

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**DETERMINAÇÃO SIMULTANÊA DE PESTICIDAS
UTILIZANDO MÉTODOS ELETROANALÍTICOS E
QUIMIOMÉTRICOS**

Zilene Alves da Silva

Dissertação apresentada
como parte dos requisitos
para obtenção do título de
MESTRE EM QUÍMICA,
área de concentração:
QUÍMICA ANALÍTICA

Orientador: Prof. Dr. Ernesto Chaves Pereira de Souza

Bolsista CNPQ

São Carlos - SP
2011

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

S586ds

Silva, Zilene Alves da.

Determinação simultânea de pesticidas utilizando métodos eletroanalíticos e quimiométricos / Zilene Alves da Silva. -- São Carlos : UFSCar, 2011.

101 f.

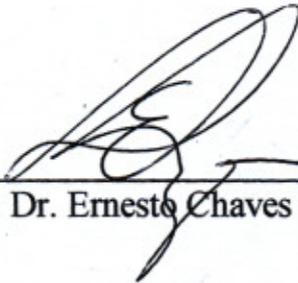
Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2011.

1. Quimiometria. 2. Eletrodo de diamante dopado com boro (DDB). 3. Pesticidas. 4. Herbicidas. I. Título.

CDD: 543.072 (20ª)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Departamento de Química
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
Curso de Mestrado Acadêmico

*Assinaturas dos membros da banca examinadora que avaliaram e aprovaram a defesa de dissertação de mestrado acadêmico da candidata **Zilene Alves da Silva**, realizada em 17 de março de 2011:*



Prof. Dr. Ernesto Chaves Pereira de Souza



Prof. Dr. Renato Lajarim Carneiro



Prof. Dr. Sergio Antonio Spinola Machado

Dedico esta dissertação a minha família que sempre esteve ao meu lado. E em especial a meu pai que mesmo não estando aqui sempre estará ao meu lado.

Agradecimentos

Em primeiro e, em especial, a Deus que mais uma vez me ensinou que tudo tem a sua hora e que na maioria das vezes não sabemos o como, o porquê e o para quê, mas no fim tudo tem um motivo.

Ao prof. Ernesto, pela orientação, pelo conhecimento compartilhado e pela paciência e apoio nos momentos necessários.

Ao prof. Fatibello, pelo diamante dopado com boro cedido para realização das medidas realizadas.

À prof.(a) Djenaine, pelo apoio, conhecimento compartilhado e discussões realizadas.

Aos professores, pelos conhecimentos adquiridos.

Aos meus pais Trajano e Joaquina, pelo apoio e força. Aos meus irmãos Zenon e Leonardo, que sempre estiveram ao meu lado.

Aos amigos que, mais que amigos, foram anjos nos momentos difíceis, fazendo-se presentes com o seu apoio, incentivo e ombro amigo.

Aos colegas do LIEC e DEQ, pelas amizades conquistadas e convivência harmoniosa.

Aos amigos e colegas de Montes Claros, que me apoiaram e deram força nessa etapa.

Aos funcionários do departamento de Química, que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao CNPq, pela bolsa concedida.

Muito Obrigada

Lista de Abreviações

α – Variável codificada com base no planejamento composto central

ΔE_s - Incremento de varredura

τ - Período

a – Amplitude de pulso

ANOVA- Análise de variância (do inglês *Analysis of Variance*)

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CCD- Planejamento composto central (do inglês *central composite design*)

CVD- Deposição química de vapor (do inglês *Chemical Vapor Deposition*)

DDB- Diamante Dopado com Boro

Diquat- dibrometo de 1,11-etileno-2,2-bipiridílio

EGM- Eletrodo gotejante de mercúrio

f - Frequência

HPHT- Alta pressão/alta temperatura(do inglês *High Pressure/High Temperature*)

LMR- Limite Máximo residual

MSR - Metodologia de superfície de resposta (do inglês *Response Surface Methodology*)

Nipals – Quadrados Mínimos Parciais Não lineares (do inglês *Nonlinear Iterative Partial Least Squares*)

Paraquat - dicloreto de 1,1-dimetil-4,4-bipiridílio

PC- Componente principal (do ingles *Principal Component*)

PCA- Análise por componente principal (do inglês *Principal Component Analysis*)

PLS - Mínimos quadrados parciais (do inglês *Partial Least Squares*)

PRESS- Soma dos Quadrados dos Erros de Previsão (do inglês *Prediction Residual Error Sum of squares*)

RMSEV – Erro médio quadrático de Validação Cruzada (do inglês *Root Mean Standard Error of Cross Validation*)

RMSEP- Erro médio quadrático de predição (do inglês *Root Mean Standard Error of Cross Prediction*)

SEV- Erro padrão de validação (do inglês *Standard Error of Validation*)

SVD - Decomposição por valores singulares (do inglês *Singular Value Decomposition*)

SWV-Voltametria de onda quadrada (do inglês *Square Wave Voltammetry*)

V- Volt

Listas de tabelas

TABELA 1- Matriz de planejamento 2^2	15
TABELA 2 - Tabela de análise de variância para um modelo linear.....	20
TABELA 3 - Análise da variância para o ajuste, pelo método dos mínimos quadrados onde n_i = número de repetições no nível; m = número de níveis distintos da variável independente; n = número total de observações; p = número de parâmetros do modelo.	20
TABELA 4- Variáveis e níveis escolhidos para o planejamento fatorial.....	33
TABELA 5- Matriz de planejamento fatorial para $k=3$	33
TABELA 6-Variáveis e níveis escolhidos para o planejamento CCD.....	34
TABELA 7 - Matriz de planejamento composto central com $k=2$	35
TABELA 8-Conjunto de dados da matriz de validação	35
TABELA 9 - Matriz de planejamento fatorial para validação.	36
TABELA 10-Variáveis e níveis escolhidos para o planejamento fatorial.....	41
TABELA 11- Matriz de planejamento fatorial para $k=3$	42
TABELA 12- Planejamento fatorial para o paraquat utilizando a corrente de pico.....	43
TABELA 13-Cálculo dos efeitos e dos erros experimentais para as variáveis estudadas no planejamento fatorial utilizando a corrente de pico para estudar os parâmetros associados às medidas de SWV para o paraquat em meio de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ $0,1 \text{ mol}^{-1}$	44
TABELA 14-Planejamento fatorial completo utilizando a PC1 para o paraquat utilizando transformação em componente principal.....	45
TABELA 15-Cálculo dos efeitos e dos erros experimentais para as variáveis estudadas no planejamento fatorial utilizando a transformação em componente principal para estudar os parâmetros associados às medidas de SWV para o paraquat em meio de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$	46
TABELA 16-Planejamento fatorial para o diquat utilizando a corrente de pico.	48
TABELA 17-Cálculo dos efeitos e dos erros experimentais para as variáveis estudadas no planejamento fatorial utilizando a corrente de pico para estudar os parâmetros associados às medidas de SWV para o diquat em meio de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ $0,1 \text{ mol}^{-1}$	48
TABELA 18-Planejamento fatorial completo utilizando a PC1 para o diquat	49
TABELA 19-Cálculo dos efeitos e dos erros experimentais para as variáveis estudadas no planejamento fatorial utilizado para estudar os parâmetros associados às medidas de SWV para o diquat em meio de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$	50
TABELA 20-Planejamento fatorial completo utilizando a PC1 para a mistura.....	52

TABELA 21-Cálculo dos efeitos e dos erros experimentais para as variáveis estudadas no planejamento fatorial utilizado para estudar os parâmetros associados às medidas de SWV para a mistura paraquat/diquat em meio de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 0,1 mol L ⁻¹	53
TABELA 22-Variáveis e níveis escolhidos para o planejamento CCD para a técnica de SWV	54
TABELA 23- Matriz de planejamento CCD para os parâmetros voltamétricos frequência e amplitude.	55
TABELA 24-Planejamento CCD para o paraquat utilizando corrente de pico.....	56
TABELA 25-Coefficientes e erros para a superfície de resposta para o paraquat utilizando a SWV e corrente de pico.....	57
TABELA 26-Teste ANOVA do planejamento CCD para o paraquat utilizando a SWV e corrente de pico onde: SQ é o somatório quadrático, GL- Grau de liberdade, QM- média quadrática.....	58
TABELA 27-Resultado do Planejamento CCD para os parâmetros voltamétricos para o Paraquat utilizando PCA	59
TABELA 28- Coeficientes e erros para a superfície de resposta para o paraquat utilizando a SWV e a transformação para PC.	59
TABELA 29- Teste ANOVA do planejamento CCD para o paraquat utilizando a SWV onde: SQ é o somatório quadrático, GL- Grau de liberdade, QM- média quadrática.....	60
TABELA 30-Planejamento CCD para o diquat utilizando corrente de pico.	63
TABELA 31 - Coeficientes e erros para a superfície de resposta para o diquat utilizando a SWV e corrente de pico.....	64
TABELA 32 - Teste ANOVA do planejamento CCD para o diquat utilizando a SWV e corrente de pico onde: SQ é o somatório quadrático, GL- Grau de liberdade, QM- média quadrática.....	64
TABELA 33-Resultado do Planejamento CCD para os parâmetros voltamétricos para o diquat utilizando PC1.	65
TABELA 34- Coeficientes e erros para a superfície de resposta para o diquat utilizando a SWV.	66
TABELA 35- Teste ANOVA do planejamento CCD para o diquat utilizando a SWV e PC1 onde: SQ é o somatório quadrático, GL- Grau de liberdade, QM- média quadrática.	66
TABELA 36-Resultado do Planejamento CCD para os parâmetros voltamétricos para a mistura utilizando PCA	69

TABELA 37- Coeficientes e erros para a superfície de resposta para a mistura utilizando a SWV.	70
TABELA 38-ANOVA do planejamento CCD para a mistura utilizando a SWV	70
TABELA 39 - Limites de detecção e quantificação, repetibilidade e reprodutibilidade para o paraquat e diquat.....	77
TABELA 41-Planejamento CCD para construção da matriz de calibração dos pesticidas.	78
TABELA 42-Planejamento fatorial para construção da matriz de validação dos pesticidas. ..	79
TABELA 43-Valores de PRESS, SEP e correlação(r) obtidos para o modelo de PLS- centrado na média e primeira derivada utilizando validação cruzada.....	81
TABELA 44- Valores de PRESS, SEP e correlação (r) obtidos para o modelo de PLS- centrado na média e primeira derivada utilizando validação externa.....	83

Lista de Figuras

FIGURA 1- Estrutura molecular (a) paraquat (b) diquat	5
FIGURA 2- Forma de aplicação do potencial na SWV onde a - amplitude, ΔE_s - incremento de varredura e t é o período.	9
FIGURA 3- Voltamograma de onda quadrada para um sistema redox totalmente reversível onde: (a) corrente direta; (b) corrente reversa e (c) corrente resultante.	10
FIGURA 4- Esquema geral do processo de deposição de filme de diamante, a partir do método CVD.....	12
FIGURA 5- Em (a) Planejamento CCD (k=2) (b) Matriz de planejamento CCD.	18
FIGURA 6 - Correlação sinal versus resposta para calibração univariada e multivariada.	21
FIGURA 7- Representação esquemática dos Princípios da PCA onde A é o número de componentes.	23
FIGURA 8- Representação de uma PC no caso de duas variáveis: (A) os loadings são os ângulos do vetor direção; (B) os scores são as projeções das amostras.	24
FIGURA 9- Método PLS (a) relação externa-decomposição de X.....	25
FIGURA 10- Método PLS relação externa- decomposição de Y.	25
FIGURA 11- Célula eletroquímica utilizada nas medidas voltamétricas.....	31
FIGURA 12- Eletrodo de diamante dopado com boro.....	31
FIGURA 13- Voltamograma de onda quadrada obtido para o paraquat em meio de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com a técnica de SWV utilizando os seguintes parâmetros: $f = 100 \text{ s}^{-1}$, $a = 50 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$	38
FIGURA 14- Voltamograma de onda quadrada obtido para o diquat em meio de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com a técnica de SWV utilizando os seguintes parâmetros: $f = 100 \text{ s}^{-1}$, $a = 50 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$	39
FIGURA 15- Voltamograma de onda quadrada obtido para a mistura em meio de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com a técnica de SWV utilizando os seguintes parâmetros: $f = 100 \text{ s}^{-1}$, $a = 50 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$	40
FIGURA 16- Voltamogramas de onda quadrada obtidos para o paraquat em meio de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com a técnica de SWV a partir da matriz de planejamento.....	43
FIGURA 17- Voltamogramas de onda quadrada obtidos para o diquat em meio de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com a técnica de SWV a partir da matriz de planejamento.....	47

- FIGURA 18- Voltamogramas de onda quadrada obtidos para a mistura paraquat/diquat em meio de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com a técnica de SWV a partir da matriz de planejamento. 52
- FIGURA 19 - Voltamogramas de onda quadrada obtidos para o paraquat em meio de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com a técnica de SWV a partir da matriz de planejamento CCD. 56
- FIGURA 20-Superfície de resposta obtida para os parâmetros voltamétricos da SWV para o paraquat em meio de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com a técnica de SWV, corrente de pico, utilizando os seguintes parâmetros: $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ 61
- FIGURA 21 - Superfície de resposta obtida para os parâmetros voltamétricos da SWV para o paraquat em meio de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com a técnica de SWV, PCA e os seguintes parâmetros: $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ 62
- FIGURA 22 – Voltamogramas de onda quadrada obtidos para o diquat em meio de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com a técnica de SWV a partir da matriz de planejamento CCD..... 63
- FIGURA 23 - Superfície de resposta obtida para os parâmetros voltamétricos da SWV para o diquat em meio de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com a técnica de SWV, corrente de pico, utilizando os seguintes parâmetros: $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ 67
- FIGURA 24-Superfície de resposta obtida para os parâmetros voltamétricos da SWV para o diquat em meio de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com a técnica de SWV e PC, utilizando os seguintes parâmetros: $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ 68
- FIGURA 25-Superfície de resposta obtida para os parâmetros voltamétricos da SWV para a mistura paraquat e diquat em meio de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com a técnica de SWV utilizando os seguintes parâmetros: $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ 71
- FIGURA 26- Voltamogramas planejamento CCD para os parâmetros voltamétricos da mistura em meio de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ 73
- FIGURA 27- (a) Voltamogramas de SWV utilizando o eletrodo de DDB em meio de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ contendo diferentes concentrações de paraquat, no intervalo de $9,90 \times 10^{-7}$ a $3,15 \times 10^{-5}$. (b) Curva de corrente de pico em função da concentração obtida a partir da parte (a) da Figura..... 75
- FIGURA 28- (a) Voltamogramas de SWV utilizando o eletrodo de DDB em meio de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ contendo diferentes concentrações de diquat, no intervalo de $9,90 \times 10^{-7}$ a $3,15 \times 10^{-5}$. (b) Curva de corrente de pico em função da concentração obtida a partir da parte (a) da Figura..... 76
- FIGURA 30-Voltamogramas de SWV para determinação simultânea dos pesticidas paraquat/diquat para o conjunto de calibração em meio de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com a técnica

de SWV utilizando os seguintes parâmetros: $f = 170 \text{ s}^{-1}$, $a = 40 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$.

..... 79

FIGURA 31-Voltamogramas de SWV para determinação simultânea dos pesticidas paraquat/diquat para o conjunto de validação em meio de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com a técnica de SWV utilizando os seguintes parâmetros: $f = 170 \text{ s}^{-1}$, $a = 40 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$. $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$.

..... 80

FIGURA 32- Concentrações previstas x concentrações reais para o paraquat e diquat na validação cruzada utilizando algoritmo PLS..... 82

FIGURA 32-Concentrações previstas x concentrações reais para o paraquat e diquat na validação externa utilizando algoritmo PLS..... 84

RESUMO

DETERMINAÇÃO SIMULTANÊA DE PESTICIDAS UTILIZANDO MÉTODOS ELETROANALÍTICOS E MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS.

Este trabalho descreve a determinação simultânea dos pesticidas paraquat e diquat utilizando técnicas eletroanalíticas acopladas com métodos quimiométricos. Embora estes dois pesticidas possam ser facilmente determinados em nível de traço, o mesmo não se aplica à mistura devido a uma grande sobreposição dos picos voltamétricos. Por esta razão, tornou-se necessário tratar os dados obtidos por voltametria de onda quadrada com métodos quimiométricos que utilizassem não os picos de corrente, mas sim todos os pontos do voltamograma. Em uma primeira etapa de trabalho, foram otimizados os parâmetros voltamétricos da técnica, isto é, a frequência do pulso, sua amplitude e o incremento de potenciais, utilizando o planejamento de experimentos. Nesta etapa, para cada analito foram utilizados como resposta a corrente de pico, i_p , e a primeira componente principal, PC1. Ambos os procedimentos de análise mostraram que a frequência do pulso, sua amplitude e o efeito cruzado destas variáveis têm efeito significativo sobre a resposta do sistema (i_p ou PC1). Em uma segunda etapa, o efeito das variáveis mais significativas foram estudadas através da superfície de resposta, que empregou um planejamento CCD (do inglês *central composite design*) otimizado. Foi então construído um modelo empírico que correlaciona a resposta (i_p ou PCs) com as variáveis estudadas. As condições ótimas encontradas para obter a melhor resposta voltamétrica foram frequência $170s^{-1}$, amplitude 40 mV e incremento de varredura de 2 mV. Finalmente, em uma terceira etapa de trabalho, foi realizada a análise da mistura do paraquat e diquat, aplicando os parâmetros otimizados e transformando os voltamogramas para o espaço das componentes principais. A quantificação da mistura dos pesticidas foi realizada

utilizando a Regressão Parcial dos Mínimos Quadrados, PLS. Os modelos construídos obtiveram um RMSEP de 1,39 para o paraquat e 2,22 para o diquat e coeficientes de correlação maiores do que 0,99, o que demonstra a utilidade da metodologia utilizada.

ABSTRACT

SIMULTANEOUS DETERMINATION OF PESTICIDES USED ELECTROANALYTICAL METHODS AND CHEMOMETRIC METHODS.

This paper describes the simultaneous determination of the pesticides paraquat and diquat using electroanalytical techniques coupled with chemometric methods. Although these two pesticides can be easily determined in trace levels, the same does not apply to mix due to a large overlap of the voltammetric peaks. For this reason it became necessary to treat the data obtained by square wave voltammetry with chemometric methods that used no current peaks, but all points of the voltammogram. In a first stage of work, the parameters were optimized voltammetric technique, the frequency of the pulse, amplitude and increased potential for using the design of experiments. In this step, for each analyte were used as a response to peak current, i_p , and the first principal component, PC1. Both analysis procedures showed that the frequency of the pulse amplitude and the cross effect of these variables has a significant effect on the response of the system (i_p or PC1). In a second step, the effect of the most significant variables were studied by response surface, which employed a planning CCD (central composite design of English) was optimized. It was then built an empirical model that correlates the response (i_p or PCs) with the variables studied. The optimum values to obtain the best voltammetric response was frequency 170 s^{-1} , amplitude 40 mV and scan increment of 2 mV. Finally, in a third stage of labor was performed to analyze the mixture of paraquat and diquat, applying the optimized parameters and transforming the voltammograms for the space of principal components. The quantification of the mixture of pesticides was performed using the Partial Least Squares Regression, PLS. The

models developed had a RMSEP, 1,39 and 2,22 for paraquat and diquat for the correlation coefficients greater than 0.99, which demonstrates the efficiency of the methodology used.

Sumário

INTRODUÇÃO	1
1-REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
1.1 Pesticidas	4
1.1-2 Herbicidas paraquat e diquat.....	4
1.2 Voltametrias de Onda Quadrada	7
1.3 Eletrodos de Diamante Dopado com Boro.....	10
1.4 Quimiometria	14
1.4.1 Planejamento Experimental.....	14
1.4.2 Metodologia para Superfície de resposta	16
1.5 Calibração Multivariada	21
1.5.1 Pré-Tratamentos de dados	22
1.5.2 Análise de Componente principal- PCA e Regressão por Mínimos Quadrados Parciais – PLS	22
2 Objetivos.....	29
3 Materiais e Métodos	30
3.1 Reagentes e Soluções	30
3.2 Eletrodos.....	30
3.3 Instrumentação e programas.....	32
3.4 Procedimentos Experimentais	32
3.4.1 Otimização dos parâmetros voltamétricos	32
3.4.2 Determinação simultânea dos pesticidas.....	34
3.4.3 Tratamento dos dados.....	36
4 - Resultados e Discussão.....	37
4.1 Comportamento eletroquímico dos pesticidas paraquat e diquat.....	37
4.2 Otimização dos parâmetros voltamétricos	40
4.3 Otimização das condições experimentais utilizando Metodologia de Superfície de Resposta	54
4.4 Aplicação da Técnica SWV sob condições otimizadas	74

4.5 Determinação Simultânea dos pesticidas paraquat e diquat	77
4.5.1 Determinação simultânea utilizando o PLS	80
5 - Conclusões.....	85
6-Apêndice.....	86
7 - Referências Bibliográficas	95

INTRODUÇÃO

Atualmente, há uma grande necessidade mundial em aliar o aumento da produção de alimentos com a escassez de terras agriculturáveis. E, como consequência, é cada vez maior a aplicação de pesticidas como a principal forma do controle de pragas na agricultura.

Segundo a ANVISA, o mercado brasileiro de pesticidas é o maior do mundo, com 107 empresas aptas a registrar produtos. Isso, por sua vez, corresponde a 16% do mercado mundial. Além disso, o país ocupa a sexta posição na importação de pesticidas¹. Estes agentes de controle de pragas são substâncias ou mistura de substâncias que têm a finalidade de prevenir a ação ou destruir direta ou indiretamente insetos, ácaros, roedores, ervas daninhas, bactérias e outras formas de vida animal ou vegetal que prejudicam a lavoura². Os pesticidas também podem ser utilizados nas etapas de armazenamento e transporte dos alimentos.

Buscando a minimização dos efeitos negativos no ambiente, existe a necessidade de métodos de monitoramento e quantificação, tanto no ambiente terrestre como no aquático. É importante frisar que estes últimos são os principais reservatórios dos resíduos agrícolas. Neste contexto, o estudo de diversos métodos de análise, tais como a cromatografia³, espectrometria⁴, eletroanalíticos⁵ vêm sendo amplamente empregados na quantificação destes compostos.

Tradicionalmente, o método mais utilizado para análise de pesticidas é a cromatografia, uma vez que esta técnica é relativamente rápida. Por outro lado, são necessárias várias etapas de pré-tratamento das amostras, além de técnicas auxiliares para a identificação precisa como, por exemplo, a cromatografia acoplada ao espectrômetro de massa⁶.

Dentre as técnicas citadas acima, as eletroanalíticas possuem diversas vantagens tais como: baixo custo, rapidez, não necessita de etapas de

pré-tratamento de amostra, além de possibilitarem limites de detecção que permitem trabalhar em nível de traço⁷. Uma das técnicas eletroanalíticas que se destaca é a voltametria de onda quadrada (SWV).

A SWV possui vantagens como a possibilidade de obtenção de corrente de pico definidas em altas velocidades de varredura com melhor sensibilidade e diminuição do ruído de fundo, sendo isso possível através da medida da corrente elétrica ao final do pulso direto e reverso, o que origina um pico simétrico com posição, largura e altura característicos do sistema avaliado⁸.

Dentro deste contexto, um tema tão atual quanto a determinação de pesticidas é a determinação de suas misturas, uma vez que estas ocorrem em diferentes produtos de uso comercial como, por exemplo, no dextrone® (mistura dos pesticidas paraquat e diquat). Neste caso, o problema de quantificação de cada um dos componentes torna-se ainda mais difícil, uma vez que pode ocorrer a sobreposição dos sinais dos dois analitos para a técnica de SWV. Nestas situações, utilizam-se diferentes técnicas matemáticas⁹ e estatísticas tais como a estatística multivariada, o que é conhecido, comumente, por “soft modelling”^{10, 11}. Este conjunto de métodos matemáticos e estatísticos é conhecido como quimiometria^{12, 13}.

Nos últimos anos, vêm sendo publicados trabalhos utilizando as técnicas eletroanalíticas aliadas com as técnicas quimiométricas^{14, 15}. Além das técnicas eletroanalíticas, a quimiometria tem sido utilizada para analisar dados obtidos com outras técnicas analíticas como, por exemplo, as espectrométricas, cromatográficas e análise térmica¹⁶.

Dentro deste contexto, este trabalho é uma das linhas de pesquisa do Laboratório Interdisciplinar de Eletroquímica e Cerâmica, onde são empregados métodos computacionais para planejar, simular e tratar os resultados obtidos com a aplicação de diferentes técnicas eletroquímicas. Neste sentido, esta dissertação se propõe à determinação simultânea de dois pesticidas, o

paraquat e o diquat, em soluções aquosas em nível de traço utilizando a SVW e tratando os resultados obtidos com técnicas quimiométricas.

Esta dissertação foi organizada em capítulos, sendo que no primeiro capítulo consta uma revisão de literatura sobre detecção dos pesticidas, e a fundamentação teórica das técnicas eletroanalítica e quimiométrica utilizadas no desenvolvimento deste trabalho.

O segundo capítulo trata dos objetivos desta dissertação.

O capítulo três contém os materiais e métodos utilizados para desenvolvimento deste trabalho e no capítulo quatro são apresentados os resultados obtidos com as discussões necessárias.

Finalmente, o capítulo cinco abrange as conclusões obtidas e no capítulo seis têm-se as referências bibliográficas, que foram consultadas durante todo desenvolvimento do trabalho.

1-REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O presente capítulo apresenta as revisões da literatura sobre os pesticidas paraquat e diquat, os fundamentos voltamétricos e quimiométricos.

1.1 Pesticidas

Atualmente, aproximadamente 670 ingredientes ativos são utilizados mundialmente na formulação de pesticidas e estão registrados para usos específicos na agricultura¹⁷. Desses, 350 contribuem com 98% dos pesticidas utilizados, sendo que 80% deles são rotineiramente usados na agricultura de países da América do Sul, como o Brasil. Os pesticidas abrangem uma ampla variedade de substâncias químicas com diferentes grupos funcionais, modos de ação, biotransformação e eliminação³. Dentre estas classes de substâncias, podemos citar os compostos organoclorados, carbamatos, organofosforados, piretróides, bupiridílios, triazinas e clorofenóis. A maior parte desses compostos pode causar riscos à saúde humana e ao meio ambiente, os quais, na maioria das vezes, não são aparentes ou estudados com a profundidade necessária¹⁸.

Os herbicidas são uma classe de pesticidas utilizados para controlar ervas classificadas como daninhas. Sua origem está no latim *herba* que significa erva e *caedere* que significa matar. A importância do uso destas substâncias na agricultura está no fato de que as ervas classificadas como daninhas competem em nutrientes, água, luz e espaço com as culturas de interesse.

1.1-2 Herbicidas paraquat e diquat

Especificamente os herbicidas do tipo bupiridílios apresentam intenso uso na agricultura e, em particular, o paraquat (dicloreto de 1,1-dimetil-4,4-bupiridílio) e o diquat (dibrometo de 1,11-etileno-2,2-bupiridílio) são

extremamente perigosos para a saúde humana^{19, 20}.

Os bipyridílios paraquat e diquat, cujas estruturas químicas estão apresentadas na FIGURA 1, são herbicidas de contato, usados em culturas de banana, beterraba, café, cebola, citros, couve, feijão, maçã, manga, nectarina, pera, pêssigo, pimenta do reino, abacate, algodão, arroz, aspargo, banana, cana-de-açúcar e coco. Além disto, eles podem ser utilizados na etapa de secagem de culturas de algodão, arroz, batata, cana-de-açúcar, milho, soja e sorgo. A mistura paraquat/diquat também é utilizada como agente dessecante²¹.

O paraquat e o diquat (FIGURA1) são compostos quaternários de amônio, sendo que o diquat é constituído por dois anéis piridílicos ligados pela posição *orto* e também pelo nitrogênio do anel que mantém a dupla carga positiva da molécula, enquanto o paraquat tem uma estrutura maior sendo que os dois anéis piridílicos encontram-se unidos de maneira que os átomos de nitrogênio encontram-se diametralmente opostos, isto é, na posição *para*²².

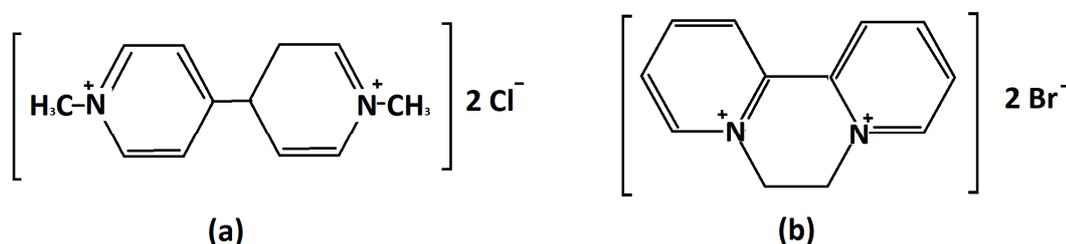


FIGURA 1- Estrutura molecular (a) paraquat (b) diquat

O Paraquat, também conhecido com metil-viologeno, é um herbicida pertencente à classe toxicológica I, onde se encontram agrupados as substâncias com propriedades extremamente tóxicas ao ambiente e à saúde humana. O diquat pertence à classe toxicológica II, considerados de alta toxicidade. A ANVISA, por meio da portaria nº 10 de março de 1985, define a legislação para utilização dos pesticidas paraquat e diquat em agropecuária e agricultura, definindo os limites máximos de resíduos permitidos para a maior parte das culturas²³. O limite máximo de resíduos (LMR) do Paraquat varia de

0,05 a 0,2mg/Kg e do diquat de 0,02 a 0,5mg/Kg ,dependendo da cultura na qual são empregados ²³ .

