

VALÉRIA FARIAS ANDRADE

**OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DA TÉCNICA DE EXTRAÇÃO SÓLIDO-
LÍQUIDO COM PURIFICAÇÃO EM BAIXA TEMPERATURA DE DIBENZO-
P-DIOXINA E DIBENZOFURANO POLICLORADOS EM
LODO DE ESGOTO E SOLO**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Produção Vegetal, área de concentração em Produção Vegetal, do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Produção Vegetal.

Área de concentração: Produção Vegetal

Orientador: Prof. Flaviano Oliveira
Silvério

Montes Claros – MG

2015

A447o Andrade, Valéria Farias.
2015

Otimização e validação da técnica de extração sólido-líquido com purificação em baixa temperatura de dibenzo-*p*-dioxina e dibenzofurano policlorados em lodo de esgoto e solo / Valéria Farias Andrade. Montes Claros, MG: Instituto de Ciências Agrárias/UFMG, 2015.

122 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal, Universidade Federal de Minas Gerais, 2015.

Orientador: Prof. Flaviano Oliveira Silvério.

Banca examinadora: Paulo Henrique Fidencio, Gevany Paulino de Pinho, Douglas Lopes Cassimiro e Flaviano Oliveira Silvério.

Referências: f: 112-122.

1. Dioxinas. 2. Lodo de esgoto-solo. I. Silvério, Flaviano Oliveira. II. Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais. III. Título.

CDU: 628.3

Elaborada pela Biblioteca Comunitária em Ciências Agrárias do ICA/UFMG

VALÉRIA FARIAS ANDRADE

OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DA TÉCNICA DE EXTRAÇÃO SÓLIDO-
LÍQUIDO COM PURIFICAÇÃO EM BAIXA TEMPERATURA DE DIBENZO-*P*-
DIOXINA E DIBENZOFURANO POLICLORADOS EM
LODO DE ESGOTO E SOLO

Prof. Flaviano Oliveira Silvério
Orientador (ICA/UFMG)

Aprovada em 30 de outubro de 2015.

Montes Claros – MG
2015

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, por me dar forças para vencer todos os obstáculos desta caminhada.

Ao meu marido, Douglas, por todo amor, incentivo e cumplicidade, por acreditar na minha escolha e por entender muitas vezes a minha ausência.

Ao meu filho, Heitor, que veio durante esta jornada para alegrar minha vida e me dar forças para vencer.

Aos colegas do Grupo de Pesquisa em Agroquímica que participaram direta e indiretamente da execução deste trabalho, obrigada por cada momento compartilhado e pela convivência amigável. Em especial: Ane, Ana Luiza e Alisson pela ajuda nos experimentos e amizade.

Aos meus orientadores: professor Flaviano Oliveira Silvério e professora Gevany Paulino de Pinho, pela confiança, compreensão, ensinamentos e infraestrutura disponibilizada.

Ao professor Waldemar de Paula Júnior, Coordenador do curso de Farmácia das Faculdades Santo Agostinho, pela compreensão e incentivo para esta conquista.

Ao Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais (ICA-UFMG) pela oportunidade de realização do mestrado e infraestrutura disponibilizada.

À FAPEMIG pelo auxílio financeiro, permitindo a condução desta pesquisa.

À Companhia de Saneamento (COPASA/MG), da cidade de Juramento, pelo fornecimento das amostras de lodo.

Por fim, a todos aqueles que colaboraram direta e indiretamente para conclusão deste trabalho.

MUITO OBRIGADA!

Dedico

*Ao Senhor meu Deus
A minha mãe Maria Aparecida
Ao meu marido Douglas
Ao meu filho Heitor*

Minha eterna gratidão a vocês...

*“Deem graças em todas as circunstâncias,
pois esta é a vontade de Deus para
você em Jesus Cristo.”*

1 Tessalonicenses 5:18

RESUMO

Lodo de esgoto é um resíduo sólido gerado durante o tratamento das águas residuárias nas Estações de Tratamento de Esgotos (ETEs). Depois de tratado e processado, esse material pode ser utilizado na agricultura como complemento de fertilizantes ou condicionador de solos agrícolas devido ao elevado conteúdo de material orgânico, bem como elementos essenciais às plantas, como nitrogênio e fósforo. Entretanto, essa prática pode levar à contaminação e acumulação de poluentes tóxicos e micro-organismos patogênicos em solos, plantas e animais, bem como entrar na cadeia alimentar ou ser transportado para rios ou até águas subterrâneas. No presente trabalho, a técnica de extração sólido-líquido com purificação em baixa temperatura (ESL-PBT) foi otimizada e validada para o monitoramento de 2,3,7,8-tetraclorodibenzeno-*p*-dioxina (2,3,7,8-TCDD) e 2,3,7,8-tetraclorodibenzenofurano (2,3,7,8-TCDF) em lodo de esgoto e solo. As análises foram realizadas por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. Para a extração desses compostos utilizou-se acetonitrila/acetato de etila (6,50 mL:1,50 mL). As porcentagens de extração foram superiores a 97 % com desvio padrão relativo inferior a 5 % para o lodo de esgoto e acima de 82% com desvio padrão relativo inferior a 7 % para o solo no limite de quantificação (LQ). Os LQ para o lodo de esgoto foram de 1,6 ng kg⁻¹ TEQ para o 2,3,7,8-TCDF e de 8 ng kg⁻¹ TEQ de 2,3,7,8-TCDD no lodo de esgoto. Já no solo os LQ foram de 0,2 ng kg⁻¹ TEQ para o 2,3,7,8-TCDF e de 2 ng kg⁻¹ TEQ de 2,3,7,8-TCDD. O método apresentou-se linear na faixa de concentração estudada (entre 1,25 a 25 µg L⁻¹ para o lodo de esgoto e entre 1,25 a 20 µg L⁻¹ para o solo), seletivo, exato e preciso. Sendo uma alternativa viável para o monitoramento de 2,3,7,8-TCDD e 2,3,7,8-TCDF em lodo de esgoto e solo para destinação agrícola.

PALVRAS-CHAVE: Dioxinas. ESL-PBT. Método de extração. Validação.

ABSTRACT

Sewage sludge is a solid residue generated during the treatment of wastewater in Sewage Treatment Plants (STPs). After treated and processed, this material can be used in agriculture as a complement to fertilizer or conditioner of agricultural soils due to the high content of organic material as well as essential elements to plants, such as nitrogen and phosphorus. However, this practice can lead to contamination and accumulation of toxic pollutants and pathogenic micro-organisms in soil, plants and animals, as well as enter the food chain or be transported to rivers or even groundwater. In the present work, the solid-liquid extraction technique with purification at low temperature (ESL-PBT) was optimized and validated for monitoring of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (2,3,7,8-TCDD) and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzenofurano (2,3,7,8-TCDF) in sewage sludge and soil. The analyzes were performed by gas chromatography coupled to mass spectrometry. For the extraction of these compounds it was used acetonitrile / ethyl acetate (6.50 mL: 1.50 mL). The extraction percentages were higher than 97% with relative standard deviation of less than 5% for sewage sludge and above 82% with relative standard deviation of less than 7% for soil at the limit of quantitation (LOQ). The LOQ for the sewage sludge were 1.6 ngkg⁻¹ TEQ for 2,3,7,8-TCDF and 8 ngkg⁻¹ TEQ of 2,3,7,8-TCDD in sewage sludge. Already in the soil the LOQ were of 0.2 ng kg⁻¹ TEQ for the 2,3,7,8-TCDF and of 2 ng kg⁻¹ TEQ of 2,3,7,8-TCDD. The method presented itself linear in the studied concentration range (between 1.25 to 25 µg L⁻¹ for sewage sludge and from 1.25 to 20 µg L⁻¹ for ground), selective, accurate and precise. Being a viable alternative to the monitoring of 2,3,7,8-TCDD and 2,3,7,8-TCDDF in sewage sludge and soil for agricultural destination.

