matriz.

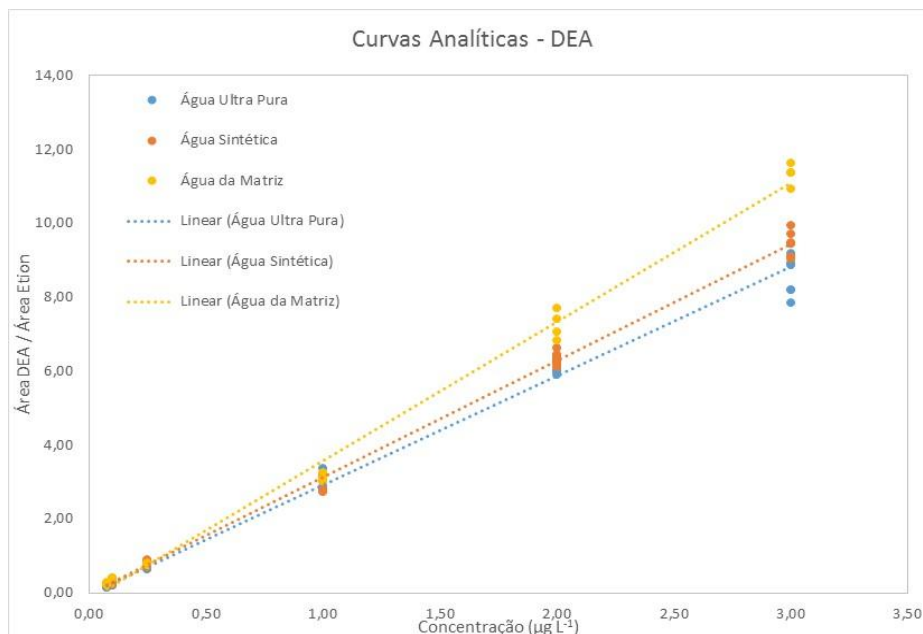


Figura 16. Estudo do efeito de matriz comparando-se a inclinação da curva analítica em quatro diferentes soluções aquosas fortificadas com DEA a diferentes concentrações. A cor azul indica água ultra pura, a cor laranja indica água sintética e a cor amarela indica a água da matriz.

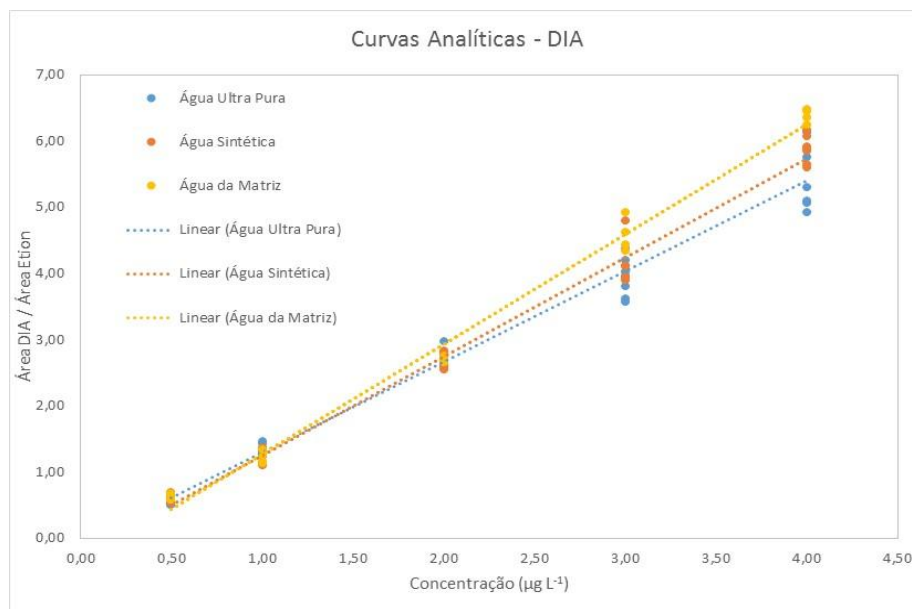


Figura 17. Estudo do efeito de matriz comparando-se a inclinação da curva analítica em quatro diferentes soluções aquosas fortificadas com DIA a diferentes concentrações. A cor azul indica água ultra pura, a cor laranja indica água sintética e a cor amarela indica a água da matriz.

A avaliação do efeito de matriz foi realizada utilizando os dados contidos na Tabela XI, para determinar o t_{calc} utilizando as equações 09 a 11, comparando água ultra pura com água sintética e água da matriz. Ao analisar os valores obtidos de t_{calc} (Apêndice VI) e comparados com os valores de t_{crit} , conclui-se, com um grau de confiança de 95%, que a H_0 é rejeitada e a H_1 é aceita. Portanto, há efeito de matriz na água de matriz em comparação com a água ultra pura e com a água sintética. Por essa razão, deve-se utilizar a curva construída na água da matriz para quantificar os analitos em estudo nas amostras aquosas reais que serão analisadas na sequência desse trabalho.

5.3.8 Robustez

A robustez de um método é a capacidade de não alterar o valor verdadeiro por pequenas variações nos parâmetros analíticos, sem alterar a precisão e exatidão. A avaliação da robustez foi realizada utilizando duas modificações na metodologia previamente estabelecida: a primeira consistiu na alteração do valor de pH (para o valor de pH igual a 6) da amostra durante a DLLME. A segunda modificação foi realizada mediante a utilização de uma nova coluna cromatográfica (TR-5MS) que apresentava as mesmas características de fase estacionária e dimensões de: comprimento, espessura da fase estacionária e diâmetro interno que a coluna usada anteriormente. Esses testes foram realizados em dois níveis de concentrações, preparados em água da matriz. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela XIX.

Tabela XIX. Valores do estudo da robustez para os analitos ATZ, DEA e DIA.

Extração com pH 6						
Analito	Nível 1 (n=3)			Nível 2 (n=3)		
	C _t (µg L ⁻¹)	C _p (µg L ⁻¹)	DPR (%)	C _t (µg L ⁻¹)	C _p (µg L ⁻¹)	DPR (%)
ATZ	0,100	0,1071	3,23	2,000	2,0001	3,41
DEA	0,100	0,1106	5,26	2,000	1,9452	0,68
DIA	1,000	1,1031	3,47	3,000	3,3869	2,04
Coluna cromatográfica nova						
Analito	Nível 1 (n=3)			Nível 2 (n=3)		
	C _t (µg L ⁻¹)	C _p (µg L ⁻¹)	DPR (%)	C _t (µg L ⁻¹)	C _p (µg L ⁻¹)	DPR (%)
ATZ	0,100	0,1039	3,72	2,000	1,9148	3,34
DEA	0,100	0,1121	3,59	2,000	1,9641	3,05
DIA	1,000	1,0809	4,27	3,000	3,3815	3,47
Coluna cromatográfica antiga						
Analito	Nível 1 (n=3)			Nível 2 (n=3)		
	C _t (µg L ⁻¹)	C _p (µg L ⁻¹)	DPR (%)	C _t (µg L ⁻¹)	C _p (µg L ⁻¹)	DPR (%)
ATZ	0,100	0,1058	1,82	2,000	1,8914	4,56
DEA	0,100	0,1069	3,07	2,000	1,9498	1,64
DIA	1,000	1,0717	2,32	3,000	3,2592	3,12

Onde: n: número de extrações; C_t: concentração teórica; C_p: concentração predita; DPR: desvio padrão relativo.

A avaliação da robustez foi realizada através da observação do DPR⁹⁷. Os valores de DPR aceitos para concentrações de até 10,0 µg L⁻¹ são de 21% e para concentrações até 1,0 µg L⁻¹ podem apresentar um DPR de até 30%. Assim, todos os valores de DPR obtidos nesse estudo estão dentro dessa faixa esperada e, portanto, indicam que o método é robusto.

5.3.9 Estabilidade

Um estudo de estabilidade foi realizado para avaliar o efeito do tempo na degradação dos analitos de interesse. As extrações foram realizadas em duplicata e os valores são apresentados na Tabela XX. Ao analisar os valores da Tabela XX, observa-se um decaimento de aproximadamente 20 % na concentração inicial de ATZ e 7% na concentração inicial de DEA na terceira semana do estudo. Para o analito DIA, observa-se o decaimento a partir da

quarta semana com o valor aproximado de 7 % em relação à concentração inicial. De acordo com a Diretiva da União Europeia 2002-657-CE⁹⁹, o estudo de estabilidade é encerrado quando se observa o primeiro fenômeno de degradação, não informando o valor ou porcentagem de decaimento que é aceitável. No presente estudo, verificou-se que, a partir da terceira semana (ATZ e DEA) e na quarta semana (DIA), ocorre a degradação dos analitos na matriz aquosa avaliada. Foi realizada a comparação da concentração inicial (valor de referencia), com as concentrações das respectivas semanas, utilizando teste t de Student, com um grau de confiança de 95%, para avaliar se o decaimento dessas concentrações eram significativas ou não. Com base nessa avaliação, foi concluído que as amostras são estáveis ($P < 0,5$) por pelo menos 2 meses. Assim, as amostras em estudo puderam ser armazenadas por pelo menos dois meses, sem sofrer qualquer alteração significativa nos resultados das análises para os analitos em estudo.

Tabela XX. Estudo da estabilidade dos analitos (ATZ, DEA e DIA) na matriz de água superficial da BP3.

Periodo	ATZ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	%	DEA ($\mu\text{g L}^{-1}$)	% *	DIA ($\mu\text{g L}^{-1}$)	% *
Semana 0	1,214 ^a	-	1,116 ^a	-	1,205 ^a	-
Semana 1	1,254 ^a	103,30	1,205 ^a	107,98	1,270 ^a	105,46
Semana 2	1,178 ^a	97,09	1,208 ^a	108,28	1,302 ^a	108,11
Semana 3	0,974 ^a	80,27	1,043 ^a	93,43	1,247 ^a	103,48
Semana 4 (mês 1)	1,107 ^a	91,24	1,036 ^a	92,81	1,131 ^a	93,89
Mês 2	1,103 ^a	90,88	1,007 ^a	90,24	0,988 ^a	82,02

Análises realizadas em duas repetições. Letras minúsculas iguais em uma mesma coluna indicam que não apresentam diferenças significativas entre as semanas ($P < 0,5$).

5.4 Avaliação de custo e da demanda temporal na etapa de extração dos analitos

Avaliação de custo e da demanda temporal foram realizadas através da comparação das três técnicas de extração estudadas e descritas nas seções anteriores. Para efeito de comparação, foram avaliados os valores gastos de materiais consumíveis, solventes e reagentes, para realizar a extração de uma amostra e também para um total de 30 amostras. Os materiais permanentes, como por exemplo, o *mainfold* para realizar a extração da SPE, as microseringas para realização da DLLME e o *holder* usado na SPME, não foram

contabilizados, pois são materiais que apresentam uma vida útil bastante elevada caso sejam utilizados com os devidos cuidados. Da mesma forma, os custos operacionais, as horas de trabalho do analista e a manutenção do equipamento (GC-MS), não foram considerados.

A Tabela XXI apresenta os respectivos valores em relação aos custos e demanda temporal para a realização da extração de uma única amostra e para a extração de 30 amostras. A tentativa de trabalhar com a análise de custos e demanda temporal para 30 amostras vem do fato de que se procurava, com a execução deste estudo, um processo que pudesse ser empregado como técnica de extração em análises de rotina.

Como se pode observar nos resultados, a SPE é a técnica que apresenta o custo mais elevado (de R\$ 54,11 por extração de cada amostra – uma réplica), em função do alto custo da aquisição do cartucho de extração. Além disso, apresenta uma elevada demanda temporal, de 170 minutos para realizar o procedimento de extração e de ressuspensão para a extração de uma amostra.

Para a SPME foi realizada uma estimativa de tempo de vida útil da fibra de PA, para 30 extrações. Dessa forma, essa técnica apresenta um valor de extração de R\$ 27,28 por amostra e o procedimento de extração necessita de um período de 72 minutos para ser executado.

Finalmente, a DLLME apresenta o valor de extração de R\$ 1,71 e uma demanda temporal de 20 minutos para cada amostra. Já para realizar a extração de 30 amostras são necessários 600 minutos e R\$ 51,14 de custos. É importante observar que a DLLME apresentou o menor custo e a menor demanda de tempo e que ambos os aspectos são fundamentais para uma técnica usada em análise de rotina. Por estes motivos a DLLME foi escolhida para realizar as extrações das amostras coletadas da BP3.

Tabela XXI. Comparação de custos e demanda temporal para a execução das técnicas de extração dos analitos atrazina, DIA e DEA.

Técnica de extração	Insumos utilizados	Valor dos insumos (a) R\$	Valor de cada um dos insumos para extração de uma amostra (b) R\$	Custo		Demanda Temporal			Tempo total para extração de 30 amostras (min)
				Valor total para extração de uma amostra (c) R\$	Valor total para extração de 30 amostras (d) R\$	Ajuste pH e Força iônica (min)	Execução da extração (min)	Ressuspensão (min)	
DLLME	Acetona HPLC/UV	30,00	0,0165	1,71	51,14	10	10	-	600
	Acetona PA *	12,50	0,1250						
	Diclorometano HPLC/UV	35,00	0,0057						
	Isopropanol PA *	14,00	0,1400						
	n-hexano HPLC/UV*	95,55	0,9500						
	Cloreto de Sódio PA	9,50	0,0450						
	Insert 300 µL	0,42	0,4200						
SPE	Metanol HPLC/UV	34,50	0,5175	54,11	1.623,30	-	110	60	1360
	DCM HPLC/UV	35,00	0,2625						
	Cartucho Oasis® HLB	53,33**							
SPME	Cloreto de Sódio	9,50	0,0119	27,28	818,46	10	72	-	2160
	Fibra SPME								
	Poliacrilato	27,27***							

(a) Valor dos insumos utilizados para análises em litros ou quilogramas; (b) Custos referentes aos insumos utilizados por extração; (c) Custo referente a extração de uma amostra; ****Custo referente a extração de 30 amostras; (e) Tempo necessário para realizar uma extração; *Solventes utilizados para limpeza da microseringa; ** Custo por cartucho de SPE; *** Valor estimado do tempo de vida útil da fibra de SPME.

5.5 Análise das amostras de água superficial da Bacia do Paraná 3

5.5.1 Primeira campanha de coleta

Na primeira campanha de coleta que ocorreu entre o período de 16 de janeiro de 2017 a 06 de março do mesmo ano (6 semanas), foram analisadas um total de 126 amostras de água superficial da BP3 de amostragem fixa, ou seja, coletadas semanalmente. Nesse mesmo período também foi realizada a coleta de amostras referentes aos eventos de precipitação que ocorreram na BP3, as quais totalizaram 89 amostras. As amostras foram extraídas por DLLME e analisadas por GC-MS. A Tabela XXII apresenta os resultados para ATZ, DEA e DIA obtidos nas coletas semanais. A Tabela XXIII mostra as concentrações dos analitos determinadas em amostras provenientes de precipitação pluviométrica acima de 10 mm. Foram indicados somente os resultados em que a presença dos analitos foi detectada e/ou quantificada.