Por serem sais de amônio quartenário, tem elevada polaridade e, conseqüentemente, são altamente solúveis em água (700g/L para ambos), o que pode ocasionar a contaminação de águas de abastecimento e mananciais.

O Paraquat pode ser encontrado nas formulações comerciais Dexuron®, Dextrone®, Crisquat®, Weedol® e Pathclear®, enquanto o Diquat está presente nas formulações Deiquat®, Aquacide®, Reglon® e Preeglone®. Finalmente, ambos os pesticidas também são encontrados juntos em formulação como o Dextrone®^{24, 25}.

Diversos métodos analíticos têm sido propostos para a determinação do paraquat e diquat. Dentre estes métodos, podemos citar os métodos cromatográficos²⁶. Estes métodos são baseados em técnicas de separação fundamentada na migração diferencial dos componentes de uma mistura. A cromatografia líquida aliada a métodos de extração^{27, 28} ou com pareamento iônico²⁹, são alguns destes. Além disso, a cromatografia gasosa vem sendo utilizada na quantificação de paraquat e diquat em fluídos biológicos³⁰. Na busca por melhores limites de detecção e maior sensibilidade às técnicas de separação são acopladas a uma segunda técnica como a espectrometria de massas^{29, 30, 31}. Além dessas técnicas, a determinação simultânea de paraquat e diquat já foi realizada empregando-se a detecção espectrofluorimétrica³².

Os métodos eletroanalíticos foram também utilizados na determinação destes pesticidas^{33, 34}. A voltametria de redissolução catódica³⁵ e a voltametria de pulso diferencial³⁶ foram empregadas para a determinação de paraquat em água, utilizando eletrodos modificados. Outro método utilizado é a voltametria de onda quadrada que vem sendo proposta para a determinação destes pesticidas em diferentes tipos de eletrodos, tais como: pasta de carbono³⁴, eletrodos modificados³⁷, microeletrodos³⁸ e diamante dopado com boro³³.

A resposta voltamétrica do paraquat apresenta dois picos de redução

com características de processos redox reversível. O primeiro pico em aproximadamente -0,7 V (vs Ag/AgCl) é associado à redução eletroquímica da molécula na interface eletrodo-solução ($PQ^{2+} \leftrightarrow PQ^+$) seguido de um segundo pico em aproximadamente -1,2 V (vs Ag/AgCl) relacionado à redução de espécies adsorvidas à superfície do eletrodo ($PQ^+ \leftrightarrow PQ$)³⁹. A determinação eletroquímica do diquat é similar à do paraquat, apresentado dois picos de redução com características de processo redox reversível, sendo que o primeiro pico ocorre em aproximadamente -0,6 V (vs Ag/AgCl) e o segundo pico de redução em -1,1 V (vs Ag/AgCl)⁴⁰. Estes potenciais podem ter os valores deslocados para sentidos anódicos ou catódicos, dependendo da superfície eletródica empregada do eletrólito de suporte.

1.2 Voltametrias de Onda Quadrada

As técnicas eletroanalíticas envolvem o estabelecimento de relações entre a concentração do analito e algumas propriedades elétricas, tais como: corrente faradaica, potencial elétrico, condutividade e carga. Elas são utilizadas no estudo da influência das variações de potenciais sobre as correntes que fluem por uma célula eletroquímica e também no estudo da influência dos potenciais elétricos com relação à variação de tempo, quando saltos de potenciais são aplicados⁴¹.

A voltametria de onda quadrada (Square Wave Voltametry-SWV) é uma técnica de pulso em que a forma do pico de corrente resultante é proveniente da aplicação de potenciais de altura ΔE_s , que variam de acordo com uma escada de potencial com largura a e duração $2t$ (período). As correntes são medidas ao final dos pulsos diretos e reversos e o sinal é dado como uma intensidade da corrente resultante (ΔI), que é o sinal obtido pela diferença dos valores do pulso. Os valores de limite de detecção podem ser comparados aos das técnicas cromatográficas e espectroscópicas. Além disto, seu uso possibilita a avaliação cinética e mecanística de processos eletroquímicos de interesse⁸.

Nos anos 50, as respostas voltamétricas obtidas utilizando-se o eletrodo gotejante de mercúrio (EGM) e técnicas eletroanalíticas tinham uma intensa influência da corrente capacitiva residual, a qual prejudicava a sensibilidade das medidas voltamétricas. Neste contexto, iniciou-se uma série de estudos acerca de maneiras de diminuir a corrente capacitiva residual e assim melhorar a sensibilidade das análises voltamétricas. Para isto, o eletrodo de trabalho foi perturbado pela aplicação de uma programação de potenciais na forma de uma onda simétrica com frequência de 225 Hz sobreposta a uma rampa de potencial com variação lenta, e a corrente capacitiva foi medida ao final da vida de cada gota, a 1,94 milissegundos após cada mudança de potencial da onda quadrada. O sinal final foi definido como sendo a diferença das correntes obtidas entre cada semiciclo. Iniciou-se assim o desenvolvimento da polarografia de onda quadrada⁸. Em 1969, RAMALEY e KRAUSE, buscando eliminar os ruídos do capilar de mercúrio, utilizaram eletrodos estacionários e também substituíram a rampa linear de potencial por uma variação em forma de escada como ilustrada na FIGURA 2⁴².

Após estes trabalhos, em 1977, OSTERYOUNG et al.⁴³ estudaram as limitações da técnica chegando ao modelo atual da SWV, onde a aplicação de pulsos de potenciais de altura a (amplitude) é constante em uma escada de potenciais com largura ΔE_s (incremento de varredura) e duração 2τ . As correntes são medidas como uma resultante entre aquelas obtidas na aplicação do pulso no sentido direto e reverso ao da escada de potenciais como apresentado na FIGURA 2.

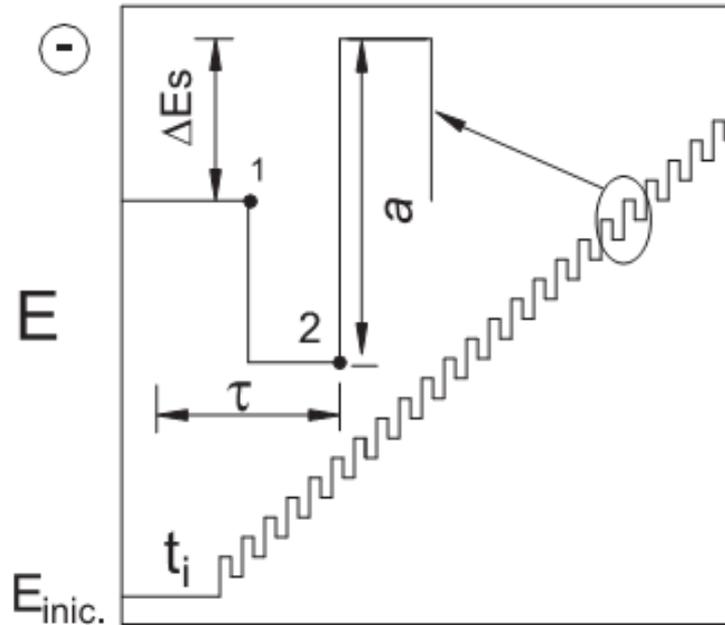


FIGURA 2- Forma de aplicação do potencial na SWV onde a - amplitude, ΔE_s - incremento de varredura e τ é o período⁸.

A FIGURA 3 apresenta o perfil característico obtido para um voltamograma teórico associado a processo redox de um sistema totalmente reversível, no qual se observam as componentes de corrente direta, reversa e resultante. As curvas de corrente-potencial ou voltamogramas apresentam perfis voltamétricos bem definidos e são simétricas devido às correntes serem medidas ao final de cada semi-período e as variações na largura do pulso de potencial são sempre constantes, para um determinado intervalo de potenciais⁸.

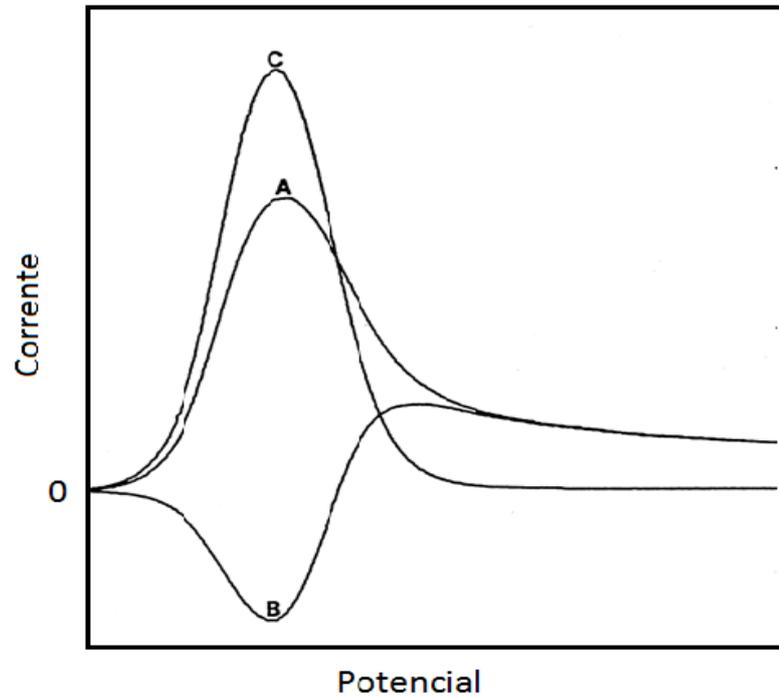


FIGURA 3-Voltamograma de onda quadrada para um sistema redox totalmente reversível onde: (a) corrente direta; (b) corrente reversa e (c) corrente resultante.

Na voltametria de onda quadrada, a corrente dos pulsos direto e reverso é medida de tal forma que a informação obtida é similar àquela obtida por experimentos de voltametria cíclica. O aumento na sensibilidade depende da reversibilidade do processo redox.

A técnica de SWV vem sendo cada vez mais utilizada pelos eletroanalíticos devido às suas vantagens tais como: capacidade em realizar uma varredura completa do potencial em poucos segundos e a redução do ruído de fundo em medidas sucessivas.

1.3 Eletrodos de Diamante Dopado com Boro

O Diamante é uma forma alotrópica do carbono, possuindo elevada densidade atômica, de alta dureza e resistência mecânica. A sua alta estabilidade contra ataques químicos o caracteriza como um material praticamente inerte. Por ser naturalmente um isolante, este material não fornecia os requisitos

necessários para a fabricação de um eletrodo e sua utilização em eletroquímica não despertava interesse.

A dopagem do diamante com o boro, ou outro agente dopante, torna o diamante um material semicondutor. A melhora das características de condutibilidade e outras propriedades eletroquímicas podem ser verificadas a partir dos níveis de dopagem⁴⁴. Os agentes de dopagem podem ser vários elementos tais como: enxofre, nitrogênio, fósforo, lítio e boro, sendo o boro o mais utilizado⁴⁵.

A partir da década de 50, o desenvolvimento de técnicas de síntese eficientes e baratas permitiu o desenvolvimento de filmes finos de diamante sintético que hoje vem sendo utilizado em diversas áreas como: farmacêutica⁴⁶, alimentícia⁴⁷, meio ambiente⁴⁸ e eletroquímica^{47, 49}.

Atualmente, dois métodos são comumente utilizados para crescimento do filme de diamante: crescimento a alta pressão/alta temperatura (HPHT do inglês *High Pressure/High Temperature*) e a deposição química a partir da fase de vapor (CVD do inglês *Chemical Vapor Deposition*)⁵⁰.

A técnica HPHT necessita de temperaturas iguais ou superiores a 1670 K e pressões muito altas em torno de 5×10^9 Pa, enquanto a CVD trabalha em temperaturas na ordem de 1270 K e pressões subatmosféricas, da ordem de 1000 a 10000 Pa⁵⁰.

A técnica CVD vem sendo a mais utilizada e continuamente aperfeiçoada com a implementação de novos reatores e a busca de novas fases de vapor⁵⁰. Uma representação esquemática do processo CVD é mostrada na FIGURA 4, onde se pode observar na região 1 a injeção de uma mistura de gases, geralmente composto de hidrogênio e hidrocarbonetos, em seguida passa-se à região 2, onde há o processo de ativação da mistura gasosa, que consiste na dissociação do hidrogênio molecular em hidrogênio atômico e também a dissociação dos hidrocarbonetos. Por difusão, passando à região 3, o hidrogênio

atômico e o radical metila chegam ao substrato, o qual é colocado a uma distância previamente definida da região de ativação. Desta forma, terá início o processo de nucleação, com posterior coalescência (processo em que duas ou mais partículas ou gotículas fundem-se, formando apenas uma única gotícula) e crescimento dos grãos do filme de diamante policristalino, sobre o substrato empregado⁵⁰.

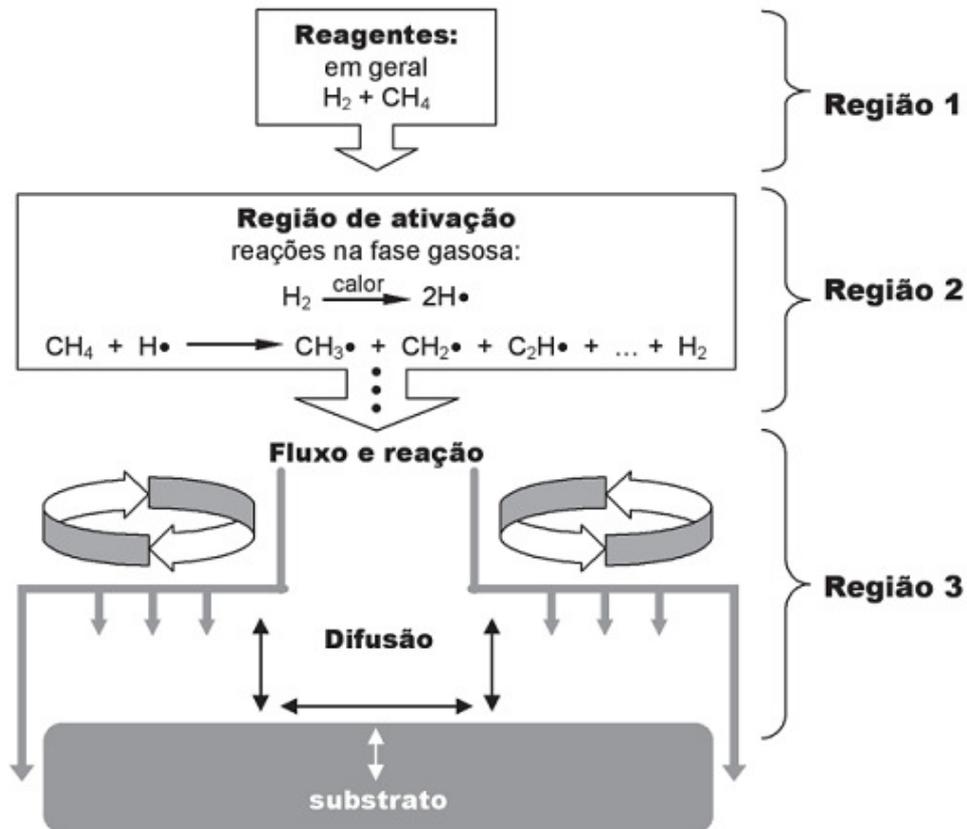


FIGURA 4- Esquema geral do processo de deposição de filme de diamante, a partir do método CVD⁵⁰.

Em geral, os reagentes gasosos utilizados são metano altamente diluído em hidrogênio. No entanto, podem ser empregadas outras substâncias orgânicas como fonte de carbono, ou juntamente com o metano, tais como metanol, acetona, etanol⁵⁰. O processo de dopagem inicia-se no momento em que o agente dopante é acrescido à mistura de reagentes gasosos e inserida no reator. Durante esse processo os níveis de dopagem podem sofrer variações de

10 a 20000 ppm, sendo definida ao inserir a mistura no reator⁵¹.

Ao realizar a dopagem, o eletrodo de diamante dopado com boro sofrerá mudanças na sua resistividade elétrica como, por exemplo, de 10^4 ohm cm (para uma dopagem moderada de 10^{18} átomos de boro por cm^3) a poucos milésimos de ohm cm (para forte dopagem de 10^{21} átomos de boro por cm^3)⁵². Esta variação no nível de dopagem traz um ganho nas propriedades dielétricas, semicondutoras, semimetálicas, além do aumento da dopagem favorecer o seu uso em eletroanalítica.

Neste contexto, os eletrodos de diamante dopado com boro vêm recebendo grande atenção devido as suas propriedades únicas tais como: fraca adsorção, estabilidade em meios corrosivos, baixa corrente de fundo, estabilidade estrutural e morfológica a altas temperaturas e amplo intervalo de potencial em eletrólitos aquosos ou não aquosos^{53, 54}.

O pré- tratamento eletroquímico aplicado ao eletrodo de diamante dopado com boro, é um ponto fundamental na aplicação analítica deste eletrodo^{55, 56}. Este método pode ser o anódico ou/e catódico que geram terminações na superfície do eletrodo, sendo que a terminação de hidrogênio traz ao eletrodo uma característica hidrofóbica e elevada condutibilidade, enquanto a terminação em oxigênio gera uma tendência hidrofílica e baixa condutibilidade^{57, 58}. Com os pré-tratamentos realizados, o eletrodo de DDB vem alcançando baixos limites de quantificação, além de melhorar a reprodutibilidade e seletividade⁵⁷ e o processo de transferência de carga⁵⁵.

Por estas razões, o eletrodo de DDB vem sendo amplamente usado na determinação de pesticidas como na substituição do uso de eletrodos a base de mercúrio na análise de nitrofenóis por DDB obtendo bons resultados⁵⁹ ou na determinação de pesticidas em comida fresca em nível traço³³. A análise de pesticidas, como o pentachorofenol, em água, vem sendo realizado com bons limites de detecção e recuperação utilizando estes eletrodos⁴⁹.

1.4 Quimiometria

A quimiometria é uma área da química que se refere à aplicação da estatística e de outros métodos que utilizam a lógica formal para planejar ou selecionar experimentos de forma otimizada e para fornecer o máximo de informação de um conjunto de dados. A quimiometria vem sendo usada com sucesso, tanto na indústria como na área acadêmica, onde o desenvolvimento de diversas ferramentas para tratamento de dados pode ser utilizado em diversas áreas como⁶⁰ otimização de processos, classificação e construção de modelos de regressões⁶¹.

1.4.1 Planejamento Experimental

O planejamento de experimentos consiste em uma ferramenta que permite propor, de forma otimizada, experimentos que devem ser realizados para determinar, e mesmo quantificar, a influência das variáveis sobre as respostas desejadas. O planejamento experimental possui as seguintes vantagens⁶²:

- 1 - redução do número de experimentos ou repetições;
- 2 - análise dos fatores que simultaneamente permite determinar e quantificar os efeitos sinérgicos ou cruzados;
- 3 – possibilitar a análise de mais de uma resposta ao mesmo tempo;
- 4 - permite calcular e avaliar os erros experimentais.

Um tipo particular de planejamento experimental, conhecido como planejamento fatorial, é de grande utilidade em investigações preliminares quando se deseja saber se determinado(s) fator (es) tem ou não influência sobre a resposta(s) desejada(s), mas a descrição rigorosa desta influência não é necessária⁶³.

Em um planejamento fatorial, são investigadas as influências de todas as variáveis experimentais de interesse e os efeitos de interação nas

respostas⁶⁴. Neste caso, cada variável varia entre dois ou mais níveis. O número de experimentos é calculado pela expressão n^k , em que n é o número de níveis a serem estudados e k , o número de variáveis. Normalmente, em uma primeira abordagem, os planejamentos são estudados em dois níveis, porque, dependendo da quantidade de variáveis, o número de experimentos torna-se grande e o procedimento fica inviável. Caso haja necessidade, o planejamento fatorial em 2 níveis pode ser estendido a um número maior de níveis utilizando, por exemplo, uma rotação dos valores iniciais, conhecido como planejamento estrela⁶⁵.

Os experimentos fatoriais 2^k permitem a estimativa de todos os efeitos principais, as interações de dois fatores e as de três fatores. Normalmente, os níveis das variáveis são nomeados pelo nível inferior (-) e nível superior (+), não sendo este um critério definitivo à nomeação⁶⁵. Como exemplo, apresenta-se na TABELA 1 um planejamento no qual são realizadas todas as combinações possíveis de um planejamento 2^2 .

TABELA 1- Matriz de planejamento 2^2

Ensaio	Variáveis	
	1	2
1	-1	-1
2	1	-1
3	-1	1
4	1	1

A partir dos resultados obtidos, pode ser construído um modelo empírico. Neste caso, como foram usados somente dois níveis de variáveis o modelo deverá ser linear e no máximo conter os termos de interação entre a variável 1 e 2. Um modelo deste tipo está ilustrado na Equação 1 e foi baseado na matriz de planejamento contida na TABELA 1.

$$y = b_0 + b_1 x_1 + b_2 x_2 + b_{12} x_1 x_2 + e$$

Equação 1

Onde b_0 é o valor da média das respostas e os b_1 e b_2 são os coeficientes relacionados ao efeito principal; já b_{12} está relacionado ao efeito de interação enquanto e é o erro aleatório associado ao modelo⁶⁵.

A partir da matriz de planejamento apresentada na TABELA 1, obtém-se a matriz de contraste X, juntamente com um vetor de resposta y, que é a resposta experimental obtida. Esta matriz é utilizada para o cálculo dos coeficientes do modelo como base na Equação 2.

$$b = (X^t X)^{-1} X^t y$$

Equação 2

1.4.2 Metodologia para Superfície de resposta

A partir das respostas obtidas como o planejamento fatorial, pode haver a necessidade de otimizar os valores de respostas obtidos. Neste caso, a técnica quimiométrica mais utilizada é a superfície de resposta (MSR do inglês *Response Surface Methodology*)⁶⁶. Este método foi desenvolvido na década de 50 por Box e Wilson^{63, 67} considerando-se o emprego de planejamentos fatoriais e atualmente vem sendo amplamente utilizado na construção de modelos em processos industriais. O princípio da técnica é o ajuste das respostas obtidas com os dados experimentais através de equações polinomiais⁶⁸.

Neste sentido, muitos sistemas exibem respostas que são funções não de um, mas de duas ou mais variáveis. Desta forma, a aplicação de modelos empíricos pode ser representada por uma função $f(x)$ que possua uma relação entre as variáveis experimentais e a resposta observada em uma dada região experimental⁶⁹.

Um modelo polinomial contendo apenas termos lineares descreve uma relação linear entre as variáveis x_1 e x_2 e pode ser expresso por⁶⁹:

$$y = b_0 + b_1 x_1 + b_2 x_2 + \text{resíduo}$$

Equação 3

Se este modelo ajusta bem os dados experimentais, encerra-se o processo de busca. Caso contrário, é necessário incluir outros termos descritores na equação. De forma geral, o modelo seguinte (Equação 1) em complexidade é aquele que inclui os termos de interação de primeira ordem.

Claramente, alguns conjuntos de dados experimentais apresentam um máximo ou um mínimo no comportamento da respostas. Neste caso, o modelo empírico deve ser de segunda ordem, como o descrito abaixo⁷⁰:

$$y = b_0 + b_1 x_1 + b_2 x_2 + b_{11} x_1^2 + b_{22} x_2^2 + b_{12} x_1 x_2 + \text{resíduo}$$

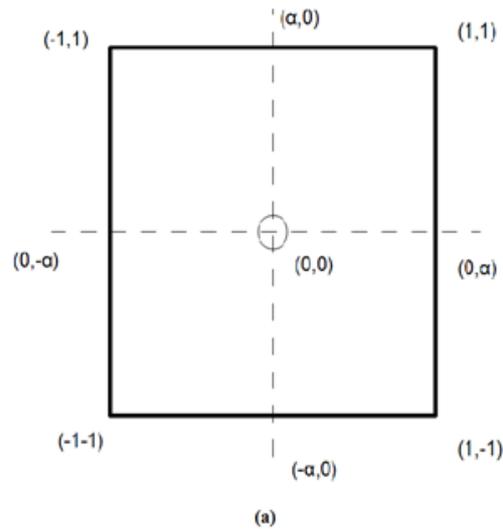
Equação 4

Um planejamento fatorial em 2 níveis não pode levar à construção de um modelo de segunda ordem. Neste caso, os planejamentos centrais múltiplos (CCD-*central composite design*) são os mais utilizados^{71, 72}.

A FIGURA 5 ilustra os pontos experimentais no sistema de coordenadas definidas pelos eixos x_i . No CCD, acrescenta-se ao planejamento inicial um planejamento idêntico, porém com rotação de 45 graus em relação à orientação de partida⁶⁴.

O CCD foi introduzido por Box e Wilson⁷⁰ na década de 50. Este planejamento é constituído de três partes, como pode ser observado na FIGURA 5, onde:

- (1) planejamento fatorial;
- (2) planejamento estrela, formado por $n=2k$ pontos com todas as suas coordenadas nulas exceto uma, que é igual a α e $-\alpha$;
- (3) ponto central.



Planejamento CCD		
X1	X2	
-1	-1	} Planejamento fatorial
1	-1	
-1	1	
1	1	
-α	0	} Pontos axiais
α	0	
0	-α	
0	α	
0	0	} Pontos centrais
0	0	
0	0	

FIGURA 5-Em (a) Planejamento CCD (k=2) (b) Matriz de planejamento CCD.

Neste planejamento, os níveis α necessitam ser decodificados para os valores experimentais nestes níveis, sendo, portanto, necessário o uso da Equação 5:

$$x_i = \frac{z_i - \bar{z}}{\frac{\Delta z}{2}}$$

Equação 5

Onde x_i é o valor codificado do planejamento CCD, z_i é o valor experimental do nível e \bar{z} valor médio entre os níveis superior (+) e inferior (-), e Δz é a diferença entre os níveis superior (+) e inferior (-)⁶⁴.

O CCD é um planejamento eficiente, pois a partir de suas análises é possível testar a qualidade do modelo através da Análise de Variância (ANOVA)⁷³.

A análise de variância (ANOVA) é uma maneira confiável de avaliar a qualidade do ajuste do modelo construído. O teste ANOVA é definido como a soma quadrática de dois componentes: regressão (SQ_{regr}) e soma quadrática dos resíduos (SQ_{res}), como descrito pela Equação 6 .

$$SQ_{\text{total}} = SQ_{\text{regr}} + SQ_{\text{res}}$$

Equação 6

Onde SQ_{regr} e SQ_{res} podem ser descritas pelas Equações 7 e 8.

$$SQ_{\text{regr}} = \sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^{r_i} (\mathcal{Y}_i - \bar{y})^2$$

Equação 7

$$SQ_{\text{res}} = \sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^{r_i} (y_{ij} - \hat{y}_i)^2$$

Equação 8

Onde \bar{y} é a média das respostas, \hat{y}_i é a resposta prevista pela regressão e y_{ij} resposta para a j-ésima resposta obtida para o i-ésimo ensaio

A partir dos parâmetros acima calculados, podemos realizar os testes para a validação do modelo com base na TABELA 2 . Neste caso, considerando a precisão desejada e o número de graus de liberdade, pode-se concluir que o modelo é válido quando o $F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}}$ sendo que nem sempre a significância pelo teste F é útil para realizar previsões devido à extensão do erro experimental que pode estar mascarada. Uma regra prática usada por Box et al.⁶³ é considerar a regressão como útil para fins de previsão se o valor do F_{calc} for pelo menos de cerca de dez vezes o valor do F_{tab} com o número apropriado de graus de liberdade.

TABELA 2 - Tabela de análise de variância para um modelo linear

Fontes de Variação	Soma Quadrática	GL	Média Quadrática	Fcalc
Regressão	$\sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^{r_i} (\hat{y}_i - \bar{y})^2$	p-1	$MQ_{reg} = \frac{SQ_{reg}}{p-1}$	$F_{calc} = \frac{MQ_{reg}}{MQ_{res}}$
Resíduos	$\sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^{r_i} (y_{ij} - \hat{y}_i)^2$	n-p	$MQ_{res} = \frac{SQ_{res}}{n-p}$	
Total	$SQ_{reg} + SQ_{res}$	n-1		

Na TABELA 2 consta a análise de variância para regressão e resíduo, sendo possível o desdobramento da soma quadrática do resíduo em duas novas contribuições, que são a falta de ajuste e o erro puro, formando a versão completa da ANOVA apresentada na TABELA 3.

TABELA 3 - Análise da variância para o ajuste, pelo método dos mínimos quadrados onde n_i = número de repetições no nível; m = número de níveis distintos da variável independente; n = número total de observações; p = número de parâmetros do modelo.

Fontes de Variação	Soma Quadrática	GL	Média Quadrática	Fcalc
Regressão	$\sum_i^m \sum_j^{n_i} (\hat{y}_i - \bar{y})^2$	p-1	$MQ_{reg} = \frac{SQ_{reg}}{p-1}$	$F_{calc} = \frac{MQ_{reg}}{MQ_{res}}$
Resíduos	$\sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \hat{y}_i)^2$	n-p	$MQ_{res} = \frac{SQ_{res}}{n-p}$	
Falta de ajuste	$\sum_i^m \sum_j^{n_i} (\hat{y}_i - \bar{y}_i)^2$	m-p	$MQ_{falt} = \frac{SQ_{falt}}{m-p}$	$F_{calc} = \frac{MQ_{falt}}{MQ_{err}}$
Erro puro	$\sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \bar{y}_i)^2$	n-m	$MQ_{err} = \frac{SQ_{err}}{n-m}$	
Total	$SQ_{reg} + SQ_{res}$	n-1		
%variação explicada	$\frac{SQ_{reg}}{SQ_{total}}$			
%máxima de variação explicável	$\frac{SQ_{total} - SQ_{err}}{SQ_{total}}$			

1.5 Calibração Multivariada

Nos últimos anos, a calibração multivariada vem sendo difundida em diversas áreas^{74, 75, 76}. O processo de calibração tem por objetivo estabelecer, sobre condições específicas, uma relação matemática entre os dados experimentais (medidas instrumentais) e os valores relacionados aos parâmetros físicos ou químicos de interesse, previamente determinados por uma técnica independente⁷⁷.