KEYWORDS: Dioxins. ESL-PBT. Method of extraction. Validation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Representação das estruturas químicas gerais das dibenzo- <i>p</i> -dioxinas policloradas e dibenzofuranos policlorados	24
Figura 2 - Representação das estruturas químicas do 2,3,7,8-tetraclorodibenzo- <i>p</i> -dioxina (2,3,7,8-TCDD) e do 2,3,7,8-tetradibenzofurano (2,3,7,8-TCDF)	25
Figura 3 - Representação esquemática do princípio da técnica ESL-PBT	36
Figura 4 - Representação das etapas da técnica de extração sólido-líquido com purificação em baixa temperatura (ESL-PBT) de 2,3,7,8-TCDF e de 2,3,7,8-TCDD em lodo de esgoto.....	51
Figura 5 – Representação do cromatograma de íons totais do 2,3,7,8-TCDF e do 2,3,7,8-TCDD em hexano na concentração de 1 mg L ⁻¹	57
Figura 6 – Representação dos espectros de massas do 2,3,7,8-TCDF e do 2,3,7,8-TCDD obtidos sob o modo de impacto de elétrons a 70 ev	58
Figura 7 – Representação dos cromatogramas obtidos no modo MIS do 2,3,7,8-TCDF e do 2,3,7,8-TCDD em hexano (25 µg L ⁻¹) e no extrato de lodo de esgoto fortificado (25 µg L ⁻¹)	60
Figura 8 – Representação dos cromatogramas no modo MIS do 2,3,7,8-TCDF e do 2,3,7,8-TCDD.....	62
Figura 9 – Representação da foto dos <i>vials</i> contendo os extratos do lodo de esgoto, após congelamento	63
Figura 10 - Representação dos cromatogramas obtidos no modo MIS do 2,3,7,8-TCDF e do 2,3,7,8-TCDD no extrato de lodo de esgoto fortificado (0,5 µg L ⁻¹) Obtido após tratamento em soxtec, empregando 6,0000 e 14,0000 g de amostra.....	65
Figura 11 - Representação dos cromatogramas obtidos no modo MIS do 2,3,7,8-TCDF e do 2,3,7,8-TCDD no extrato de lodo de esgoto fortificado (0,5 µg L ⁻¹) obtido após tratamento em soxtec, empregando 1, 2, 3 e 4 horas de extração	66
Figura 12 - Representação dos cromatogramas dos extratos de lodo de esgoto obtidos após a ESL-PBT: (A) fortificado com o 2,3,7,8-TCDF e o 2,3,7,8-TCDD na concentração de 10 µg L ⁻¹ e (B) amostra de lodo isenta destes analitos (branco)	67
Figura 13 – Representação dos cromatogramas dos extratos de lodo de esgoto obtidos após a ESL-PBT: (A) isento destes analitos (branco), (B) fortificado com o 2,3,7,8-TCDF, na concentração de 0,625 µg L ⁻¹ (LD) e (C) fortificado com o 2,3,7,8-TCDF, na concentração de 1,25 µg L ⁻¹ (LQ)	69
Figura 14 - Representação dos cromatogramas dos extratos de lodo de esgoto obtidos após a ESL-PBT: (A) isento destes analitos (branco), (B) fortificado com o 2,3,7,8-TCDD, na concentração de 0,3125 µg L ⁻¹ (LD) e (C) fortificado com o 2,3,7,8-TCDD, na concentração de 0,625 µg L ⁻¹ (LQ).....	70

Figura 15 - Representação das curvas de calibração obtidas na avaliação da linearidade para o 2,3,7,8-TCDF e o 2,3,7,8-TCDD em extrato de lodo de esgoto fortificado, na faixa de concentração entre 1,25 a 25 $\mu\text{g L}^{-1}$, com respectivas equações e coeficientes de determinação (R^2)	72
Gráfico 1 – Representação dos gráficos exploratórios dos resíduos da regressão das curvas de 2,3,7,8-TCDF e de 2,3,7,8-TCDD em extrato de lodo de esgoto fortificado, após exclusão dos valores extremos diagnosticados pelo teste de resíduos padronizados Jackknife, com $\alpha = 0,05$. e_i = resíduo da regressão, - - - = $\pm t_{(1-\alpha/2; n-2)} S_{\text{res}}$, α = significância	74
Gráfico 2 – Representação dos gráficos de probabilidade normal das curvas de 2,3,7,8-TCDF e de 2,3,7,8-TCDD em extrato de lodo de esgoto fortificado. R: coeficiente de correlação de Ryan-Joiner. $R_{\text{crítico}}$: valor crítico estabelecido, α = significância, e_i = resíduo da regressão, q_i = valor normal esperado.....	76
Gráfico 3 – Representação da independência dos resíduos de regressão com distribuição dos pontos para o 2,3,7,8-TCDF e o 2,3,7,8-TCDD	78
Figura 16 – Representação dos gráficos do efeito de matriz nas concentrações 1,25; 10 e 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ em hexano (■) e no extrato da matriz (■) fortificados com o 2,3,7,8-TCDF, com os cromatogramas de comparação dessas análises nas três concentrações estudadas	81
Figura 17 – Representação dos gráficos do efeito de matriz nas concentrações 1,25; 10 e 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ em hexano (■) e no extrato da matriz (■) fortificados com o 2,3,7,8-TCDD, com os cromatogramas de comparação dessas análises nas três concentrações estudadas	82
Figura 18 – Representação das etapas da extração sólido-líquido com purificação em baixa temperatura (ESL-PBT) de 2,3,7,8-TCDF e de 2,3,7,8-TCDD em solo	87
Figura 19 - Representação dos cromatogramas obtidos no modo MIS do 2,3,7,8-TCDF e do 2,3,7,8-TCDD em hexano (10 $\mu\text{g L}^{-1}$) e no extrato de solo fortificado (10 $\mu\text{g L}^{-1}$)	91
Figura 20 – Representação dos cromatogramas no modo MIS do 2,3,7,8-TCDF e do 2,3,7,8-TCDD no extrato de solo fortificado na concentração de 10 $\mu\text{g L}^{-1}$, com as fase extratora ACN:AC: acetonitrila / acetato de etila	93
Figura 22 – Representação dos cromatogramas dos extratos de solo obtidos após a ESL-PBT: (A) fortificado com o 2,3,7,8-TCDF e o 2,3,7,8-TCDD na concentração de 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ e (B) amostra de solo isenta desses analitos (branco)	95
Figura 23 - Representação dos cromatogramas dos extratos de solo obtidos após a ESL-PBT: (A) isento desses analitos (branco), (B) fortificado com o 2,3,7,8-TCDF e o 2,3,7,8-TCDD na concentração de 0,08 $\mu\text{g L}^{-1}$ (LD) e (C) fortificado com o 2,3,7,8-TCDF e o 2,3,7,8-TCDD na concentração de 0,16 $\mu\text{g L}^{-1}$ (LQ).....	97
Figura 24 – Representação das curvas de calibração obtidas para o 2,3,7,8-TCDF e o 2,3,7,8-TCDD em extrato de solo, na faixa de concentração entre	