Durante a primeira campanha (Tabela XXII), das 126 amostras, 13,50% delas, apresentaram a presença de ATZ em concentrações menores ao LQ ($0,15 \mu\text{g L}^{-1}$), e ainda, 3,17 % das amostras apresentaram ATZ em concentrações superiores ao LQ, mas estando em concentrações inferiores ao limite máximo permitido de $2,0 \mu\text{g L}^{-1}$ que é estabelecido na legislação brasileira vigente ⁸. Além disso, observa-se que a última semana de coleta (20 a 26 de fevereiro de 2017), foi o período que apresentou a maior frequência de detecção e quantificação. Essa maior frequência de detecção pode estar relacionada com o calendário agrícola do plantio do milho, que no estado do Paraná é realizado até o final da primeira quinzena de fevereiro. Assim, antes de proceder ao plantio do milho é necessário realizar a limpeza e manejo do solo ¹⁰³. Dentre as 21 microbacias, a PA16 apresentou ATZ abaixo do limite de quantificação ($0,15 \mu\text{g L}^{-1}$) em todas as 6 semanas de coleta. A microbacia PA13 apresentou a presença de ATZ a de $0,81 \mu\text{g L}^{-1}$, valor superior aos outros pontos, mas ainda inferior ao limite máximo estabelecido pela legislação brasileira ⁸.

Com relação ao DEA, o analito foi detectado em somente 3 microbacias, nos pontos PA15, PA17 e PA19, porém nas três situações a concentração desse analito foi inferior ao LQ do método ($0,50 \mu\text{g L}^{-1}$). Nas amostras de coleta fixa, o DIA não foi detectado. Cabe lembrar que os TPs da ATZ não são legislados.

Para as amostras coletadas provenientes dos eventos de precipitação, 27,00 % dessas apresentaram a detecção de ATZ, sendo que na microbacia PA17, a amostra

coletada no dia 22 de fevereiro (Tabela XXIII), apresentou a concentração de $2,89 \pm 0,17 \mu\text{g L}^{-1}$. A Figura 17 apresenta o cromatograma obtido para esta amostra. Nesse caso a concentração de ATZ determinada estava acima do limite máximo estabelecido pela normativa CONAMA 357/2005⁸. Além disso, nesse mesmo ponto identificou-se a presença de DEA e DIA em concentrações de $0,80 \pm 0,02 \mu\text{g L}^{-1}$ e $1,22 \pm 0,01 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. Ao analisar os dados obtidos, nessa microbacia, para a amostra de precipitação em relação aos valores determinados para água superficial (Tabela XXII) se observa que a detecção de ATZ e DEA, nitidamente, ocorreu no período de 20 a 26 de fevereiro de 2017. Isso poderia indicar que, provavelmente, foi realizada a aplicação do agrotóxico ATZ nas lavouras presentes nas áreas próximas ao ponto de amostragem e, com o evento de precipitação, ocorreu o escoamento superficial dos contaminantes para a microbacia em questão.

As demais amostras provenientes de evento de precipitação (PA09 e PA14) (Tabela XXIII) apresentaram uma concentração de $1,14 \pm 0,06 \mu\text{g L}^{-1}$ e $0,23 \pm 0,01 \mu\text{g L}^{-1}$ para ATZ, respectivamente. Já as amostras das microbacias PA01, PA02, PA06, PA07, PA09 PA11, PA13, PA14, PA16, PA17, PA18, PA19, PA21 e PA22 a ATZ foi detectada, porém esteve abaixo do limite de quantificação ($0,15 \mu\text{g L}^{-1}$) estabelecido para a metodologia. Para as demais amostras provenientes dos eventos de precipitação, não foram detectados a presença de nenhum dos contaminantes estudados. Essa relação de amostras pode ser vista no Apêndice VII.

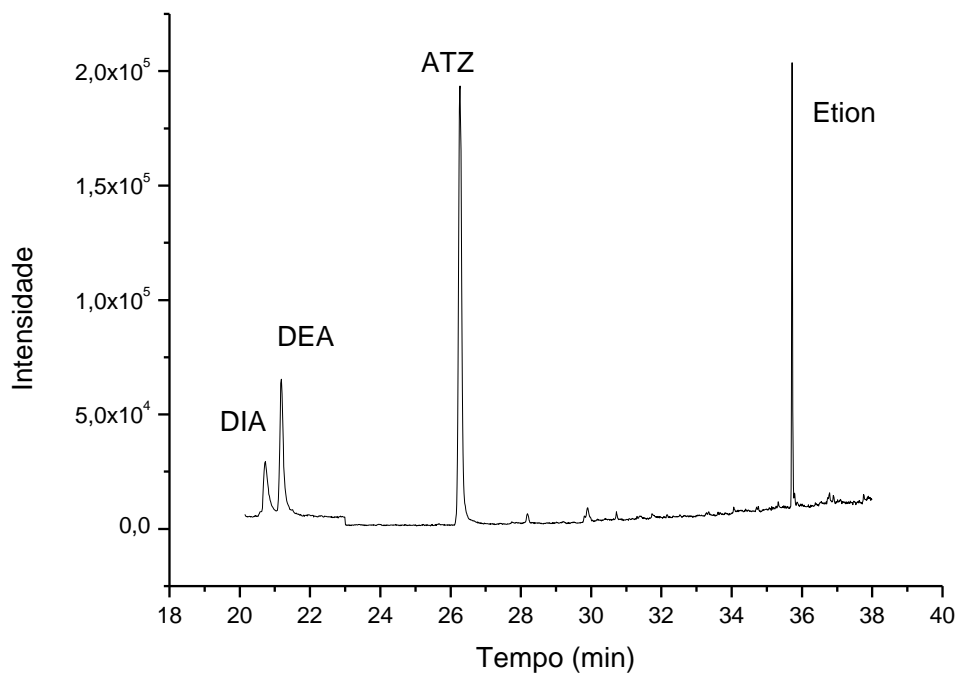


Figura 18. Cromatograma referente amostra do evento de precipitação do PA17 do dia 22/02/2017. Extração realizada em DLLME, 5 mL de amostra em concentração de $0,1 \text{ g mL}^{-1}$ de NaCl, $163 \text{ }\mu\text{L}$ de Diclorometano(solvente extrator) e $550 \text{ }\mu\text{L}$ de Acetona(solvente dispersor), em pH 7. ATZ em concentração de $2,89 \pm 0,17$, DEA $0,80 \pm 0,02$ e DIA $1,22 \pm 0,01 \text{ }\mu\text{g L}^{-1}$, o padrão interno (etion) em concentração de $2 \text{ }\mu\text{g L}^{-1}$.

Tabela XXII. Resultados de atrazina, DIA e DEA em amostras de águas superficiais na BP3 referentes ao primeiro período de coleta em 2017.

Micro- bacias	1ª Semana			2ª Semana			3ª Semana			4ª Semana			5ª Semana			6ª Semana		
	16 a 22 de janeiro			23 a 29 de janeiro			30 janeiro a 5 fevereiro			6 a 12 fevereiro			13 a 19 fevereiro			20 de fevereiro a 6 de março		
	ATZ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	DIA ($\mu\text{g L}^{-1}$)	DEA ($\mu\text{g L}^{-1}$)	ATZ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	DIA ($\mu\text{g L}^{-1}$)	DEA ($\mu\text{g L}^{-1}$)	ATZ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	DIA ($\mu\text{g L}^{-1}$)	DEA ($\mu\text{g L}^{-1}$)	ATZ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	DIA ($\mu\text{g L}^{-1}$)	DEA ($\mu\text{g L}^{-1}$)	ATZ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	DIA ($\mu\text{g L}^{-1}$)	DEA ($\mu\text{g L}^{-1}$)	ATZ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	DIA ($\mu\text{g L}^{-1}$)	DEA ($\mu\text{g L}^{-1}$)
PA01	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PA02	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PA03	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,61 ± 0,02	n.d.	n.d.
PA04	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PA05	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	< LQ	n.d.	n.d.
PA06	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PA07	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PA08	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PA09	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<LQ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PA11	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PA12	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PA13	< LQ	n.d.	n.d.	<LQ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<LQ	n.d.	n.d.	0,81 ± 0,08	n.d.	n.d.
PA14	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PA15	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,26 ± 0,03	n.d.	<LQ
PA16	< LQ	n.d.	n.d.	<LQ	n.d.	n.d.	< LQ	n.d.	n.d.	< LQ	n.d.	n.d.	<LQ	n.d.	n.d.	<LQ	n.d.	n.d.
PA17	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<LQ	n.d.	<LQ
PA18	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,46 ± 0,02	n.d.	n.d.
PA19	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<LQ	n.d.	<LQ
PA20	n.d.	n.d.	n.d.	<LQ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<LQ	n.d.	n.d.	<LQ	n.d.	n.d.
PA21	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<LQ	n.d.	n.d.
PA22	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Onde: n.d.: amostra onde o analito não foi detectado; <LQ.: analito detectado, porém o mesmo se encontra abaixo do LQ do método.

Tabela XXIII. Resultados de atrazina, DIA e DEA em amostras de águas superficiais na BP3 referentes aos eventos de precipitação durante o primeiro período de coleta em 2017.

Microbacia	Data de amostragem	ATZ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	DEA ($\mu\text{g L}^{-1}$)	DIA ($\mu\text{g L}^{-1}$)
PA01	31/jan	<LQ	n.d.	n.d.
PA02	11/fev	<LQ	n.d.	n.d.
PA06	31/jan	<LQ	n.d.	n.d.
PA07	11/fev	<LQ	n.d.	n.d.
PA09	25/jan.	<LQ	n.d.	n.d.
	31/jan.	$1,14 \pm 0,06$	n.d.	n.d.
	11/fev	<LQ	n.d.	n.d.
PA11	10/fev	<LQ	n.d.	n.d.
PA13	17/jan	<LQ	n.d.	n.d.
	25/jan	<LQ	n.d.	n.d.
	29/jan	<LQ	n.d.	n.d.
	05/fev	<LQ	n.d.	n.d.
	10/fev.	<LQ	n.d.	n.d.
	13/fev	<LQ	n.d.	n.d.
	22/fev.	<LQ	n.d.	n.d.
PA14	22/fev.	$0,23 \pm 0,01$	n.d.	n.d.
PA16	01/fev	<LQ	n.d.	n.d.
	02/fev	<LQ	n.d.	n.d.
	09/fev	<LQ	n.d.	n.d.
PA17	22/fev.	$2,89 \pm 0,16$	$0,80 \pm 0,02$	$1,22 \pm 0,01$
PA18	15/fev	<LQ	n.d.	n.d.
PA19	31/jan	<LQ	n.d.	n.d.
PA21	10/fev	<LQ	n.d.	n.d.
PA22	12/fev	<LQ	n.d.	n.d.

Onde: n.d.: amostra onde o analito não foi detectado; <LQ.: analito detectado, porém o mesmo se encontra abaixo do L

5.5.2 Segunda campanha de coleta

A segunda campanha de coleta, também definida em função do calendário agrícola, em especial pelo período de plantio da soja, foi realizada entre os dias 03 de setembro a 14 de outubro de 2017. Nesse período foi realizada a coleta de 124 amostras de água superficial em diferentes pontos da BP3. Além disso, foi realizada a coleta de 68 amostras de água superficial relacionadas com eventos de precipitação.

Ao observar os resultados das análises das amostras referentes ao período de 03 de setembro a 14 de outubro (Tabela XXIV), as amostras da primeira semana de coleta, período de 03 a 09 de setembro, foram as que apresentaram a maior frequência de ATZ, com exceção das microbacias PA22 que não foi detectada a presença de ATZ e a microbacia PA07 onde não foi realizada a coleta. Além disso, as microbacias PA01, PA03 e PA08 foram constatadas as concentrações de ATZ em 0,15, 0,18 e 0,15 $\mu\text{g L}^{-1}$ respectivamente. Essa alta frequência de detecção da ATZ (primeira semana de coleta) ocorre em função do período do vazio sanitário da soja (10 de junho a 10 de setembro), pois é ao final desse período que os agricultores realizam a etapa da limpeza do terreno, efetuando aplicação de agrotóxicos para o combate das ervas daninhas, tais como a ATZ; para depois, iniciar a semeadura da soja. Na segunda semana de coleta, a frequência de detecção de ATZ decaiu nas sete microbacias, PA03, PA04, PA06, PA12, PA13, PA16 e PA20. Já na terceira semana, nas microbacias PA08, PA11 e PA17 foram detectadas a presença de ATZ, e ainda, na microbacia PA14 foi constatada a presença de ATZ em concentração de 0,19 $\mu\text{g L}^{-1}$. Na quarta semana de coleta, nenhuma amostra apresentou a presença dos contaminantes. Na quinta semana foram detectadas as presenças de ATZ nas microbacias PA09, PA12, PA16, PA19 e PA22, todas abaixo do LQ. Na última semana de coleta, foi detectada a presença de ATZ nas microbacias PA12, PA20 e PA22. Desse modo, das 124 amostras coletadas, 30,6 % das amostras analisadas apresentaram ATZ. Para esse período de coleta nenhuma amostra apresentou contaminação de ATZ acima do limite máximo permitido na legislação ⁸.

A presença de DEA ocorreu somente na microbacia PA09 em concentração de 0,59 $\mu\text{g L}^{-1}$. O DIA não foi detectado em nenhuma amostra.

As amostras provenientes dos eventos de precipitação estão apresentadas na Tabela XXV, e a relação total das amostras analisadas, são apresentadas na Tabela XXVIII (Apêndice 7). Das 68 amostras coletadas, a presença de ATZ foi detectada em

20,60 % das amostras, sendo estas provenientes das microbacias PA06, PA07, PA13, PA16, PA17, PA18, PA19, PA20, PA21 e PA22. Os produtos de transformação da ATZ não foram detectados nas amostras analisadas para essa campanha.

Tabela XXIV. Resultados de atrazina, DIA e DEA em amostras de águas superficiais na BP3 referentes ao segundo período de coleta em 2017.

Micro bacias	1ª Semana 03 ao 09 de setembro			2ª Semana 10 ao 16 de setembro			3ª Semana 17 ao 23 de setembro			4ª Semana 24 ao 30 de setembro			5ª Semana 01 ao 07 de outubro			6ª Semana 08 ao 14 de outubro		
	ATZ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	DIA ($\mu\text{g L}^{-1}$)	DEA ($\mu\text{g L}^{-1}$)	ATZ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	DIA ($\mu\text{g L}^{-1}$)	DEA ($\mu\text{g L}^{-1}$)	ATZ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	DIA ($\mu\text{g L}^{-1}$)	DEA ($\mu\text{g L}^{-1}$)	ATZ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	DIA ($\mu\text{g L}^{-1}$)	DEA ($\mu\text{g L}^{-1}$)	ATZ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	DIA ($\mu\text{g L}^{-1}$)	DEA ($\mu\text{g L}^{-1}$)	ATZ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	DIA ($\mu\text{g L}^{-1}$)	DEA ($\mu\text{g L}^{-1}$)
PA01	0,15 ± 0,01	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PA02	<LQ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PA03	0,18 ±0,01	n.d.	n.d.	<LQ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PA04	<LQ	n.d.	n.d.	<LQ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PA05	<LQ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PA06	<LQ	n.d.	n.d.	<LQ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PA07	-	-	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PA08	0,15 ±0,01	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<LQ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PA09	<LQ	n.d.	0,59± 0,01	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<LQ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PA11	<LQ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<LQ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PA12	<LQ	n.d.	n.d.	<LQ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<LQ	n.d.	n.d.	<LQ	n.d.	n.d.
PA13	<LQ	n.d.	n.d.	<LQ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PA14	<LQ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,19 ± 0,01	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PA15	<LQ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PA16	<LQ	n.d.	n.d.	<LQ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<LQ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PA17	<LQ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<LQ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PA18	<LQ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PA19	<LQ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<LQ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PA20	<LQ	n.d.	n.d.	<LQ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<LQ	n.d.	n.d.
PA21	<LQ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-	-	-
PA22	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<LQ	n.d.	n.d.	<LQ	n.d.	n.d.

n.d.: amostra não detectado; <LQ.: Analito detectado, mas não possível realizar a quantificação.