A calibração, em linhas gerais, relaciona a matriz de dados experimentais (X), conhecida como as variáveis independentes, com as variáveis medidas (matriz Y), formada pelas variáveis dependentes⁶⁴.

Entre os métodos de calibração, temos os univariados e os multivariados. Os métodos univariados possuem apenas uma resposta instrumental relacionada a cada amostra, enquanto os métodos multivariados permitem a utilização de múltiplas respostas para relacionar as propriedades medidas das amostras, como pode ser observado na FIGURA 6, sendo esta a sua grande vantagem frente ao método univariado⁷⁷.

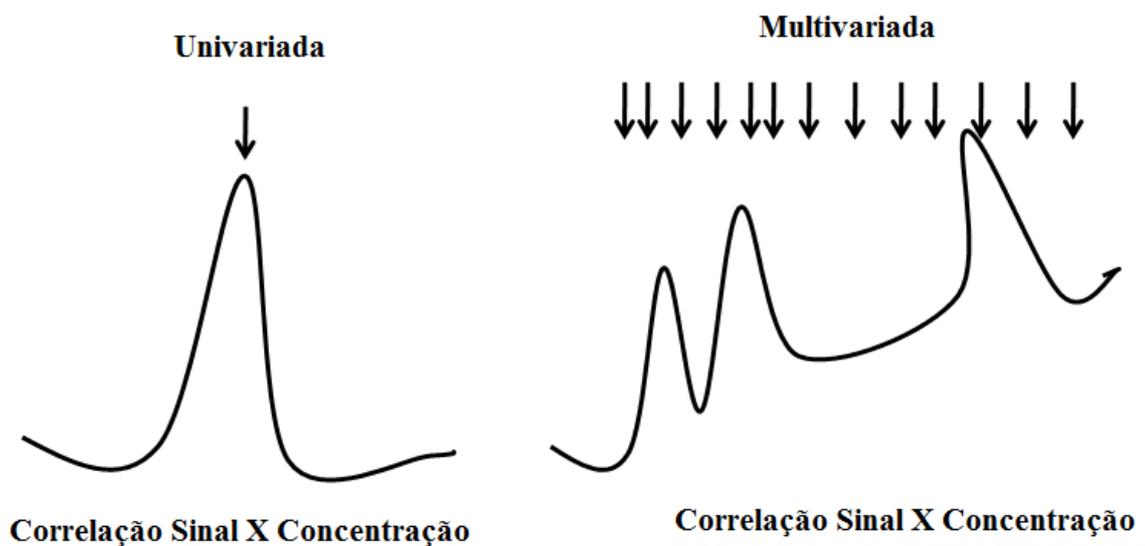


FIGURA 6 - Correlação sinal versus resposta para calibração univariada e multivariada.

1.5.1 Pré-Tratamento de dados

O pré-tratamento de dados é constituído de qualquer manipulação matemática antes de qualquer análise preliminar dos dados. O pré-tratamento pode ser dividido em transformações e pré-processamento.

Diferentes técnicas são utilizadas nesta etapa, sendo uma das mais utilizadas centrar os dados na média. Este pré-processamento é utilizado com o objetivo de eliminar um fator constante dos dados (*offset*) e transladar os dados da origem natural para a média (Equação 9).

$$x_{ij}(cm) = x_{ij} - \bar{x}_j$$

Equação 9

onde: $x_{ij}(cm)$ = valor centrado na média para a variável j na amostra i ;

x_{ij} = valor da variável j na amostra i ;

\bar{x}_j = média dos valores das amostras na coluna j ;

No caso das transformações de dados, os métodos matemáticos empregados são orientados à linha da matriz de dados \mathbf{X} . A primeira derivada é uma das mais utilizadas, pois permite deslocar toda a resposta experimental de uma quantidade constante (*offset*).

1.5.2 Análise de Componente principal- PCA e Regressão por Mínimos Quadrados Parciais – PLS

A análise por componentes principais (PCA) é uma técnica multivariada que possui como ideia central a criação de um conjunto de coordenadas ortogonais a partir da matriz de dados, o que permite a observação

de correlação entre as variáveis e, além disto, leva a uma redução na dimensionalidade dos dados⁷⁸. As variáveis originais são linearmente transformadas em um número menor de variáveis, que recebem o nome de componentes principais (PCs do inglês Principal Component), sendo descritas pela Equação 10. As componentes principais possuem como característica a ortogonalidade, além da obtenção dos PCs em ordem decrescente de variância, o que significa que a primeira PC detém o maior número de informações dos dados do que a segunda e assim sucessivamente^{79, 80}.

A PCA consiste de uma matriz de dados X decomposta em uma matriz T conhecida como a matriz de escores (*scores*), P a matriz de pesos (*loadings*)⁸¹ demonstrados na Equação 10. Os escores estão relacionados com a posição ocupada pelas amostras nos novos eixos e a informação, do quanto cada variável original contribui para a formação de cada novo eixo, está presente nos pesos. Os escores expressam as relações entre as amostras, enquanto os pesos mostram as relações entre as variáveis originais, como pode ser observado na FIGURA 7⁸².

$$X = \sum_{i=1}^A T * P^t$$

Equação 10

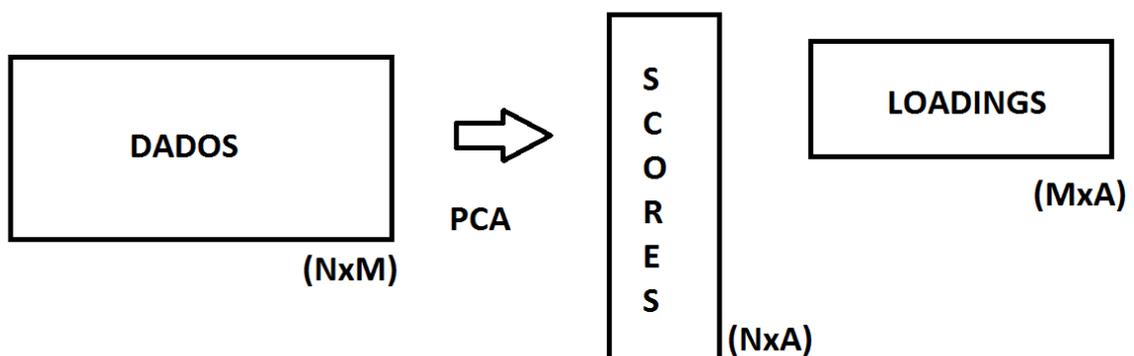


FIGURA 7- Representação esquemática dos Princípios da PCA onde A é o número de componentes.

Para apresentar os novos eixos, na FIGURA 8 temos o T (scores), P^t (pesos) que ilustra no plano bidimensional duas variáveis x_1 e x_2 . A FIGURA 8A mostra uma componente principal que é a reta que aponta para a direção de maior variabilidade das amostras da FIGURA 8B. Os "scores" T são as projeções das amostras na direção da componente principal e os P^t "pesos" são os cossenos dos ângulos formados entre a componente principal e cada variável.

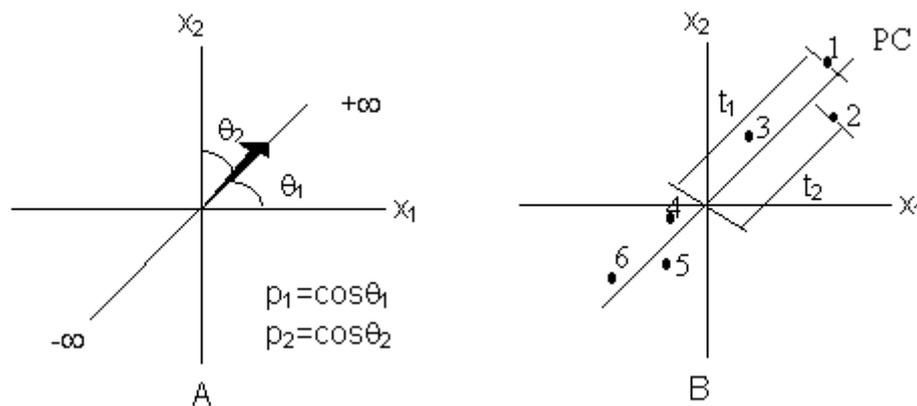


FIGURA 8- Representação de uma PC no caso de duas variáveis: (A) os loadings são os ângulos do vetor direção; (B) os scores são as projeções das amostras.

Vários algoritmos são utilizados para realizar uma PCA, sendo que os mais utilizados são o Nipals⁸³ (do inglês *Nonlinear Iterative Partial Least Squares*) e o SVD (Decomposição por valores singulares)⁸⁴. A PCA vem sendo aplicada em várias áreas com objetivos tais como: redução do número de dados e análise de imagens^{78, 85}.

A regressão por mínimos quadrados parciais (PLS) é o método mais utilizado atualmente em calibração multivariada. Neste método, os sinais obtidos (variáveis \mathbf{X}) e concentrações (variáveis \mathbf{Y}) podem ser utilizados para obtenção de um modelo linear⁸⁶.

A regressão PLS consiste basicamente em três etapas. A primeira delas consiste em montar as matrizes de dados \mathbf{X} (a partir das variáveis

independentes) e Y a partir das propriedades de interesse (variáveis dependentes). A próxima etapa consiste em eliminar informações que não são relevantes ao sistema, através de combinações lineares das colunas da matriz X feita pela análise de componente principal (PCA), presente na FIGURA 9 e descrita pela Equação 11, e da combinação linear da matriz Y , presente na FIGURA 10 e descrita pela Equação 12. A terceira etapa consiste em obter a relação entre a matriz X e a matriz Y reduzida pela PCA, a qual pode ser descrita pela Equação 13⁸².

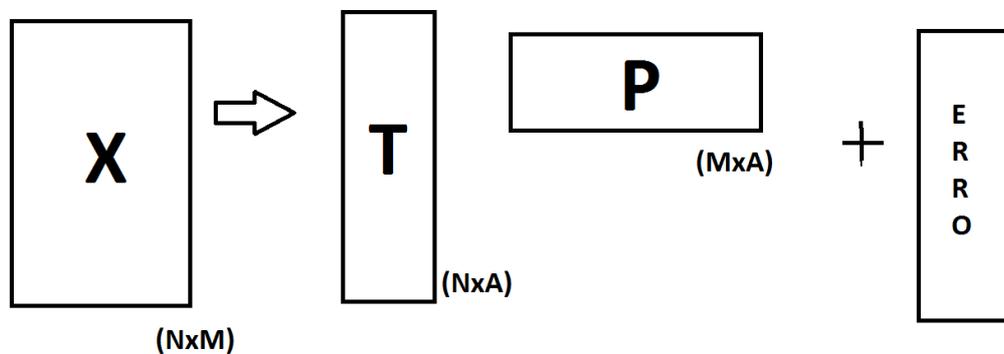


FIGURA 9-Método PLS (a) relação externa-decomposição de X .

$$X = T * P^t + E$$

Equação 11

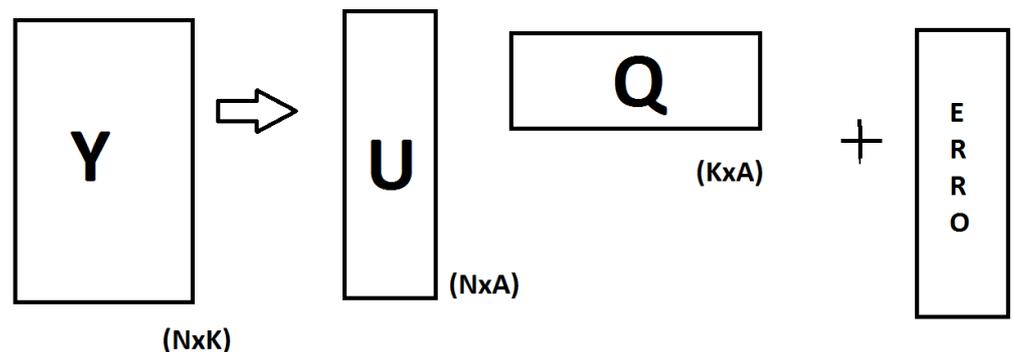


FIGURA 10- Método PLS relação externa- decomposição de Y .

$$Y = U * Q^t + R$$

Equação 12

$$U = b * T$$

Equação 13

Nas FIGURA 9 e 10 podemos observar os elementos das matrizes T e U que representam os *scores* das matrizes X e Y respectivamente, e as matrizes P e Q representam os *loadings*. As matrizes E e R representam os erros e o t indica a presença de uma matriz transposta. Na Equação 13, temos a relação linear entre as matrizes X e Y obtida através do b que representa o coeficiente de regressão.

A técnica PLS pode ser subdividida em duas variantes: PLS₁, em que a regressão é feita para uma variável dependente de cada vez (a matriz Y é um vetor coluna), e PLS₂, onde todas são calculadas simultaneamente⁸².

Para uma melhor correlação dos dados, faz-se necessária a manipulação das matrizes X e Y simultaneamente, na busca de uma maior covariância. No PLS, isso é realizado com uma leve rotação das componentes principais, levando a uma pequena distorção da ortogonalidade. Devido a isso, as componentes principais passam a ser chamadas de variáveis latentes.

O número de variáveis latentes a ser utilizado é determinado no momento da validação do modelo. A validação pode ser de dois tipos: a validação cruzada e a validação externa. O processo de validação é utilizado com o objetivo de realizar uma verificação no modelo (regressão realizada) com amostras que não foram incluídas na calibração.

A validação cruzada é realizada a partir da divisão da matriz de dados em pequenos grupos. Então, um determinado grupo é removido da matriz original, sendo agora realizado o PLS estabelecendo um modelo de calibração. A partir deste modelo de calibração construído, as amostras que foram retiradas sofrem o processo de previsão e os resíduos são calculados entre os valores reais e os valores estimados, sendo este procedimento repetido para todos os pequenos grupos. A validação cruzada pode ser feita retirando-se uma, duas ou mais amostras de cada vez, dependendo do conjunto de dados utilizados⁶⁴.

No caso da validação externa, o conjunto de dados é dividido em dois subconjuntos: um conjunto para calibração e outro para validação. O modelo é construído com base no conjunto de calibração e depois é validado com as amostras restantes do conjunto de validação. Os resultados obtidos nesta etapa são comparados aos valores reais, sendo o resíduo calculado.

Nos dois casos de validação citados acima, a eficácia do modelo é maior quanto menores forem os resíduos encontrados. Para avaliar esta eficácia dos modelos, os parâmetros utilizados são o PRESS (do inglês *Prediction Residual Error Sum of square*) (Equação 14), o RMSEV (do inglês *Root mean Square of Cross Validation*) (Equação 15) e o RMSEP (do inglês *Root Mean Square of Prediction*) (Equação 16)^{86, 87}.

$$PRESS = \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2$$

Equação 14

$$RMSEV = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (y_{cal,i} - \hat{y}_{cal,i})^2}{N - df}}$$

Equação 15

$$RMSEP = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^M (y_{pred,i} - \hat{y}_{pred,i})^2}{M}}$$

Equação 16

Onde y_i é o valor de referência da amostra i :

\hat{y}_i é o valor de previsão para a amostra i utilizando o modelo;

N é o número de amostras do conjunto de calibração;

df é o número de graus de liberdade definido pelo número de fatores utilizado menos 1;

M é o número de amostras do conjunto de predição.

Após a validação, é possível a utilização do modelo construído na previsão de propriedades modeladas em amostras onde este valor é

desconhecido. Para isso, é preciso reunir os dados (voltamogramas) em uma matriz e introduzi-los, no computador, submetendo-os à determinação das concentrações usando o modelo construído.

2 Objetivos

O trabalho desenvolvido tem como objetivo avaliar o uso de métodos quimiométricos para a determinação simultânea dos pesticidas paraquat e diquat a partir das suas respostas voltamétricas utilizando eletrodo de diamante dopado com boro.

3 Materiais e Métodos

Neste capítulo são apresentados, a instrumentação, os materiais e os reagentes utilizados na otimização dos parâmetros voltamétricos, e na determinação simultânea dos pesticidas paraquat e diquat.

3.1 Reagentes e Soluções

Todos os reagentes químicos utilizados foram de grau analítico sem nenhuma purificação prévia. Os padrões de Paraquat e Diquat foram obtidos da empresa Sigma-Aldrich, com 99% de pureza. O tetraborato de sódio ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$) e o ácido sulfúrico (H_2SO_4) foram adquiridos da Merck com 99,5% e da Sigma-Aldrich 95-98% respectivamente. A água utilizada para o preparo das soluções foi purificada pelo sistema de Osmose Reversa Gehaka[®] modelo OS 20 LX FARMA.

Para o pré-tratamento do eletrodo, foi utilizada uma solução de H_2SO_4 0,5 mol L^{-1} . Uma solução de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 0,1 mol L^{-1} foi utilizada como eletrólito suporte. Os padrões de pesticidas foram utilizados na preparação de soluções estoque nas concentrações de 0,01 e 1×10^{-4} mol L^{-1} .

3.2 Eletrodos

Para as medidas voltamétricas, foi utilizada uma célula eletroquímica em borosilicato com capacidade para 40 mL com uma tampa em politetrafluoretileno adequada aos eletrodos empregados (FIGURA 11).

Como eletrodo de trabalho, utilizou-se um eletrodo de Diamante Dopado com Boro (DDB), apresentado na FIGURA 12, comercialmente obtido da Amaranant technologic com nível de dopagem de boro entre 6000 e 8000 ppm. O DDB passou por um tratamento eletroquímico prévio para ativação e estabilização da superfície eletródica. Tal tratamento constitui na aplicação de

um potencial anódico de 3 V por 5 segundos e de um catódico de -3 V por 10 segundos. Estes potenciais foram aplicados utilizando uma solução de H_2SO_4 0,5 mol L^{-1} . O tratamento foi efetuado no início de cada série de experimentos e sempre que necessário para remoção de produtos adsorvidos na superfície eletródica. Como eletrodo auxiliar foi usado um fio de platina e um eletrodo Ag/AgCl em KCl 3 mol L^{-1} como referência.

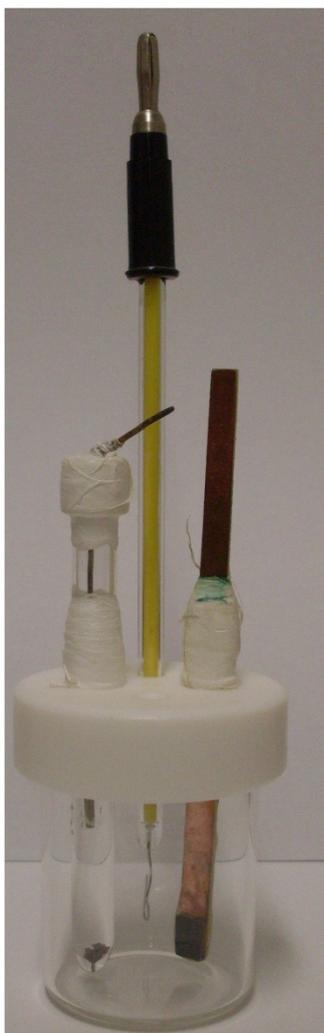


FIGURA 11- Célula eletroquímica utilizada nas medidas voltamétricas



FIGURA 12-Eletrodo de diamante dopado com boro

3.3 Instrumentação e programas

As medidas voltamétricas foram realizadas empregando-se a técnica de voltametria de onda quadrada, em um potenciostato/galvanostato PGSTAT302N da Metrohm-EcoChemie gerenciado pelo software GPES 4.9 (General Purpose Electrochemical System), também da Metrohm-EcoChemie.

Os tratamentos quimiométricos foram realizados utilizando os seguintes programas: planilhas do Calc do pacote BrOffice®⁶⁵, Pirouette® e o Statística 9.0 versão Trial.

3.4 Procedimentos Experimentais

3.4.1 Otimização dos parâmetros voltamétricos

Com o objetivo de otimizar a resposta em corrente, realizou-se um planejamento experimental com o objetivo de se conseguir um máximo de informações com poucos experimentos a respeito dos parâmetros que podem ser utilizados na voltametria de onda quadrada.

Inicialmente, foi realizado um planejamento fatorial englobando os parâmetros da técnica de voltametria de onda quadrada: frequência de aplicação do pulso de potencial (f), amplitude de pulso (a) e incremento de varredura de potencial (ΔE_s). Os parâmetros instrumentais a serem empregados no planejamento foram escolhidos baseados no conhecimento da técnica descrito na literatura^{33, 88} e estão apresentados na TABELA 4. Os experimentos realizados, por sua vez, estão apresentados na TABELA 5. Neste caso, considerando que foram estudados 3 parâmetros em 2 níveis, um total de 8 experimentos foram realizados. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

TABELA 4- Variáveis e níveis escolhidos para o planejamento fatorial.

Variáveis	Níveis	
	-1	1
Frequência / s ⁻¹ (1)	10	100
Amplitude / mV (2)	5	50
Incremento / mV (3)	2	8

TABELA 5- Matriz de planejamento fatorial para k=3

Ensaio	Variáveis		
	Frequência	Amplitude	Incremento
1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1
3	-1	1	-1
4	1	1	-1
5	-1	-1	1
6	1	-1	1
7	-1	1	1
8	1	1	1

O seguinte procedimento experimental foi utilizado: foram transferidos 20 mL do eletrólito suporte para a célula eletroquímica. O oxigênio foi removido, purgando-se gás N₂ durante 10 minutos. As medidas voltamétricas foram realizadas com varreduras de potenciais catódicas entre -0,3V e -1,2V. Os experimentos foram realizados em ordem aleatória para impedir que fatores não controlados contaminassem os efeitos que seriam investigados⁶³.

A partir dos dados obtidos, foram utilizadas planilhas do Calc do pacote BrOffice®⁶⁵ e Pirouette® para avaliar os valores dos efeitos e coeficientes obtidos a partir dos planejamentos realizados. Com base nos resultados obtidos e

significância dos dados, foram realizados novos experimentos utilizando um planejamento composto central (CCD) para obtenção da superfície de resposta. Por uma questão de facilidade da interface de uso, neste caso, foi usado o software Estatística 9.0 versão Trial.

3.4.2 Determinação simultânea dos pesticidas

Utilizando a técnica com os parâmetros otimizados foi realizado um planejamento CCD com o objetivo de determinar quantitativamente os valores de concentrações do paraquat e do diquat, simultaneamente, usando medidas eletroquímicas. Os valores das concentrações utilizados no CCD se encontram na TABELA 6. A utilização deste procedimento resultou em 9 experimentos, os quais são apresentados na TABELA 7.

TABELA 6-Variáveis e níveis escolhidos para o planejamento CCD.

Variáveis	Níveis				
	-1.41	-1	0	1	1.41
Paraquat/ $\mu\text{mol L}^{-1}$	1,96	5,82	15,14	24,46	28,32
Diquat/ $\mu\text{mol L}^{-1}$	1,96	5,82	15,14	24,46	28,32

TABELA 7 - Matriz de planejamento composto central com k=2.

Ensaio	Variáveis	
	Paraquat	Diquat
1	-1	-1
2	1	-1
3	-1	1
4	1	1
5	-1,414	0
6	1,414	0
7	0	-1,414
8	0	1,414
9	0	0

Um novo conjunto de dados foi obtido para a formação de um conjunto de amostras para validação, com as concentrações na TABELA 8 e a matriz de planejamento utilizada na TABELA 9. totalizando 5 experimentos.

TABELA 8-Conjunto de dados da matriz de validação

Variáveis	Níveis		
	-1	0	1
Paraquat/ $\mu\text{mol L}^{-1}$	3,89	11,84	19,80
Diquat/ $\mu\text{mol L}^{-1}$	3,89	11,84	19,80

TABELA 9 - Matriz de planejamento fatorial para validação.

Ensaio	Variáveis	
	Paraquat	Diquat
1	-1	-1
2	1	-1
3	-1	1
4	1	1
5	0	0

3.4.3 Tratamento dos dados

Inicialmente, foi realizado um pré-tratamento dos dados tanto com transformações como com pré-processamento. Inicialmente, os dados foram centrados na média e, em seguida, aplicou-se a primeira derivada.

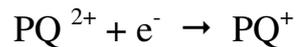
Após o pré-tratamento dos dados, foi aplicado o método PLS. Nesse caso, o número de fatores utilizados para a construção do modelo foi determinado por validação cruzada, a qual foi realizada aplicando-se o método *leave-one-out*⁶⁴, e que serviu para o cálculo do erro médio de validação cruzada (RMSEV). A previsão do modelo foi avaliada pelo erro médio de previsão (RMSEP) e pelo coeficiente de correlação(r).

4 - Resultados e Discussão

Neste capítulo, serão apresentados os resultados obtidos a partir do planejamento de experimentos e a aplicação desta metodologia para a determinação simultânea do paraquat e diquat.

4.1 Comportamento eletroquímico dos pesticidas paraquat e diquat

O paraquat existe em três estados de oxidação básicos PQ^{2+} , PQ^{+} , PQ com uma resposta voltamétrica bem definida com a presença de dois picos de redução, os quais possuem as características de um processo redox totalmente reversível⁸⁹. O primeiro pico, como pode ser observado na FIGURA 13, aparece em $-0,677V$ (vs. $Ag/AgCl$) e com largura de meia altura de $0,119 V$, nas condições experimentais utilizadas, é associado à redução eletroquímica da molécula na interface eletrodo-solução (seguido de um segundo pico em $-0,994V$ (vs. $Ag/AgCl$) que está associado à segunda transferência eletrônica,³⁹ demonstrados no esquema a seguir.



No processo anódico, pode surgir um pico em aproximadamente $0,9V$ com o seguinte processo $2 PQ^0 \rightarrow (PQ)_2^{2+} + 2e^{-}$ e um pico de oxidação em $-0,65 V$ explicado pela re-oxidação do PQ^{+} espécies: $PQ^{+} \rightarrow PQ^{2+} + e^{-}$. Um pico agudo aparece entre os dois picos acima referidos em $-0,75 V$, que foi previamente identificado como a oxidação de dois elétrons do cátion radical dímero: $(PQ)_2^{2+} \rightarrow + 2 PQ^{2+} + 2e^{-}$ formado pela comproportionation (uma reação química onde dois reagentes, cada um contendo o mesmo elemento, mas com um diferente número de oxidação, formarão um produto com um número

de oxidação médio dos dois reagentes.) de PQ^0 sobre o eletrodo com PQ^{2+} em solução³⁹.

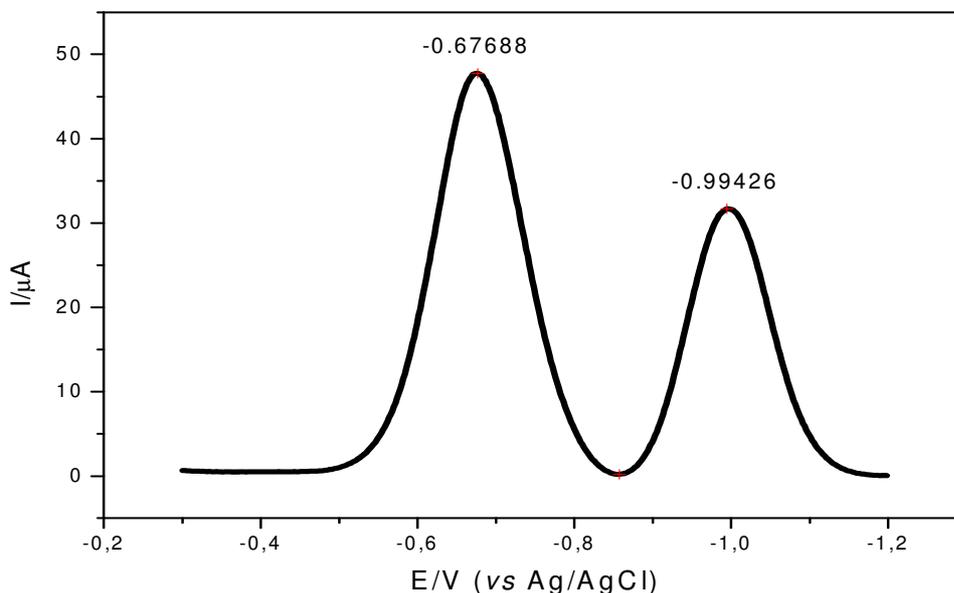


FIGURA 13-Voltamograma de onda quadrada obtido para o paraquat em meio de $Na_2B_4O_7$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com a técnica de SWV utilizando os seguintes parâmetros: $f = 100 \text{ s}^{-1}$, $a = 50 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$.