1,25 a 20,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, com respectivas equações e coeficientes de determinação (R^2)	99
Gráfico 4 - Representação dos gráficos exploratórios dos resíduos da regressão das curvas de 2,3,7,8-TCDF e 2,3,7,8-TCDD em extrato de solo, após exclusão dos valores extremos diagnosticados pelo teste de resíduos padronizados Jackknife, com $\alpha = 0,05$. e_i = resíduo da regressão, - - - = $\pm t_{(1-\alpha/2; n-2)} S_{\text{res}}$, α = significância	100
Gráfico 5 - Representação dos gráficos de probabilidade normal das curvas de 2,3,7,8-TCDF e 2,3,7,8-TCDD em extrato de solo. R: coeficiente de correlação de Ryan-Joiner. $R_{\text{crítico}}$: valor crítico estabelecido, α = significância, e_i = resíduo da regressão, q_i = valor normal esperado	102
Gráfico 6 – Representação da independência dos resíduos de regressão com distribuição dos pontos para o 2,3,7,8-TCDF e o 2,3,7,8-TCDD	104
Figura 26 – Representação dos gráficos do efeito de matriz nas concentrações 1,25; 10 e 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ em hexano (■) e no extrato da matriz (■) fortificados com o 2,3,7,8-TCDF, com os cromatogramas de comparação dessas análises nas três concentrações estudadas	107
Figura 27 – Representação dos gráficos do efeito de matriz nas concentrações 1,25; 10 e 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ em hexano (■) e no extrato da matriz (■) fortificados com o 2,3,7,8-TCDD, com os cromatogramas de comparação dessas análises nas três concentrações estudadas	108
Figura 28 – Representação dos cromatogramas obtidos no modo MIS de extrato de lodo de esgoto fortificado com o 2,3,7,8-TCDF e o 2,3,7,8-TCDD, na concentração de 1,25 $\mu\text{g L}^{-1}$ e extratos de solos condicionados com lodo de esgoto seco e solarizado, bem como dos espectros desses compostos em cada extrato analisado.	110

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Propriedades físico-químicas de 2,3,7,8-TCDD e 2,3,7,8-TCDF.	26
Tabela 2 – Misturas extratoras avaliadas na ESL-PBT de 2,3,7,8-TCDF e de 2,3,7,8-TCDD em amostras de lodo de esgoto.....	52
Tabela 3 – Parâmetros avaliados para a extração das amostras de lodo de esgoto por soxtec	52
Tabela 4 – Representação da independência dos resíduos de regressão das curvas analíticas de 2,3,7,8-TCDD e 2,3,7,8-TCDF teste de Durbin-Watson	77
Tabela 5 – Estatística da análise de variância da regressão para as curvas de 2,3,7,8-TCDD e 2,3,7,8-TCDF analisadas	79
Tabela 6 – Exatidão e precisão do método para determinação do 2,3,7,8-TCDF e 2,3,7,8-TCDD em extratos de lodo de esgoto fortificado	80
Tabela 7 – Representação da independência dos resíduos de regressão das curvas analíticas de 2,3,7,8-TCDD e 2,3,7,8-TCDF teste de Durbin-Watson	103
Tabela 8 – Estatística da análise de variância da regressão para as curvas de 2,3,7,8-TCDD e 2,3,7,8-TCDF analisados	105
Tabela 9 – Exatidão e precisão do método para determinação do 2,3,7,8-TCDF e do 2,3,7,8-TCDD em solo fortificado	105

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	Acetonitrila
AC	Acetato de etila
Ah	Aril hidrocarboneto
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CG	Cromatografia Gasosa
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CNTP	Condições Normais de Temperatura e Pressão
CONAMA	Conselho Nacional de Meio Ambiente
DBDPs	Dibenzo- <i>p</i> -dioxinas policloradas
DBFPs	Dibenzofuranos policlorados
DPR	Desvio Padrão Relativo
ELL-PBT	Extração Líquido-Líquido com Purificação em Baixa Temperatura
EM	Espectrometria de Massas
EPA	Environmental Protection Agency
ESL-PBT	Extração Sólido-Líquido com Purificação em Baixa Temperatura
ETE	Estação de Tratamento de Esgoto
EUA	Estados Unidos da América
FIG	Figura
HPA	Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade
ISO	Isopropanol
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
MAPA	Ministério da Agricultura , Pecuária e Abastecimento
min	Minutos
MIS	Monitoramento de íon seletivo
MMQO	Método dos Mínimos Quadrados Ordinários
MS	Espectrometria de Massas
PLE	Extração com líquido pressurizado

POPs	Poluentes Orgânicos Persistentes
PVC	Policloreto de vinila
TAB	Tabela
2,3,7,8-TCDD	2,3,7,8-tetraclorodibenzeno- <i>p</i> -dioxina
2,3,7,8-TCDF	2,3,7,8-tetraclorodibenzofurano
TEQ	Toxicidade Equivalente
TEF	Fator de toxicidade equivalente
THF	Tetraidrofurano

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – REFERENCIAL TEÓRICO	18
1.1 INTRODUÇÃO	18
1.2 REVISÃO DE LITERATURA	20
1.2.1 Lodo de esgoto	20
1.2.2 Destinação final do lodo de esgoto	20
1.2.2.1 Utilização agrícola do solo condicionado com lodo de esgoto	21
1.2.3 Contaminantes químicos no lodo de esgoto	23
1.2.3.1 Dibenzo- <i>p</i> -dioxinas policloradas (DBDPs) e dibenzofuranos policlorados (DBFPs)	23
1.2.3.1.1 Propriedades e características de DBDPs e DBFPs	24
1.2.3.1.2 Toxicidade de DBDPs e DBFPs	27
1.2.3.1.3 Fator de toxicidade equivalente de 2,3,7,8-TCDF e de 2,3,7,8-TCDD	28
1.2.3.1.4 Ocorrência no ambiente de DBDPs e DBFPs	28
1.2.3.1.5 Histórico de DBDPs e DBFPs em lodo de esgoto	30
1.2.3.1.6 Limites máximos para DBDPs e DBFPs em lodo de esgoto e solo	32
1.2.3.1.7 Métodos de extração de DBDPs e DBFPs	32
1.2.4 Extração sólido-líquido com purificação em baixa temperatura (ESL-PBT)	34
1.2.5 Métodos de análise para DBDPs e DBFPs	37
1.2.6 Validação de métodos analíticos	38
1.2.6.1 Seletividade	38
1.2.6.2 Limite de detecção e limite de quantificação	39
1.2.6.3 Linearidade de resposta do método	40
1.2.6.3.1 Valores extremos	40
1.2.6.3.2 Normalidade	41
1.2.6.3.3 Homoscedasticidade	42
1.2.6.3.4 Independência	43
1.2.6.4 Exatidão e precisão	44
1.2.6.5 Efeito de Matriz	45
1.3 OBJETIVOS	47
1.3.1 Objetivo geral	47
1.3.2 Objetivos específicos	47
CAPÍTULO 2 – OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DA TÉCNICA DE ESL-PBT DE DIBENZO-<i>P</i>-DIOXINA E DIBENZOFURANO POLICLORADOS EM LODO DE ESGOTO	48
2.1 MATERIAL E MÉTODOS	48
2.1.1 Materiais	48
2.1.2 Instrumentação	48
2.1.3 Análises cromatográficas	48
2.1.4 Preparo de soluções padrão	49
2.1.5 Preparo de amostras de lodo de esgoto fortificadas	50
2.1.6 ESL-PBT	50
2.1.7 Otimizações univariadas	51
2.1.7.1 Otimização da ESL-PBT	51
2.1.8 Validação do método analítico	53