Tabela XXV. Resultados de atrazina, DIA e DEA em amostras de águas superficiais na BP3 referentes aos eventos de precipitação durante o segundo período de coleta em 2017.

Microbacia	Data de amostragem	ATZ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	DEA ($\mu\text{g L}^{-1}$)	DIA ($\mu\text{g L}^{-1}$)
PA06	07/out	<LQ	n.d.	n.d.
PA07	08/out	<LQ	n.d.	n.d.
	09/out	<LQ	n.d.	n.d.
PA13	08/out	<LQ	n.d.	n.d.
PA16	09/out	<LQ	n.d.	n.d.
PA17	02/out	<LQ	n.d.	n.d.
PA18	30/set	<LQ	n.d.	n.d.
	29/set	<LQ	n.d.	n.d.
PA19	08/out	<LQ	n.d.	n.d.
	30/set	<LQ	n.d.	n.d.
PA20	08/out	<LQ	n.d.	n.d.
	25/set	<LQ	n.d.	n.d.
PA21	02/out	<LQ	n.d.	n.d.
	02/out	<LQ	n.d.	n.d.
PA22	02/out	<LQ	n.d.	n.d.

Onde: n.d.: amostra onde o analito não foi detectado; <LQ.: analito detectado, porém o mesmo se encontra abaixo do L

5.5.3 Mapa do estudo da presença de micropoluentes na BP3

A partir dos resultados das análises das amostras da primeira e segunda campanhas de amostragem do ano de 2017, foi confeccionado o mapa da presença dos micropoluentes estudados. A Figura 19 apresenta esse mapa, no qual pode-se observar, em todas as microbacias em estudo, a ocorrência dos micropoluentes avaliados no presente trabalho. Também se verifica que somente uma microbacia (PA17) apresentou a presença de ATZ acima do limite máximo permitido na legislação ⁸.

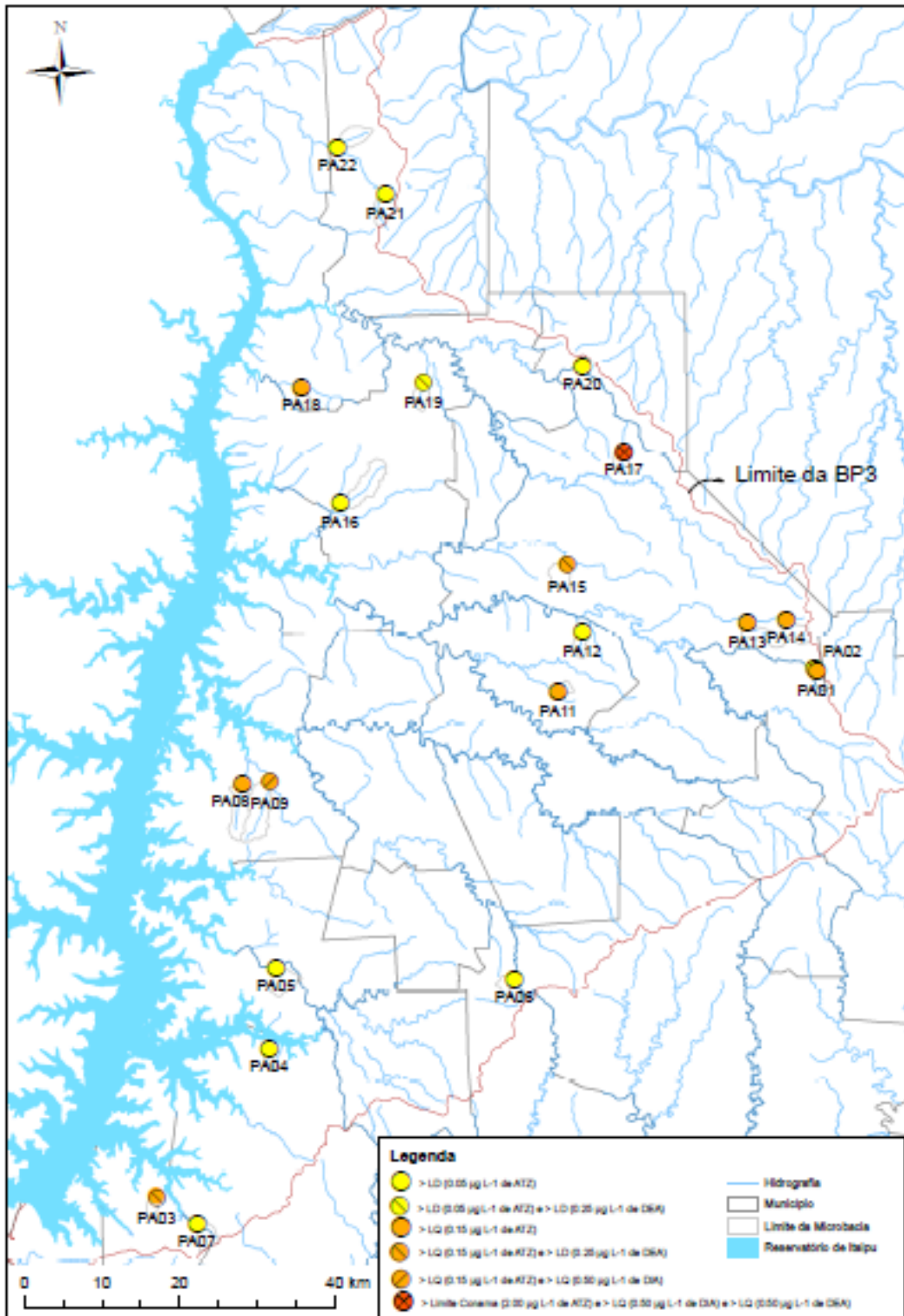


Figura 19. Mapa da presença de microcontaminantes na BP3.

6 CONCLUSÕES

O presente trabalho estabeleceu uma metodologia analítica para detecção e quantificação de ATZ, DEA e DIA em amostras de água superficial.

Aplicação do planejamento Dohler se mostrou uma ferramenta excelente para otimização da técnica de extração DLLME. A melhor condição encontrada foi utilizando 163,0 μL de SE, 550,0 μL de SD e 0,10 g mL^{-1} de NaCl. Além disso, o planejamento foi validado pela análise de variância, no qual o que a regressão foi significativa e a falta de ajuste foi não significativo. A identificação e quantificação dos analitos foi realizado utilizando GC-MS em modo *SIM*.

Os métodos de extrações, DLLME, SPME e SPE foram comparados para determinar qual é a técnica que apresenta o menor custo de extração e baixa demanda temporal, visando adaptar a técnica para análises de rotina. A DLLME mostrou que é uma técnica de baixo custo e com uma demanda temporal relativamente baixa para execução de 30 extrações.

Ao realizar o balanço final das 217 amostras analisadas no primeiro período de coleta, 20,93 % das amostras apresentaram ATZ, além disso, somente uma amostra apresentou a presença de ATZ acima do permitido pela legislação brasileira ⁸, sendo esta amostra proveniente de evento de precipitação. Apesar desse valor, somente 26,97 % das amostras oriundas de eventos de precipitação deram positivo para ATZ. Para as amostras provenientes da amostragem fixa, nenhuma apresentou concentração de ATZ acima da legislação. Para os produtos de transformação da ATZ, somente 2% de todas as amostras analisadas nesse período, apresentaram a presença do DEA. Além disso, para o DIA, somente uma microbacia apresentou a presença desse analito.

No segundo período de coleta foram detectados aproximadamente 27,08 % de ATZ nas 192 amostras analisadas e nenhuma amostra apresentou concentração acima do permitido pela legislação brasileira ⁸. O DEA foi detectado e quantificado somente em uma microbacia. Já o DIA não foi detectado em nenhuma amostra avaliada.

A DLLME mostrou-se um método de preparo de amostra adequado, permitindo a análise de 407 amostras de forma rápida e eficiente, podendo ser facilmente adaptada e aplicada na análise de rotina de laboratório para determinação de ATZ e seus TPs.

Finalmente, com os resultados obtidos nesse trabalho, um mapa da presença dos analitos em estudo foi estabelecido para a BP3, indicando a necessidade de avaliação dos outros compartimentos, tais como águas subterrâneas, visto o alto potencial de lixiviação deste herbicida e de seus TPs.

REFERÊNCIAS

1. Ribeiro, D. C. A. Problemas Ambientais Causados por Agrotóxicos: Uma Proposta de Formação de Professores de Química Viabilizando a Metodologia da Resolução de Problemas. Dissertação de Mestrado, 2016. UFRGS, Porto Alegre.
2. Londres, F. Agrotóxicos no Brasil: um guia para ação em defesa da vida. – Rio de Janeiro: AS-PTA – Assessoria e Serviços a Projetos em Agricultura Alternativa. 2011, 190 p.
3. IPARDES, Governo do Estado do Paraná. Indicadores de desenvolvimento sustentável por bacias hidrográficas do Estado do Paraná. Paraná. 2013, 245 p.
4. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria nº 36, de 19 de janeiro de 1990.
5. _____. Ministério da Saúde. Portaria n.º 1469, de 29 de dezembro de 2000
6. _____. Ministério da Saúde Portaria nº 518, de 25 de março de 2004.
7. _____. Ministério da Saúde. Portaria 2914 de 12 de dezembro de 2011.
8. _____. Ministério do Meio Ambiente, Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). Resolução N° 357/2005.
9. Barbosa, D. B. P. Degradação de atrazina em solo sob plantio direto aplicada em formulações de liberação controlada, 2013. Tese de doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
10. Bortuluzzi, E., Rheinheimer, D. S., Gonçalves, C. S., Pellegrini, J. B. R., Maroneze, A. M., Kurz, M. H. S., Bacar, N. M., Zanella, R. *Química Nova*. **2007**, 30 (8), 1872.
11. Nogueira, E. N., Dores, E. F. G. C., Pinto, A. A., Amorim, R. S. S., Ribeiro, M. L., Lourencetti, C.. *Journal of the Brazilian Chemical Society*.**2012**, 23 (8), 1476-1487.
12. Sousa, A. S.; Duavi, W. C.; Calvacante, R. M.; Milhome, M. A.; Nascimento, R. F. *Bull Environ Contam Toxicol*. **2015**, 016, 96:90–95.

13. Masiá, A.; Ibáñez, M.; Blasco, C.; Sancho, J.V.; . Picó, Y.; Hernández, F. *Analytica Chimica Acta*. **2013**, 761, 117– 127.
14. Hurtado-Sánchez, M. C.; Romero-González, R.; Rodríguez-Cáceres, M.I.; Durán-Merás, I.; Garrido Frenichb.. *Journal of Chromatography A*. **2013**, 1305, 193.
15. Brauns, B.; Jakobsen, R.; Song, X.; Bjerg, P. *Science of The Total Environment*. **2018**, 1307-1316.
16. Pitarch, E.; Cervera, M. I.; Portolés, T.; Ibáñez, M.; Barreda, M.; Renau-Pruñonosa, A.; Morell, I.; López, F.; Albarrán, F.; Hernández, F.. *Science of the Total Environment*. **2016**, 548–549,211–220.
17. Vryzas, Z.; Vassiliou, G.; Alexoudis,C.; Papadopoulou-Mourkidou, E. *Water research*. **2009**, 43, 1–1 0.
18. Brandhonneur, N.; Mendes, M. S.; Lepvrier, E.; Esseiva, E. F.; Chevanne, F.;Corre, P. L. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*.**2015**, 104, 90–96.
19. Aguilar, C.; Ferrer, I.; Borrull, F.; Marcé, R.M.; Barceló, D. *Analytica Chimica, Acta*. **1999**, 386, 237.
20. D'Archivio , A. A.; Fanelli, M.; Mazzeo, P.; Ruggieri, F. *Talanta*. **2007**, 71, 25.
21. Min, G.; Wang, S.; Zhu, H.; Fang, G.; Zhang, Y. *Science of the Total Environment*. **2008**, 396, 78
22. Nevado, J. J. B; Guiberteau-Cabanillas, C.; Llerena, M. J. V.; Rodríguez-Robledo, V. *Journal of Chromatography & Separation Techniques*. **2014**, 5, 2.
23. Ferrari, R.; Nilsson, T.; Arena, R.; Arlatia, R.; Bartolucci, G.; Basla, R.; Cioni, F.; Carlo, G. D; Dellavedora, P.; Fattore, E.; Fungi, M.; Grote, C.; Guidotti, M.; Morgillo, S.; Muller, L.; Voltante. *Journal of Chromatography A*. **1998**, 795 , 371.
24. Hu, R.; Elia, D.; Berthion, J.M.; Poliak, S.. *Chromatographia*. **2001**, 53, 306.

25. Lambropoulou, D. A.; Sakkas, A.; Hela, D. G.; Albanisa, T. A.. *Journal of Chromatography A*. **2002**, 963, 107.
26. Nagaraju, D.; Huang, S. *Journal of Chromatography A*. **2007**, 1161, 89.
27. Zhou, Q. X.; Pang, L. ; Xie, G. H.; Xiao, J.; Bai, H. *Analytical Sciences January*. **2009**, 25, 73
28. Gavrilesco, M. *Engineering in Life Sciences*. **2005**, 5, 6.
29. Borsoi, A., Santos, P. R. R., Taffarel, L. E., Júnior, A. C. G. *Acta Iguazu*. **2014**, 3 (1), 86-100.
30. Agência Brasil. Acessado em 09/08/2017; Disponível em: <http://agenciabrasil.ebc.com.br/internacional/noticia/2017-03/especialistas-da-onu-recomendam-banir-o-uso-de-pesticidas-na>
31. Oliveira Jr, R. S.; Constantin, J; Inoue, M. H.(2011) *Biologia e Manejo de Plantas Daninhas*. Curitiba, PR: Omnipax, 348 p.
32. Austrália. Acessado em: 28 de Janeiro 2016. Disponível em:<<http://apvma.gov.au/node/12371>>
33. Wu, M.; Quirindongo, M.; Sass, J.; Wetzler, A. Acessado em 28 de janeiro de 2018. Disponível em:<<http://www.nrdc.org/health/atrazine/files/atrazine10.pdf>>.
34. Stoker, T. E.; Guidici, D. L.; Laws, S. C.; Cooper, R. L. *Toxicological Sciences*, **2002**, 67, 198.
35. Bonansea, R. I.; Amé, M. V.; Wunderlin, D. A. *Chemosphere*. **2013**, 90, 1860.
36. Gerónimo, E.; Aparicio, V.C.; Bárbaro, S.; Portocarrero. R.; Jaime, S.; Costa, J. L. *Chemosphere*. **2014**, 107, 423–431.
37. Milhome, M. A. L., Sousa, P. L. R., Lima, F. A. F., Nascimento, R. F. *International Journal of Environmental Research*. **2015**, 9 (1), 255.