Por outro lado, o diquat possui um comportamento redox similar ao observado para o paraquat com a presença de dois processos redox com características de processos totalmente reversíveis. O primeiro pico, como observado pela FIGURA 14, encontra-se em aproximadamente $-0,583\text{V}$ (vs. Ag/AgCl) com uma largura de meia altura de $0,129 \text{ V}$, nas condições experimentais utilizadas, sendo o comportamento eletroquímico similar ao paraquat, seguido de um segundo pico em aproximadamente $-1,026\text{V}$ (Ag/AgCl)

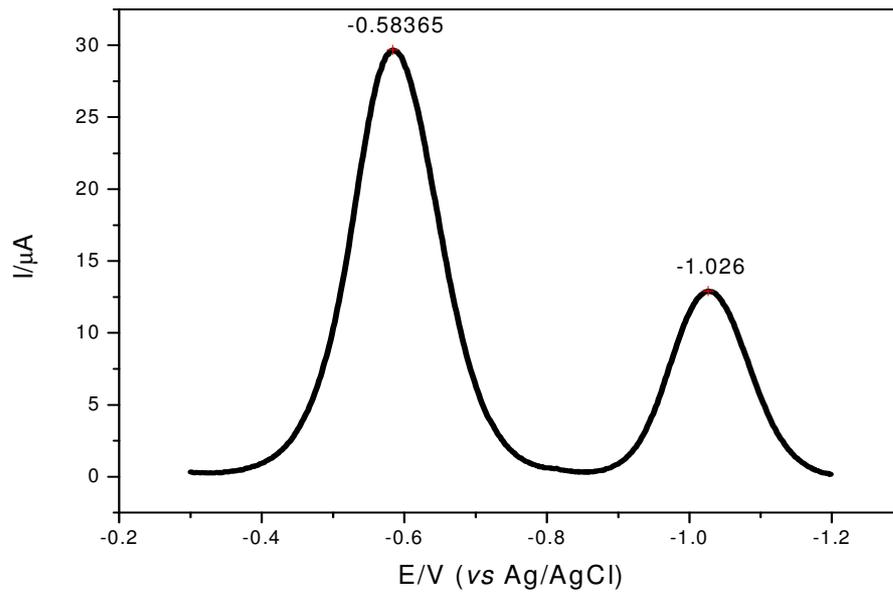


FIGURA 14- Voltamograma de onda quadrada obtido para o diquat em meio de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com a técnica de SWV utilizando os seguintes parâmetros: $f = 100 \text{ s}^{-1}$, $a = 50 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$.

Na FIGURA 15, é apresentado um voltamograma de onda quadrada obtido para a mistura paraquat/diquat, ambos com concentração de $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Pôde-se observar que ocorreu um alargamento no primeiro pico, o qual agora tem uma altura de meia altura de $0,190 \text{ V}$. Com relação ao segundo pico, existe a total sobreposição das ondas de redução e, além disso, a intensidade de corrente aumenta consideravelmente devido a esta sobreposição.

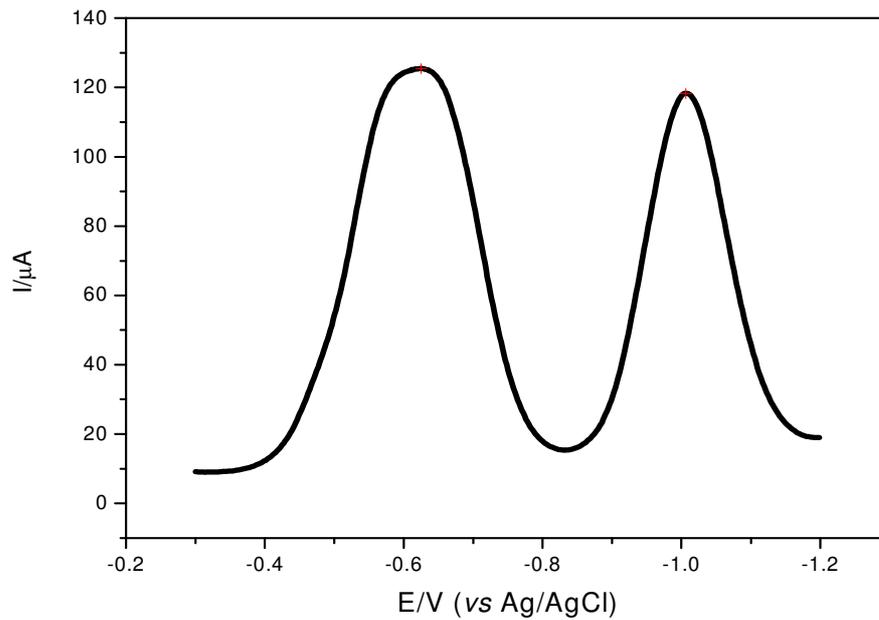


FIGURA 15- Voltamograma de onda quadrada obtido para a mistura em meio de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com a técnica de SWV utilizando os seguintes parâmetros: $f = 100 \text{ s}^{-1}$, $a = 50 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$.

Buscando uma solução para resolver a separação dos pesticidas paraquat e diquat, será descrito, nas próximas seções, um estudo dos parâmetros voltamétricos associados à técnica para melhorar a intensidade de corrente associada a ambas as substâncias. Esse estudo levou a uma separação parcial dos picos bem como aos valores de corrente associados aos processos. Em seguida, a determinação simultânea dos pesticidas será descrita utilizando técnicas quimiométricas.

4.2 Otimização dos parâmetros voltamétricos

Os parâmetros instrumentais estudados foram escolhidos e tiveram os seus níveis determinados a partir do conhecimento da técnica de voltametria de onda quadrada descritos na literatura^{33, 90}. Tais parâmetros são apresentados nas TABELAS 10 e 11 as quais contêm respectivamente as variáveis com os

valores escolhidos e a matriz de planejamento. No presente caso, está amplamente descrito na literatura⁹⁰ que 3 parâmetros: frequência, amplitude de pulso e o incremento de potenciais afetam a resposta de corrente em SWV. Desta forma, optamos por realizar um planejamento fatorial completo do tipo 2^3 , isto é, 3 variáveis estudadas em 2 níveis cada uma com o objetivo principal de fazer a triagem das variáveis que apresentam influência sobre a resposta voltamétrica nos voltamogramas obtidos pela voltametria de onda quadrada. É importante frisar que todos os experimentos foram realizados em duplicata como, descrito na parte experimental.

A frequência de aplicação dos pulsos de potencial é uma das mais importantes variáveis na SWV⁸. Isto ocorre porque, mantendo-se constante a concentração dos analitos, é ela quem determina a intensidade dos sinais, e conseqüentemente, a sensibilidade obtida nas análises.

O estudo da variação da amplitude de pulsos de potencial ajudará na avaliação do tipo de processo redox envolvido, já que, para sistemas totalmente irreversíveis, o aumento da amplitude pode deslocar os valores de potenciais de pico, provocar mudanças significativas nas larguras de meia-altura e, além disto, um aumento da amplitude também pode provocar aumento da corrente de pico.

Na SWV, a velocidade de varredura é definida em função da frequência de aplicação dos pulsos de potenciais e do incremento de varredura de potencial. Sendo assim, a otimização do incremento pode alterar significativamente a sensibilidade obtida nas análises.

TABELA 10-Variáveis e níveis escolhidos para o planejamento fatorial.

Variáveis	Níveis	
	-1	1
Frequência / s^{-1} (1)	10	100
Amplitude / mV (2)	5	50
Incremento / mV (3)	2	8

TABELA 11- Matriz de planejamento fatorial para k=3

Ensaio	Variáveis		
	Frequência	Amplitude	Incremento
1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1
3	-1	1	-1
4	1	1	-1
5	-1	-1	1
6	1	-1	1
7	-1	1	1
8	1	1	1

Inicialmente, foram realizadas as medidas voltamétricas para o paraquat com base na matriz de planejamento apresentada na TABELA 11. Analisando os voltamogramas obtidos, apresentados na FIGURA 16, pôde-se concluir que o aumento da frequência leva a um aumento na corrente de pico. Possivelmente, este aumento na corrente de pico ocorre devido ao fato de que a frequência está relacionada ao aumento da velocidade de varredura, ou seja, à intensidade da corrente e à sensibilidade da técnica de SWV⁸. Além disso, a combinação alta frequência e alta amplitude vistas no ensaio 8 e 4, presentes na FIGURA 16, levam a um aumento na corrente. O incremento presente nestes ensaios, nos níveis superior e inferior, não traz grande influência sobre as respostas de corrente. Por outro lado, observou-se nos ensaios 1 e 5, onde os sinais de corrente são baixos, que ocorre uma pequena corrente de pico, e o incremento de varredura de potenciais não trouxe grande influência sobre a corrente de pico. Já no ensaio 6, que combinou alta frequência e alto incremento com baixa amplitude, pôde-se observar a existência de um descolamento no valor de potencial para o primeiro pico.

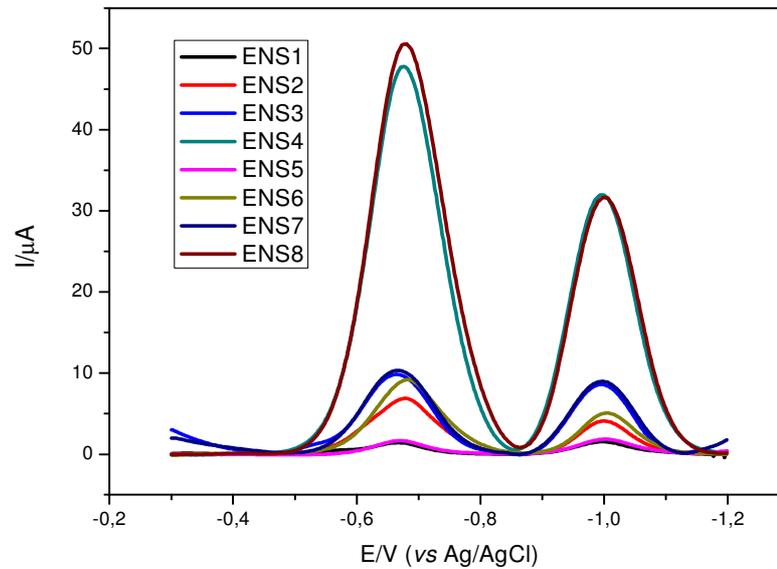


FIGURA 16- Voltamogramas de onda quadrada obtidos para o paraquat em meio de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com a técnica de SWV a partir da matriz de planejamento.

Após a obtenção dos conjuntos de voltamogramas para o paraquat, a corrente de pico foi analisada através do planejamento fatorial onde os valores de corrente obtidos podem ser observados na TABELA 12. A média das correntes de pico foi calculada utilizando as réplicas, e as respostas médias obtidas tiveram uma variância das observações de 1,53.

TABELA 12- Planejamento fatorial para o paraquat utilizando a corrente de pico.

Ensaio	Fatores			Respostas I_p		
	Frequência	Amplitude	Incremento	Réplica 1	Réplica 2	Média
1	-1	-1	-1	1,330	1,330	1,330
2	1	-1	-1	6,530	6,200	6,365
3	-1	1	-1	9,370	9,330	9,350
4	1	1	-1	47,50	44,60	46,05
5	-1	-1	1	1,600	1,610	1,605
6	1	-1	1	8,510	8,200	8,355
7	-1	-1	1	9,230	9,380	9,305
8	1	1	1	51,00	47,00	49,00

Utilizando os valores de I_p , foram calculados os efeitos, apresentados na TABELA 13. Nesta tabela, constam os valores de efeitos calculados com os devidos erros e teste t (Apêndice 1) . O teste t (student) foi calculado para testar a significância dos efeitos utilizando o procedimento bem estabelecido na literatura⁹¹. Neste caso, quando o $t_{\text{calculado}} > t_{\text{tabelado}}$ o efeito é considerado significativo. Pôde-se observar que os efeitos de frequência, amplitude e frequência combinada com a amplitude são significativos. Neste caso, aumento da frequência assim com o aumento da amplitude leva a um aumento na resposta voltamétrica

TABELA 13-Cálculo dos efeitos e dos erros experimentais para as variáveis estudadas no planejamento fatorial utilizando a corrente de pico para estudar os parâmetros associados às medidas de SWV para o paraquat em meio de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ $0,1 \text{ mol}^{-1}$.

	Efeito	Erro	t(8)	t tabelado
Média	16,27	± 0,31	52,92	
Fr	22,05	± 0,62	35,52	2,310
Amp	24,01	± 0,62	38,70	
Incr	1,293	± 0,62	2,083	
Fr X Amp	16,15	± 0,62	26,03	
Fr X Incr	1,178	± 0,62	1,897	
Amp X Incr	0,16	± 0,62	0,258	
Fr X Amp X Incr	0,32	± 0,62	0,516	

Após o estudo dos voltamogramas, os dados foram transformados para o espaço das componentes principais, PC. O software utilizado para tal procedimento foi o Piroutte®. Após diversas tentativas de pré-tratamento dos dados, obtiveram-se os melhores resultados quando estes foram centrados na media e aplicados à primeira derivada (Apêndice 2) com de objetivo realizar a

correção da linha de base. A partir destes tratamentos, foram obtidos os componentes principais. Os gráficos de scores e loadings se encontram no apêndice 2.

A TABELA 14 apresenta o planejamento fatorial utilizando os dados obtidos pela transformação dos dados em componentes principais. Apenas a primeira componente principal (PC1) foi utilizada, pois esta explica 97,23% da variância dos dados voltamétricos. A média dos scores das PCs foi calculada utilizando as duplicatas e as respostas médias obtidas tiveram uma variância das observações de 0,27 explicitando uma boa reprodutibilidade dos dados voltamétricos.

TABELA 14-Planejamento fatorial completo utilizando a PC1 para o paraquat utilizando transformação em componente principal.

Ensaio	Fatores			Respostas Scores PC1		
	Frequência	Amplitude	Incremento	Réplica 1	Réplica 2	Média
1	-1	-1	-1	-3,699	-4,254	-3,977
2	1	-1	-1	-2,674	-3,142	-2,908
3	-1	1	-1	-1,752	-0,978	-1,365
4	1	1	-1	7,910	7,349	7,630
5	-1	-1	1	-3,615	-4,142	-3,878
6	1	-1	1	-2,229	-2,767	-2,498
7	-1	-1	1	-1,130	-0,717	-0,924
8	1	1	1	7,190	8,651	7,921

Utilizando os valores de PC1, foram calculados os efeitos apresentados na TABELA 15. Nesta tabela, constam os valores de efeitos calculados com os devidos erros. Como pode ser observado na TABELA 15, os efeitos de frequência, amplitude e frequência combinada com a amplitude são significativos, isto é, os resultados demonstram que existe um aumento da corrente de redução associado ao aumento das variáveis, ou seja, o aumento da frequência assim com o aumento da amplitude leva a um aumento na resposta voltamétrica. Comparando-se os resultados obtidos, utilizando corrente de pico e PCA, vê-se a similaridade do comportamento dos parâmetros estudados, logo,

tanto as correntes de pico quanto a PCA são úteis para a utilização no estudo dos parâmetros voltamétricos.

Nos ensaios 8 e 4, em ambos os planejamentos, observam-se as maiores respostas e nos ensaios 1 e 5 as menores respostas.

TABELA 15-Cálculo dos efeitos e dos erros experimentais para as variáveis estudadas no planejamento fatorial utilizando a transformação em componente principal para estudar os parâmetros associados às medidas de SWV para o paraquat em meio de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

	Efeito		Erro	t(8)	t(tabelado)
Média	1,11E-16	±	0,13	8,55E-16	
Fr	5,070	±	0,26	19,54	2,310
Amp	6,630	±	0,26	25,54	
Incr	0,310	±	0,26	1,190	
Fr X Amp	3,850	±	0,26	14,82	
Fr X Incr	0,040	±	0,26	0,150	
Amp X Incr	0,060	±	0,26	0,220	
Fr X Amp X Incr	-0,120	±	0,26	0,450	

Os efeitos calculados utilizando corrente de pico e PCA possuem uma similaridade onde os efeitos significativos são os mesmos para ambos os tipos de tratamento.

O mesmo tipo de estudo foi realizado para o diquat. Os voltamogramas obtidos encontram-se na FIGURA 17. Numa análise qualitativa da FIGURA 17, pôde-se observar que a combinação de alta frequência e alta amplitude (ensaio 8 e 4) levam a um aumento na corrente, enquanto o incremento apresentado nestes ensaios nos níveis (+) e (-) promoveu uma maior influência sobre a resposta de corrente se comparada aos ensaios realizados para o paraquat. Observa-se que nos ensaios 1 e 5, onde se tem baixa frequência e

baixa amplitude, aparece uma corrente de pico pequena. Por outro lado, quando o incremento se encontra nos níveis (+) ou (-) não é observada uma grande influência sobre as correntes de pico. Já no ensaio 6, que combina alta frequência, alto incremento e baixa amplitude, pôde-se observar a existência de um deslocamento de potencial no primeiro pico.

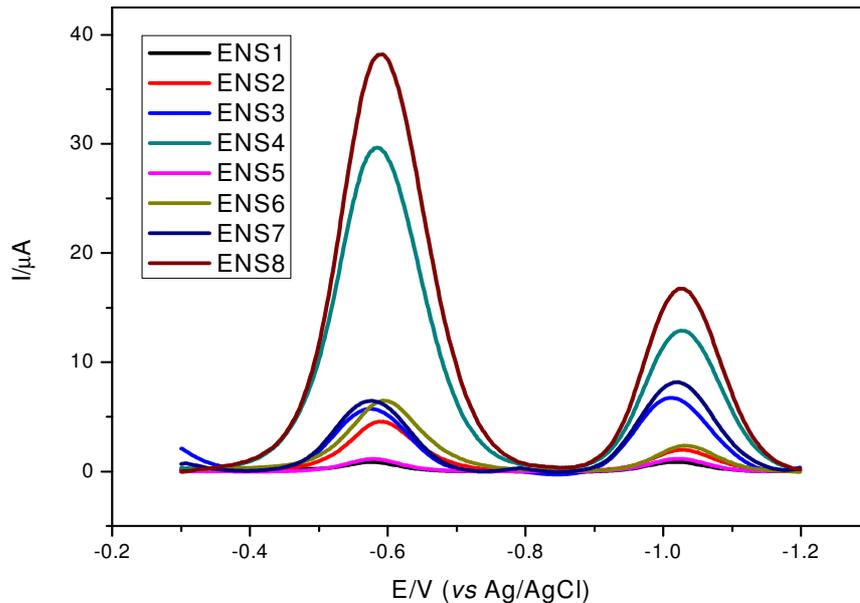


FIGURA 17- Voltamogramas de onda quadrada obtidos para o diquat em meio de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com a técnica de SWV a partir da matriz de planejamento.

Após a obtenção dos conjuntos de voltamogramas para o diquat, a corrente de pico foi analisada através do planejamento fatorial em que os valores de corrente obtidos podem ser observados na TABELA 16. A média das correntes de pico foi calculada utilizando as duplicatas, e as respostas médias obtidas tiveram uma variância das observações de 0.230.

TABELA 16-Planejamento fatorial para o diquat utilizando a corrente de pico.

Ensaio	Fatores			Respostas Ip		
	Frequência	Amplitude	Incremento	Réplica 1	Réplica 2	Média
1	-1	-1	-1	0,90	0,90	0,90
2	1	-1	-1	4,66	4,47	4,57
3	-1	1	-1	6,50	6,07	6,29
4	1	1	-1	31,90	30,20	31,05
5	-1	-1	1	1,13	1,24	1,19
6	1	-1	1	6,30	6,30	6,30
7	-1	-1	1	6,70	7,28	6,99
8	1	1	1	37,00	36,60	36,80

Utilizando os valores de Ip, foram calculados os efeitos, apresentados na TABELA 17. Nesta tabela, constam os valores de efeitos calculados com os devidos erros. Como pode ser observado na TABELA 17, os efeitos e todas as suas combinações são significativos, embora com diferentes graus de importância. Desta forma, pode-se observar que o parâmetro incremento e suas combinações, se comparadas à frequência e amplitude, possuem um efeito menor.

TABELA 17-Cálculo dos efeitos e dos erros experimentais para as variáveis estudadas no planejamento fatorial utilizando a corrente de pico para estudar os parâmetros associados às medidas de SWV para o diquat em meio de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ $0,1 \text{ mol}^{-1}$.

	Efeito	Erro	t(8)	t tabelado
Média	11,76	± 0,12	98,90	
Fr	15,84	± 0,24	66,60	2,310
Amp	17,04	± 0,24	71,67	
Incr	2,120	± 0,24	8,910	
Fr X Amp	11,45	± 0,24	48,14	
Fr X Incr	1,620	± 0,24	6,830	
Amp X Incr	1,110	± 0,24	4,660	
Fr X Amp X Incr	0,900	± 0,24	3,780	

Após a análise do planejamento com as correntes de pico, os dados foram submetidos à análise quimiométrica no espaço das componentes principais. Os dados de corrente foram centrados na média e aplicados à primeira derivada (Figura apêndice 3) com o objetivo de minimizar o efeito da linha de base.

TABELA 18 apresenta a análise quimiométrica no espaço dos componentes principais, onde apenas os dados de scores de PC1 (Figura apêndice 3) foram utilizados, pois estes explicam 94,00% da variância dos dados. As respostas de PC1 foram utilizadas para as respostas médias. As respostas médias obtidas tiveram uma variância das observações de 0,0200 explicitando uma boa reprodutibilidade dos dados voltamétricos. Observando as respostas médias para os planejamentos, utilizando corrente de pico e transformação para PC, os ensaios 8 e 4 obtiveram as maiores respostas para ambos.

TABELA 18-Planejamento fatorial completo utilizando a PC1 para o diquat

Ensaio	Fatores			Respostas Scores PC1		
	Frequência	Amplitude	Incremento	Réplica 1	Réplica 2	Média
1	-1	-1	-1	-2,04	-2,14	-2,09
2	1	-1	-1	-1,38	-1,44	-1,41
3	-1	1	-1	-0,97	-0,86	-0,91
4	1	1	-1	3,16	3,59	3,38
5	-1	-1	1	-1,94	-2,06	-2,00
6	1	-1	1	-1,09	-1,19	-1,14
7	-1	-1	1	-0,51	-0,69	-0,60
8	1	1	1	4,77	4,79	4,78

Utilizando os valores dos escores de PC 1, foram realizados os cálculos para os efeitos que estão apresentados na TABELA 19,. Onde se observam os efeitos calculados com os respectivos erros, além dos valores do teste t calculado.

TABELA 19-Cálculo dos efeitos e dos erros experimentais para as variáveis estudadas no planejamento fatorial utilizado para estudar os parâmetros associados às medidas de SWV para o diquat em meio de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

	Efeito	Erro	t(8)	t(tabelado)
Média	$1,11\text{E-}16 \pm$	0,03	$3,35\text{E-}15$	
Fr	$2,800 \pm$	0,07	42,37	2,310
Amp	$3,320 \pm$	0,07	50,19	
Incr	$0,520 \pm$	0,07	7,850	
Fr X Amp	$2,030 \pm$	0,07	30,71	
Fr X Incr	$0,320 \pm$	0,07	4,810	
Amp X Incr	$0,340 \pm$	0,07	5,130	
Fr X Amp X Incr	$0,230 \pm$	0,07	3,450	

Como pode ser observado na TABELA 19, os efeitos de frequência, amplitude, incremento e todos os efeitos cruzados (combinações) de dois e três níveis são significativos, embora com diferentes graus de importância. Tal comportamento é similar ao obtido, utilizando-se corrente de pico. Similarmente ao observado, trabalhando com a corrente de pico, o parâmetro incremento e suas combinações, se comparadas à frequência e amplitude, possuem um efeito menor.

Ao se analisarem os voltamogramas e os dados obtidos através do planejamento para o paraquat e diquat, percebe-se que o incremento passa a ter valores significativos para o diquat. Uma possível explicação para este fato seria a diferença na velocidade de reação entre um analito e o outro. Conforme está descrito na literatura⁹², a velocidade de reação de redução do paraquat é lenta quando comparada ao diquat e, desta forma, não se observa a influência do incremento, enquanto no diquat, a cinética é rápida, o que leva à influência do incremento no processo³⁹.

Dando continuidade a este estudo inicial, passamos então a estudar a mistura de paraquat e diquat com o objetivo de compreender como as mesmas variáveis experimentais afetavam os resultados voltamétricos. Neste caso, é importante frisar que, devido à alta convolução dos picos voltamétricos, não é possível fazer a análise da corrente, mas somente a quantificação no espaço dos componentes principais. Considerando este propósito, foram realizados os mesmos ensaios contidos na matriz de planejamento TABELA 11. E o conjunto de voltamogramas obtidos encontra-se presente na FIGURA 18. Uma análise qualitativa destes resultados permite observar que a combinação alta frequência e alta amplitude vistas no ensaio 8 e 4, levam a um aumento na corrente. Por outro lado, observa-se, nos ensaios 1 e 5, onde se tem baixa frequência e baixa amplitude que ocorre um baixo valor de corrente de pico à presença de dois picos parcialmente convoluídos na região entre 0,5 V e 0,8 V, que devem estar relacionados ao paraquat e diquat. Neste caso, a variável incremento se encontra nos níveis (+) ou (-) e não traz grande influência sobre a corrente de pico. Já no ensaio 6, que combina alta frequência e alto incremento com baixa amplitude não se observa a existência de um deslocamento de potencial, o que tinha ocorrido nos pesticidas individualmente. Finalmente, com base neste conjunto de voltamogramas, no intervalo de condições experimentais estudados, percebe-se que a amplitude no nível (-) favorece o surgimento dos picos apenas parcialmente convoluídos para o paraquat e diquat. Este comportamento fica evidenciado analisando os ensaios 1,2,5 e 6.

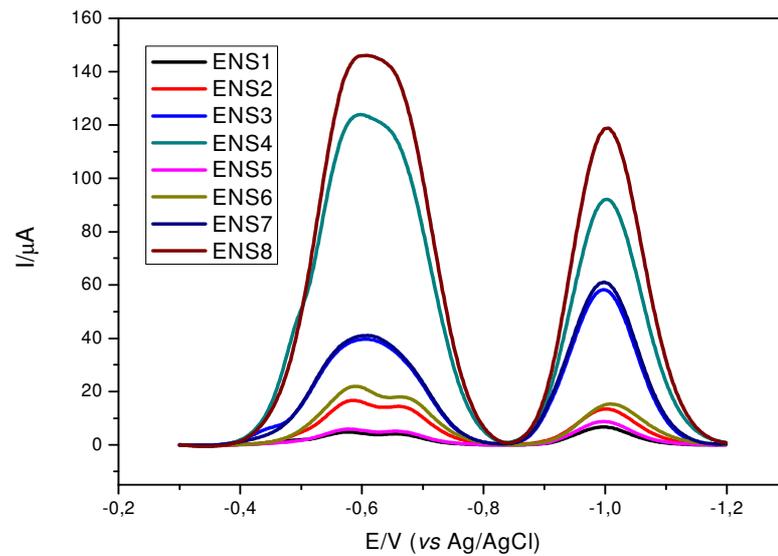


FIGURA 18- Voltamogramas de onda quadrada obtidos para a mistura paraquat/diquat em meio de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com a técnica de SWV a partir da matriz de planejamento.

A TABELA 20 apresenta o planejamento fatorial utilizando a transformação dos dados para o espaço das componentes principais utilizando o mesmo tratamento de dados anteriores, onde os escores de PC1 (Apêndice 4) explicam 96,20% da variância dos dados. A resposta média foi calculada com base nestes dados de PC1 para as duplicatas. As respostas médias obtidas tiveram uma variância das observações de 0,140 explicitando uma boa reprodutibilidade dos dados obtidos pela técnica de SWV.

TABELA 20-Planejamento fatorial completo utilizando a PC1 para a mistura.

Ensaio	Fatores			Respostas Scores PC1		
	Frequência	Amplitude	Incremento	Réplica 1	Réplica 2	Média
1	-1	-1	-1	-10,10	-9,89	-9,99
2	1	-1	-1	-7,84	-7,64	-7,74
3	-1	1	-1	-0,04	-0,68	-0,36
4	1	1	-1	13,95	1,003	13,47
5	-1	-1	1	-9,69	-9,45	-9,57
6	1	-1	1	-7,06	-7,09	-7,07
7	-1	-1	1	0,46	0,56	0,51
8	1	1	1	20,32	21,20	20,76

A transformação dos dados para o espaço das componentes principais e a análise dos efeitos utilizando os scores da PC1 são apresentadas na TABELA 21. Os efeitos de frequência, amplitude, incremento, bem como os seus efeitos cruzados de segunda e terceira ordem, são significativos. Anteriormente, foi discutida a influência do incremento no comportamento do diquat. Acredita-se que a influência deste parâmetro na mistura seja justamente devido à presença do diquat na mistura.

TABELA 21-Cálculo dos efeitos e dos erros experimentais para as variáveis estudadas no planejamento fatorial utilizado para estudar os parâmetros associados às medidas de SWV para a mistura paraquat/diquat em meio de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

	Efeito	Erro	t(8)	t(tabelado)
Média	1,25E-07	± 0,09	1,33E-06	
Fr	9,710	± 0,19	51,70	2,310
Amp	17,19	± 0,19	91,55	
Incr	2,310	± 0,19	12,31	
Fr X Amp	7,330	± 0,19	39,06	
Fr X Incr	1,660	± 0,19	8,860	
Amp X Incr	1,770	± 0,19	9,410	
Fr X Amp X Incr	1,540	± 0,19	8,220	

Com base nos planejamentos realizados e no teste de Student, podemos observar que os parâmetros voltamétricos que apresentaram uma maior significância foram frequência e amplitude de pulso. Apesar do incremento também se apresentar significativo em alguns parâmetros, não será utilizado para construção da superfície de resposta devido a sua menor significância.

Assim, o valor da variável incremento será mantido fixo no valor de 2 mV. O valor de 2 mV foi escolhido porque valores altos de incremento para os pesticidas estudados podem levar à diminuição da resolução nas análises⁹³. As variáveis amplitude e frequência serão estudadas utilizando a metodologia de

superfície de resposta para se determinarem as reais influências de cada variável e dos efeitos interações entre as variáveis no sistema.

A segunda etapa deste processo de escolha de variáveis para a realização das medidas experimentais envolve a otimização destas condições. Isto será feito utilizando a Metodologia de Superfície de Resposta, a qual está descrita na próxima seção.