2.1.8.1 Seletividade	53
2.1.8.2 Limite de detecção e limite de quantificação	53
2.1.8.3 Linearidade de resposta do método	53
2.1.8.4 Exatidão e Precisão	54
2.1.8.5 Estudo do efeito de matriz	54
2.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
2.2.1 Análises Cromatográficas	56
2.2.2 Otimizações univariadas	61
2.2.2.1 Otimização da ESL-PBT	61
2.2.2.2 Extração do lodo de esgoto utilizando soxtec	64
2.2.3 Validação	67
2.2.3.1 Seletividade	67
2.2.3.4 Exatidão e precisão	79
2.2.3.5 Estudo do Efeito de Matriz	80
CAPÍTULO 3 – OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DA TÉCNICA DE ESL-PBT DE DIBENZO-<i>P</i>-DIOXINA E DIBENZOFURANO POLICLORADOS EM SOLO	84
3.1 MATERIAL E MÉTODOS	84
3.1.1 Materiais	84
3.1.2 Instrumentação	84
3.1.3 Análises cromatográficas	84
3.1.4 Preparo de soluções padrão	85
3.1.5 Preparo de amostras de solo fortificada	85
3.1.6 ESL-PBT	86
3.1.7 Validação do método analítico	87
3.1.7.1 Seletividade	87
3.1.7.2 Limite de detecção e limite de quantificação	88
3.1.7.3 Linearidade de resposta do método	88
3.1.7.4 Exatidão e precisão	88
3.1.7.5 Estudo do efeito de matriz	89
3.1.8 Amostras reais	89
3.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO	91
3.2.1 Análise cromatográfica	91
3.2.2 ESL-PBT	92
3.2.3 Validação	95
3.2.3.1 Seletividade	95
3.2.3.2 Limite de detecção e limite de quantificação	96
3.2.3.3 Linearidade de resposta do método	98
3.2.3.4 Exatidão e precisão	105
3.2.3.5 Efeito de matriz	106
3.2.4 Aplicação em amostra real	108
CONCLUSÃO	111
REFERÊNCIAS	112

CAPÍTULO 1 – REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 INTRODUÇÃO

Um dos atuais problemas com a poluição em áreas urbanas é o descarte dos esgotos nos rios sem o devido tratamento. Para solucionar ou ao menos minimizar esse problema, há políticas de incentivo ao saneamento básico que, por meio da instalação de Estações de Tratamento de Esgoto (ETEs) em todas as cidades brasileiras, preconizam coletar e tratar as águas residuárias devidamente antes da devolução aos mananciais (ANDREOLI, 2001). No entanto, com a instalação das ETEs, a disposição do lodo de esgoto produzido durante o processo de tratamento das águas residuárias resultou em um novo problema ambiental (FYTILI; ZABANIOTOU, 2007; SMITH, 2009; FEDRIZZI, 2012).

Entre as diversas alternativas existentes para a disposição final do lodo de esgoto, está a aplicação dele em áreas agrícolas, apresentando-se como uma alternativa econômica e ambientalmente viável para sua destinação (ZEITOUNI, 2005). Entretanto, diversos contaminantes químicos podem se acumular no lodo de esgoto e gerar vários prejuízos para plantas e todo o meio ambiente (CLARKE; SMITH, 2011; TORRE *et al.*, 2011).

Dentre os contaminantes comumente encontrados no lodo de esgoto destacam-se a 2,3,7,8-tetraclorodibenzeno-*p*-dioxina (2,3,7,8-TCDD) e o 2,3,7,8-tetraclorodibenzofurano (2,3,7,8-TCDF), compostos cancerígeno, mutagênicos e altamente tóxicos ao ambiente (CLARKE; SMITH, 2011; TORRE *et al.*, 2011; HOOGENBOOM *et al.*, 2015).

Esses compostos são formados como subprodutos na fabricação de organoclorados; na incineração de substâncias contendo cloro, tais como o PVC (policloreto de vinila), no branqueamento de papel a partir de compostos clorados, e em fontes naturais, como os vulcões e incêndios florestais (GRIBBLE, 1994; KIM; OH; CHANG, 2003; QUAB; FERMANN; BROKER, 2004; LIN *et al.* 2007).

Tradicionalmente, o soxhlet tem sido usado para extração das dibenzo-*p*-dioxinas policloradas (DBDPs) e dibenzofuranos policlorados

(DBFPs) em lodo de esgoto e solo, mas esse procedimento demanda elevada quantidade de amostra e solventes orgânicos. Além disso, requer períodos muito longos de extração (até 48h), elevando os custos das análises (ELJARRAT; CAIXACH; RIVERA, 2000).

Por isso, novas metodologias têm sido avaliadas visando superar as desvantagens e melhorar a automação dos métodos tradicionais. Nesse sentido, a busca por métodos que sejam simples, rápidos, com baixo custo e consumo de solventes e que, ao mesmo tempo, reproduzam bons resultados tem motivado o desenvolvimento e a expansão de outros métodos. A extração sólido-líquido com purificação em baixa temperatura (ESL-PBT) surge como um método que apresenta todas essas características, pois combina a extração e *clean up* em uma única etapa (GOULART *et al.*, 2012).

Portanto, no presente estudo, foi otimizado e validado o método de extração sólido-líquido com purificação em baixa temperatura (ESL-PBT), quantificação por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), de 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-*p*-dioxina e de 2,3,7,8-tetraclorodibenzofuranos, considerados indicadores ambientais presentes no lodo de esgoto e no solo.

1.2 REVISÃO DE LITERATURA

1.2.1 Lodo de esgoto

O lodo de esgoto é um resíduo sólido obtido através do processo de tratamento de efluentes nas ETEs - Estações de Tratamento de Esgoto, com potencial uso na agricultura (VON-SPERLING, 2001; CLARKE *et al.*, 2008; NUVOLARI, 2011). A natureza desse resíduo depende do tipo de tratamento empregado em sua produção e da fonte geradora. Em geral é composto por uma mistura de sólidos, minerais e orgânicos, que sofreram modificação química, física ou biológica (VON-SPERLING, 2001; FONTS *et al.*, 2012).

O lodo de esgoto é produzido como resultado da execução do tratamento primário (os sólidos se separam do líquido por gravidade), do tratamento secundário (os sólidos são separados após a ação biológica do tratamento) e do tratamento terciário ou avançado. Ao final desses processos, tem-se um produto de conteúdo predominantemente orgânico (CHAGAS, 2000).