38. Machado, C. S.; Alves, R. I. S.; Fregonesi, B. M.; Tonani, K. A. A.; Martinis, B. S.; Sierra, J.; Nadal, M.; Domingo, J. L.; Segura-Muñoz, S. *Procedia Engineering*. **2016**, 162, 230 – 237.
39. Machado, K. C.; Grassi, M. T.; Vidal, C.; Pescara, I. C.; Jardim, W. F.; Fernandes, A. N.; Sodr , F. F.; Almeida, F. V.; Santana, J. S.; Canela, C. M.; Nunes, C. R. O.; Bichinho, K. M.; Severo, F. J. R. *Science of the Total Environment*. **2016**, 572, 138–146.
40. Ma, W. T.; Cai, Z.; Jiang, G. B. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. **2003**, 17, 2707.
41. K ck-Schulmeyer, M.; Ginebreda, A.; Postigo, C.; Garrido, T.; Fraile, J.; Alda, M. L.; Barceló, D. *Science of the Total Environment*. **2014**, 470-471, 1087–1098.
42. Jiang, H., Adam, C. D., Koffsky, W. *Journal of Chromatography A*. **2005**, 1064, 219.
43. Rocha, C.; Pappas, E. A.; Huang, C. *Environmental Pollution*. **2008**, 152, 239.
44. Tagert, M. L. M.; Joseph H. Massey, H. J.; Shaw, D. R. *Science of the Total Environment*. **2014**, 481, 564–573.
45. Elliott, S. M.; VanderMeulen, D. D. *Science of the Total Environment*. **2017**, 579, 1726–1735.
46. Sauret-Szczepanski, N., Mirabel, P., Wortham, H. *Environmental Pollution*. **2006**, 139, 133.
47. Cerejeira, M. J., Viana, P., Batista, S., Pereira, T., Silva, E., Valério, M. J., Silva, A., Ferreira, M., Silva-Fernandes, A. M. *Water Research*. **2003**, 37, 1055.
48. UE. Diretiva (2008/105/CEE): DO PARLAMENTO EUROPEU E DO CONSELHO de 16 de Dezembro de 2008.
49. Mudhoo, A.; Garg, V. K. *Pedosphere*. **2010**, 21 (1), 11.
50. Pinto, M.I. Sontag, G. Bernardino, R.J. Noronha. J.P. *Microchemical Journal*. **2010**, 96 (2), 225.

51. Rezaee, M., Assadi, Y., Hosseini, M. M., Aghaee, E., Ahmadi, F., Berijani, S. *Journal of Chromatography A*. **2006** 1116, 1.
52. Giger, W. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **2009**, 393, 37.
53. Silva, C. G. A. da e Collins, C. H. *Química Nova*. **2011** 34 (4), 665.
54. Bernardi, G.; Kemmerich, M.; Ribeiro, L. C.; Adaime, M. B.; Zanella, R.; Prestes, O. D. *Talanta*. **2016**, 161, 40–47.
55. Lozowicka, B.; Ilyasova, G.; Kaczynski, P.; Jankowska, M.; Rutkowska, E.; Hryenko, I.; a, Patrycja Mojsak, P.; Szabunko, J. *Talanta*. **2016**, 151, 51–61.
56. Vázquez, P. P.; Lozano, A.; Uclés, S.; Ramos, M. M. G.; Fernández-Alba, A. R. *Journal of Chromatography A*. **2015**, 1426, 161–173.
57. Robles-Molina, J.; Gilbert-López, B.; García-Reyes, J. F.; Molina-Díaz, A. *Science of the Total Environment*. **2014** 479–480, 247–257.
58. Arthur, C., Pawliszyn, J. *Analytical Chemistry*. **1990**, 62, 2145.
59. Płotka-Wasyłka, J., Szczepanska, N., Guardia, M. *Trends in Analytical Chemistry*. **2015**, 73, 19
60. Toxicologia Analítica. Acessado em 28/01/2018. Disponível em: <http://toxicologiaufsj.blogspot.com.br/2011/08/normal-0-21-false-false-false.html>.
61. Prosen, H., Zupančič-Kralj, L. *Trends in analytical chemistry*. **1999**, 18 (4), 236.
62. Caldas, S. S.; Gonçalves, F. F.; Primel, E. G. *Química Nova*. **2011**, 34 (9), 1604.
63. Macherey-Nagel. Acessdo em: 28/01/2018. Disponível em : <<http://www.mn-net.com/tabid/11444/default.aspx> Acessado em 28/01/2018>.,
64. US EPA. Acessdo em: 28/01/2018. Disponível em :< https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-10/documents/method_1694_2007.pdf >.

65. Andrade-Eiroa, A., Canle, M., Leroy-Cancellieri, V., Cerda, V. *Trends in Analytical Chemistry*. **2016**, 80, 641–654.
66. Jardim, I. C. S. F. *Scientia Chromatographica*. **2010**, 2 (1), 13.
67. Hildebrandt, A.; Guillamón, M.; Lacorte, S.; Tauler, R.; Barceló, D. *Water Research*. **2008**, 42, 3315 – 3326.
68. Gervais, G.; Brosillion, S.; Laplace, A.; Helen, C. *Journal of Chromatography A*. **2008**, 1202, 163–172.
69. Silva, D. S. HPAs em águas superficiais e efluente hospitalar: degradação por PAOs e desenvolvimento de métodos para determinação e identificação de subprodutos, 2016. Tese de Doutorado. UFSM, Santa Maria.
70. Xiao-Huan, Z.; Qui-Hua, W.; Mei-Yue, Z.; Guo-Hong, X.; Zhi, W. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*. **2009**, 37 (2), 161.
71. Huo, X.; Li, Q.; Lin, X.; Chen, X.; Bi, K. *Chromatographia*. **2011**, 73, 313.
72. Kocúrová, L.; Balogh, I. S.; Sandrejová, J.; Andrush, V. *Microchemical Journal*. **2012**, 102, 11.
73. Saraji, M.; Boroujeni, M. K. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **2014**, 406, 2027.
74. Leong, M; Huang, S. *Journal of Chromatography A*. **2008**, 1211, 8.
75. Sanagi, W. M., Abbas, H. H., Ibrahim, W. A., Aboul-Enien, H. Y. *Food Chemistry*. **2012**, 133, 557.
76. Ruschel, C. F. C.; Ferrão, M. F.; Santos, F. P.; Samios, D. *Química Nova*. **2012**, 39 (3), 267-272.
77. Ferreira, S. L.C; Santos, W. N. L.; Quintella, C. M.; Neto, B.B.; Bosque-Sendra, J. M. *Talanta*. **2004**, 63, 1061–1067.
78. Teófilo, R. F.; Ferreira, M.M.C. *Química Nova*. **2006**, 29 (2), 338-350.

79. Ruschel, C. F. C. Aplicação de ferramentas quimiométricas e técnicas espectroscópicas na análise de combustíveis, 2017. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
80. Silveira, T. M.; Alves, R. D.; Queiroz, M. E. L. R.; Neves, A. A.; Coutrim, M. X.; Afonso, R. J. C. F.; Silva, G. A. *Water Air Soil Pollut.* **2016**, 227: 335
81. Bartolomé, L. Etxebarria, J. L. N.; Zuloaga, O.; Jonsson, J. A. *Journal of Separation Science.* **2007**, 30, 2144–2152.
82. Collins, C. H; Braga, G. L.; Bonato, P. S; Org. Fundamentos de Cromatografia. Editora da Unicamp. 2010, Campinas-SP.
83. Albanis, T.A.; Hela, D.G.; Sakellarides, T.M.; Konstantinou, I.K. (1998). *Journal of Chromatography A.* **1998**, 823, 59.
84. Poole, C. F. Gas Chromatography. Elsevier, 1 ED, 2012.
85. Agilente. Acessado em 18/12/2017. Disponível em : <<https://www.agilent.com/cs/library/catalogs/public/5991-5213PTBR.pdf>>
86. Grob, R. L; Barry, E. F. Modern Practice of Gas Chromatography. 4 ED, 2004
87. Cherta, L.; Beltran, J.; Portoles, T.; Hernandez, F. *Analytical and Bioanalytical Chemistry.* **2012**, 402, 2301.
88. Guimarães, R. C. “Capítulo 2 – Bacia Hidrográfica”, in Shaidian, S., Guimarães, C. R. e Rodrigues, C. M. 2012, Hidrologia Agrícola. Universidade de Évora.
89. ITAIPU BINACIONAL. Divisão de Geoprocessamento, Classificação supervisionada de imagem Landsat OLI 8 em outubro de 2014.
90. ADAPAR. Acessado em 15/11/2017; Disponível em: <http://www.adapar.pr.gov.br/modules/noticias/article.php?storyid=414&tit=Adapar-estabelece-novo-periodo-de-vazio-sanitario-e-mantem-data-limite-para-semeadura-da-soja>.

91. US, EPA. Acessado em: 03/01/2018, Disponível em: https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-08/documents/acute-freshwater-and-marine-wet-manual_2002.pdf.
92. Tompkins, B. A.; Ilgner, R. H. *Journal of Chromatography A*. **2002**, 972, 183–194.
93. Ligiero, C. B. P.; Reis, L. A.; Parrilha, G. L.; Filho, M. B.; e Canela, M. C. *Química Nova*. **2009**, 32,(5), 1338-1341.
94. Piri-Moghadam, H.; Gionfriddo, E.; Rodriguez-Lafuente, A.; Grandy, J. J.; Lord, H. L.; Obal, T.; Pawliszyn, J. *Analytica Chimica Acta*. **2017**, 964, 74-84.
95. González, J. L.; Pell, A.; López-Mesas, M.; Valiente, M. *Science of the Total Environment*. **2017**, 603–604, 109–117.
96. Ribeiro, F. A. L.; Ferreira, M. M. C.; Morano, S. C.; Silva, L. R. S.; Schneide, R. P. *Química Nova*. **2008**, 31 (1), 164-171.
97. INMETRO. DOQ-CGCRE-008, revisão 05, agosto 2016.
98. Ribani, M.; Bottoli, C. B. G.; Collins, C. H.; Jardim, I. C. S. F.; Melo, L. F. C. *Química Nova*. **2004**, 27 (5), 771-780.
99. UE. Diretiva (2002/657/CE): Decisão da Comissão, de 12 de Agosto de 2002. Acessado em 18/12/2017. Disponível em: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32002D0657&from=EN>.
100. Batista, A. D. Fibras para SPME (Microextração em Fase Sólida) recobertas com sílica modificadas por grupos vinila, 2010. Dissertação de Mestrado, UNICAMP.
101. Chen, P.S. Haung, W.Y.; Huang, S.D. *Journal of Chromatography B*. **2014**, 955–956, 116–123.
102. Alcantra, G. K. S. Avaliação da microextração líquido-líquido dispersiva para determinação do levetiracetam e da risperidona por técnicas cromatográficas

acopladas a espectrometria de massas, 2016. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

103. Cruz, J. C. ; Filho, I. A. P.; Duarte, A. P. Milho Safrinha. Acessado em: 15/11/2017. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/milho/arvore/CONT000fya0krse02wx5ok0pvo4k3mp7ztkf.html>
104. Odiário. Maringá. Acessado em 15/01/2018; Disponível em: <http://maringa.odiario.com/parana/2017/09/estiagem-aumenta-risco-de-chuva-acida-no-parana-alerta-defesa-civil/2417592/>.
105. Nist. Acessado em 22/12/2017. Disponível em: <http://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C1912249&Units=SI&Mask=200#Mass-Spec>.
106. _____. Acessado em 22/12/2017. Disponível em: <http://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C6190654&Units=SI&Mask=200#Mass-Spec>.
107. _____. Acessado em 22/12/2017. Disponível em: <http://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C1007289&Units=SI&Mask=200#Mass-Spec>.
108. _____. Acessado em 22/12/2017. Disponível em: <http://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C563122&Units=SI&Mask=200#Mass-Spec>.

Apêndices

Apêndice I

Ficha de amostragem dos agricultores.



FICHA DE CAMPO AMOSTRADORES

Nome do rio / microbacia:	Amostrador:
Município:	Gestor:
Telefone para contato:	Observação Geral:

DATA DA COLETA	HORA DA COLETA	CHUVA NOS ÚLTIMOS 2 DIAS: Sim/Não	CHUVA NA HORA DA COLETA: Sim/Não	OBS GERAL

EM CASO DE DÚVIDA LIGUE PARA:

- Bióloga Simone: (45) 3520-6954
- Bióloga Jussara: (45) 3520-6518

Apêndice II

Espectro de massas dos compostos estudados nesse trabalho apresentados pelas figuras 20 a 23.

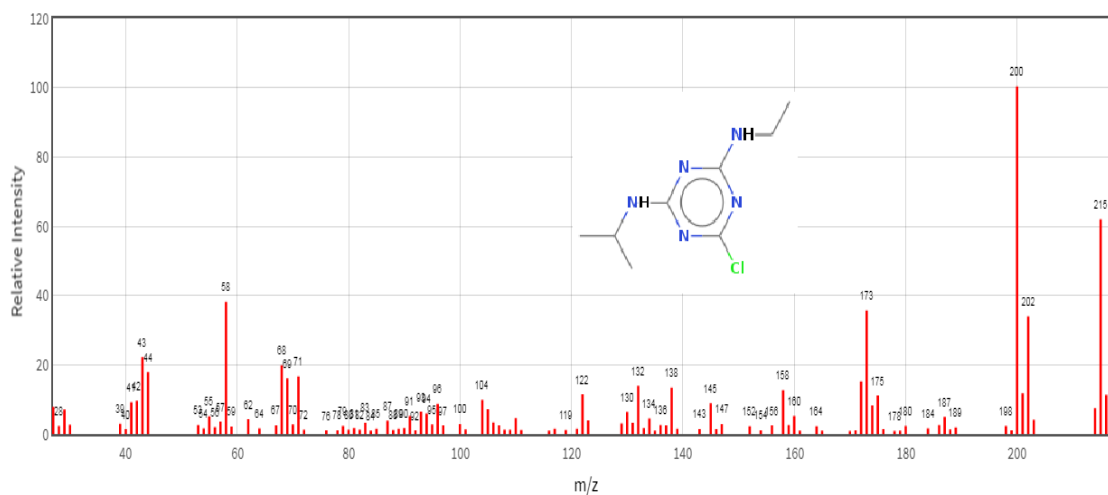


Figura 20. Espectro de massas da ATZ. [Adaptado de NIST] ¹⁰⁵.