4.3 Otimização das condições experimentais utilizando Metodologia de Superfície de Resposta

Para obtenção da superfície de resposta, foi utilizado o planejamento CCD, constituído por planejamento fatorial do tipo estrela com ponto central em triplicata, onde os níveis utilizados e seus valores se encontram na TABELA 22. Os valores escolhidos inicialmente foram do nível superior (+1) e do nível inferior (-1). A partir disso, os demais valores de variável foram codificados com base na Equação 17.

$$x_i = \frac{z_i - \bar{z}}{\frac{\Delta z}{2}}$$

Equação 17

Onde x_i é o valor codificado do planejamento CCD; z_i é o valor experimental do nível e \bar{z} , o valor médio entre os níveis superior (+) e inferior (-), e Δz é a diferença entre os níveis superior (+) e inferior (-)

TABELA 22-Variáveis e níveis escolhidos para o planejamento CCD para a técnica de SWV

Variáveis	Níveis				
	-1,41	-1	0	1	1,41
Frequência/s ⁻¹	29,30	50	100	150	170,70
Amplitude/mV	11,72	20	40	60	68,28

TABELA 23- Matriz de planejamento CCD para os parâmetros voltamétricos frequência e amplitude.

Ensaio	Variáveis	
	Frequência	Amplitude
1	-1	-1
2	1	-1
3	-1	1
4	1	1
5	-1,414	0
6	1,414	0
7	0	-1,414
8	0	1,414
9	0	0
10	0	0
11	0	0

Utilizando os valores e a matriz de planejamento para os parâmetros voltamétricos apresentados nas TABELA 22 e TABELA 23, foram medidos os conjuntos de voltamogramas para o paraquat e diquat, ambos na concentração de 1×10^{-4} mol L⁻¹ e da mistura equimolar dos dois componentes na concentração de 1×10^{-4} mol L⁻¹. Inicialmente, foram trabalhados com os pesticidas em separado, voltamogramas apresentados nas FIGURA 19 e FIGURA 22. E, como realizado anteriormente, o planejamento construído inicialmente utilizou os valores de corrente de pico para os pesticidas em separados que se encontram nas TABELA 24 e TABELA 30.

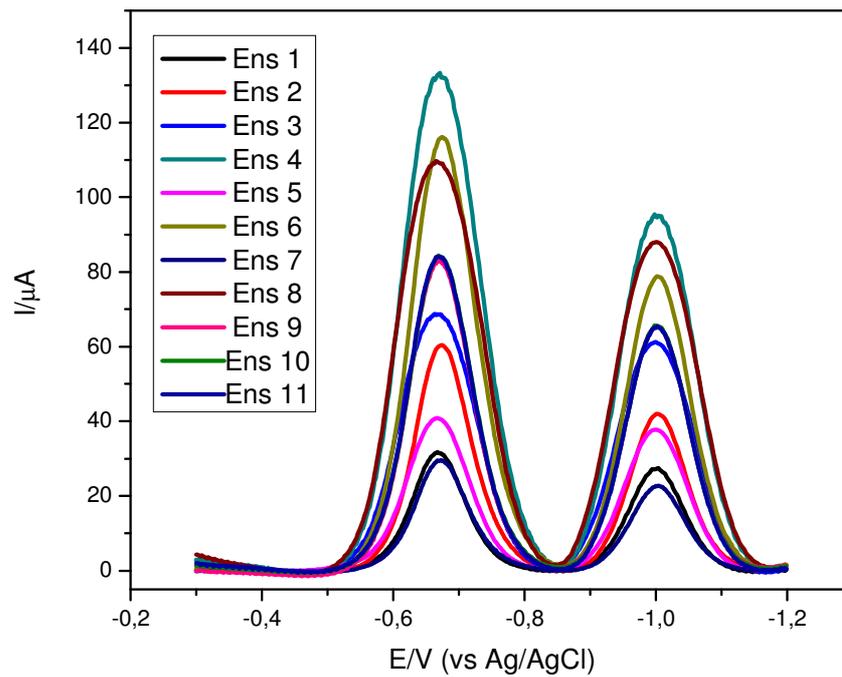


FIGURA 19 - Voltamogramas de onda quadrada obtidos para o paraquat em meio de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com a técnica de SWV a partir da matriz de planejamento CCD.

TABELA 24-Planejamento CCD para o paraquat utilizando corrente de pico.

Ensaio	Fatores		Resposta I _{pico} μA		
	Frequência	Amplitude	Réplica 1	Réplica 2	Média
1	-1	-1	29,90	29,90	29,9
2	1	-1	52,00	51,00	51,5
3	-1	1	62,90	63,00	62,95
4	1	1	110,00	109,00	109,5
5	-1.41	0	38,10	38,00	38,05
6	1.41	0	95,70	91,90	93,8
7	0	-1.41	26,60	26,00	26,3
8	0	1.41	94,90	94,50	94,7
9	0	0	71,80	71,90	71,85
10	0	0	73,20	72,20	72,7
11	0	0	73,10	73,50	73,3

Com base nas correntes de picos do ponto central, presentes na TABELA 24, foi calculado o desvio padrão obtendo um valor de 0,73 para os dados mostrando uma boa reprodutibilidade neste ponto.

Analisando as TABELA 24 e TABELA 30, pôde-se observar que as melhores respostas de corrente ocorrem nos níveis superiores e médios das variáveis frequência e amplitude, sendo que a melhor condição observada nas tabelas ocorre quando ambos se encontram no nível (+1), enquanto nos níveis (-1) de respostas obtêm-se as menores respostas voltamétricas.

Em um primeiro momento, para os pesticidas em separados, realizou-se o cálculo dos efeitos e análise de variância utilizando a corrente de pico.

TABELA 25 contém os cálculos de coeficiente e o erro utilizando a corrente de pico. Os cálculos dos coeficientes do modelo empírico e o teste ANOVA foram realizados utilizando planilhas do BR office®.

TABELA 25-Coeficientes e erros para a superfície de resposta para o paraquat utilizando a SWV e corrente de pico

Coeficientes		Erro		t(2)	t tabelado
bo	72,625	±	0,26	172,60	
Fr	18,44	±	0,26	71,32	4,30
Am	23,51	±	0,26	91,12	
FrXFr	-3,29	±	0,31	10,68	
AmXAm	-6,02	±	0,31	19,55	
FrXAm	6,24	±	0,36	17,12	

TABELA 25, pode-se observar que todos os coeficientes são significativos com base no teste t. O teste foi realizado para cada um dos coeficientes e comparado ao t tabelado onde podemos observar que todos os valores para o coeficiente são significativos. A análise de variância foi realizada para observar o ajuste dos dados estando estes contidos na TABELA 26.

TABELA 26-Teste ANOVA do planejamento CCD para o paraquat utilizando a SWV e corrente de pico onde: SQ é o somatório quadrático, GL- Grau de liberdade, QM- média quadrática

	SQ	GL	MQ	Fcalc.	Ftab
Regressão	7480,47	5	1496,09	363,57	*5,05
Resíduos	20,58	5	4,12		
F. Ajuste	19,51	3	6,50	12,25	**9,55
Erro Puro	1,06	2	0,53		
Total	7501,05	10			
%variação explicada			99,73		
%máx. de variação explicável			99,99		

$$*F_{(5,5)} = 5,05$$

$$**F_{(3,2)} = 9,55$$

O teste ANOVA apresentado na TABELA 26 mostra que a regressão foi significativa e a falta de ajuste também se mostrou significativa demonstrando que o modelo de segunda ordem não foi bem ajustado para o paraquat.

Com base nos coeficientes calculados, é possível determinar a equação ajustada que descreve o modelo para o paraquat utilizando a corrente de pico que está descrita na Equação 18.

+

$$Z = 72,61(\pm 0,42) + 18,40(\pm 0,26) Fr + 23,51 (\pm 0,26) Amp - 3,29 (\pm 0,31) Fr^2 - 6,073(\pm 0,31) Amp^2 + 6,310(\pm 0,36) Fr \times Amp$$

Equação 18

Após a análise dos efeitos e cálculos dos coeficientes utilizando os dados sem qualquer transformação, os dados foram submetidos à transformação para o espaço das componentes principais utilizando software Piroutte®. O pré-tratamento realizado foi aquele já descrito anteriormente, isto é, os dados de corrente foram centrados na média e aplicado a primeira derivada (Apêndice 5) com o objetivo de realizar a correção da linha de base.

Aplicando o tratamento de transformação em PCs, verificou-se que os dados voltamétricos do paraquat tiveram sua variância explicada por 85,32% pela PC1, sendo a PC1 utilizada para a construção do modelo.

TABELA 27-Resultado do Planejamento CCD para os parâmetros voltamétricos para o Paraquat utilizando PCA

Ensaio	Fatores		Resposta PC1		
	Frequência	Amplitude	Replica 1	Replica 2	Média
1	-1	-1	-10,14	-9,90	-10,02
2	1	-1	-4,49	-4,36	-4,43
3	-1	1	0,62	0,58	0,60
4	1	1	12,88	12,26	12,57
5	-1.41	0	-7,57	-7,29	-7,43
6	1.41	0	7,69	7,47	7,58
7	0	-1.41	-11,01	-10,72	-10,86
8	0	1.41	7,91	7,85	7,88
9	0	0	1,77	1,63	1,70
10	0	0	1,77	1,78	1,78
11	0	0	1,81	1,86	1,83

A partir dos dados contidos na TABELA 28, foi possível realizar o cálculo do desvio padrão, com base nas replicatas no ponto central, obtendo o valor de 0,07, além dos cálculos dos coeficientes e da análise de variância contidos nas TABELA 28 e TABELA 29.

TABELA 28- Coeficientes e erros para a superfície de resposta para o paraquat utilizando a SWV e a transformação para PC.

Coeficientes		Erro	t(2)	t tabelado
bo	1,77	± 0,0379	46,71	
Fr	4,85	± 0,0232	209,10	4,30
Am	6,78	± 0,0232	291,82	
FrXFr	-0,75	± 0,0277	27,09	
AmXAm	-1,54	± 0,0277	55,50	
FrXAm	1,60	± 0,0328	48,65	

Na TABELA 28, encontram-se os coeficientes do modelo e seus erros. O teste t foi realizado para cada um dos coeficientes e comparado ao t tabelado onde podemos observar que todos os valores para o coeficiente são significativos, o que permite utilizar estes valores para construção da equação que descreverá o modelo para os parâmetros voltamétricos da SWV referentes ao paraquat.

A TABELA 29 apresenta o teste ANOVA que demonstra que tanto a regressão como a falta de ajuste são significativos.

TABELA 29- Teste ANOVA do planejamento CCD para o paraquat utilizando a SWV onde: SQ é o somatório quadrático, GL- Grau de liberdade, QM- média quadrática.

	SQ	GL	MQ	Fcalc.	Ftab
Regressão	578,16	5	115,63	262,87	5,05
Resíduos	2,20	5	0,44		
F. Ajuste	2,19	3	0,73	169,83	9,55
Erro Puro	0,01	2	0,00		
Total	580,36	10			
%variação explicada			99,62		
%máx. de variação explicável			99,99		

* $F_{(5,5)} = 5,05$

** $F_{(3,2)} = 9,55$

Com base nos valores dos coeficientes obtidos(TABELA 29), construiu-se a equação que descreve o modelo de superfície de resposta do paraquat, gerando a equação do modelo ajustado com seus respectivos erros que é apresentada na Equação 19.

$$Z = 1,77(\pm 0,37) + 4,85(\pm 0,23) Fr + 6,78 (\pm 0,23) Amp - 0,75 (\pm 0,27) Fr^2 - 1,54(\pm 0,27) Amp^2 + 1,60(\pm 0,32) Fr \times Amp$$

Equação 19

A partir destes resultados, foi possível construir a superfície de resposta que descreve o comportamento da corrente de pico e PCs em função dos parâmetros experimentais da SWV. Esses resultados estão ilustrados nas FIGURAFIGURA 20 eFIGURA 21.

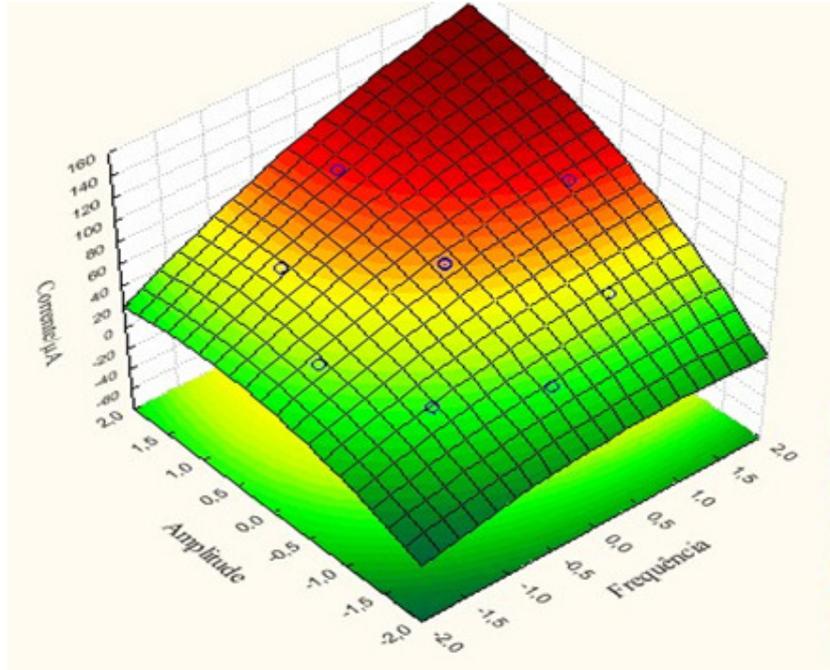


FIGURA 20-Superfície de resposta obtida para os parâmetros voltamétricos da SWV para o paraquat em meio de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com a técnica de SWV, corrente de pico, utilizando os seguintes parâmetros: $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$.

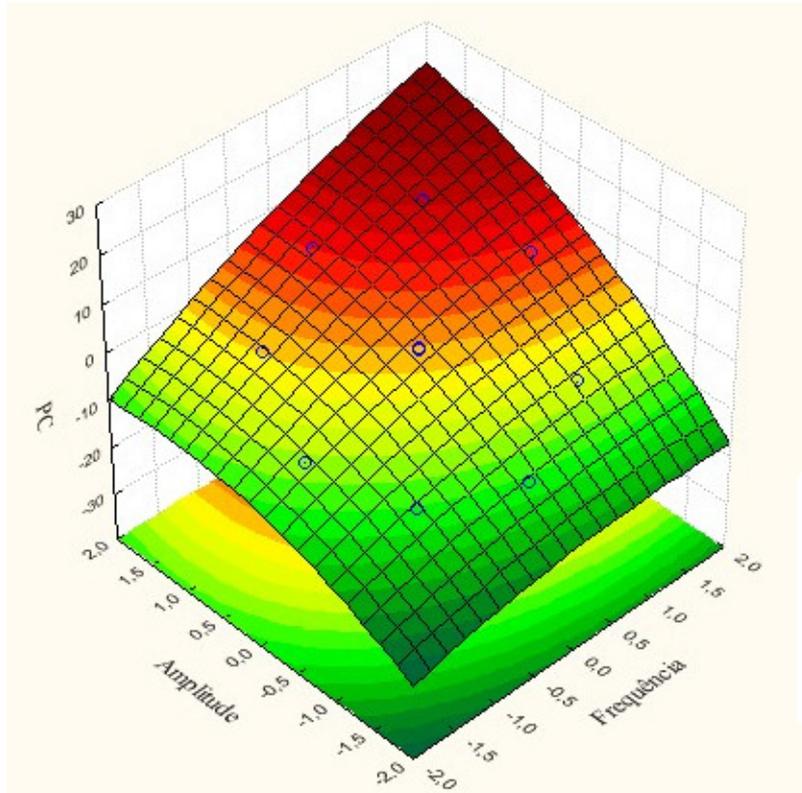


FIGURA 21 - Superfície de resposta obtida para os parâmetros voltamétricos da SWV para o paraquat em meio de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com a técnica de SWV, PCA e os seguintes parâmetros: $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$.

Como pode ser observado nas FIGURAS FIGURA 20 e FIGURA 21, a máxima resposta para corrente de pico e PCs ocorre quando se trabalha em valores elevados para os parâmetros frequência e incremento. O resultado da superfície de resposta mostra que os fatores utilizados no planejamento são potencialmente capazes de aumentar a resposta voltamétrica para o pesticida paraquat quando estes são aumentados na faixa estudada.

Com base nas superfícies construídas, pôde-se observar também a semelhança existente entre elas, o que confirma as conclusões realizadas até agora que tanto o planejamento utilizando corrente de pico como PCs são úteis para construção de modelo ajustado. Os modelos possuem uma máxima explicação 99,74% utilizando corrente de pico e 99,64% utilizando PCs.

O procedimento e os cálculos descritos para a obtenção da equação ajustada e superfície de resposta para o paraquat serão utilizados para o diquat e para a mistura paraquat e diquat.

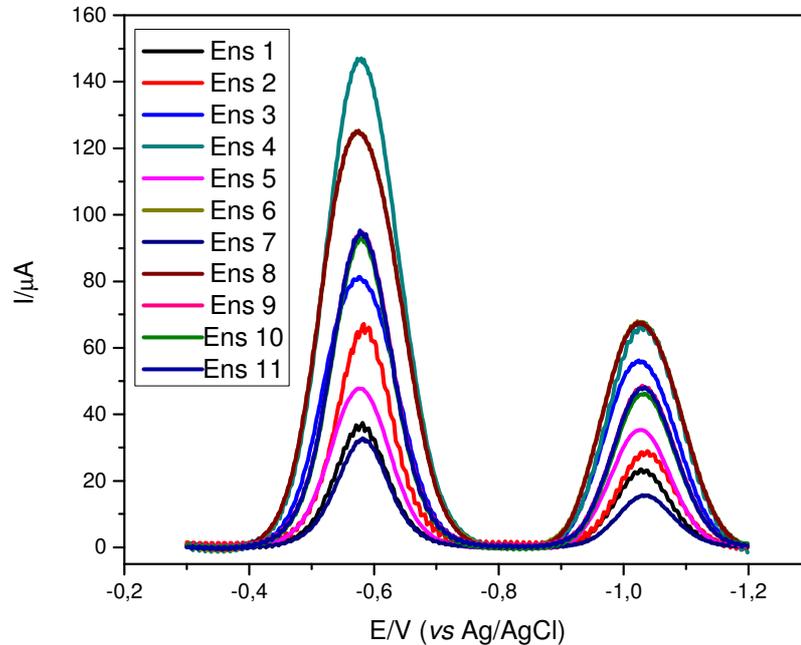


FIGURA 22 – Voltamogramas de onda quadrada obtidos para o diquat em meio de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com a técnica de SWV a partir da matriz de planejamento CCD.

TABELA 30-Planejamento CCD para o diquat utilizando corrente de pico.

Ensaio	Fatores		Resposta Ipico μA		
	Frequência	Amplitude	Réplica 1	Réplica 2	Média
1	-1	-1	37,70	37,60	37,65
2	1	-1	68,10	65,70	66,9
3	-1	1	81,10	80,70	80,9
4	1	1	151,00	146,00	148,5
5	-1.41	0	47,20	47,60	47,4
6	1.41	0	125,00	122,00	123,50
7	0	-1.41	34,10	32,60	33,35
8	0	1.41	126,00	125,00	125,5
9	0	0	95,60	94,00	94,8
10	0	0	94,60	93,00	93,8
11	0	0	96,20	93,20	94,7

Com bases nos dados voltamétricos apresentados na TABELA 30, obteve-se 1,28 de desvio padrão no ponto central demonstrando uma boa reprodutibilidade dos dados referentes ao diquat.

Similarmente ao realizado com o paraquat inicialmente se realizaram os cálculos de coeficiente e erro utilizando a corrente de pico. Os cálculos dos coeficientes do modelo empírico e o teste ANOVA presentes nas TABELA 31 e TABELA 32, foram realizados utilizando planilhas do BR office®.

TABELA 31 - Coeficientes e erros para a superfície de resposta para o diquat utilizando a SWV e corrente de pico

Coeficientes		Erro	t(2)	t tabelado
bo	94,43	± 0,32	296,97	
Fr	25,60	± 0,20	131,25	4,30
Am	31,94	± 0,20	163,80	
FrXFr	-4,23	± 0,23	18,20	
AmXAm	-7,26	± 0,23	31,22	
FrXAm	9,59	± 0,28	34,82	

TABELA 32 - Teste ANOVA do planejamento CCD para o diquat utilizando a SWV e corrente de pico onde: SQ é o somatório quadrático, GL- Grau de liberdade, QM- média quadrática.

	SQ	GL	MQ	Fcalc.	Ftab
Regressão	14054,43	5	2810,89	618,49	5,05
Resíduos	22,72	5	4,54		
F. Ajuste	22,12	3	7,37	24,30	9,55
Erro Puro	0,61	2	0,30		
Total	14077,15	10			
%variação explicada			99,84		
%máx. de variação explicável			99,99		

$$*F_{(5,5)} = 5,05$$

$$**F_{(3,2)} = 9,55$$

Com base na ANOVA, TABELA 32, pode se observar que o modelo ajustado possui uma regressão significativa e também a falta de ajuste

foi significativa, demonstrando a necessidade de ajustes futuros. E, com os valores de coeficientes obtidos, foi possível equacionar o modelo de superfície de resposta para os parâmetros voltamétricos do diquat, utilizando a corrente de pico, presente na Equação 20.

$$Z = 94,43(\pm 0,32) + 25,60(\pm 0,20) \text{ Fr} + 31,94(\pm 0,20) \text{ Amp} - 4,23(\pm 0,23) \text{ Fr}^2 - 7,26(\pm 0,23) \text{ Amp}^2 + 9,56(\pm 0,28) \text{ Fr} \times \text{Amp}$$

Equação 20

Após a análise por corrente de pico, os dados voltamétricos obtidos para o diquat foram tratados por PCA (Apêndice 6), utilizando o mesmo pré-tratamento de dados descritos anteriormente. Pode-se verificar que a variância dos dados foi explicada por 85,86% pela PC. Com base nisso, foram utilizados os dados de PC1 para o planejamento descrito

TABELA 33.

TABELA 33-Resultado do Planejamento CCD para os parâmetros voltamétricos para o diquat utilizando PC1.

Ensaio	Fatores		Resposta PC1		
	Frequência	Amplitude	Réplica 1	Réplica 2	Média
1	-1	-1	-10,25	-10,25	-10,25
2	1	-1	-4,14	-4,14	-4,14
3	-1	1	-0,26	-0,26	-0,26
4	1	1	14,11	14,09	14,10
5	-1.41	0	-8,57	-8,57	-8,57
6	1.41	0	6,45	6,45	6,45
7	0	-1.41	-11,89	-11,89	-11,89
8	0	1.41	8,80	8,79	8,80
9	0	0	2,44	2,44	2,44
10	0	0	1,44	1,44	1,44
11	0	0	1,90	1,88	1,89

Com base nos pontos centrais presentes na TABELA 33, foi possível realizar o cálculo do desvio padrão que foi de 0,44 para os dados utilizados.

Na TABELA 34, encontram-se os coeficientes do modelo e seus erros determinados. O teste t foi realizado para cada um dos coeficientes e comparado ao t tabelado onde podemos observar que todos os valores para o coeficiente são significativos, ou seja, podem ser usados para construção do modelo de superfície de resposta a partir da equação que descreve o modelo.

TABELA 34- Coeficientes e erros para a superfície de resposta para o diquat utilizando a SWV.

Coeficientes		Erro	t(5)	t tabelado
bo	1,920	± 0,29	6,64	
Fr	5,220	± 0,18	29,44	4,30
Amp	7,200	± 0,18	40,58	
FrXFr	-1,200	± 0,21	5,67	
AmpXAmp	-1,44	± 0,21	6,83	
FrXAmp	2,060	± 0,25	8,24	

Na TABELA 35, apresenta-se a ANOVA que mostra a significância dos dados para a regressão realizada para o diquat, enquanto a falta de ajuste não foi significativa, demonstrando que o modelo se encontra ajustado, o que permite utilizar estes valores para construção da equação que descreverá o modelo para os parâmetros voltamétricos da SWV para o diquat, não necessitando de mais nenhum ajuste.

TABELA 35- Teste ANOVA do planejamento CCD para o diquat utilizando a SWV e PC1 onde: SQ é o somatório quadrático, GL- Grau de liberdade, QM- média quadrática.

	SQ	GL	MQ	Fcalc.	Ftab
Regressão	663,01	5	132,60	187,68	5,05
Resíduos	3,53	5	0,71		
F. Ajuste	3,03	3	1,01	4,03	9,55
Erro Puro	0,50	2	0,25		
Total	666,54	10			
%variação explicada			99,47		
%máx. de variação explicável			99,92		

$$*F_{(5,5)} = 5,05$$

$$**F_{(3,2)} = 9,55$$

Com base nos coeficientes significativos para o modelo gera-se a equação do modelo ajustado com seus respectivos erros que é apresentada na Equação 21.

$$Z = 1,92(\pm 0,29) + 5,22(\pm 0,18) Fr + 7,20 (\pm 0,18) Amp - 1,20 (\pm 0,21) Fr^2 - 1,44(\pm 0,21) Amp^2 + 2,06(\pm 0,25) Fr \times Amp$$

Equação 21

Com base nas Equação 21 que descrevem o modelo ajustado dentro da faixa estudada, utilizando corrente de pico e PC, é possível criar a superfície de resposta presente nas FIGURA 23 e FIGURA 24.

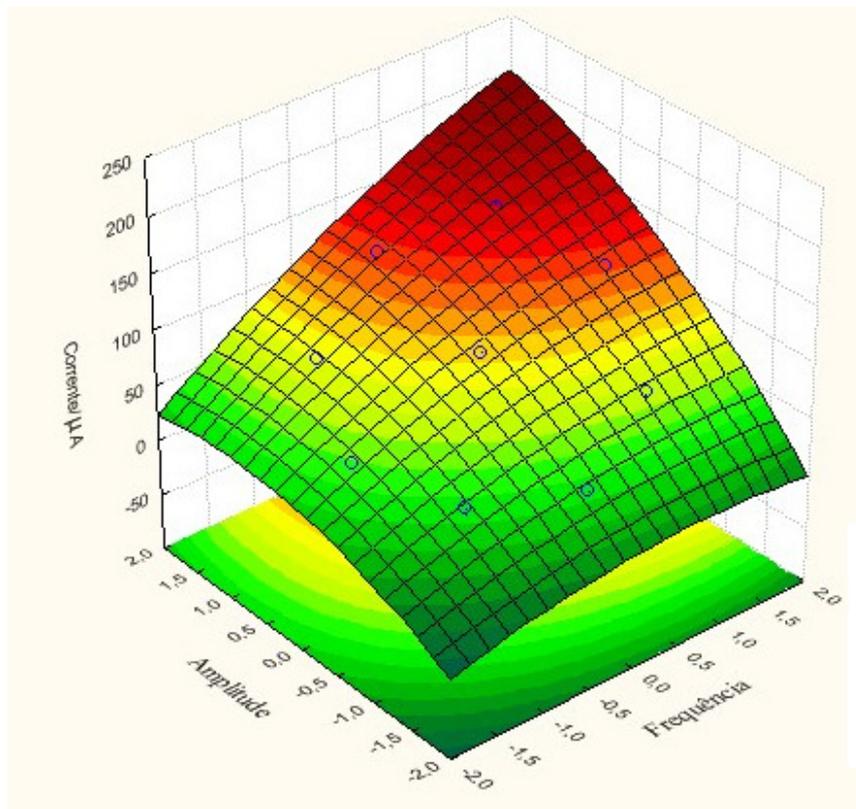


FIGURA 23 - Superfície de resposta obtida para os parâmetros voltamétricos da SWV para o diquat em meio de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com a técnica de SWV, corrente de pico, utilizando os seguintes parâmetros: $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$.

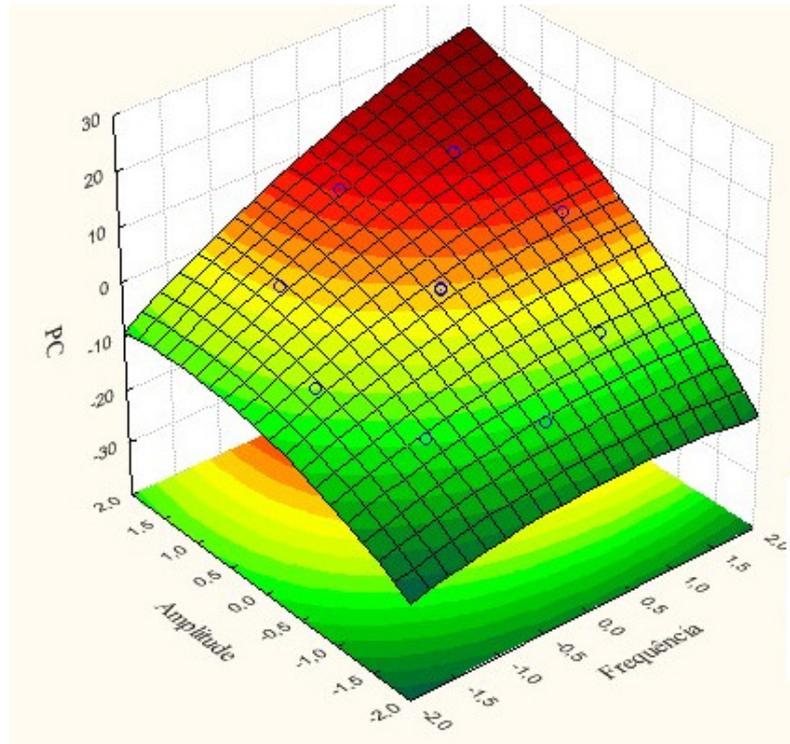


FIGURA 24-Superfície de resposta obtida para os parâmetros voltamétricos da SWV para o diquat em meio de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com a técnica de SWV e PC, utilizando os seguintes parâmetros: $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$.