No Brasil, a necessária ampliação das Estações de Tratamento de Esgoto produzirá um grande crescimento da produção de lodo de esgoto. Embora, esse resíduo represente em média 1% a 2% do volume total do esgoto tratado, seu gerenciamento é bastante complexo e demanda custos elevados (ANDREOLI *et al.*, 2006). Atualmente, a grande preocupação ambiental é como destinar corretamente esse lodo de esgoto, surgindo o desafio de encontrar formas economicamente viáveis e ecologicamente seguras para reutilizá-lo (GODOY, 2013).

1.2.2 Destinação final do lodo de esgoto

No Brasil, o descarte do lodo de esgoto é normalmente realizado em aterros sanitários, sendo uma alternativa que requer cuidados nos estudos de implantação, necessitando de dispositivos de controle ambientais avançados (GODOY, 2013).

O lodo de esgoto, uma vez disposto no aterro, deve ser recoberto no mesmo dia para evitar problema de odores, atração de insetos, pássaros, etc. Isso agrava o problema com o lixo urbano e vai contra a Política Nacional de Resíduos Sólidos, cuja previsão é a redução de resíduos sólidos urbanos úmidos dispostos em aterros sanitários (GODOY, 2013). Além disso, acarreta dificuldades econômicas e ambientais em sua disposição final, chegando a representar até 50% dos custos operacionais das ETEs (BETTIOL; CAMARGO, 2000).

A incineração, alternativa para destinação final do lodo de esgoto, é um método de tratamento que se utiliza da decomposição térmica via oxidação com o objetivo de tornar um resíduo menos volumoso, menos tóxico ou atóxico, ou ainda eliminá-lo. É uma opção que apresenta elevado custo por tonelada tratada e problemas secundários de poluição atmosférica, restando ainda nesse processo a destinação final das cinzas. Essa alternativa requer cuidados operacionais sofisticados, mostrando-se mais adequada aos grandes centros ou em situações em que a qualidade do lodo de esgoto impede sua reciclagem agrícola, geralmente relacionado ao seu conteúdo de metais pesados (SHEN *et al.*, 2008).

Destinos alternativos para o lodo de esgoto têm sido o uso como matéria-prima na produção de cimento e cerâmica, além da aplicação agrícola como fertilizante e condicionador do solo (OTERO *et al.*, 2006; ISCHIAM *et al.*, 2007).

1.2.2.1 Utilização agrícola do solo condicionado com lodo de esgoto

Lodo de esgoto contém matéria orgânica, macro e micronutrientes que exercem um papel fundamental na produção agrícola e na manutenção da fertilidade do solo. Além disso, a matéria orgânica contida no lodo de esgoto melhora a capacidade de armazenamento e de infiltração da água no solo, aumentando a resistência dos agregados e reduzindo a erosão (TSUTYA, 2000).

Em cultura do girassol e feijão, Deschamps e Favaretto (1997) conseguiram atingir os níveis de nitrogênio exigidos apenas pela utilização do

lodo de esgoto como fertilizante, não detectando prejuízos de rendimento em comparação ao uso de adubação mineral. Também foi possível detectar que a aplicação da biomassa atuou como corretor de acidez e reduziu a concentração de alumínio trocável.

O aumento no teor de matéria orgânica em solo onde foi aplicado lodo de esgoto também foi observado por Bataglia *et al.* (1983). E Melo *et al.* (1994) encontraram um aumento de carbono orgânico com aplicação de lodo de esgoto apenas na dose mais elevada (32 t ha^{-1}) até 230 dias após a aplicação. Esses autores também verificaram aumento na concentração de carbono total do solo nos tratamentos com lodo de esgoto, atribuindo esse efeito ao aumento do carbono orgânico no solo.

Além disso, o lodo de esgoto favorece a absorção gradativa do fósforo, permitindo melhor utilização pela planta quando comparado a fertilizantes convencionais (MELO; MARQUES, 2000).

Conforme Silva *et al.* (2010), o uso de lodo de esgoto em cana-de-açúcar aumentou a atividade da fosfatase ácida (houve incremento de cobre e zinco, cuja função de catálise contribui para ampliar a taxa fotossintética), a produtividade de biomassa e açúcares.

Do ponto de vista econômico, o uso do lodo de esgoto como fertilizante orgânico pode substituir em partes as doses de adubação química sobre as culturas, com rendimentos semelhantes aos adquiridos com fertilizantes comerciais. As propriedades do produto o tornam especialmente interessante a solos agrícolas desgastados por manejo inadequado, bem como na recuperação de áreas degradadas (ANDREOLI, 1994).

Com base nisso, o lodo de esgoto pode deixar de ser apenas um problema sobre como e onde ser descartado para se tornar um produto que pode beneficiar solos degradados, entre outras aplicações que agregarão valor a algo que até então gerava custos para ser dispensado (GODOY, 2013).

Contudo, para atingir esse propósito, a qualidade do lodo utilizado na agricultura deve ser assegurada, de modo que promova melhorias às qualidades físicas, químicas e biológicas do solo e ao mesmo

tempo não seja uma fonte de contaminações, conforme relatam as exigências da Resolução Conama n° 375 de 2006 (CONAMA, 2006)

1.2.3 Contaminantes químicos no lodo de esgoto

O lodo de esgoto pode apresentar contaminantes provenientes de diversas fontes, como: doméstica, efluentes de indústrias químicas (FERNANDES; SOUZA, 2001), derivados do petróleo e medicamentos (JONES; ALCOCK, 1996).

Dentre as principais classes de contaminantes encontrados no lodo de esgoto estão as bifenilas policloradas, clorobenzenos, clorofenóis, cresóis, ftalatos, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) e os pesticidas organoclorados (CONAMA, 2006). Na literatura, diversas outras classes de contaminantes em lodo de esgoto têm sido relatadas (CAI *et al.*, 2007; CLARKE *et al.*, 2008; OZCAN; TOR; MEHMET, 2013), como as dioxinas, fato que desperta preocupações ambientais e relacionadas à saúde pública devido à toxicidade inerente a esses compostos (ELJARRAT; CAIXACH; RIVERA, 2003; CLARKE *et al.*, 2008). O lodo de esgoto a ser utilizado necessita, assim, ser monitorado, pois a disposição inadequada desse resíduo pode constituir fontes secundárias de poluição ambiental e danos à saúde humana (LEIVA *et al.*, 2010; YU *et al.*, 2011).

1.2.3.1 Dibenzo-*p*-dioxinas policloradas (DBDPs) e dibenzofuranos policlorados (DBFPs)

Dioxinas são compostos clorados que subdividem - se em dois grupos: dibenzo-*p*-dioxinas policloradas e dibenzofuranos policlorados (HOOGENBOOM *et al.*, 2015). DBDPs e DBFPs não possuem nenhuma utilização industrial ou comercial e provêm essencialmente de processos químicos industriais e térmicos (de combustão), especialmente quando estão envolvidas temperaturas entre 250-350 °C na presença do cloro, favorecendo sua formação (WEBER; BERTRAM, 2003). DBDPs e DBFPs são também gerados em grandes quantidades na produção de clorofenóis e seus

derivados, na pirólise a alta temperatura (incineração de lixo e resíduos) e na combustão de compostos orgânicos halogenados (FIEDLER, 1996).