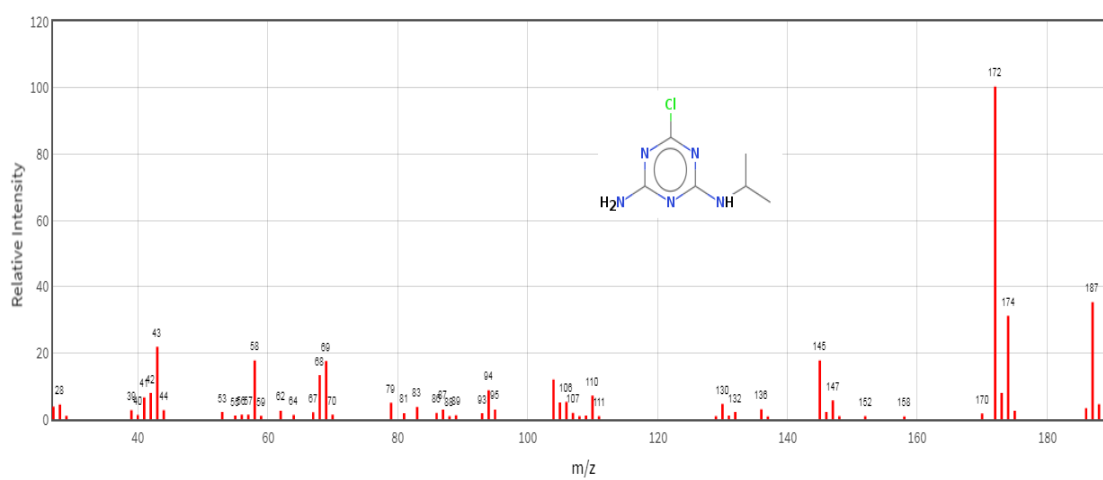


Figura 21. Espectro de massas do DEA. [Adaptado de NIST] ¹⁰⁶.

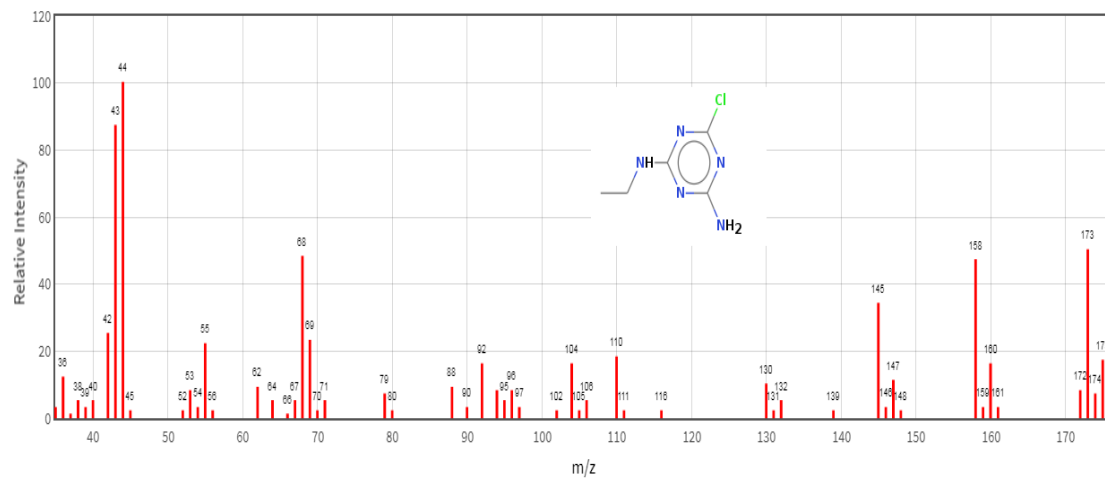


Figura 22. Espectro de massas do DIA. [Adaptado de NIST] ¹⁰⁷.

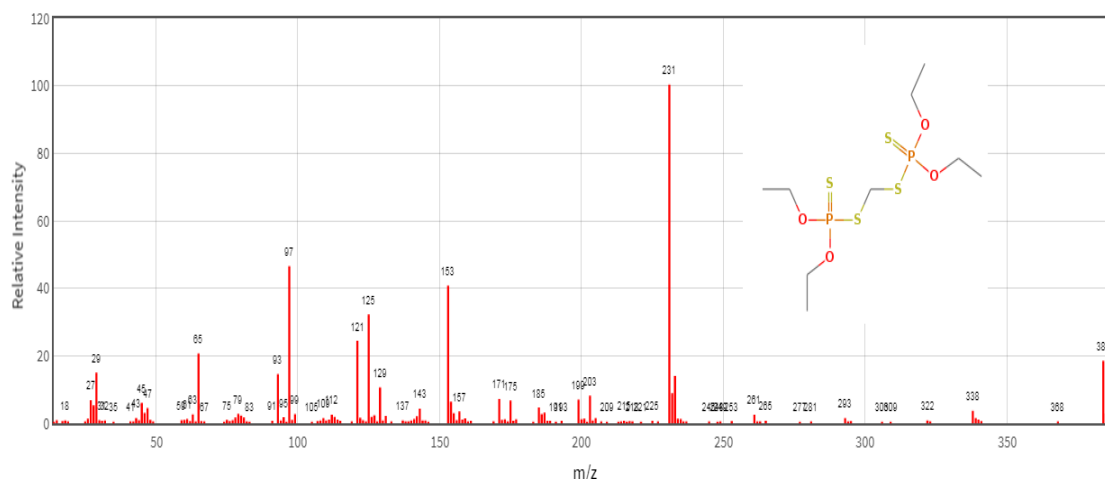


Figura 23. Espectro de massas do Etion. [Adaptado de NIST] ¹⁰⁸.

Apêndice III

Planejamento Doehlert de modelo quadrático de três variáveis utilizando as planilhas de Teófilo e Ferreira (2006). As figuras 24 ao 27 são apresentas os resultados do planejamento na integra para ATZ. O mesmo vale para a DEA nas figuras 28 a 31 e o DIA nas figuras 32 a 35.

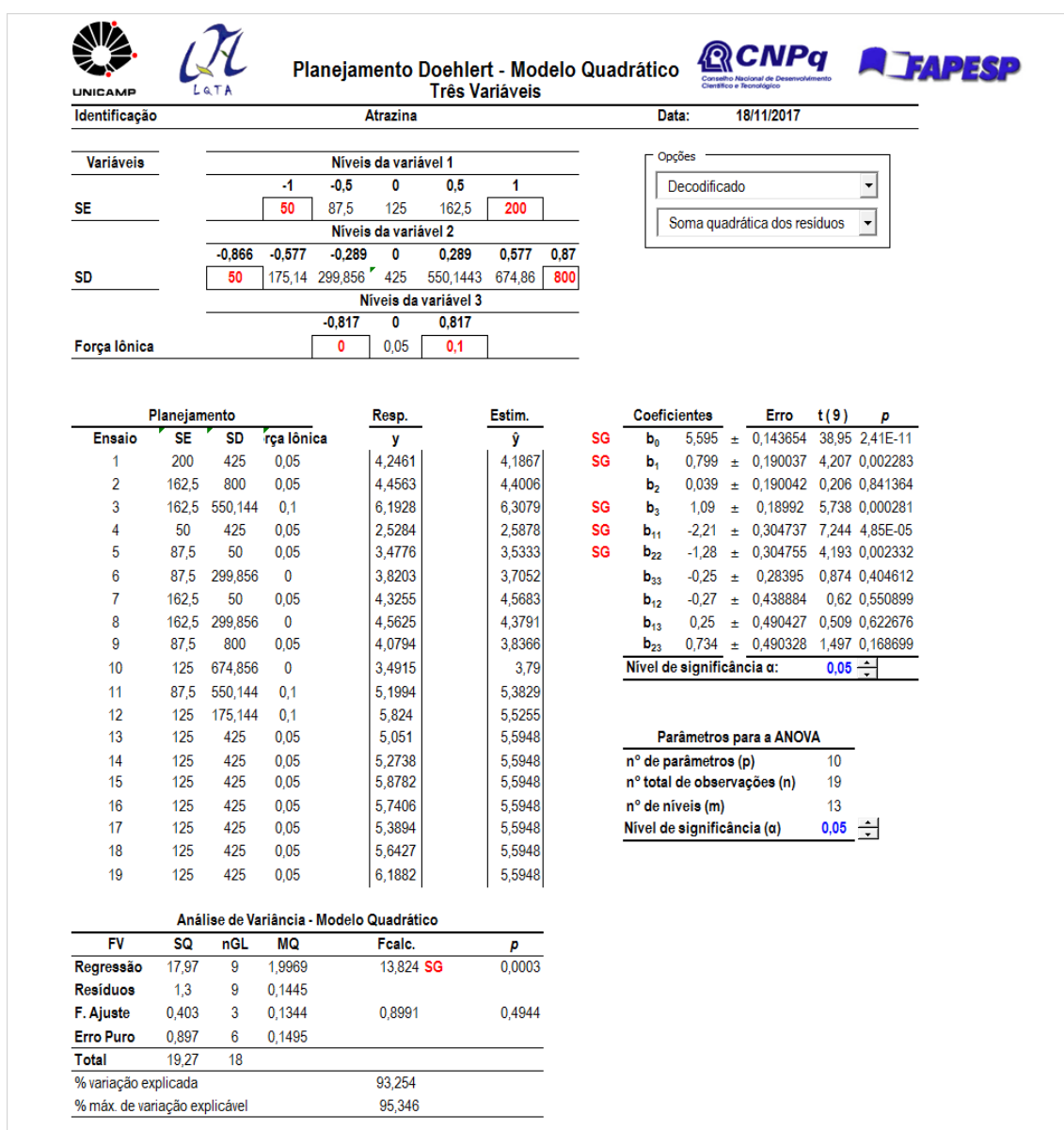


Figura 24. Planilha referente ao planejamento Doehlert de modelo quadrático para Atrazina.

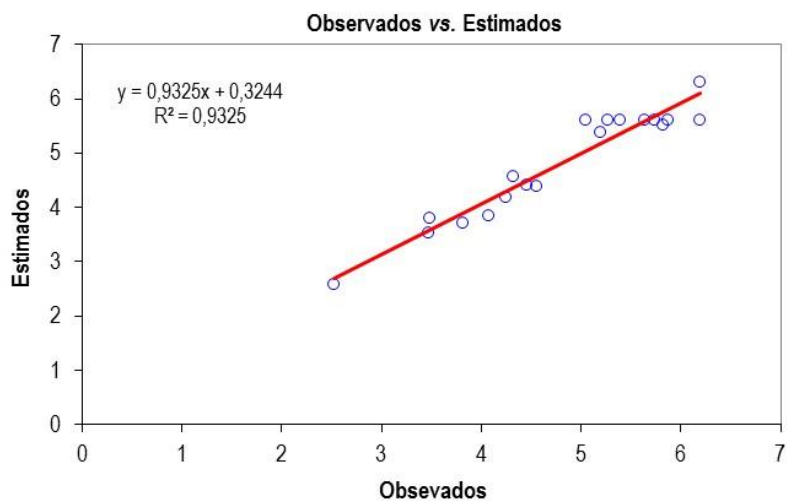


Figura 25. Gráfico da regressão dos valores estimados pelos valores observados do modelo quadrático para ATZ.

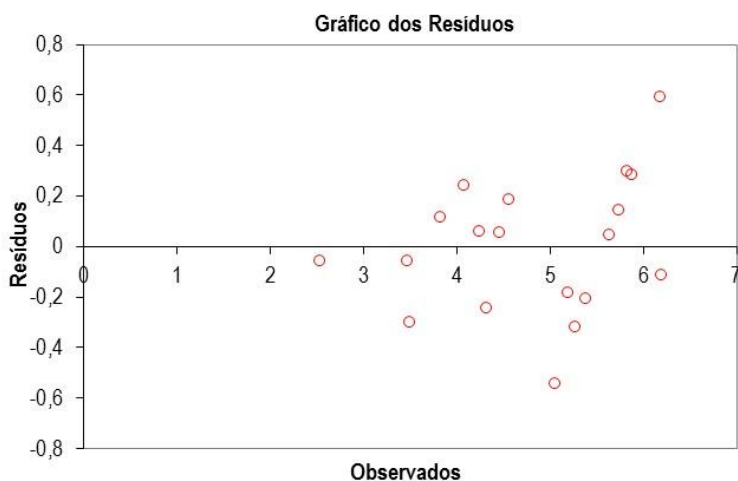


Figura 26. Gráfico da distribuição dos resíduos do modelo quadrático para ATZ.

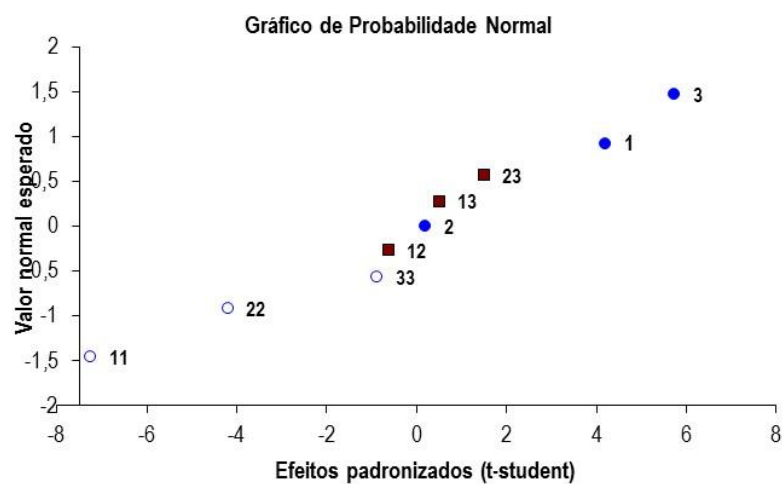


Figura 27. Gráfico referente a Probabilidade normal da ATZ.



Planejamento Doehlert - Modelo Quadrático
Três Variáveis



Identificação: Desetilatraxina Data: 18/11/2017

Variáveis	Níveis da variável 1						
	-1	-0,5	0	0,5	1		
SE	50	87,5	125	162,5	200		
SD	Níveis da variável 2						
	-0,866	-0,577	-0,289	0	0,289	0,577	0,87
	50	175,14	299,856	425	550,1443	674,86	800
Força Iônica	Níveis da variável 3						
	-0,817	0	0,817				
	0	0,05	0,1				

Opções

Decodificado

Soma quadrática dos resíduos

Planejamento				Resp.	Estim.	Coeficientes			
Ensaio	SE	SD	rça Iônica	y	ŷ		Erro	t (9)	p
1	200	425	0,05	12,081	11,976	SG	b ₀ 15,03 ± 0,41765	35,98	4,89E-11
2	162,5	800	0,05	10,825	10,629	SG	b ₁ 3,202 ± 0,552499	5,796	0,000261
3	162,5	550,144	0,1	18,067	18,368	SG	b ₂ -1,25 ± 0,552515	2,269	0,049421
4	50	425	0,05	5,4667	5,5713	SG	b ₃ 4,921 ± 0,552158	8,913	9,25E-06
5	87,5	50	0,05	9,4013	9,5978	SG	b ₁₁ -6,26 ± 0,885989	7,06	5,92E-05
6	87,5	299,856	0	8,1505	7,8494	SG	b ₂₂ -3,85 ± 0,886021	4,341	0,001876
7	162,5	50	0,05	13,041	13,735		b ₃₃ -1,31 ± 0,825535	1,585	0,147441
8	162,5	299,856	0	11,087	10,496		b ₁₂ -1,08 ± 1,275979	0,846	0,419238
9	87,5	800	0,05	9,0563	8,3615		b ₁₃ 1,062 ± 1,425831	0,745	0,475384
10	125	674,856	0	6,1203	7,0116		b ₂₃ 2,375 ± 1,425544	1,666	0,130124
11	87,5	550,144	0,1	14,02	14,61		Nível de significância α: 0,05		
12	125	175,144	0,1	17,391	16,5		Parâmetros para a ANOVA		
13	125	425	0,05	13,661	15,029		n° de parâmetros (p)	10	
14	125	425	0,05	14,281	15,029		n° total de observações (n)	19	
15	125	425	0,05	16,125	15,029		n° de níveis (m)	13	
16	125	425	0,05	15,171	15,029		Nível de significância (α)	0,05	
17	125	425	0,05	14,147	15,029				
18	125	425	0,05	15,047	15,029				
19	125	425	0,05	16,769	15,029				

Análise de Variância - Modelo Quadrático					
FV	SQ	nGL	MQ	Fcalc.	p
Regressão	234	9	25,997	21,291 SG	5E-05
Resíduos	10,99	9	1,221		
F. Ajuste	3,532	3	1,1772	0,9471	0,4751
Erro Puro	7,458	6	1,2429		
Total	245	18			
% variação explicada				95,514	
% máx. de variação explicável				96,956	

Figura 28. Planilha referente ao planejamento Doehlert de modelo quadrático para DEA.