O resultado obtido a partir da superfície de resposta, FIGURA 23 e FIGURA 24, para o diquat, demonstra que os fatores utilizados no planejamento são capazes de aumentar a resposta voltamétrica quando estes são aumentados na faixa estudada. Comparando a superfície obtida para o paraquat e diquat, pôde-se observar uma certa similaridade nas superfícies e os maiores valores de correntes se mostraram próximos.

A análise direta da corrente de pico utilizando a SWV não é possível quando o material analisado é a mistura dos dois pesticidas devido à intensa sobreposição dos picos voltamétricos. Por esta razão, os dados foram submetidos à transformação para o espaço das componentes principais utilizando software Piroutte®. O pré-tratamento realizado foi aquele já descrito anteriormente, isto é, os dados de corrente foram centrados na média e aplicado a primeira derivada com o objetivo de realizar a correção da linha de base.

Os dados voltamétricos obtidos para a mistura entre o paraquat e o diquat foram tratados de forma similar ao paraquat e diquat por PCA (Apêndice 7). Pôde-se verificar que os dados tiveram sua variância explicada por 89,64% pela PC 1. Com base nisso foram utilizados os dados de PC1 para o planejamento CCD presentes na TABELA 36.

TABELA 36-Resultado do Planejamento CCD para os parâmetros voltamétricos para a mistura utilizando PCA

Ensaio	Fatores		Resposta PC1		
	Frequência	Amplitude	Réplica 1	Réplica 2	Média
1	-1	-1	-13,87	-14,24	-14,05
2	1	-1	-7,12	-7,30	-7,21
3	-1	1	2,52	2,21	2,36
4	1	1	19,35	19,82	19,58
5	-1.41	0	-10,23	-10,35	-10,29
6	1.41	0	6,94	7,10	7,02
7	0	-1.41	-16,94	-17,16	-17,05
8	0	1.41	13,81	14,20	14,00
9	0	0	1,60	1,57	1,584
10	0	0	1,22	1,51	1,36
11	0	0	1,41	1,65	1,53

Na TABELA 37, encontram-se os coeficientes do modelo e seus erros determinados. O teste t foi realizado para cada um dos coeficientes e comparado ao t tabelado onde podemos observar que todos os valores para o coeficiente são significativos, ou seja, podem ser usados para construção do modelo para superfície de resposta.

TABELA 37- Coeficientes e erros para a superfície de resposta para a mistura utilizando a SWV.

Coeficientes		Erro	t(5)	t tabelado
bo	1,48	± 0,07	21,99	
Fr	6,08	± 0,04	146,80	2,570
Amp	10,91	± 0,04	263,46	
FrXFr	-1,12	± 0,05	22,76	
AmpXAmp	-1,07	± 0,05	21,64	
FrXAmp	2,60	± 0,06	44,40	

Na TABELA 38, apresentam-se os resultados do teste ANOVA. Pôde-se observar os valores de variância para cada um dos efeitos estudados com o respectivo teste F que, comparado ao tabelado mostra-se significativo para cada coeficiente obtendo uma correlação de 99,51%, o que significa que os coeficientes podem ser para gerar a equação ajustada que descreve o modelo para os parâmetros voltamétricos da SWV para a mistura.

TABELA 38-ANOVA do planejamento CCD para a mistura utilizando a SWV

	SQ	GL	MQ	Fcalc.	Ftab
Regressão	1280,41	5	256,08	201,23	5,05
Resíduos	6,36	5	1,27		
F. Ajuste	6,34	3	2,11	154,54	9,55
Erro Puro	0,03	2	0,01		
Total	1286,78	10			
%variação explicada			99,51		
%máx. de variação explicável			99,99		

* $F_{(5,5)} = 5,05$

** $F_{(3,2)} = 9,55$

Como base na TABELA 38, pôde-se concluir que a regressão foi significativa e a falta de ajuste também se mostrou significativa. A partir dos coeficientes significativos para o modelo, gera-se a equação do modelo ajustado com seus respectivos erros, que é apresentada na Equação 22.

$$Z = 1,48(\pm 0,07) + 6,08(\pm 0,04)Fr + 10,91(\pm 0,04) \text{ Amp} - 1,12(\pm 0,05) Fr^2 - 1,07(\pm 0,05) \text{ Amp}^2 + 2,60(\pm 0,06) Fr \times \text{Amp}$$

Equação 22

A partir da Equação 22, construiu-se a superfície de resposta presente na FIGURA 25, pois a equação descreve o modelo ajustado dentro da faixa estudada.

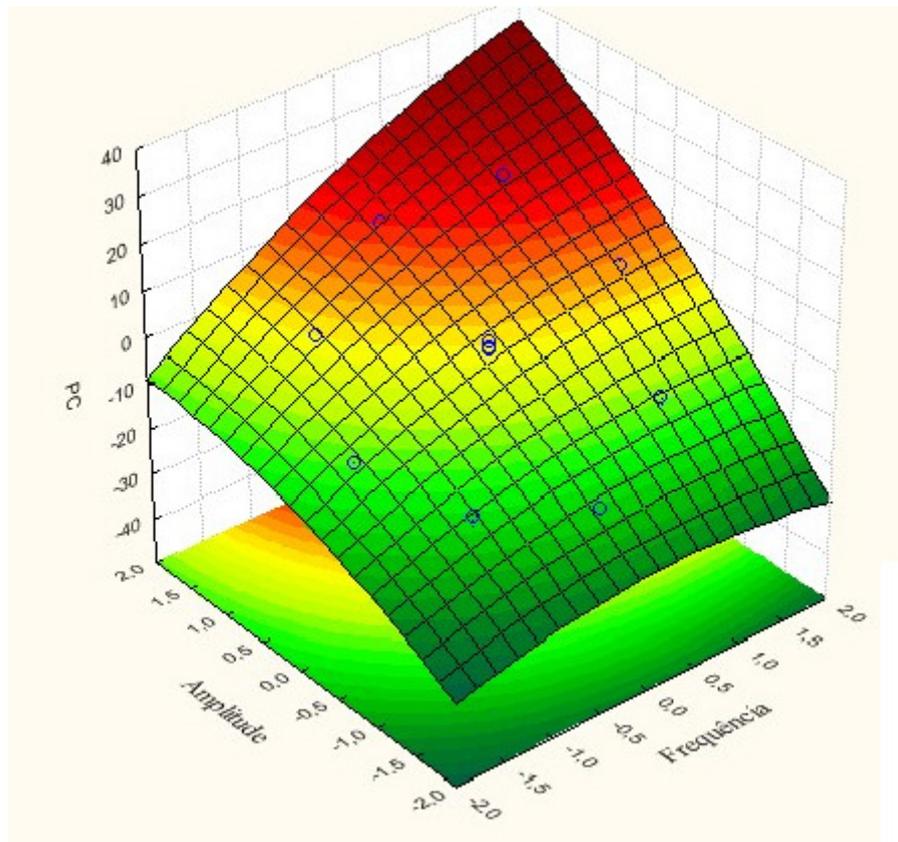


FIGURA 25-Superfície de resposta obtida para os parâmetros voltamétricos da SWV para a mistura paraquat e diquat em meio de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com a técnica de SWV utilizando os seguintes parâmetros: $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$.

A superfície obtida na FIGURA 25 mostra um comportamento semelhante ao paraquat e diquat, mas com obtenção de correntes maiores devido ao fato de as concentrações trabalhadas serem maiores que os pesticidas individualmente.

De acordo com as equações obtidas para os modelos relacionados aos parâmetros voltamétrico da SWV, a variável frequência obteve maiores valores de coeficiente, sendo esta de grande importância para a resposta voltamétrica. A frequência está diretamente ligada à velocidade de varredura^{42, 90}, um aumento da frequência leva a um aumento na resposta de corrente, conseqüentemente melhora na sensibilidade da análise. Essa comparação com corrente é possível devido ao fato de que as PCs estão relacionadas aos voltamogramas, que são medidas de corrente *versus* potencial.

Os valores das variáveis presentes na superfície de resposta estão codificados e podem ser transformados nos seus valores originais utilizando a Equação 17.

Ao realizar o planejamento para a mistura e observar os voltamogramas apresentados na FIGURA 26 pode-se observar que, com a variação da amplitude, é possível distinguir a formação de dois picos de corrente parcialmente sobrepostos na região de potenciais entre -0,5 V e -0,7 V. Supondo que uma sobreposição parcial seria mais facilmente analisável do que uma sobreposição total; e considerando ainda que os valores de corrente observados sejam suficientemente intensos para serem facilmente discutidos, optou-se para o estudo sistemático da mistura entre o paraquat e o diquat à amplitude de 40 mV.

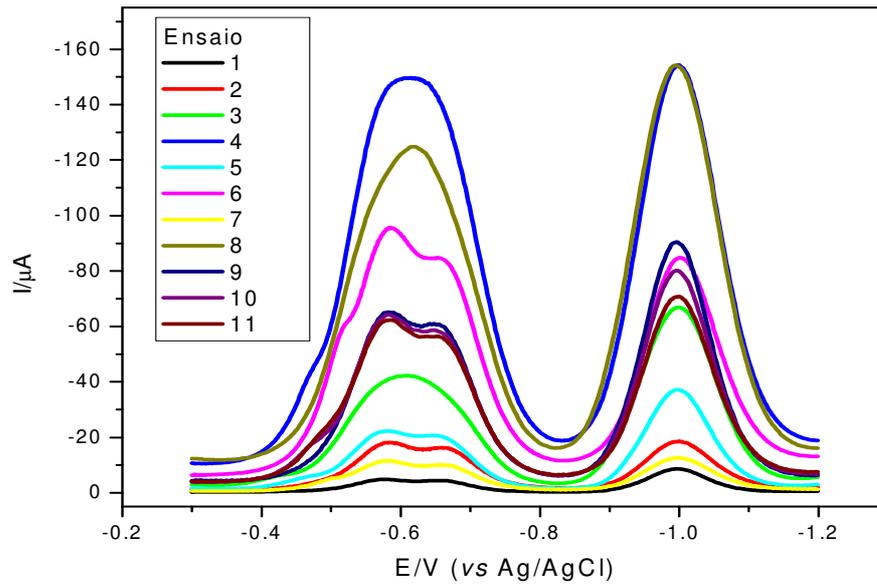


FIGURA 26- Voltamogramas planejamento CCD para os parâmetros voltamétricos da mistura em meio de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

O incremento já havia sido definido anteriormente como 2 mV e , a partir do estudo da superfície de resposta, conclui-se que a melhor frequência de trabalho se encontra no maior ponto codificado: sendo assim, a frequência de trabalho será de 170 s^{-1} .

4.4 Aplicação da Técnica SWV sob condições otimizadas

Após a otimização das condições experimentais para o eletrodo de DDB, foram construídas curvas analíticas para o paraquat e diquat por meio da SWV. Realizaram-se medidas voltamétricas no intervalo de -0,3V a -1,2 V em diferentes concentrações dos pesticidas, de 9.90×10^{-7} a 3.15×10^{-5} em $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

Na FIGURA 27a podem-se observar os voltamogramas obtidos em cada concentração de paraquat; na parte b da mesma figura, a curva analítica, de corrente de pico em função da concentração.

Como pode ser observado na FIGURA 27b, a curva é uma reta cuja equação é:

$$I_p/\mu\text{A} = 1,214\text{E}-5 + 2,172 * [\text{paraquat}]$$

Equação 23

Esta reta possui um coeficiente de correlação $r = 0,997$ para o primeiro pico voltamétrico.

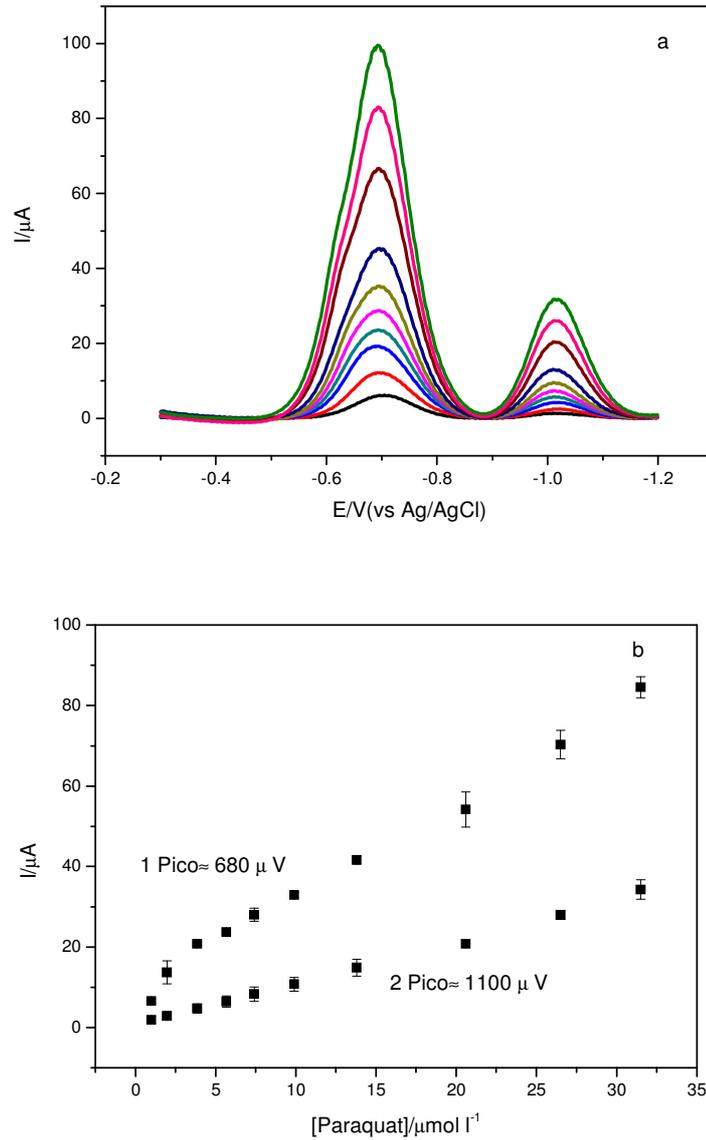


FIGURA 27- (a) Voltamogramas de SWV utilizando o eletrodo de DDB em meio de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ contendo diferentes concentrações de paraquat, no intervalo de $9,90 \times 10^{-7}$ a $3,15 \times 10^{-5}$. (b) Curva de corrente de pico em função da concentração obtida a partir da parte (a) da Figura.

Na FIGURA 28, são apresentados os dados equivalentes para o diquat. Neste caso, a equação da reta é descrita por:

$$I_p/\mu\text{A} = 1,147\text{E-}5 + 2,782 * [\text{diquat}]$$

Equação 24

Com um coeficiente de correlação de 0,997 para o primeiro pico voltamétrico.

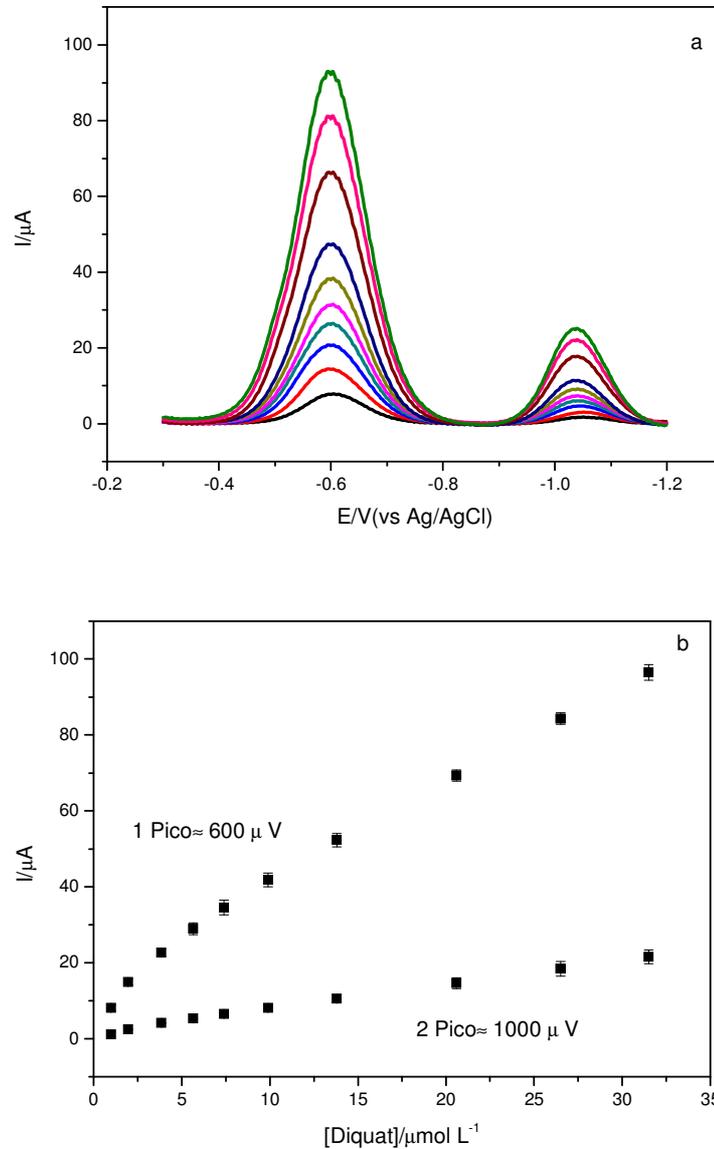


FIGURA 28- (a) Voltamogramas de SWV utilizando o eletrodo de DDB em meio de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ contendo diferentes concentrações de diquat, no intervalo de $9,90 \times 10^{-7}$ a $3,15 \times 10^{-5}$. (b) Curva de corrente de pico em função da concentração obtida a partir da parte (a) da Figura.

Os limites de detecção e quantificação foram calculados respectivamente a partir das Equação 25 (a) e (b). Os valores obtidos se encontram na TABELA 39.

$$LD = \frac{3 Sd}{b} \text{ (a)} \quad LQ = \frac{10 Sd}{b} \text{ (b)}$$

Equação 25

Onde: Sd= desvio padrão do intercepto da curva analítica e b= inclinação da reta.

O estudo da repetibilidade foi realizado em decuplicata (n=10) para solução de paraquat e diquat respectivamente com concentração de 7.60×10^{-6} mol L⁻¹. Para o estudo da reprodutibilidade foram realizadas 5 medidas de corrente em dias diferentes com soluções diferentes de 7.60×10^{-6} mol L⁻¹. Os valores obtidos se encontram na TABELA 39.

TABELA 39 - Limites de detecção e quantificação, repetibilidade e reprodutibilidade para o paraquat e diquat

	Paraquat	Diquat
Limite de detecção	$9,60 \times 10^{-7}$ mol L ⁻¹	$4,63 \times 10^{-7}$ mol L ⁻¹
Limite de quantificação	$32,0 \times 10^{-7}$ mol L ⁻¹	$15,6 \times 10^{-7}$ mol L ⁻¹
Repetibilidade (n=10)	0,72%	0,44%
Reprodutibilidade (n=5)	2,5%	5,1%

4.5 Determinação Simultânea dos pesticidas paraquat e diquat

A matriz de planejamento CCD, apresentada na TABELA 40, já com os valores decodificados de concentração, foi utilizada na obtenção dos perfis voltamétricos, para a construção de matriz de calibração. As análises foram realizadas de forma aleatória e em duplicata.

TABELA 40-Planejamento CCD para construção da matriz de calibração dos pesticidas.

Ensaio	Paraquat/ $\mu\text{mol L}^{-1}$	Diquat/ $\mu\text{mol L}^{-1}$
1	5,820	5,820
2	24,46	5,820
3	5,820	24,46
4	24,46	24,46
5	1,960	15,14
6	28,32	15,14
7	15,14	1,906
8	15,14	28,32
9	15,14	15,14

Na FIGURA 29, estão presentes os voltamogramas referentes à matriz de planejamento CCD anterior. Esse conjunto de dado será utilizado para análises quimiométricas como conjunto de calibração.

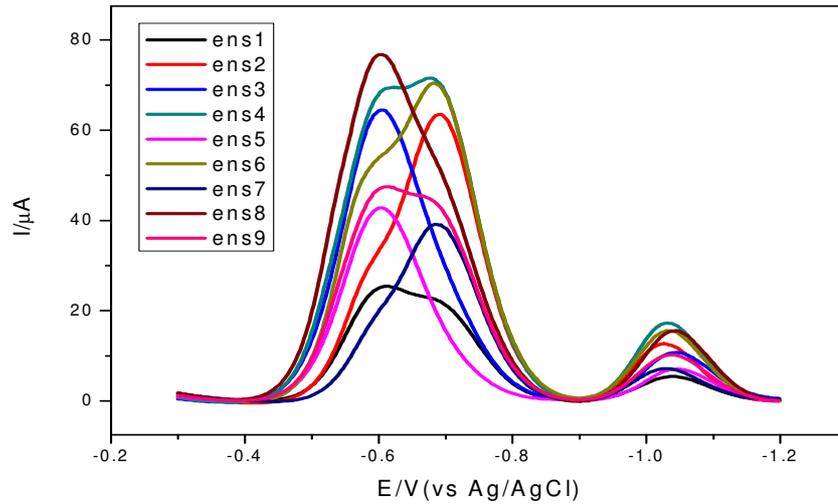


FIGURA 29-Voltamogramas de SWV para determinação simultânea dos pesticidas paraquat/diquat para o conjunto de calibração em meio de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com a técnica de SWV utilizando os seguintes parâmetros: $f = 170 \text{ s}^{-1}$, $a = 40 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$.

Um novo conjunto de dados foi obtido a fim de utilizá-lo para a validação. Na TABELA 41, temos um planejamento fatorial com os valores decodificados para a concentração. Na FIGURA 30, podemos observar os voltamogramas obtidos a partir do planejamento.

TABELA 41-Planejamento fatorial para construção da matriz de validação dos pesticidas.

Ensaio	Paraquat/ $\mu\text{mol L}^{-1}$	Diquat/ $\mu\text{mol L}^{-1}$
1	3,890	3,890
2	19,80	3,890
3	3,890	19,80
4	19,80	19,80
5	11,84	11,84

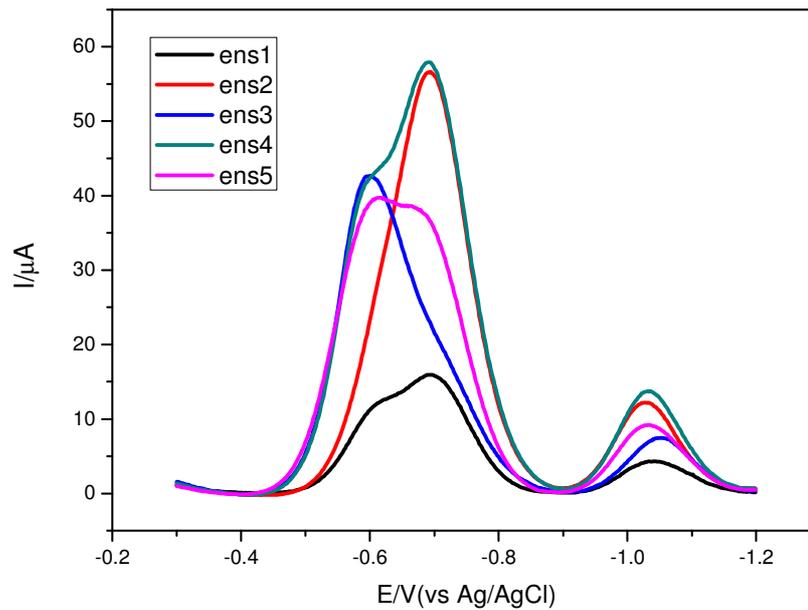


FIGURA 30-Voltamogramas de SWV para determinação simultânea dos pesticidas paraquat/diquat para o conjunto de validação em meio de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com a técnica de SWV utilizando os seguintes parâmetros: $f = 170 \text{ s}^{-1}$, $a = 40 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$. $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$.

4.5.1 Determinação simultânea utilizando o PLS

Inicialmente, os dados voltamétricos passaram por uma etapa de pré-processamento onde os dados originais, referentes à corrente para cada um dos potenciais medidos, foram centrados na média conforme o procedimento descrito na seção experimental. Após esta etapa, os dados originais (voltamogramas) foram transformados em sua primeira derivada.

Após o pré-tratamento, os dados tratados foram utilizados na construção do modelo utilizando PLS no espaço das componentes principais (pré –tratamento, Scores e loadings Apendice 8) . Na construção do modelo, utilizando PLS, foram utilizados dois métodos de validação: a validação cruzada (*Leave one out*) e a validação externa.

Na etapa de validação cruzada ou interna foram utilizadas as amostras e suas replicatas contidas no conjunto de calibração, apresentado na TABELA 40, contendo 18 voltamogramas onde a corrente foi medida em 454 valores de potenciais diferentes. Este conjunto é denominado matriz X. A matriz y foi formada com 9 amostras, em replicatas, totalizando 18, cada uma contendo os 2 em concentrações descritas na TABELA 40.

Na TABELA 42, estão dispostos os resultados obtidos para a modelagem com a validação cruzada. Podemos observar que os pesticidas apresentam uma boa previsão, mostrando ótimos resultados de número de fatores, PRESS, SEP e correlação (r). Sendo estes indicadores analisados como bons quando possuem os menores valores de PRESS, RMSEV e uma correlação entre os dados próxima a 1.

TABELA 42-Valores de PRESS, SEP e correlação(r) obtidos para o modelo de PLS- centrado na média e primeira derivada utilizando validação cruzada

Indicadores	paraquat	diquat
Número de fatores	2	2
PRESS	14,22 $\mu\text{mol L}^{-1}$	18,32 $\mu\text{mol L}^{-1}$
RMSEV	1,03 $\mu\text{mol L}^{-1}$	1,11 $\mu\text{mol L}^{-1}$
r	0,9926	0,9902

Com base nos valores obtidos no método PLS, é possível uma melhor visualização dos dados através da FIGURA 31. Nesta Figura, podemos observar a relação entre as concentrações previstas e as concentrações reais. O coeficiente de correlação prevê uma relação linear com valores de 0,993 e 0,990 para o paraquat e diquat respectivamente.

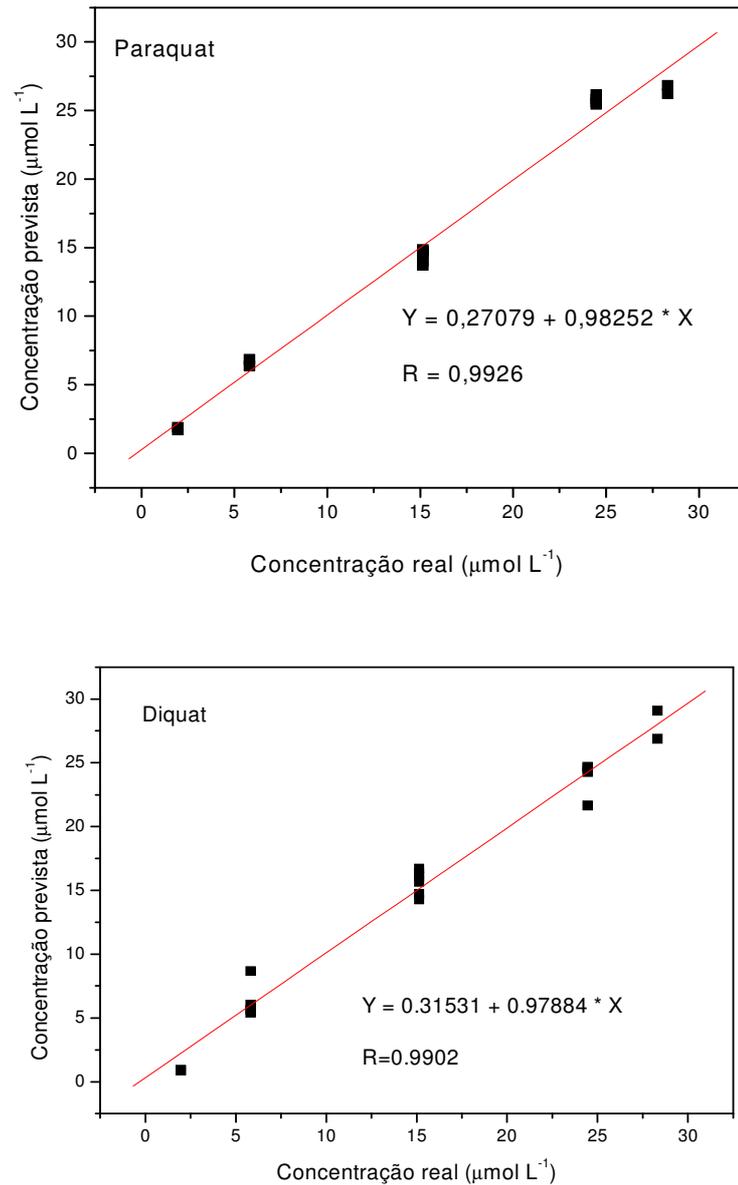


FIGURA 31- Concentrações previstas x concentrações reais para o paraquat e diquat na validação cruzada utilizando algoritmo PLS

Com a validação do conjunto de calibração, através da validação cruzada, a próxima etapa consiste na utilização do modelo obtido para verificar se o mesmo explica o conjunto de validação (amostras externas).

Para esta nova etapa de validação, conhecida como validação externa, um conjunto contendo os valores de corrente de 5 voltogramas e mais as 5 réplicas medidos em 454 potenciais, onde as concentrações dos

analitos são aquelas apresentadas na TABELA 41, será a matriz X. A matriz Y contém as 5 amostras dos 2 pesticidas, mais as replicatas.