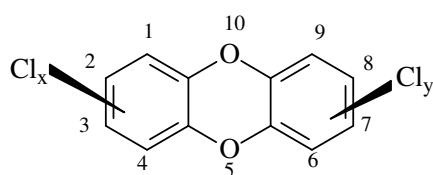
A indústria de papel tem se constituído como uma importante fonte geradora de dioxinas durante as etapas de branqueamento da celulose, realizadas pela utilização de cloro em presença de matéria orgânica em altas temperaturas (FIEDLER, 1996).

Além da formação desses contaminantes pelas reações de combustão, há evidências de que podem ser formados naturalmente (UNGER *et al.*, 2009). Assim, resíduos desses compostos têm sido detectados em amostras de lodo de esgoto (CLARKE *et al.*, 2008).

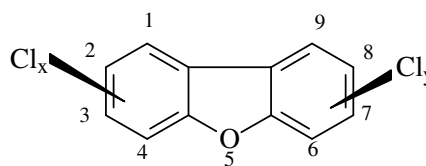
1.2.3.1.1 Propriedades e características de DBDPs e DBFPs

DBDPs e DBFPs são compostos aromáticos tricíclicos (núcleo central formado por dois anéis aromáticos ligados por um ou dois átomos de oxigênio que formam um terceiro anel central), policlorados, de função éter, com estrutura quase planar e que possuem propriedades físicas e químicas semelhantes. A estrutura química geral das dibenzo-*p*-dioxinas policloradas (DBDPs) e dibenzofuranos policlorados (DBFP) está representada na FIG. 1 (HOOGENBOOM *et al.*, 2015).

Figura 1 - Representação das estruturas químicas gerais das dibenzo-*p*-dioxinas policloradas e dibenzofuranos policlorados



Dibenzo-*p*-dioxina policloradas



Dibenzofuranos policlorados

Fonte: Elaborada pela autora.

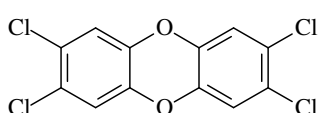
Nota: x e y podem variar de 0 a 4.

Os compostos que pertencem ao grupo das DBDPs e DBFPs são sólidos brancos cristalinos, com odor desconhecido e ponto de fusão relativamente alto, sendo semivoláteis, pouco solúveis em alguns solventes apolares e praticamente insolúveis em água. Suas propriedades físico-químicas estão descritas na TAB 1.

As DBDPs e DBFPs são termodinamicamente estáveis devido à estabilidade do anel aromático e ao impedimento estereoquímico causado pelos átomos de cloro. Em geral, são inertes ao ataque de ácidos e bases, e não sofrem oxidação ou redução nas CNTP (condições normais de temperatura e pressão), sendo resistentes à maioria dos compostos químicos e à degradação biológica pela maior parte dos micro-organismos. Devido à sua grande capacidade de transferência através dos compartimentos ambientais, podem ser encontradas em zonas tão variadas como o solo, vegetação, atmosfera, água e sedimentos marinhos (WHO, 1989).

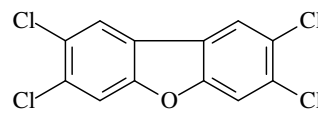
Os compostos 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-*p*-dioxina (2,3,7,8-TCDD) e 2,3,7,8-tetraclorodibenzofurano (2,3,7,8-TCDF) representados na FIG. 2, são considerados os mais tóxicos, pois são resistentes à degradação metabólica. Além disso, acumulam no corpo, especialmente na gordura visceral e fígado, e são mobilizados através do sistema circulatório. O composto mais tóxico 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-*p*-dioxina (2,3,7,8-TCDD) tem uma semivida estimada em seres humanos de cerca de sete anos (MASON *et al.*, 1987; WHO, 2000; OLSMAN *et al.*, 2007).

Figura 2 - Representação das estruturas químicas do 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-*p*-dioxina (2,3,7,8-TCDD) e do 2,3,7,8-tetradibenzofurano (2,3,7,8-TCDF)



2,3,7,8-Tetraclorodibenzo-*p*-dioxina

2,3,7,8-TCDD



2,3,7,8-Tetraclorodibenzofurano

2,3,7,8-TCDF

Fonte: Elabora pela autora.

Tabela 1 – Propriedades físico-químicas de 2,3,7,8-TCDD e 2,3,7,8-TCDF.

Dioxinas	Massa molar (g mol ⁻¹)	Solubilidade em H ₂ O (mg L ⁻¹)	Temperatura de fusão (°C)	Pressão de vapor (mmHg)	Coefficiente de partição- octano- 1-ol / água (log K _{ow})
2,3,7,8-TCDD	323,9	7,9 x 10 ⁻⁶ e 3,2 x 10 ⁻⁴ (25 °C)	305-306	7,4 x 10 ⁻¹⁰ e 3,4 x 10 ⁻⁵ (20 °C)	6,8 e 7,58
2,3,7,8-TCDF	307,9	1,37 x 10 ⁻⁹ (20 °C)	327-328	2,0 x 10 ⁻⁶ (20 °C)	1,6

Fonte: Adaptação de MARPLE; BRUNCK; THROOP (1986); RORDORF (1989).

1.2.3.1.2 Toxicidade de DBDPs e DBFPs

A toxicidade crônica de DBDPs e DBFPs está relacionada com o caráter lipofílico e com a possibilidade de bioacumulação, observando-se uma relação de proporcionalidade direta para cada um destes fatores. E por se bioacumularem podem também atingir o topo da cadeia alimentar em concentrações significativas (EICHBAUM *et al.*, 2014).

Vários efeitos indesejáveis para os seres vivos são associados à presença de DBDPs e DBFPs (WHO, 2000). As dioxinas agem no sistema reprodutivo e em outras funções do organismo, induzindo à má-formação dos fetos, problemas ligados ao desenvolvimento das crianças em nível comportamental e alterações de funções orgânicas. Isso ocorre devido ao receptor preferencial de DBDPs e DBFPs, o receptor aril hidrocarboneto (Ah), atuar nas mesmas funções do organismo relacionadas com tais problemas. A ação ocorre pela alta afinidade ao receptor Ah (DOI *et al.*, 2003).

Os receptores Ah possuem duas funções principais, a mediação de efeitos tóxicos de compostos xenobióticos e um papel fisiológico no desenvolvimento e função de órgãos. Esses receptores já foram detectados em várias espécies e órgãos, tais como os pulmões, fígado, timo e glândulas suprarrenais (FISCHER, 2000; DOI *et al.*, 2003).

A ligação de compostos alvo com receptor Ah faz com que ocorram alterações na expressão de genes, ou seja, as dioxinas se ligam ao receptor Ah e fazem com que a enzima aril hidrocarboneto nuclear transferase se ligue ao receptor Ah, formando um complexo químico que se liga ao DNA. Esse complexo, uma vez ligado ao DNA, pode ativar a codificação de enzimas do complexo do citocromo P450 com o intuito de libertar o organismo do agente químico, ou pode ativar genes que resultam na disfunção e diferenciação do crescimento celular (EC, 1999; DOI *et al.*, 2003).

Além disso, esse complexo pode codificar as enzimas envolvidas na biotransformação de xenobióticos e compostos endógenos, como uma série de hormônios. Eventualmente, efeitos sobre os sistemas imunológico e reprodutivo são observados, bem como no desenvolvimento do cérebro e

capacidade de aprendizagem (OLSMAN *et al.*, 2007; HOOGENBOOM *et al.*, 2015).