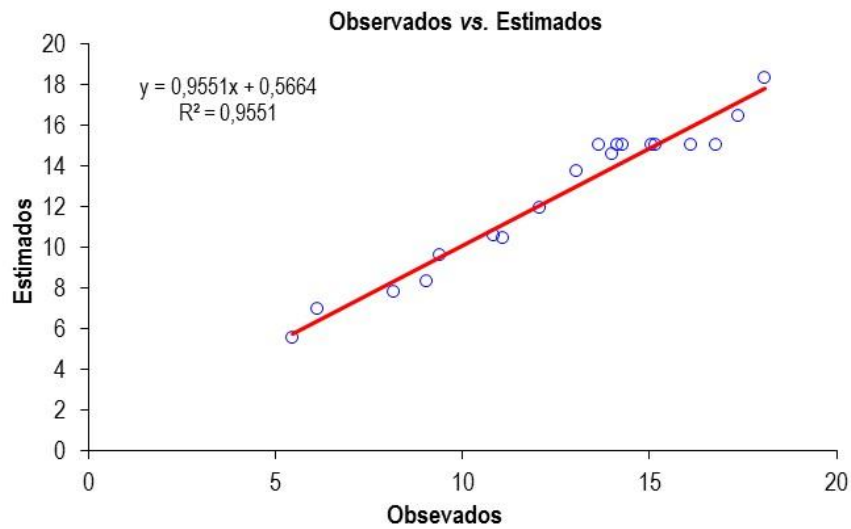


Figura 29.Gráfico da regressão dos valores estimados pelos valores observados do modelo quadrático para DEA.

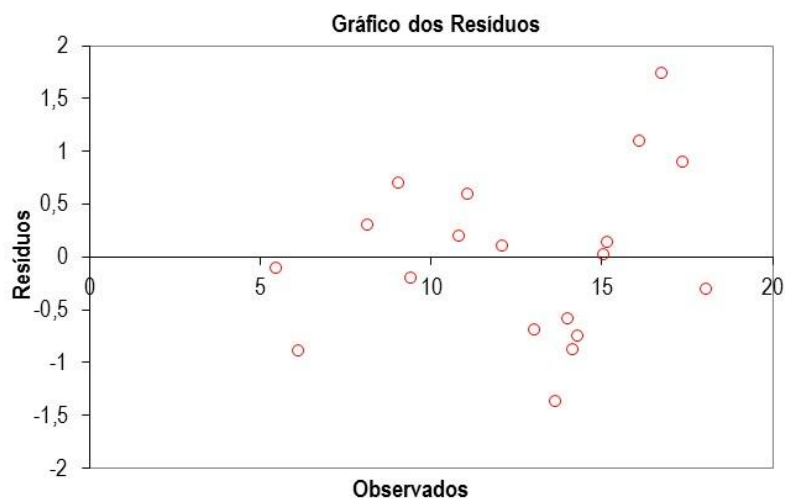


Figura 30.. Gráfico da distribuição dos resíduos do modelo quadrático para DEA.

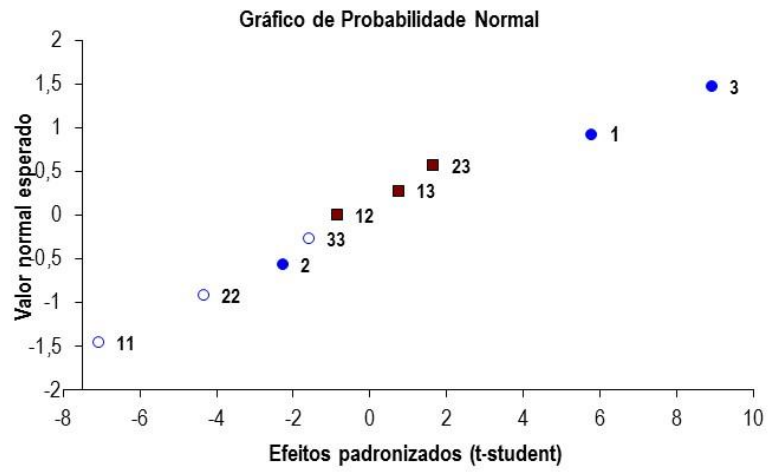


Figura 31. Gráfico referente a Probabilidade normal da DEA.



Planejamento Doehlert - Modelo Quadrático
Três Variáveis



Identificação: Deisopropilatrizona Data: 18/11/2017

Variáveis	Níveis da variável 1						
	-1	-0,5	0	0,5	1		
SE	50	87,5	125	162,5	200		
SD	Níveis da variável 2						
	-0,866	-0,577	-0,289	0	0,289	0,577	0,87
SD	50	175,14	299,856	425	550,1443	674,86	800
Força Iônica	Níveis da variável 3						
	-0,817	0	0,817				
Força Iônica	0	0,05	0,1				

Opções

Decodificado

Soma quadrática dos resíduos

Ensaio	Planejamento			Resp. y	Estim. ŷ
	SE	SD	rça Iônica		
1	200	425	0,05	4,9465	4,9504
2	162,5	800	0,05	4,008	3,9965
3	162,5	550,144	0,1	8,2428	8,2505
4	50	425	0,05	1,7332	1,7294
5	87,5	50	0,05	3,6009	3,6124
6	87,5	299,856	0	2,7026	2,6949
7	162,5	50	0,05	5,2707	5,6384
8	162,5	299,856	0	4,1221	3,7505
9	87,5	800	0,05	3,1693	2,8015
10	125	674,856	0	1,9198	2,2991
11	87,5	550,144	0,1	5,7135	6,0851
12	125	175,144	0,1	7,85	7,4707
13	125	425	0,05	5,3449	5,8351
14	125	425	0,05	5,7697	5,8351
15	125	425	0,05	6,4444	5,8351
16	125	425	0,05	5,5607	5,8351
17	125	425	0,05	5,395	5,8351
18	125	425	0,05	5,7723	5,8351
19	125	425	0,05	6,5583	5,8351

	Coefficientes	Erro	t (9)	p
SG	b ₀	5,835 ± 0,188846	30,9	1,91E-10
SG	b ₁	1,61 ± 0,24982	6,447	0,000119
SG	b ₂	-0,71 ± 0,249828	2,834	0,019582
SG	b ₃	2,665 ± 0,249666	10,67	2,07E-06
SG	b ₁₁	-2,5 ± 0,400604	6,229	0,000154
SG	b ₂₂	-1,6 ± 0,400627	3,991	0,003154
	b ₃₃	-0,09 ± 0,373277	0,245	0,811652
	b ₁₂	-0,48 ± 0,576952	0,832	0,427146
	b ₁₃	0,849 ± 0,64471	1,317	0,220489
	b ₂₃	0,757 ± 0,64458	1,174	0,270515
Nível de significância α:		0,05	↔	

Parâmetros para a ANOVA

n° de parâmetros (p)	10
n° total de observações (n)	19
n° de níveis (m)	13
Nível de significância (α)	0,05 ↔

Análise de Variância - Modelo Quadrático

FV	SQ	nGL	MQ	Fcalc.	p
Regressão	55,73	9	6,1923	24,805 SG	3E-05
Resíduos	2,247	9	0,2496		
F. Ajuste	0,835	3	0,2783	1,1828	0,3922
Erro Puro	1,412	6	0,2353		
Total	57,98	18			
% variação explicada				96,125	
% máx. de variação explicável				97,565	

Figura 32. Planilha referente ao planejamento Doehlert de modelo quadrático para DIA.

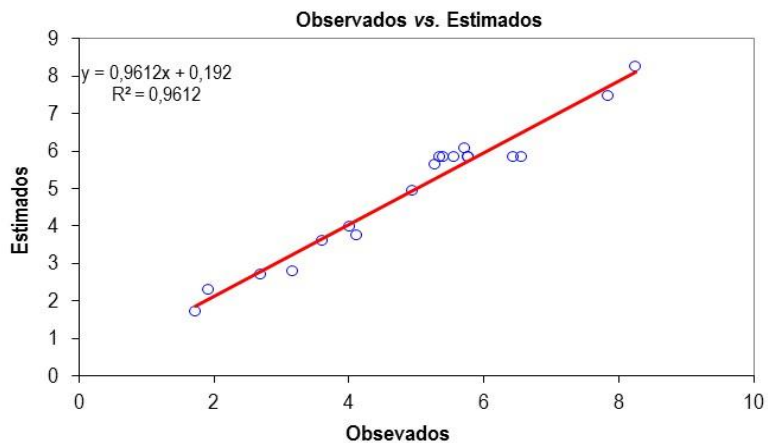


Figura 33. Gráfico da regressão dos valores estimados pelos valores observados do modelo quadrático para DIA.

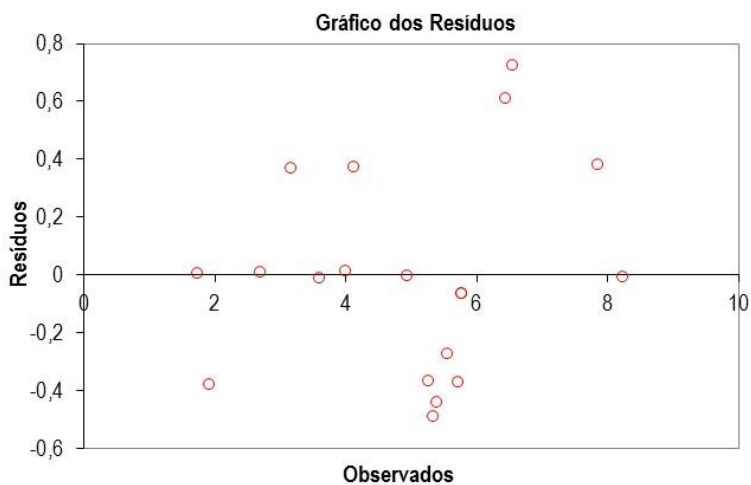


Figura 34. Gráfico da distribuição dos resíduos do modelo quadrático para DIA.

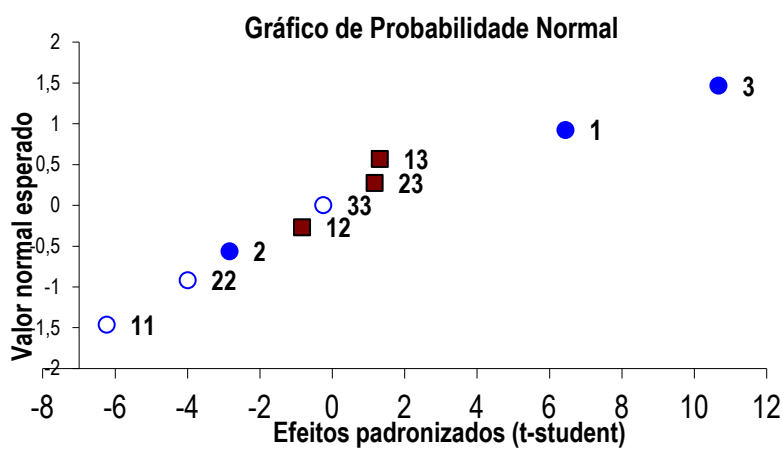


Figura 35. Gráfico referente a Probalidade normal da DIA

Apêndice IV

O modelo quadrático foi utilizado para plotar os gráficos de superfície de respostas, representadas pelas equações 16 e 17, 18 e 19, 20 e 21 para ATZ, DEA e DIA respectivamente. As equações 15, 17 e 19 representam as interações entre a solvente extrator (X_1) e força iônica (X_2), e para as interações de solvente dispersor (X_1) e força iônica (X_2) são representadas pelas equações 16, 18 e 20. Desta forma, as figuras 36 a 41 são os gráficos da superfície de resposta, utilizando as equações citadas anteriormente.

$$y = 5,59 + 0,80X_1 + 1,09X_2 - 0,25X_1X_2 - 2,20X_1^2 - 0,24X_2^2 \quad \text{Equação 16}$$

$$y = 4,19 - 0,23X_1 + 1,34X_2 + 0,73X_1X_2 - 1,27X_1^2 - 0,24X_2^2 \quad \text{Equação 17}$$

$$y = 15,03 + 3,20X_1 + 4,92X_2 + 1,06X_1X_2 - 6,26X_1^2 - 1,31X_2^2 \quad \text{Equação 18}$$

$$y = 11,97 - 2,33X_1 + 5,98X_2 - 2,37X_1X_2 - 3,85X_1^2 - 1,31X_2^2 \quad \text{Equação 19}$$

$$y = 5,84 + 1,61X_1 + 2,66X_2 + 0,85X_1X_2 - 2,50X_1^2 - 0,09X_2^2 \quad \text{Equação 20}$$

$$y = 4,95 - 1,19X_1 + 3,51X_2 + 0,76X_1X_2 - 1,60X_1^2 - 0,09X_2^2 \quad \text{Equação 21}$$

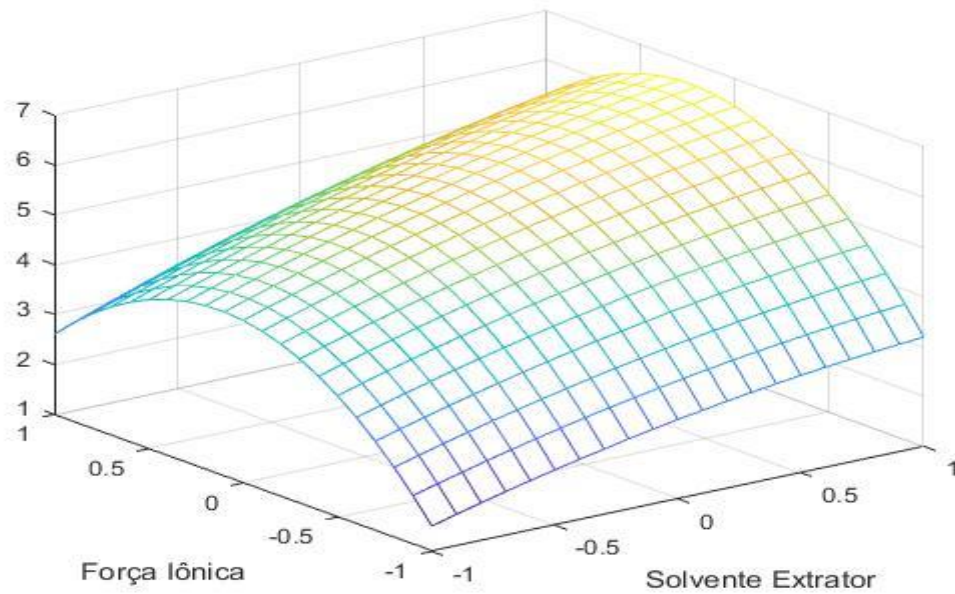


Figura 36. Representação da superfície de resposta para a interação entre força iônica e solvente extrator obtidas para o planejamento Doehlert na otimização das condições da DLLME para ATZ.