O tratamento dos dados utilizados na calibração externa é similar ao aplicado na validação cruzada realizada anteriormente. Os resultados obtidos se encontram na TABELA 43.

TABELA 43- Valores de PRESS, SEP e correlação (r) obtidos para o modelo de PLS- centrado na média e primeira derivada utilizando validação externa

Indicadores	paraquat	diquat
Número de fatores	2	2
PRESS	37,87 $\mu\text{mol L}^{-1}$	246,74 $\mu\text{mol L}^{-1}$
RMSEP	1,39 $\mu\text{mol L}^{-1}$	2,22 $\mu\text{mol L}^{-1}$
r	0,997	0,933
Inclinação	1,13	0,82
Intercepto	0,0935	-2,150

Os dados obtidos na validação externa utilizando o método PLS, podem ser mais bem visualizados através da FIGURA 32, onde podemos observar as concentrações reais *versus* as previstas, possuindo um comportamento linear com coeficientes de correlação de 0,997 e 0,933 para o paraquat e diquat respectivamente.

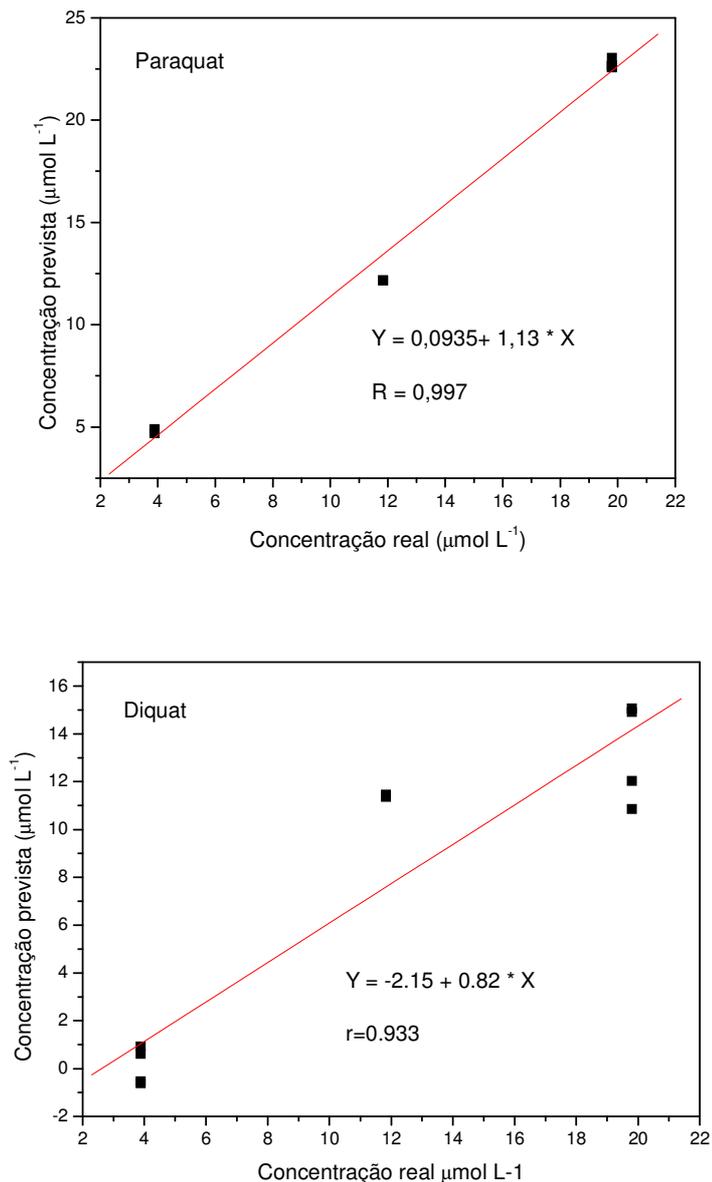


FIGURA 32-Concentrações previstas x concentrações reais para o paraquat e diquat na validação externa utilizando algoritmo PLS.

Com base na validação externa, podemos observar que ao trabalharmos com o paraquat obtivemos melhores resultados de PRESS e SEP se comparado ao diquat. E, de forma geral, os resultados são razoáveis para a determinação simultânea dos pesticidas paraquat e diquat.

5 - Conclusões

A análise, a partir de métodos quimiométricos, foi abordada neste trabalho de forma ampla desde a utilização de planejamento de experimento à utilização de Análise Multivariada.

O planejamento de experimentos permitiu a diminuição do número de experimentos e o estudo das interações entre as variáveis.

A frequência, amplitude e suas combinações foram as variáveis mais significativas sobre a resposta voltamétrica, já o incremento não apresentou influência significativa na resposta.

Através da Análise Multivariada, obteve-se a separação da mistura paraquat/diquat com um RMSEP de 1,39 para o paraquat e 2,22 para o diquat. Resultados melhores utilizando PLS podem não ter sido obtidos devido a uma falta de linearidade dos dados.

6-Apêndice

Apêndice 1- Fórmulas para cálculo do desvio para os efeitos e o teste t (student)

$$s_{efeito} = \sqrt{\frac{s_{total}^2}{N}}$$

Onde s_{total}^2 é a variância total e N, o número de replicatas.

$$s_{total}^2 = \frac{v_1 s_1^2 + v_2 s_2^2 + \dots + v_n s_n^2}{v_1 + v_2 + \dots + v_n}$$

Onde v_n representa os graus de liberdade para n

Apêndice 2- PCA para o planejamento fatorial referente ao paraquat

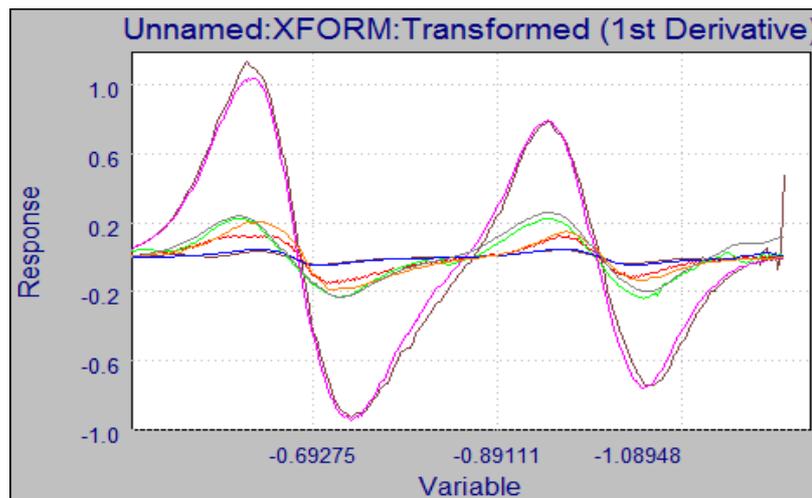


GRÁFICO A.2-1 Gráfico de primeira derivada referente ao planejamento fatorial do paraquat

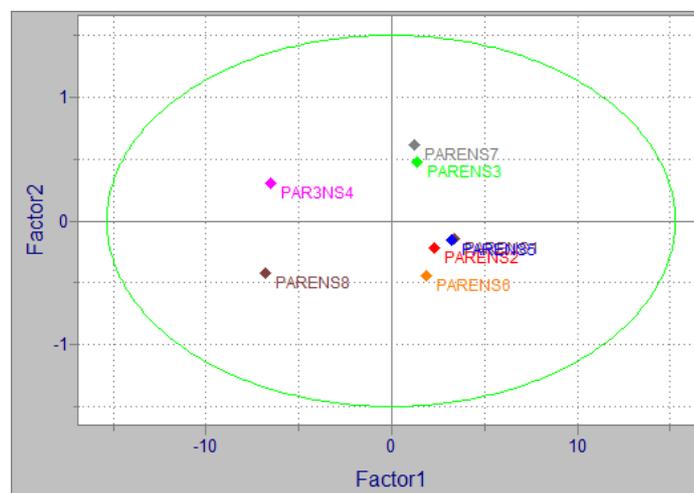


GRÁFICO A.2-2 Gráfico dos scores de PC1 *versus* PC2 referente ao planejamento fatorial do paraquat

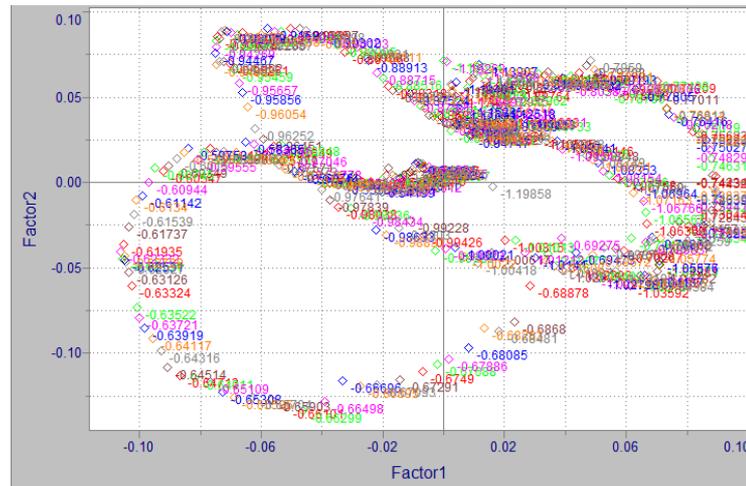


GRÁFICO A.2-3 Gráfico dos *loadings* de PC1 *versus* PC2 referente ao planejamento fatorial do paraquat

Apêndice 3- PCA para o planejamento fatorial referente ao diquat

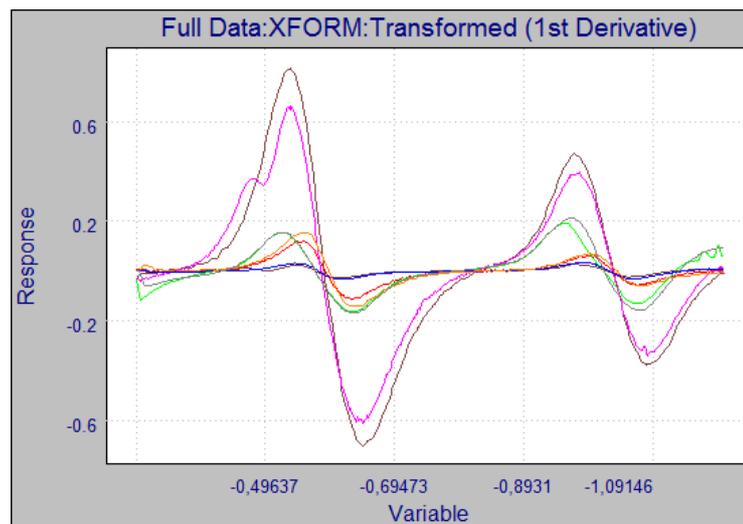


GRÁFICO A.3-1 Gráfico de primeira derivada referente ao planejamento fatorial do diquat

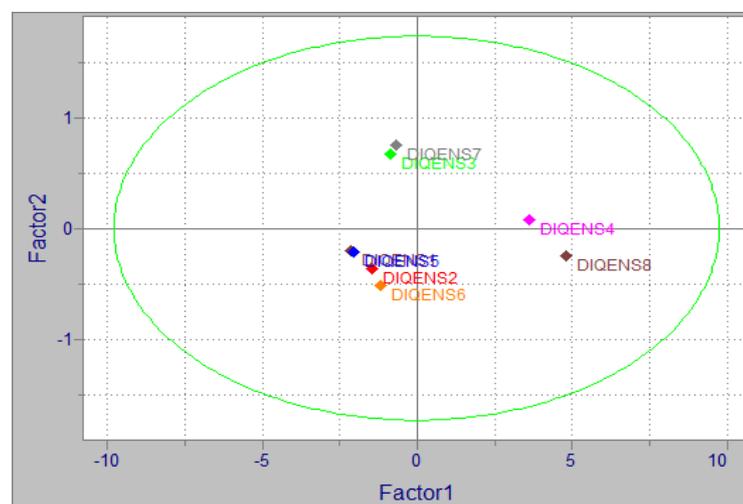


GRÁFICO A.3-2 Gráfico dos scores de PC1 *versus* PC2 referente ao planejamento fatorial do diquat

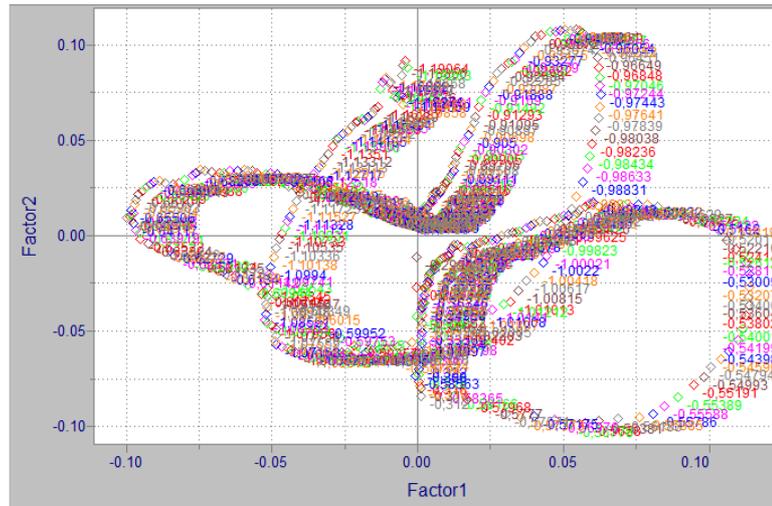


GRÁFICO A.3-3 Gráfico dos *loadings* de PC1 *versus* PC2 referente ao planejamento fatorial do diquat.

Apêndice 4- PCA para o planejamento fatorial referente à mistura paraquat e diquat

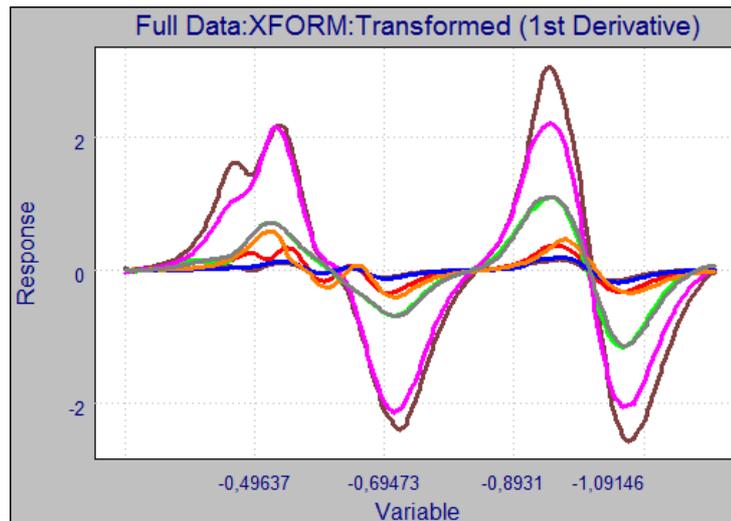


Gráfico A.4-1 Gráfico de primeira derivada referente ao planejamento fatorial da mistura.

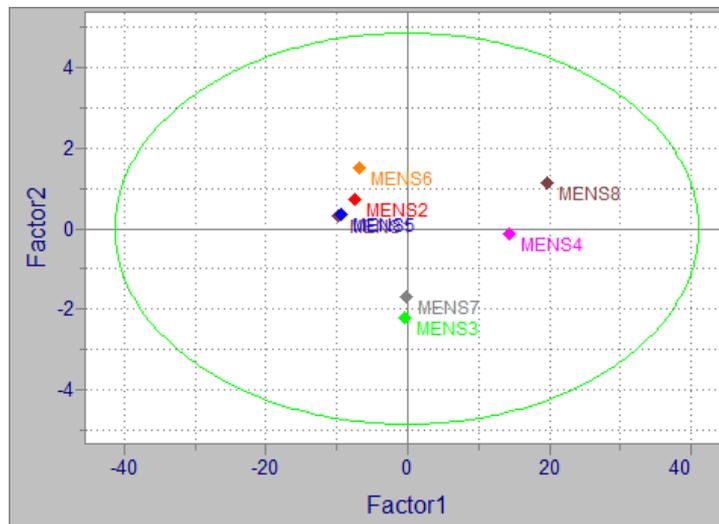


GRÁFICO A.4-2 Gráfico dos scores de PC1 *versus* PC2 referente ao planejamento fatorial da mistura

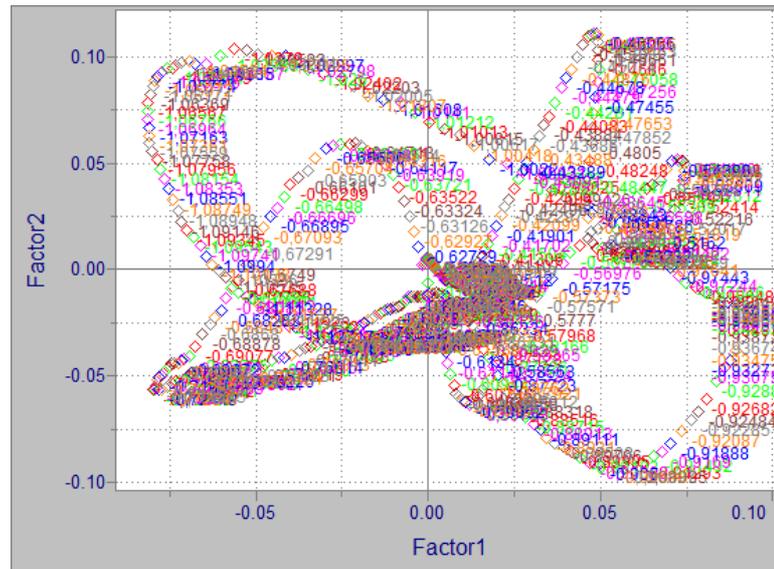


GRÁFICO A.4-3 Gráfico dos *loadings* de PC1 *versus* PC2 referente ao planejamento fatorial da mistura.

Apêndice 5 –PCA para o planejamento CCD referente ao paraquat

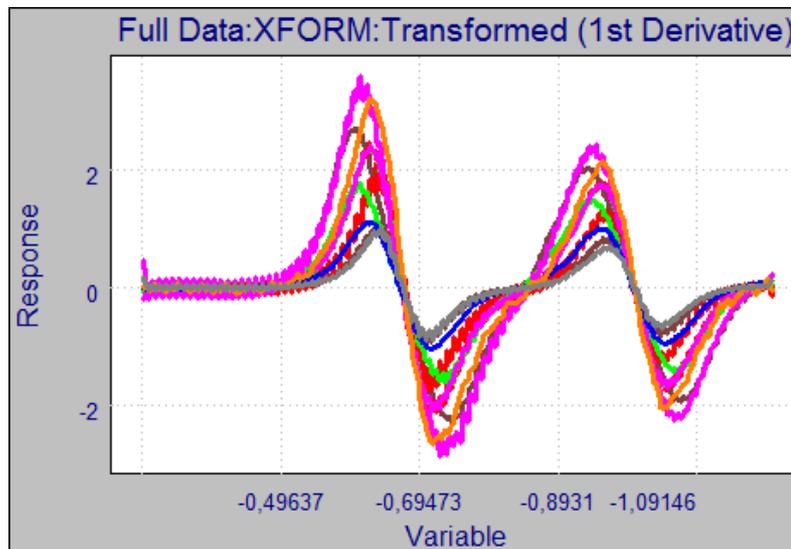


GRÁFICO A.5-1 Gráfico de primeira derivada referente ao planejamento CCD para o paraquat.

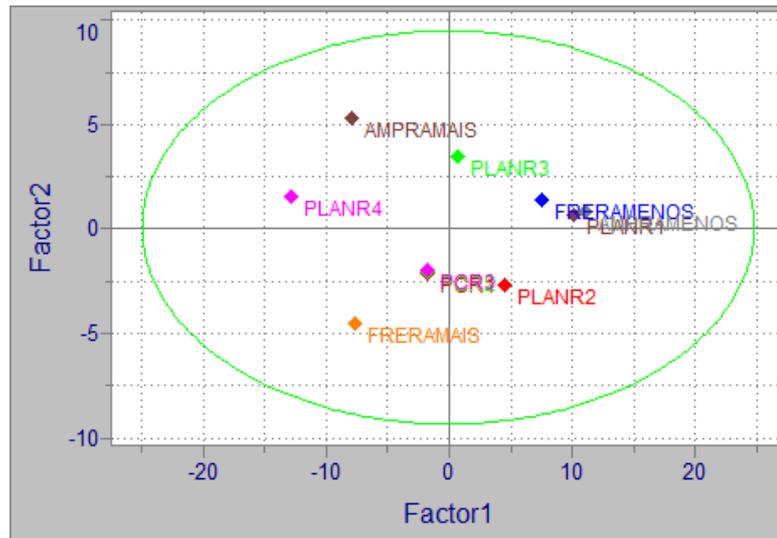


GRÁFICO A.5-2 Gráfico dos *scores* de PC1 versus PC2 referente ao planejamento CCD para o paraquat.

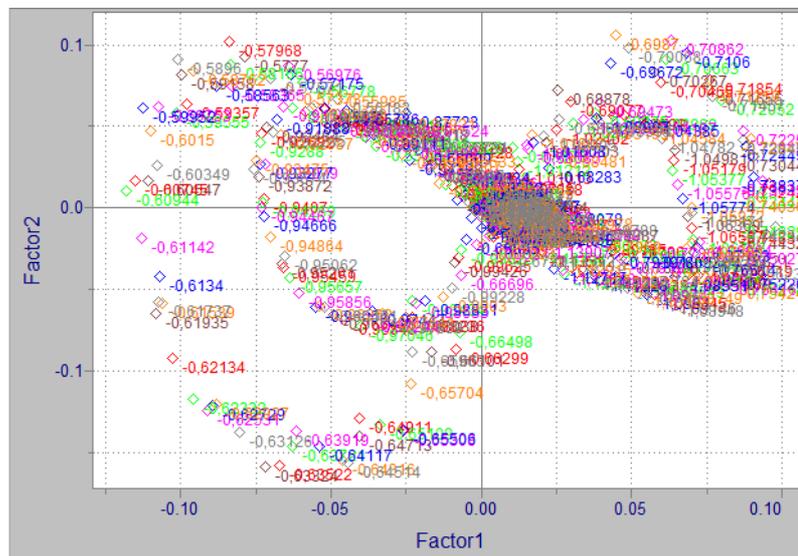


GRÁFICO A.5-3 Gráfico dos *loadings* de PC1 versus PC2 referente ao planejamento CCD para o paraquat.

Apêndice 6 – PCA para o planejamento CCD referente ao diquat

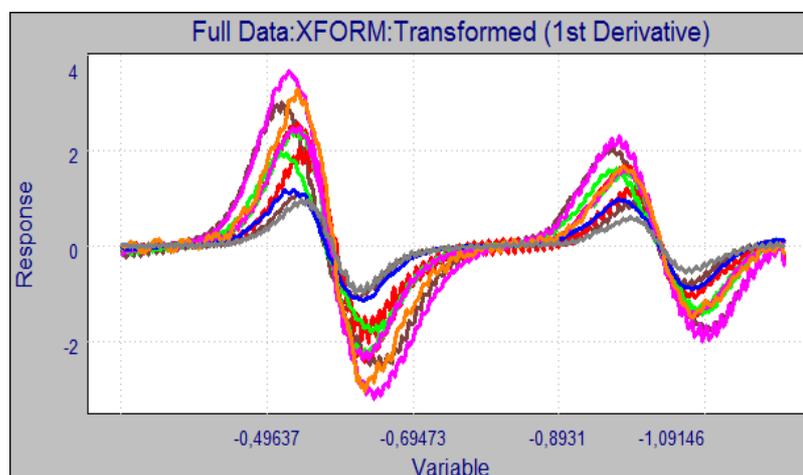


GRÁFICO A.6-1 Gráfico de primeira derivada referente ao planejamento CCD para o diquat.

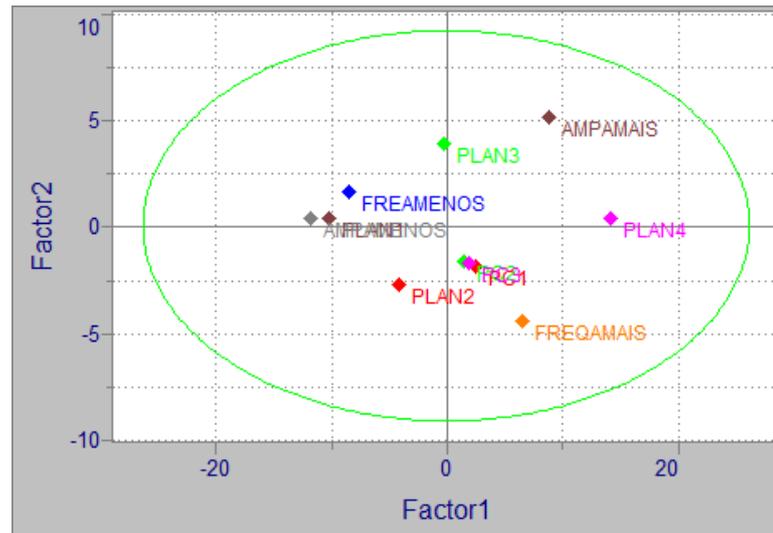


GRÁFICO A.6-2 Gráfico dos *scores* de PC1 versus PC2 referente ao planejamento CCD para o diquat.

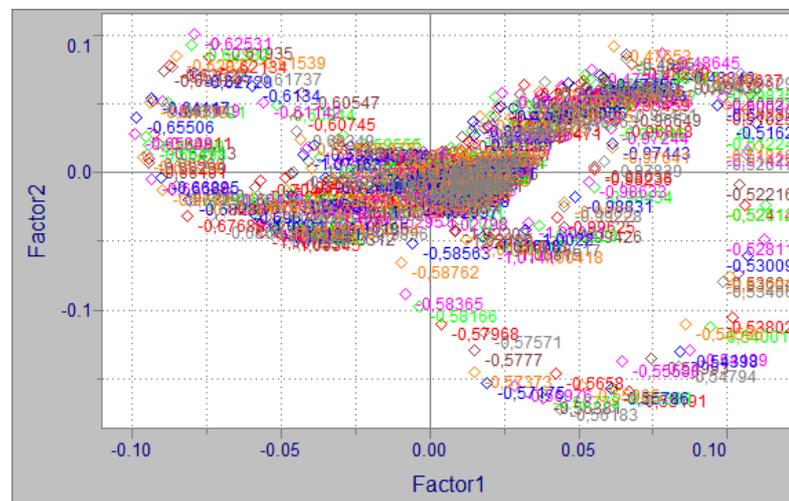


GRÁFICO A.6-3 Gráfico dos *loadings* de PC1 versus PC2 referente ao planejamento CCD para o diquat.

Apêndice 7 – PCA para o planejamento CCD referente à mistura paraquat/diquat

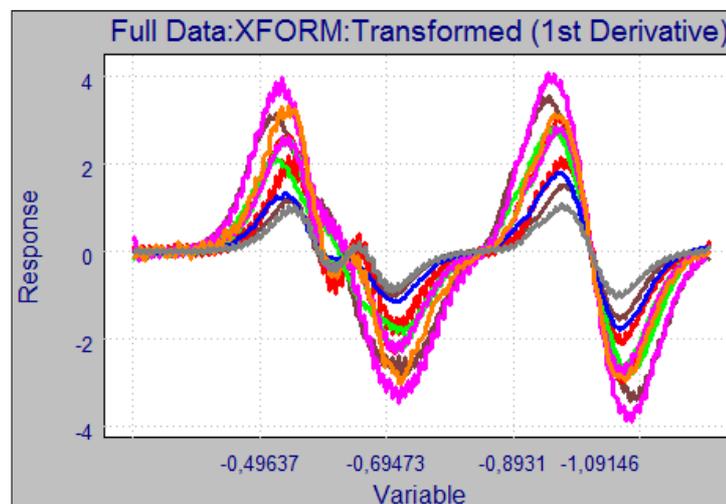


GRÁFICO A.7-1 Gráfico de primeira derivada referente ao planejamento CCD para a mistura paraquat/diquat.

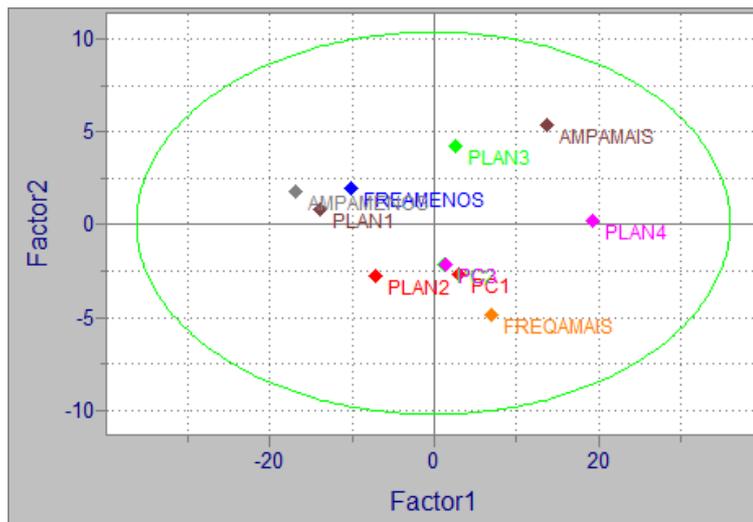


GRÁFICO A.7-2 Gráfico dos *scores* de PC1 versus PC2 referente ao planejamento CCD para a mistura paraquat/diquat.