DBDPs e DBFPs vêm sendo encontrados nas mais diversas matrizes sendo, portanto, reconhecidos como poluentes onipresentes para o ambiente (CLARKE *et al.*, 2008). Dentre as matrizes ambientais, os efluentes de esgoto e seus produtos revelaram-se como uma fonte significativa desses compostos. A elevada persistência no meio ambiente, resistência à degradação, além da baixa polaridade desses contaminantes facilitam sua acumulação, chegando até mesmo ao produto final de tratamento de esgoto, o lodo de esgoto (SONG *et al.*, 2006).

1.2.3.1.3 Fator de toxicidade equivalente de 2,3,7,8-TCDF e de 2,3,7,8-TCDD

Devido à toxicidade variada das dioxinas foi definido o fator de toxicidade equivalente (TEF), tendo como referência o valor de 2,3,7,8-TCDD por ser a dioxina de maior toxicidade, em que é atribuído o valor 1 de TEF, seguido pelo 2,3,7,8-TCDF com TEF de 0,1. Esses valores de TEF são utilizados rotineiramente pela NATO/CCMS (1988 a, b).

Para misturas onde há vários isômeros de DBDPs e DBFPs, a toxicidade equivalente (TEQ) é calculada através do somatório das concentrações de cada isômero multiplicada pelo seu TEF, conforme EQ. 1.

$$TEQ = \sum [\text{congênero}] \times \text{TEF (Eq. 1)}$$

1.2.3.1.4 Ocorrência no ambiente de DBDPs e DBFPs

A compreensão dos prejuízos que a exposição das DBDPs e DBFPs pode trazer veio após a guerra do Vietnã, por volta de 1970. O uso dos herbicidas ácido diclorofenoxi (2,4-D) e ácido triclorofenoxi (2,4,5-T), conhecidos por “agentes laranja”, como desfoliante, expuseram os soldados e a população a esses compostos e seus contaminantes. Os herbicidas estavam contaminados com DBDPs e DBFPs, formados na síntese industrial.

Constatou-se que nesses soldados houve aumento de incidência de câncer de pulmão, uma vez que a mistura dos princípios ativos com solventes facilita a absorção pela pele e através da respiração (IARC, 1997).

Os estudos relacionados às DBDPs e DBFPs aumentaram a partir de 1976, impulsionados pela ocorrência de um acidente em Seveso, na Itália, numa fábrica de herbicidas. Um reator que produzia clorofenóis liberou uma nuvem de substâncias químicas, dentre elas a 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina ou 2,3,7,8-TCDD (Dioxina de Seveso). Os efeitos observados foram a incidência de cloroacne e câncer (MOCARELLI, 2001).

No Brasil, o início das discussões acerca de DBDPs e DBFPs surgiu em 1998, no episódio da contaminação da polpa cítrica. Após rastreamento realizado para identificar a origem do aumento repentino dos níveis dessas substâncias em leite de vaca na Alemanha, detectou-se que provinham da cal (CaO) utilizada no processo de produção de “pellets” a partir de farelo de polpa cítrica, que é um componente da ração animal exportado pelo Brasil para a Europa. Para a retomada da exportação surgiu a primeira legislação brasileira relacionada à DBDPs e DBFPs, de competência do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (BRASIL, 1999).

E em 2001, foi disposta à assinatura a convenção que trata desses poluentes, na cidade de Estocolmo, Suécia. Conhecida como Convenção de Estocolmo ou Convenção dos Poluentes Orgânicos Persistentes (POPs), com a inclusão de DBDPs e DBFPs no grupo. O principal objetivo da convenção foi a proteção da população e do meio ambiente, através do controle do uso, produção e disposição dessas substâncias. Após sua entrada em vigor no início de 2004, os países signatários, como o Brasil, assumiram a responsabilidade de planejar ações de implementação da convenção, como a construção do inventário de fontes emissoras e o desenvolvimento de programas de monitoramento dos níveis de DBDPs e DBFPs em matrizes ambientais e biológicas.

1.2.3.1.5 Histórico de DBDPs e DBFPs em lodo de esgoto

Níveis de DBDPs e DBFPs em lodo de esgoto foram relatados pela primeira vez por Lamparski; Nestricks e Stenger (1984) que analisaram duas amostras atuais (1981, 1982) e uma amostra armazenada (1933), e observaram que os níveis de DBDPs e DBFPs nas amostras foram semelhantes. Houve apenas um aumento na concentração de 2,3,7,8-TCDD de 2,2 ng kg⁻¹, em 1933, para 16 ng kg⁻¹, em 1982. Especula-se que os compostos foram formados principalmente por reações de condensação após cloração de substâncias fenólicas do abastecimento de água e de resíduos.

Em 1985, Weerasinghe; Gross e Lisk relataram os níveis de DBDPs e DBFPs em duas amostras de lodo de esgoto, uma urbana e outra rural, do estado de Nova York. Eles descobriram que o lodo de esgoto urbano continha cerca de sete vezes mais desses contaminantes do que o lodo de esgoto rural.

Em 1988 e 1989, a Agência de Proteção Americana dos Estados Unidos (US EPA) conduziu o "National Sewage Sludge Survey" de 181 Estações de Tratamento de Esgoto (ETEs) nos Estados Unidos da América (EUA) (US EPA, 1990). Telliard *et al.* (1990) relataram dados selecionados a partir dessa pesquisa. Os dados foram apresentados numa base de peso seco sem valores de TEQ, resultando em dados inadequados para comparação com outros trabalhos. No entanto, eles encontraram uma associação positiva entre os níveis de DBDPs e DBFPs e matéria orgânica o que corrobora a teoria de que os compostos de DBDPs e DBFPs particionam quase totalmente para a fase orgânica na produção do lodo de esgoto.

Rappe *et al.* (1994) continuaram as análises de DBDPs e DBFPs em lodo de esgoto e relataram os resultados de 30 amostras de lodo de esgoto na Suíça, considerando que as concentrações variaram de 6 a 4100 ng I-TEQ kg⁻¹. Rappe *et al.* (1998) constataram que os níveis de DBDPs e DBFPs em amostras de lodo de esgoto nos EUA tiveram, em geral, uma diminuição entre 35-50%. Essa conclusão foi apoiada pelo trabalho de Alvarado *et al.* (2001), demonstrando que DBDPs e DBFPs em amostras de lodo de esgoto

nos EUA tinham diminuído de uma média de 60,5 para 41,1 ng WHO98 TEQ kg^{-1} entre os anos de 1994 e 2001, ou seja, cerca de 32%.

Por sua vez, Eljarrat; Caixach e Rivera (2003) analisaram oito amostras de lodos de esgoto das estações de tratamento de esgoto rural, urbano e industrial na Catalunha (Espanha) para a determinação dos níveis DBDPs e DBFPs. Os valores de DBDPs e DBFPs WHO-TEQ para as amostras variaram de 4,9 a 20,8 pg / g de peso seco (dw). As concentrações foram comparadas com os dados anteriores, obtidos a partir de amostras de lodo de esgoto coletados durante os anos 80, e os resultados mostraram que os níveis de DBDPs e DBFPs têm diminuído desde os anos 80.