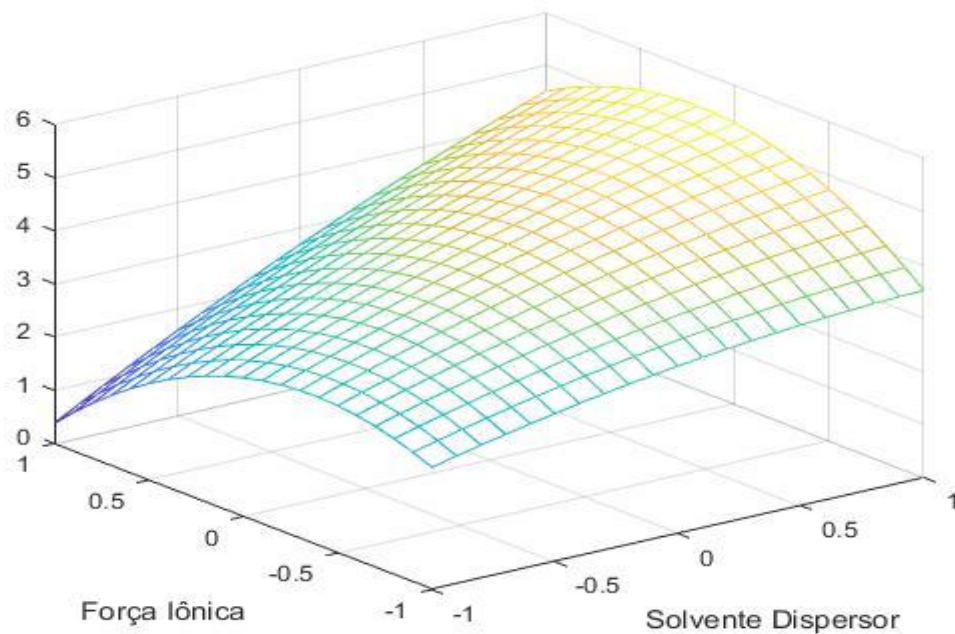


Figura 37. Representação da superfície de resposta para a interação entre força iônica e solvente dispersor obtidas para o planejamento Doehlert na otimização das condições da DLLME para ATZ.

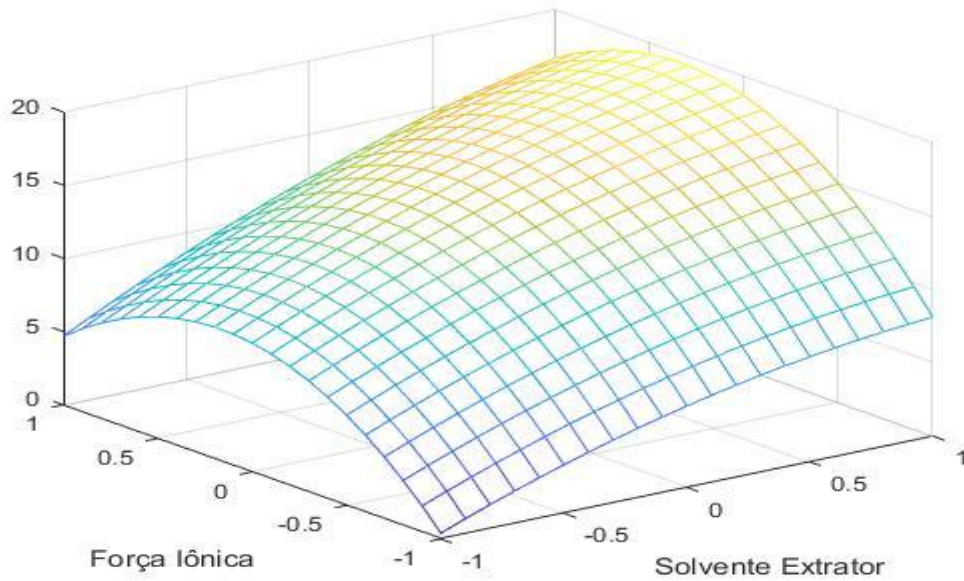


Figura 38. Representação da superfície de resposta para a interação entre força iônica e solvente extrator obtidas para o planejamento Doehlert na otimização das condições da DLLME para DEA.

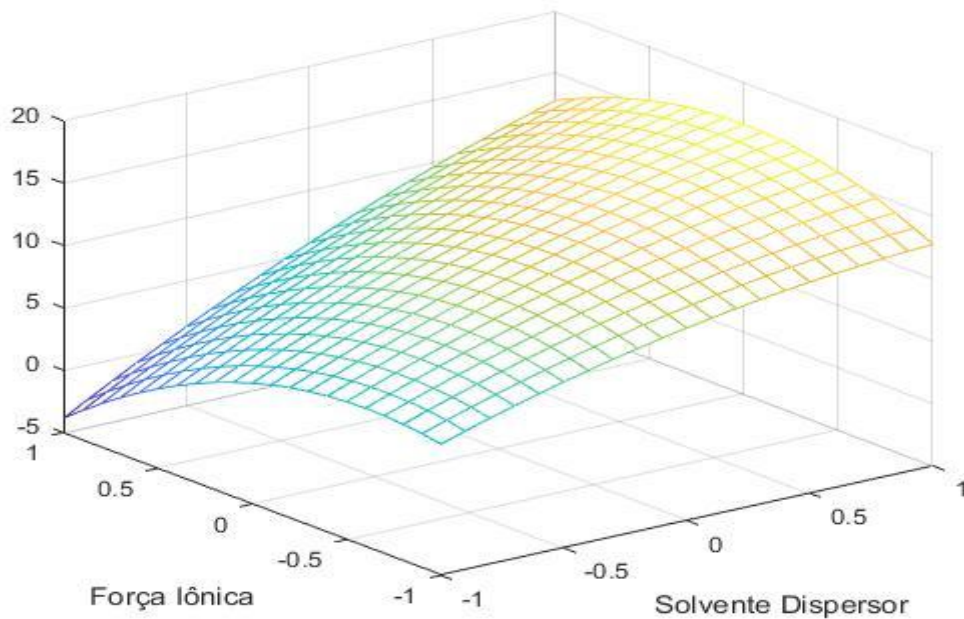


Figura 39. Representação da superfície de resposta para a interação entre força iônica e solvente dispersor obtidas para o planejamento Doehlert na otimização das condições da DLLME para DEA.

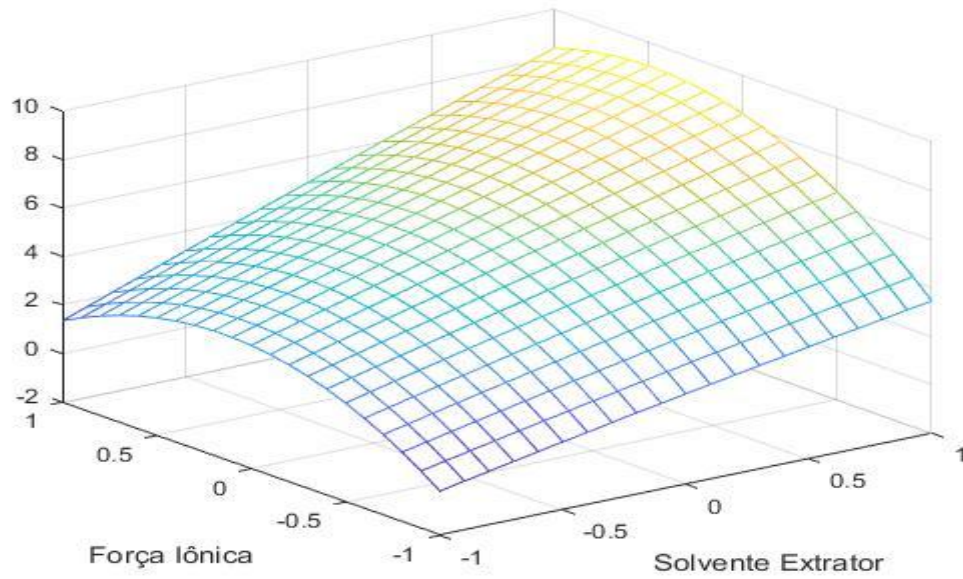


Figura 40. Representação da superfície de resposta para a interação entre força iônica e solvente extrator obtidas para o planejamento Doehlert na otimização das condições da DLLME para DIA

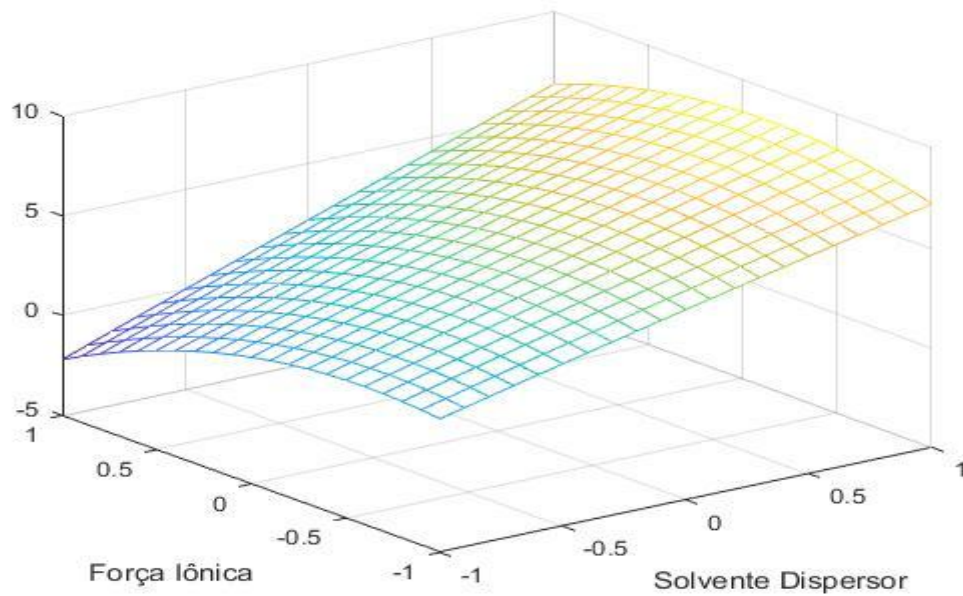


Figura 41. Representação da superfície de resposta para a interação entre força iônica e solvente dispersor obtidas para o planejamento Doehlert na otimização das condições da DLLME para DIA.

Apêndice V

Gráficos das curvas analíticas representadas pelas figuras 42 a 44, além dos gráficos de resíduos representadas pelas figuras 45 a 47.

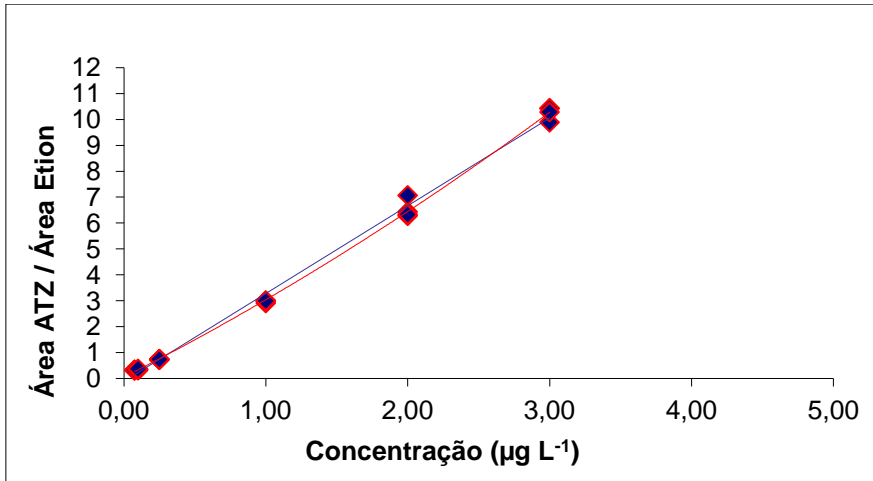


Figura 42. Curva analítica de 0,075 – 3,00 ($\mu\text{g L}^{-1}$) para ATZ em água da matriz.

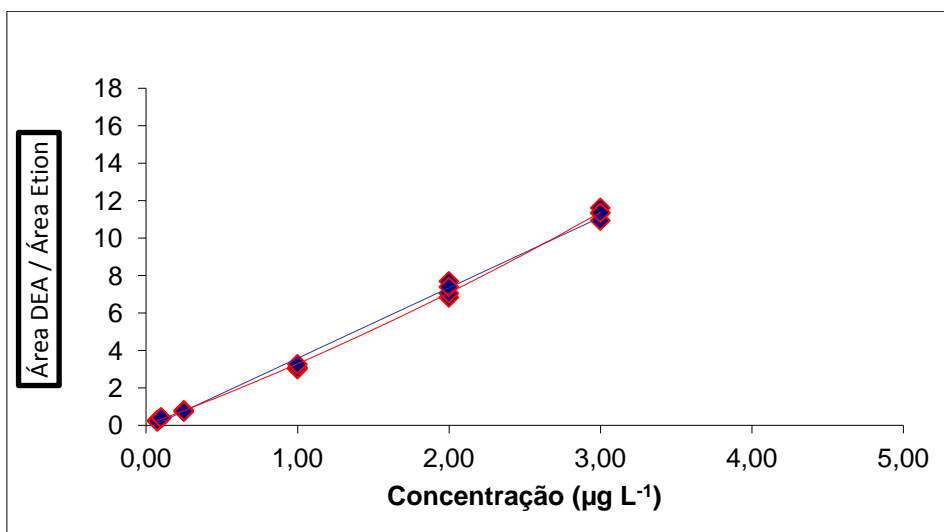


Figura 43. Curva analítica de 0,075 – 3,00 ($\mu\text{g L}^{-1}$) para DEA em água da matriz.

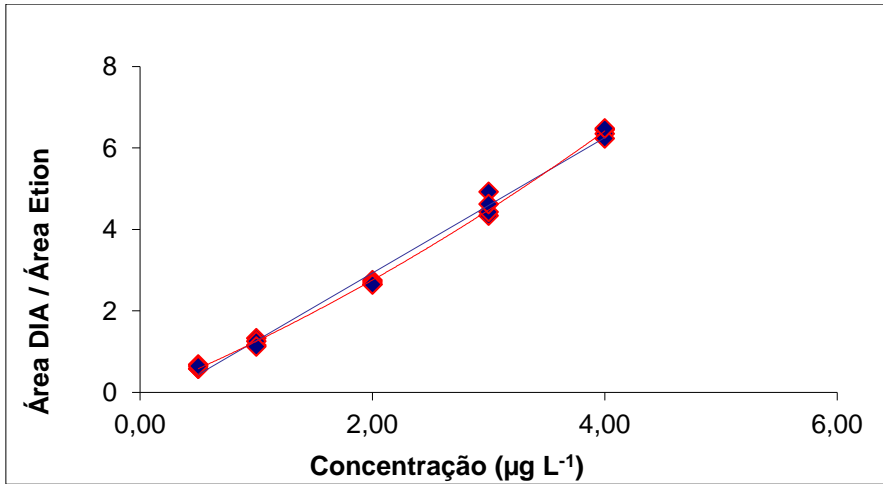


Figura 44. Curva analítica de 0,50 – 4,00($\mu\text{g L}^{-1}$) para DIA em água da matriz.