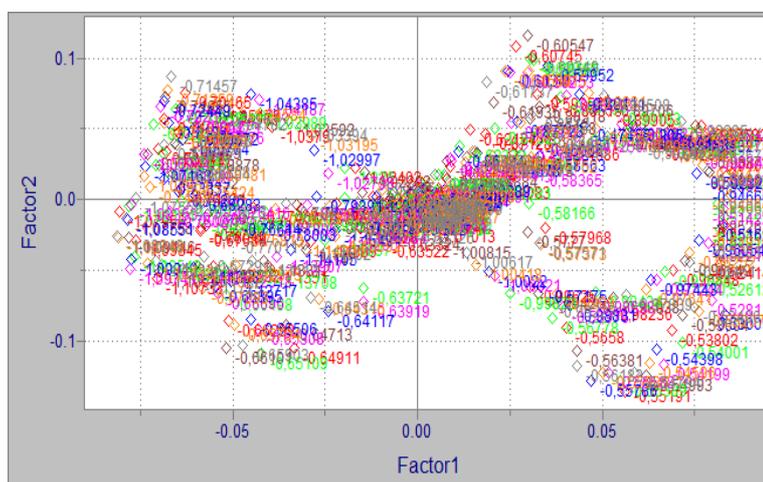


GRÁFICO A.7-3 Gráfico dos *loadings* de PC1 versus PC2 referente ao planejamento CCD para a mistura paraquat/diquat.

Apêndice 8 – PLS

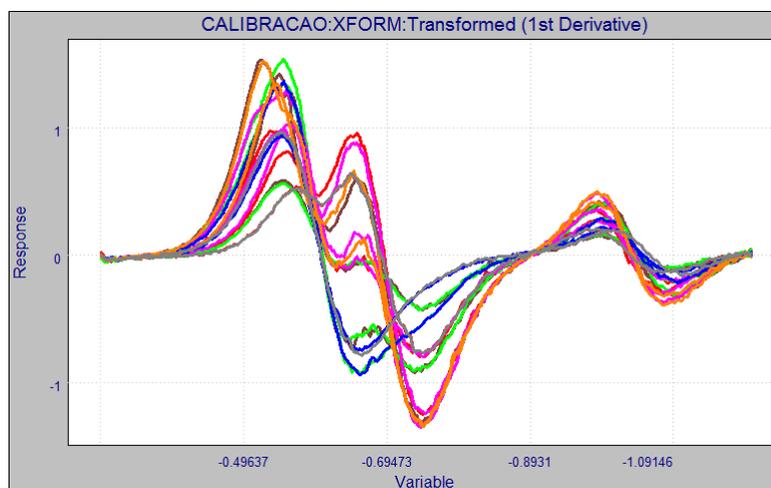


GRÁFICO A.8-1 Gráfico de primeira derivada referente ao conjunto de calibração.

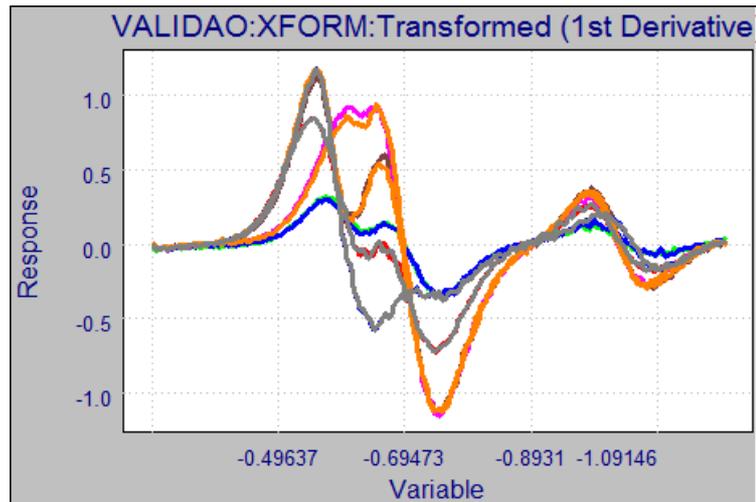


GRÁFICO A.8-2 Gráfico de primeira derivada referente ao conjunto de validação.

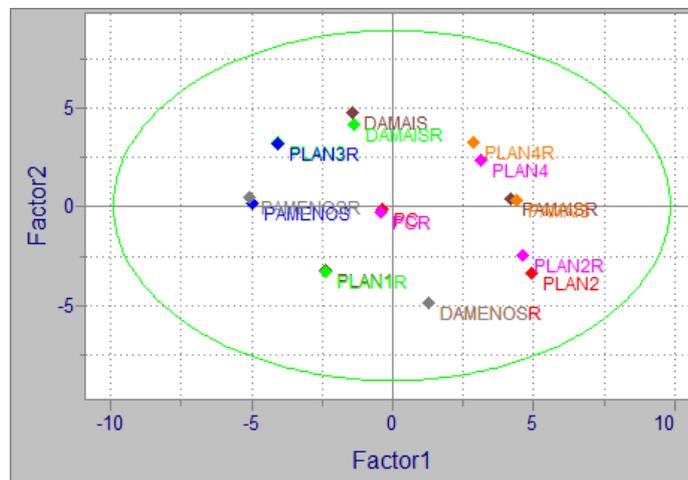


GRÁFICO A.8-3 Gráfico dos *scores* referente ao conjunto de calibração para o paraquat.

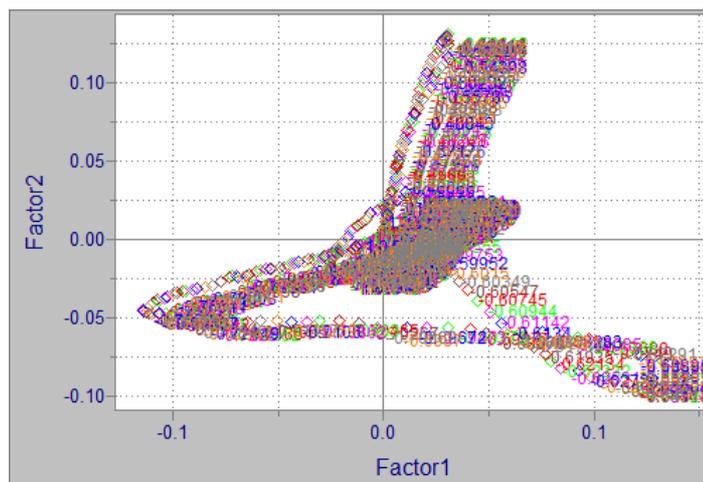


GRÁFICO A.8-4 Gráfico dos *loadings* referente ao conjunto de calibração para o paraquat.

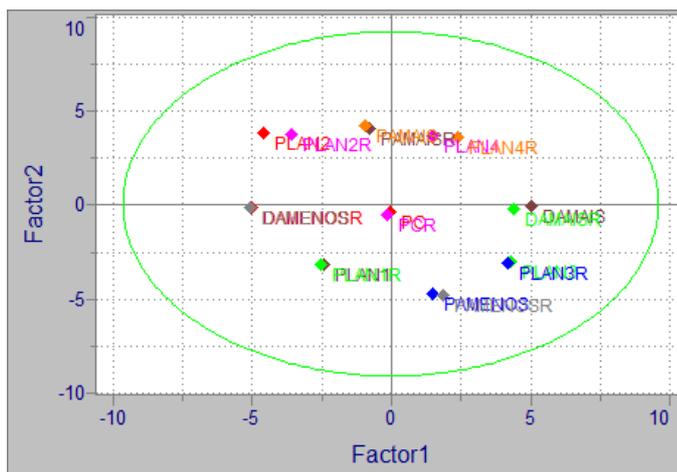


GRÁFICO A.8-5 Gráfico dos *scores* referente ao conjunto de calibração para o diquat.

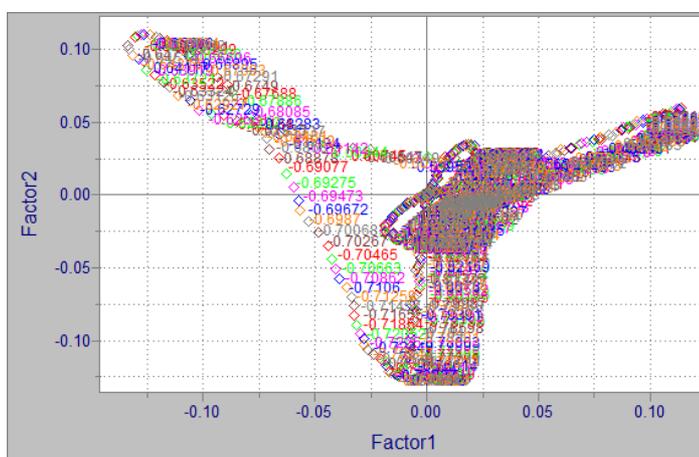


GRÁFICO A.8-6 Gráfico dos *loadings* referente ao conjunto de calibração para o diquat.

7 - Referências Bibliográficas

- ¹ MENTEN, J.; “Evolução do consumo de agrotóxicos no Brasil 2003-2007”. ANDEF 2008.
- ² SANCHES, S.M.; TOMICH DE, H.P.S.; CAMPOS, S.X.; VIEIRA, E.M.; Pesticidas e seus respectivos riscos associados à contaminação da água. *R. Exotoxicol. e Meio Ambiente*, 13, 53-58, 2003.
- ³ VAN DER HOFF, G.R.; VAN ZONEN, P.; Trace analysis of pesticides by gas chromatography. *J. of Chro.*, 843(1-1), 301-322, 1999.
- ⁴ BARKER, Z.; VENKATCHALAN, V.; MARTIN, A.N.; FARQUAR, F.G.; FRANK, M.; Detecting trace pesticides in real time using single particle aerosol mass spectrometry. *Anal Chim Acta.*, 661(2), 188-194, 2010.
- ⁵ MANISANKAR, P.; SUNDARI, P.A.; SASIKUMA, R.; PALANIAPPAN, S.; Electroanalysis of some common pesticides using conducting polymer/multiwalled carbon nanotubes modified glassy carbon electrodes. *Talanta*, 76(5), 1022-1028, 2008.
- ⁶ FERRER, I.; GARCIAREYES, J.; MEZCUA, M.; THURMAN, E.; FERNANDEZALBA, A.; Multi-residue pesticide analysis in fruits and vegetables by liquid chromatography time-offlight mass spectrometry. *J of Chrom.*, 1082(1), 81-90, 2005.
- ⁷ LOCATELLI, C.; Analytical procedures for the simultaneous voltammetric determination of heavy metals in meals. *Microchem.*, 75(3), 233-240, 2003.
- ⁸ DE SOUZA, D.; MACHADO, S.A.S.; AVACAL, A.; Voltametria de onda quadrada .primeira parte: Aspectos teóricos. *Quim. Nova*, 26(1), 81-89, 2007.
- ⁹ GARBELLINI, G.S.; PEDROSA, V.A.; SALAZAR-BANDA, G.R.; AVACA, L.A.; Metodologia eletroanalítica para a determinação de herbicidas triazínicos por voltametria de onda quadrada e técnicas de deconvolução. *Quim. Nova*, 30(8), 2025-2030, 2007.
- ¹⁰ TAULER, R.; SMILDE, A.; KOWALSKI, B.; Selectivity, local rank, three-way data analysis and ambiguity in multivariate curve resolution. *J of Chemometrics*, 9, 31-58, 1995.
- ¹¹ ESTEBAN, M.; ARINO, C.; TAULER, R.; Multivariate curve resolution with alternating least squares optimization a soft-modelling approach to metal complexation studies by voltammetric techniques. *Trends in Anal. Chem.*, 19(1), 49-61, 2000.
- ¹² NI Y, QIU, P.; KOKOT, S.; Simultaneous determination of three organophosphorus pesticides by differential pulse stripping voltammetry and chemometrics. *Anal Chim Acta*, 516(1-2), 7-17, 2004.
- ¹³ NI, Y.; Simultaneous polarographic chemometric determination of lead, copper, vanadium, cadmium and nickel. *Chemom and intel lab Systems*, 45(1-2), 105-111, 1999.

-
- ¹⁴ NI, Y.; Voltammetric determination of chlorpromazine hydrochloride and promethazine hydrochloride with the use of multivariate calibration. *Anal Chim Acta*, 439(1), 159-168, 2001.
- ¹⁵ ESTEBAN, M.; ARINO, C.; DIAZ CRUZ, J.; Chemometrics for the analysis of voltammetric data. *Trends in Anal Chem*, 25(1), 86-92, 2006.
- ¹⁶ KOKOT, S.; GRIGG, M.; PANAYIOTOU, H.; PHUONG, T. D.; Data interpretation by some common chemometrics methods. *Electroanalysis*, 10(16), 1081-188, 1998.
- ¹⁷ JEROEN, B.; KOOMEN, I.; VAN LIDTH DE JEUDE, J.; *Pesticidas: compostos, usos e perigos*. 1 edição Fundação Agromisa, Wageningen, 2005
- ¹⁸ UNNEVEHR, L.; Changing pesticide policies: Introduction. *Food Policy*, 22(2), 105-107, 1997
- ¹⁹ BERTOLUZZA, A.; BONORA, S.; FINI, G.; FRANCIOSO, O.; MORELI, M. A.; Interaction of bipyridilium herbicides with model membranes. *Chem and Phy of Lipids*, 3084(94), 137-143, 2007.
- ²⁰ DE SOUZA, D.; GALLI, A.; CALEGARO, M. I.; MACHADO, S. A. S.; Utilização da múltipla voltametria de onda quadrada na determinação eletroanalítica de compostos orgânicos e inorgânicos. *Quim Nova*, 30(2), 458-463, 2007.
- ²¹ DA SILVA, A. A.; DOMINGOS, M.; CARDOSO, A. A.; Efeitos do paraquat e da mistura paraquat diquat como dessecantes aplicados em diferentes épocas no rendimento e na qualidade fisiológica das sementes de feijão. *R Ceres*, 46, 239-250, 1999
- ²² ALMEIDA, A. A. D.; Uso de métodos quimiométricos e otimização das condições experimentais para análise de chás comerciais da *Camellia sinensis*. Univ Est de Londrina, 2006, 126p.
- ²³ PORTARIA Nº 10/SNVS DE 08 DE MARÇO DE 1985. http://WWW.anvisa.gov.br/legis/portarias/10_85.htm. acessada em 11 de 2010.
- ²⁴ PARAQUAT (CASRN 1910-42-5). <http://WWW.epa.gov/iris/subst/0183.htm>. acessada em 11 de 2010.
- ²⁵ DIQUAT (CASRN 85-00-7). <http://WWW.epa.gov/iris/subst/0153.htm>. acessada em 11 de 2010.
- ²⁶ RODRIGUEZ MOZAZ, S.; Monitoring of estrogens, pesticides and bisphenol A in natural waters and drinking water treatment plants by solid-phase extraction/liquid chromatography/mass spectrometry. *J of Chrom*, 1045(1-2), 85-92, 2004
- ²⁷ GREY, L.; NGUYEN, B.; YANG, P.; Liquid chromatography-electrospray ionization isotope dilution mass spectrometry analysis of paraquat and diquat using conventional and multilayer solid-phase extraction cartridges. *J of Chrom A*, 958, 25-33, 2002.

-
- ²⁸ IBÁÑEZ,M.;PICO,Y.;MANES,J.;Influence of organic matter and surfactants on solid-phase extraction of diquat, paraquat and difenzoquat from waters. *J of Chrom A*,727, 245-252, 1996.
- ²⁹ WANG K-C.;CHEN S-M.;HSU J-F.;LEEC-K.;Simultaneous detection and quantitation of highly water-soluble herbicides in seru using ion-pair liquid chromatography- tandem mass spectrometry. *J of Chrom*, 876, 211-218, 2008.
- ³⁰ ALMEIDA,M.R.D.;YONAMINE,M.;Gas chromatographic-massspectrometric method for the determination of the herbicides paraquat and diquat in plasma and urine samples. *J of Chrom*, 853, 206-264, 2007
- ³¹ TAGUCHI,V.Y.;JENKINS,S.W.D.;CROZIER,P.W.;WANG,D.T.;Determination od diquat and paraquat in water by liquid chromatography.*J Am Soc Mass Spectrometric*, 305(98), 1998.
- ³² PÉREZ-RUIZ,T.;MARTINEZ-LOZANO,C.;TOMÁS,V.;Simultaneos flow injection determination od diquat e paraquat in foodstuffs, natural waters and biological fluids. *Intern J Environ Anal Chem*, 44, 243-252, 2011.
- ³³ MELO,L.C.;DE SOUZA,D.;DE LIMA-NETO,P.;CORREIA.,A.N.;Sensitive determination of diquat herbicide in fresh food samples on a highly boron-doped diamond electrode. *Electroanal*, 22(21), 2502-2510, 2010.
- ³⁴MHAMMEDI,M.A.E.;BAKASSE,M.;BACHIRAT,R.;CHTAINI,A.;Square wave voltammetry for analytical determination of paraquat at carbon paste electrode modified with fluoroapatite. *Food Chemistry*, 110,1001-1006,2008.
- ³⁵ ALVAREZ,E.;SEVILLA,M-T.;PINILLA,J.M.;HERNANDEZ,F.;Cathodic stripping voltammetry of paraquat on a carbon paste electrode modified with amberlite XAD-2 resin. *Analyt Chimi Acta*, 260(1), 19-23, 1992
- ³⁶ FIGUEREIDO-FILHO,L.C.S.D.;SANTOS,B.;JANEGITZ,C.;GUERREIRO,B.;Diferential pulse voltammetric determination of paraquat using a bismuth-film electrode. *Electroanalysis*, 11, 1260-1266, 2010.
- ³⁷ MHAMMEDI,M.A.E.;BAKASSE,M.;NAJIH,R.;CHATINI,A.; A carbon paste electrode modified with kaolin for the detection of diquat. *Applied Clay Science*, 43(1), 130-134, 2010.
- ³⁸ DE SOUZA ,D.;MACHADO,S.;Electochemical detection of the herbicide paraquat in natural water and citric fruit juices using microelectrode. *Anal Chim Acta*, 546(1), 85-91, 2005
- ³⁹ XIAO,L.;WILDOGOOSE,G.G.;COMPTONR.G.;Investigating the voltammetric reduction of methyviologen at gold and carbon based electrode materials. /evidence for a surface bound adsorption mechanism leading to electrode “protection”using multi´walled carbon nanotubes . *New J of Chem*,32(9), 1628, 2008.
- ⁴⁰ MHAMMEDI,M.A.E.;BAKASSE,M.;CHTAINI,A.;Investigation of square wave voltammetric detection of diquat at carbon paste electrode impregnated with $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$: Application in natural water samples.*Material Chem and Phy*, 109(2-3), 519-525, 2008.

-
- ⁴¹ WANG,J.;Analytical Electrochemistry .Wiley-VCH ,222p, 2000.
- ⁴² RAMALEY,L.;KRAUSE,M.S.;Theory of square wave voltammetry. Anal Chem, 41(11),1362-1365, 1969
- ⁴³ CHRISTIE,J.H.;TURNER,J.A.;OSTERYOUNG,R.A.;Square wave voltammetry at the dropping mercury electrode: theory. Anal Chem, 49(13), 1899-11903, 1977.
- ⁴⁴ COMPTON,R.G.;FOORD,J.S.;MARKEN,F.;Electroanalysis at diamondlike and doped-diamond electrodes. Electroanalysis,17, 2003.
- ⁴⁵ PLESKOV,Y.V.;Synthetic diamond, a new electrode material for electroanalysis. /j of Anal Chem, 55(11), 1045-1050, 2000.
- ⁴⁶ LIMA-NETO,P.D.;CORREIA,A.N.;PORTELA,R.R.;Square wave voltammetric determination of nitrofuratoin in pharmaceutical formulations on highly boron-doped diamond electrodes at different boron-doping contents. Talanta, 80, 1730-1736, 2010.
- ⁴⁷GARBELLINI,G.S.;SALAZAR-BANDA,G.R.;AVACA,L.A.;Sonovoltammetric determination of toxic compounds in vegetables and fruits using diamond electrodes. Food Chem, 16(4),1029-1035, 2009.
- ⁴⁸ LIU,L.;ZHAO,G.;WU,M.;LEI,Y.;GENO,R.;Electochemical degradation of chlorobenzene on boron-doped diamond and platinum electrodes.J of Hazardour Materials, 11(9), 179-186, 2009.
- ⁴⁹ CIDIGBITI,L.;MACHADO,S.A.S.;AVACA,L.A.;Square wave voltammetryon boron-doped diamond electrodes for analytical determination. Diamond and Related Materials, 11(9), 1670-1675, 2002,
- ⁵⁰ BARROS,R.C.M.D.;RIBEIRO,M.C.;SUMODIO,P.T.;Filmes de diamantes CVD dopado com boro , parte 1:históricom produção e caracterização. Quim Nova, 28(2), 317-328, 2000.
- ⁵¹ PLESKOV,Y.V.;Synthetic diamond, a new electrode material for electroanalysis. J of anal Chem, 55(11), 1165-1171, 2002.
- ⁵² PLESKOV,Y.V.;Electrochemistry of diamond: a review. Russian J of Electrochem, 38(12), 1275-1291, 2002.
- ⁵³ PANIZZA,M.;CERISOLA,G.;Application of diamond electrodes to electrochemical processes, Electrochim Acta, 51(2), 191-199, 2005.
- ⁵⁴ RAO,T.N.;FUJISHIMA,A.;Recent advances in electrochemistry of diamond. Diamond and Related Materials, 9(3-6), 384-389, 2000.
- ⁵⁵ GIRARD,H.;SIMON,N.;BALLUTAUD,D.;HERLEM,M.;ETCHEBERRY,A.;Effect of anodic and cathodic treatments on the charge transfer fo boron doped diamond electrodes . Diamond and Relatade Materials, 16(2), 319-325, 2007.

-
- ⁵⁶ SIMON,N.;GIRARD,H.;BALLUTAUD,D.;Effect of H and O termination on the charge transfer of moderately boron doped diamond electrodes. *Diamond and Related Materials*, 14(3-7),1179-1182, 2005.
- ⁵⁷ SUFFREDINI,H.;PEDROSA,V.;CODOGNOTO,L.;Enhanced electrochemical response of boron-doped diamond electrodes brought on by a cathodic surface pre-treatment. *Electrochim Acta*, 49(22-26),4021-4026, 2004.
- ⁵⁸KUANDAINATHAN,M.;HALLIC,C.;WOLVERSON,D.; Boron-doped diamond electrodes in organic media: Electrochemical activation and selectivity effects. *J of Electroanal Chem*, 606(7), 150-158, 2007.
- ⁵⁹ PEDROSA,V.;CODOGNOTO,L.;MACHADO,S.;AVACA,L.;Is the boron-doped diamond electrode a suitable substitute for mercury in pesticide analysis? A comparative study of 4-nitrophenol quantification in pure and natural waters. *J of Electroanal Chem*, 573(1), 11-18, 2004.
- ⁶⁰ WOLD,S.;SIOSTROM,M.;Chemometrics, present and future success. *Chemometrics and intelligent Lab Systems*, 44(1-2),3-14, 1998.
- ⁶¹ MASSART,D.I.;Chemometrics:a textbook. Elsevier, 1988, 500p.
- ⁶²RODRIGUES,M.I.;IEMMA,A.F.;Planejamento de experimentos e otimização de processos: Uma estratégia seqüencial de planejamento. Casa do Pão Editora, 2008.
- ⁶³ NETI,B.B.;SARMINIO,I.S.;BRUNS,R.E.;Planejamento e otimização de experimentos. Unicamp, 1995, 300p.
- ⁶⁴FERREIRA,M.M.;ANTUNES,A.M.;MEIGO,M.S.;VOLPE,P.L.O.;Quimiometria I: Calibração multivariada, um tutorial. *Quim Nova*, 22(5), 724-731, 1999.
- ⁶⁵ TEÓFILO,R.F.;FERREIRA,M.M.C.;Quimiometria II:Planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos de experimentos, um tutorial. *Quim Nova*, 29(2),338-350, 2006.
- ⁶⁶ DEAN,A.;VOSS,D.;Design and analysis of experiments. Springer-Verlag, 2009, 764p..
- ⁶⁷ ANDERSON,M.J.;WITCOMB,P.J.;RSM simplified:optimizing processes using response surface methods for design of experiments.Productivity Press, 2005, 292p.
- ⁶⁸ BAS,D.;BOYACI,I.;Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. *J of Fodd Eng*, 78(3),836-845, 2007.
- ⁶⁹ LUNDSTEDT,T.;SEFERT,E.;ABRAMO,L.;Experimental design and optimization. *Chemom and Intel Lab Systems*, 42(1-2) 3-40, 1998.
- ⁷⁰BEZERRA,M.A.;SANTELLI,R.E.;OLIVEIRA,E.P.;VILLAR,L.S.;ESCALEIRA,L.A.; Response surface methodology(RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, 76(5), 965,977, 2008.

-
- ⁷¹ CHON,I-H.;ZOH,H-D;/Photocatalytic degradation of azo dye(reactive red120)in TiO₂/UV system: Optimization and modeling using a response surface methodology(RSM) based on the entral composite design. *Dyes and Pigmentos*, 75(3), 533-543, 2007.
- ⁷² ZHANG,X.;WANG,R.;YANG,X.;YU,J.;Central composite experimental design applied to the catalytic aromatization of isophorone to 3,5-xylenol. *Chemom and Intel Lab Systems*, 89(1),45-50, 2007.
- ⁷³ Guaracho,v.v.;kaminari,n.m.s.;pontes,h.a. Central composite experimental design aplied to removal of lead and nikel fron sanda. *J oif Hazardous Materials*,172, 1087-1092, 2006.
- ⁷⁴ ESCANDAR,G.;DAMIANI,P.;GOICOECHEA,H.;OLIVEIRI,A.;A review of multivariate calibration methods applied to biomedical analysis. *Microchemical J*, 82(1), 29-42, 2006
- ⁷⁵ RUPPECHT,M.;PROBST,T.;Development of a method for the systematic use of bilinear multivariate calibration methods for the correction of interferences in inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Anal Chim Acta*, 358(3), 205-225, 1998.
- ⁷⁶FORINA,M.;CASOLINO,M.C.;DE LA PEZUELA MARTINEZ,C.;Multivariate calibration: Applicatios to pharmaceutical analysis. *J of pharm and biomed anal*, 18(1-2), 21-33, 1998.
- ⁷⁷ WILLIAN,J.;BRAGA,B.;JESUS,R.;Validação de modelos de calibração multivariada: Uma aplicação na determinação de pureza polimórfica de carbamazepona por espectroscopia no infravermelho próximo. *Quim Nova*,27(6), 1004-1011, 2004..
- ⁷⁸ KIM,H-C.;KIM,D.;BANG,S.Y.;Na efficient model order selection for PCA mixture model. *Pattern Recognition Letters*, 24, 1385-1393, 2003 .
- ⁷⁹ NETO,J.M.M.;MOITA,G.C.;Uma introdução à análise exploratória de dados multivariados. *Quim Nova*, 21(4), 467-469, 1998.
- 80
- BASTIANONI,S.;PULSELLI,F.M.;FOCARDI,S.;TIEZI,E.B.P.;GRAMATICA,P.;Correlations and complemetarities in data and methods through Principal Components Analysis(PCA) applied to the results of the spin eco Project. *J of Env Management*, 86, 419-426, 2008.
- ⁸¹ CAMACHO,J.;PICÓ,J.;FERRER,A.;Data understanding with PCA: Structural and variance information plots. *Chemom and Intell Lab Systems*, 100(1), 48-56, 2010.
- ⁸² Brereton,r.g.;Introduction to multivariate calibration in analytical chemistry. *The Analyst*, 125(11), 2125-2154, 2000.
- ⁸³ BRERETON,R.G.;Chemometrics,data analysisfor the laboratory and chemical plant. *Jonh Wiley*,2003, 490p.
- ⁸⁴ LIPOVETSKY,S.;PCA and SVDwith nonnegative loadings. *Pattern Recognition*,42, 68-76, 2009.

-
- ⁸⁵ MATOS,G.D.;PEREIRA-FILHO,E.R.;POPI,R.J.;ARRUDA,M.A.Z.;Análise exploratória em química analítica com emprego de quimiometria: PCAe PCA de imagens. R Anal, 6, 38-50, 2003
- ⁸⁶ BERZAS,J.J.;RODRIGUES,J.;CASTAIEDA,G.;Partial least square metho in the analysis by square wave voltammetry.Simultaneous determination of sulphamethoxypyridazine and trimethoprim. Anal Chim Acta, 349(97), 303-311, 1997.
- ⁸⁷ ZHANG,L.;GARCIA-MUNOZ,S.;Chemometrics and intellligent laboratory systems.A compararison of different methods to estimate prediction uncertainty using Partial Least Squares(PLS): Apractitioner's perspective. Chemom and Intel Lab Systems, 97(2), 152-158, 2009
- ⁸⁸ MIRCESKI,V.;KOMORSY LOVRIC,S.;LOVRIC,M.;Square-wave voltammetry. Springer, 2007, 202 p.
- ⁸⁹ DE SOUZA,D.;MACHADO,S.A.S.;Estudo eletroanalítico do herbicida paraquat em soluções aquosas por voltametria de onda quadrada utilizando ultramicroeletrodos. Quim Nova, 26(5), 644-647, 2003.
- ⁹⁰ OSTERYOUNG,J.G.;OSTERYOUNG,R.A.;Square wave voltammetry. Analy Chem, 57(1),101-110, 1985.
- ⁹¹ BATHKE,A.; The ANOVA F test can still be used in some balanced designs with unequal varances and nonnormal data. J of Statistical Planning and Inference, 126(2), 413-422, 2004.
- ⁹² WALACRIUS,A.; LAMBERTS,L.; Square wave voltammetric determination of paraquat and diquat in aqueous solution. Environmental Protection, 405, 59-68, 1996.
- ⁹³ DE SOUZA,D.;MACHADO,S.A.S.;PIRES,R.C.; Multiple square wave voltammetry for analytical determination of paraquat in natural water,food and beverages using microelectrodes. Talanta, 69(5), 1200-12007, 2006.