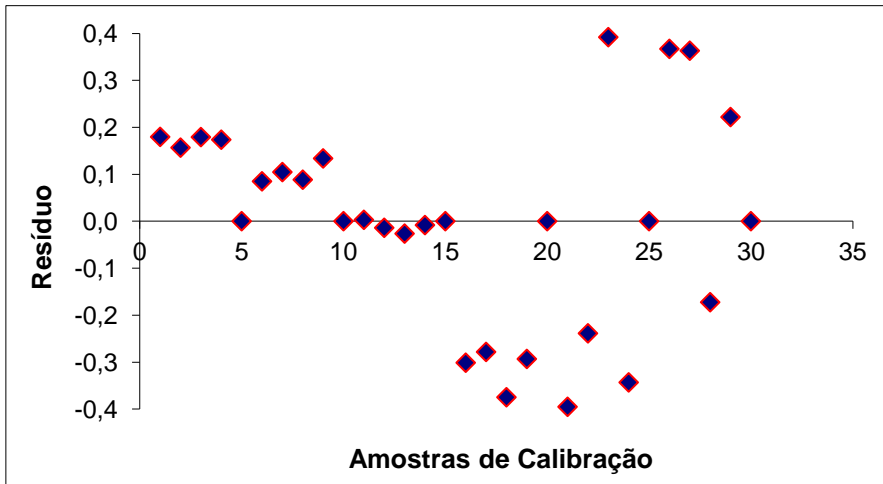


Figura 45. Gráfico de Resíduo para curva de ATZ.

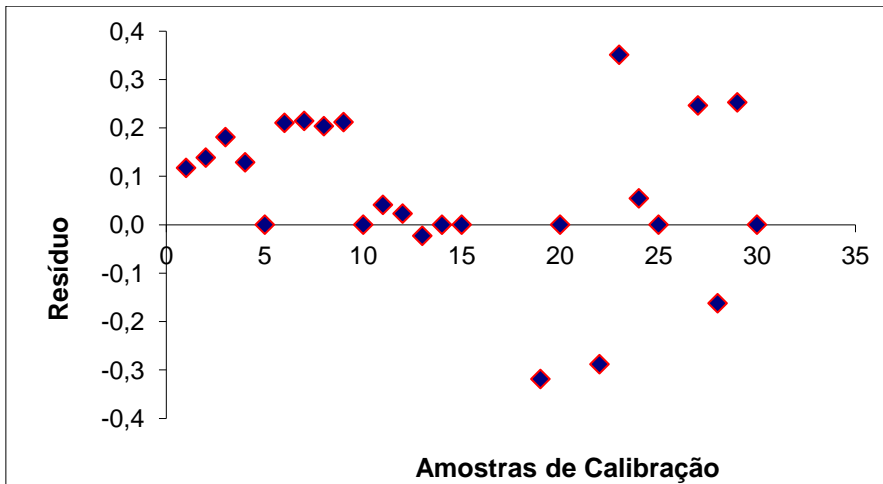


Figura 46. Gráfico de Resíduo para curva de DEA.

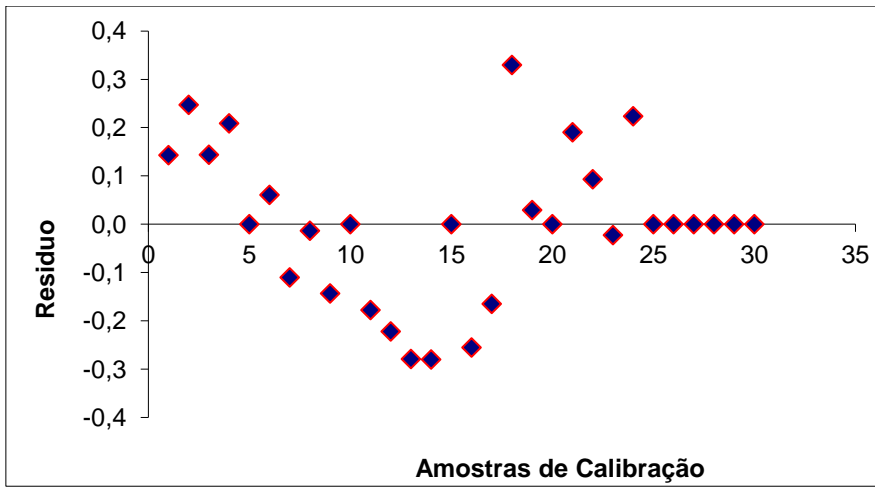


Figura 47. Gráfico de Resíduo para curva de DIA.

Apêndice VI

A tabela XXVI apresenta os valores de t_{calc} para o estudo do efeito de matriz em comparação da água ultra pura com água da nascente e água sintética.

Tabela XXVI. Valores de t_{calc} para cada matriz avaliada nesse estudo.

Analito	Água Sintética / Água Matriz			Água Ultra Pura / Água de matrizes		
	nGL	t_{calc}	t_{crit}	nGL	t_{calc}	t_{crit}
ATZ	63	93,55	2,00	63	56,27	2,00
DEA	63	59,11	2,00	64	67,40	2,00
DIA	43	20,50	2,02	43	37,51	2,02

Onde: nGL: número de graus de liberdade; t_{calc} , valor do teste t student calculado; t_{crit} , valor de t student para 95% de confiança.

Apêndice VII

Tabela XXVII. Amostras de eventos de precipitação da primeira campanha de coleta.

Microbacia	Data de Coleta	ATZ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	DEA ($\mu\text{g L}^{-1}$)	DIA ($\mu\text{g L}^{-1}$)
PA01	28/jan	n.d.	n.d.	n.d.
	31/jan	<LQ	n.d.	n.d.
	02/fev	n.d.	n.d.	n.d.
	05/fev	n.d.	n.d.	n.d.
	11/fev	n.d.	n.d.	n.d.
	13/fev	n.d.	n.d.	n.d.
PA02	28/jan	n.d.	n.d.	n.d.
	31/jan	n.d.	n.d.	n.d.
	05/fev	n.d.	n.d.	n.d.
	11/fev	<LQ	n.d.	n.d.
	13/fev	n.d.	n.d.	n.d.
PA03	01/fev	n.d.	n.d.	n.d.
	05/fev	n.d.	n.d.	n.d.
	09/fev	n.d.	n.d.	n.d.
	10/fev	n.d.	n.d.	n.d.
PA04	22/jan	n.d.	n.d.	n.d.
	06/fev	n.d.	n.d.	n.d.
	11/fev	n.d.	n.d.	n.d.
	13/fev	n.d.	n.d.	n.d.
PA05	01/fev	n.d.	n.d.	n.d.
	02/fev	n.d.	n.d.	n.d.
	05/fev	n.d.	n.d.	n.d.
	10/fev	n.d.	n.d.	n.d.
	11/fev	n.d.	n.d.	n.d.
PA06	25/jan	n.d.	n.d.	n.d.
	31/jan	<LQ	n.d.	n.d.
	01/fev	n.d.	n.d.	n.d.
	05/fev	n.d.	n.d.	n.d.
	10/fev	n.d.	n.d.	n.d.
	11/fev	n.d.	n.d.	n.d.
PA07	19/jan	n.d.	n.d.	n.d.
	01/fev	n.d.	n.d.	n.d.

Microbacia	Data de Coleta	ATZ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	DEA($\mu\text{g L}^{-1}$)	DIA($\mu\text{g L}^{-1}$)
PA07	05/fev	n.d.	n.d.	n.d.
	10/fev	n.d.	n.d.	n.d.
	11/fev	<LQ	n.d.	n.d.
PA08	31/jan	n.d.	n.d.	n.d.
	05/fev	n.d.	n.d.	n.d.
	01/fev	n.d.	n.d.	n.d.
	10/fev	n.d.	n.d.	n.d.
	11/fev	n.d.	n.d.	n.d.
PA09	21/jan	n.d.	n.d.	n.d.
	25/jan	<LQ	n.d.	n.d.
	31/jan	$1,14 \pm 0,06$	n.d.	n.d.
	05/fev	n.d.	n.d.	n.d.
	11/fev	n.d.	n.d.	n.d.
	14/fev	n.d.	n.d.	n.d.
PA11	25/jan	n.d.	n.d.	n.d.
	28/jan	n.d.	n.d.	n.d.
	01/fev	n.d.	n.d.	n.d.
	10/fev	<LQ	n.d.	n.d.
PA12	28/jan	n.d.	n.d.	n.d.
	31/jan	n.d.	n.d.	n.d.
	02/fev	n.d.	n.d.	n.d.
	13/fev	n.d.	n.d.	n.d.
PA13	17/jan	<LQ	n.d.	n.d.
	25/jan	<LQ	n.d.	n.d.
	29/jan	<LQ	n.d.	n.d.
	31/jan	n.d.	n.d.	n.d.
	03/fev	n.d.	n.d.	n.d.
	05/fev	<LQ	n.d.	n.d.
	13/fev	<LQ	n.d.	n.d.
	10/fev	<LQ	n.d.	n.d.
22/fev	<LQ	n.d.	n.d.	
PA14	31/jan	n.d.	n.d.	n.d.
	02/fev	n.d.	n.d.	n.d.
	08/fev	n.d.	n.d.	n.d.
	11/fev	n.d.	n.d.	n.d.
	13/fev	n.d.	n.d.	n.d.
	22/fev	$0,23 \pm 0,01$	n.d.	n.d.
PA15	25/jan	n.d.	n.d.	n.d.
	31/jan	n.d.	n.d.	n.d.

Microbacia	Data de Coleta	ATZ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	DEA($\mu\text{g L}^{-1}$)	DIA($\mu\text{g L}^{-1}$)
PA16	01/fev	<LQ	n.d.	n.d.
	02/fev	<LQ	n.d.	n.d.
	09/fev	<LQ	n.d.	n.d.
	13/fev	n.d.	n.d.	n.d.
PA17	25/jan	n.d.	n.d.	n.d.
	31/jan	n.d.	n.d.	n.d.
	02/fev	n.d.	n.d.	n.d.
	22/fev	2,89 \pm 0,17	0,80 \pm 0,01	1,22 \pm 0,01
PA18	31/jan	n.d.	n.d.	n.d.
	15/fev	n.d.	n.d.	n.d.
PA19	31/jan	n.d.	n.d.	n.d.
	12/fev	<LQ	n.d.	n.d.
PA20	13/fev	n.d.	n.d.	n.d.
	31/jan	n.d.	n.d.	n.d.
	02/fev	n.d.	n.d.	n.d.
PA21	01/fev	n.d.	n.d.	n.d.
	10/fev	<LQ	n.d.	n.d.
PA22	12/fev	<LQ	n.d.	n.d.

n.d.: amostra não detectado; <LQ.: Analito detectado, mas não possível realizar a quantificação

Tabela XXVIII. Amostras de eventos de precipitação da segunda campanha de coleta.

Microbacia	Data de Coleta	ATZ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	DEA($\mu\text{g L}^{-1}$)	DIA($\mu\text{g L}^{-1}$)
PA01	29/set	n.d.	n.d.	n.d.
	07/out	n.d.	n.d.	n.d.
	08/out	n.d.	n.d.	n.d.
PA02	29/set	n.d.	n.d.	n.d.
	07/out	n.d.	n.d.	n.d.
	08/out	n.d.	n.d.	n.d.
PA03	29/set	n.d.	n.d.	n.d.
	02/set	n.d.	n.d.	n.d.
	07/out	n.d.	n.d.	n.d.
PA04	10/out	n.d.	n.d.	n.d.
	07/out	n.d.	n.d.	n.d.
	8/out	n.d.	n.d.	n.d.
PA05	26/set	n.d.	n.d.	n.d.
	29/set	n.d.	n.d.	n.d.
	07/out	n.d.	n.d.	n.d.
	09/out	n.d.	n.d.	n.d.

Microbacia	Data de Coleta	ATZ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	DEA($\mu\text{g L}^{-1}$)	DIA($\mu\text{g L}^{-1}$)
PA06	25/set	n.d.	n.d.	n.d.
	29/set	n.d.	n.d.	n.d.
	02/out	n.d.	n.d.	n.d.
	06/out	n.d.	n.d.	n.d.
	07/out	<LQ	n.d.	n.d.
PA07	08/out	<LQ	n.d.	n.d.
	09/out	<LQ	n.d.	n.d.
PA08	29/set	n.d.	n.d.	n.d.
	02/out	n.d.	n.d.	n.d.
	07/out	n.d.	n.d.	n.d.
PA09	29/set	n.d.	n.d.	n.d.
	02/out	n.d.	n.d.	n.d.
	08/out	n.d.	n.d.	n.d.
PA11	02/out *	n.d.	n.d.	n.d.
	02/out **	n.d.	n.d.	n.d.
	6/out	n.d.	n.d.	n.d.
	8/out	n.d.	n.d.	n.d.
PA12	02/out *	n.d.	n.d.	n.d.
	02/out **	n.d.	n.d.	n.d.
	06/out	n.d.	n.d.	n.d.
PA13	29/set	n.d.	n.d.	n.d.
	01/out	n.d.	n.d.	n.d.
	07/out	n.d.	n.d.	n.d.
	08/out	<LQ	n.d.	n.d.
PA14	29/set	n.d.	n.d.	n.d.
	01/out	n.d.	n.d.	n.d.
	06/out	n.d.	n.d.	n.d.
	08/out	n.d.	n.d.	n.d.
PA15	19/set	n.d.	n.d.	n.d.
	08/out	n.d.	n.d.	n.d.
	09/out	n.d.	n.d.	n.d.
PA16	29/set/	n.d.	n.d.	n.d.
	09/out	<LQ	n.d.	n.d.
	15/out	n.d.	n.d.	n.d.
PA17	29/out	n.d.	n.d.	n.d.
	02/out	<LQ	n.d.	n.d.
	07/out	n.d.	n.d.	n.d.
	08/out	n.d.	n.d.	n.d.
PA18	30/set	<LQ	n.d.	n.d.

Microbacia	Data de Coleta	ATZ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	DEA($\mu\text{g L}^{-1}$)	DIA($\mu\text{g L}^{-1}$)
PA18	07/out	n.d.	n.d.	n.d.
	29/set	<LQ	n.d.	n.d.
PA19	02/out	n.d.	n.d.	n.d.
	07/out	n.d.	n.d.	n.d.
	08/out	<LQ	n.d.	n.d.
	30/set	<LQ	n.d.	n.d.
PA20	02/out	n.d.	n.d.	n.d.
	07/out	n.d.	n.d.	n.d.
	08/out	<LQ	n.d.	n.d.
	25/set	<LQ	n.d.	n.d.
PA21	02/out	<LQ	n.d.	n.d.
	07/out	n.d.	n.d.	n.d.
	02/out	<LQ	n.d.	n.d.
PA22	02/out	<LQ	n.d.	n.d.

n.d.: amostra não detectado; <LQ.:Analito detectado, mas não possível realizar a quantificação; * amostra coletada pelo turno da manhã, após o evento de precipitação; ** amostra coletada pelo turno da tarde, após o evento de precipitação.