Os níveis de DBDPs e DBFPs foram analisados em 16 amostras de lodo de esgoto, obtidas entre 2004 e 2009, em duas estações de tratamento de esgoto em Pequim na China. O I-TEQ para essas amostras foi de 97 a 15,0 pg g^{-1} de peso seco (dw), com um valor médio de 4,43 pg g^{-1} dw, indicando que todos os I-TEQ estavam abaixo dos limites máximos regulamentados pela legislação chinesa para uso agrícola em solos (LI; KE; Dong, 2011).

DBDPs e DBFPs foram analisados ainda em 24 amostras de lodo de esgoto de Estações de Tratamento de Esgoto de 18 cidades de 13 províncias da China. Os valores totais de toxicidade internacional equivalente (I-TEQ) foram avaliados e a concentração total de DBDPs e DBFPs variaram de 104,0 a 1.661 pg / g de peso seco (dw) e de 2,51 a 75,21 $\text{pg I-TEQ} / \text{g dw}$, indicando que todos os I-TEQ estavam abaixo dos limites máximo preconizados pela regulamentação chinesa (LU *et al.*, 2012).

Diante do exposto, constatou-se que a utilização do lodo de esgoto pode se tornar um risco à saúde humana, em virtude da presença de DBDPs e DBFPs. Devido à lipofilicidade e baixa degradabilidade biológica, esses compostos se concentram no lodo de esgoto, pois são removidos por adsorção em partículas orgânicas durante o processo de tratamento de águas residuais (KATSOYIANNIS; SAMARA, 2007; CLARKE *et al.*, 2008).

1.2.3.1.6 Limites máximos para DBDPs e DBFPs em lodo de esgoto e solo

Nos EUA, a Agência de Proteção Americana (EPA) estabeleceu os limites de DBDPs e DBFPs em sólidos através da instrução normativa publicada em 1994. Conforme a norma, o limite para esses contaminantes deve ser inferior a 1 ng Kg^{-1} em sólidos (US EPA, 1994). Assim como o de outras resoluções internacionais: a EPA Victoria (2004) propôs um limite de $50 \text{ ng TEQ kg}^{-1}$, já a União Europeia (EU, 2001) e a Comissão Europeia (EC, 2001) um limite máximo de $100 \text{ ng kg}^{-1} \text{ TEQ}$ no lodo de esgoto. Para o solo, a Comunidade Europeia (ECC, 2001) estabelece que o valor ideal desses analitos seja inferior a $5 \text{ ng kg}^{-1} \text{ TEQ}$, sendo que valores superiores a $100 \text{ ng kg}^{-1} \text{ TEQ}$ são considerados relativamente elevados e reduzem a possibilidade de utilizar o solo, devido à contaminação e nível de toxicidade.

No Brasil, o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) regulamenta o uso do lodo de esgoto na agricultura através da Resolução nº 375 (CONAMA, 2006) e a Resolução nº 420 (CONAMA, 2009), entretanto não são estabelecidos limites máximos de resíduos (LMR) para DBDPs e DBFPs em lodo de esgoto e solo.

1.2.3.1.7 Métodos de extração de DBDPs e DBFPs

As recomendações de diversas legislações de âmbito internacional e ainda as comprovadas propriedades maléficas de DBDPs e DBFPs corroboram os riscos que esses compostos podem trazer aos seres vivos e ao ambiente. Portanto, torna-se fundamental a investigação da presença dos contaminantes, bem como sua quantificação em matrizes como o lodo de esgoto e solo, pois podem se tornar uma fonte de contaminação caso esse monitoramento não ocorra no material destinado para fins agrícolas. Os métodos analíticos para a determinação de contaminantes em amostras ambientais envolvem as etapas de extração, *clean up* (limpeza dos extratos) e quantificação por uma técnica cromatográfica.

Na literatura, várias técnicas têm sido utilizadas para extração de DBDPs e DBFPs em lodo de esgoto e solo, como: extração em soxhlet, extração com fluido supercrítico, técnica Randall, extração assistida por micro-ondas (MAE), entre outras (ELJARRAT; CAIXACH; RIVERA, 2000; ANTUNES *et al.*, 2008; TORRES *et al.* 2011).

Extração de soxhlet é um método de extração sólido-líquido, no qual o solvente orgânico puro entra em contato com o material sólido a ser extraído por destilação e refluxo. É o método de extração oficial para esses contaminantes em amostras sólidas, mas tem como principal desvantagem o tempo de extração com duração de várias horas (até 48h). Além disso, o consumo de solvente é elevado, com uma evaporação de grande quantidade de solvente (ELJARRAT; CAIXACH; RIVERA, 2000).

A extração com líquido pressurizado (PLE) ou extração acelerada com solvente é um processo automatizado de extração de compostos orgânicos que pode ser aplicada a uma variedade de amostras sólidas e semissólidas. A PLE difere de um processo tradicional de extração porque utiliza solvente em elevada temperatura e pressão, sendo mantida aquecida durante todo o tempo de extração (ELJARRAT; CAIXACH; RIVERA, 2000).

Mannila; Koistinena e Vartiainen (2002) obtiveram resultados semelhantes na extração de DBDPs e DBFPs em solo, ao comparar a extração por Soxhlet com a extração com líquido pressurizado com a limpeza simultânea.

Antunes *et al.* (2008) fizeram uma comparação das extrações por soxhlet e PLE para DBDPs e DBFPs e observaram uma melhora na eficiência de extração com PLE quando comparada com a extração de Soxhlet em amostras ambientais (sedimentos e solo). Contudo, esses sistemas são consideravelmente mais caros do que o aparelho de soxhlet convencional.

O químico americano Edward L. Randall adaptou um extrator de soxhlet aumentando a temperatura do solvente que entra em contacto com o mistura a ser extraída, numa tentativa de reduzir tempo de extração, ficando conhecida como Técnica Randall. Nesse extrator, o recipiente poroso é

diretamente imerso no solvente em ebulição e a alta temperatura do solvente (ebulição) durante a imersão permite uma secagem rápida da amostra e uma extração de componentes solúveis. Além disso, solubilização rápida feita pelo solvente quente conduz a uma redução acentuada no tempo de extração se comparado com o soxhlet convencional (ELJARRAT; CAIXACH; RIVERA, 2000).

Eljarrat; Caixach e Rivera (2000) fizeram uma comparação das extrações feitas para DBDPs e DBFPs em amostras de solo e lodo de esgoto pela técnica de Randall e pelo Soxhlet convencional e observaram uma redução nos tempos de extração de 48 horas (soxhlet) para 2 horas (Randall) e com uma eficiência semelhante entre as técnicas. Apesar da redução no tempo de extração, o gasto de solvente ainda é consideravelmente grande.

Com base nesse contexto, estimativas indicam que o preparo de amostras é responsável por 70 a 90% do tempo de análise. Assim, há a necessidade de que os procedimentos de preparo de amostras sejam cada vez mais robustos, sensíveis, rápidos e dinâmicos (DIAS-CRUZ *et al.*, 2009; TADEO *et al.*, 2012). Para a análise de DBDPs e DBFPs, a técnica de extração ideal deve reunir as seguintes características: alta seletividade, elevada taxa de recuperação, aplicabilidade em diversos tipos de matrizes, mínimo consumo de solventes e compatibilidade com qualquer instrumento de análise (ELJARRAT; CAIXACH; RIVERA, 2000). No entanto, há uma dificuldade, atualmente, em encontrar técnicas de extração que apresentem todos os atributos reunidos.

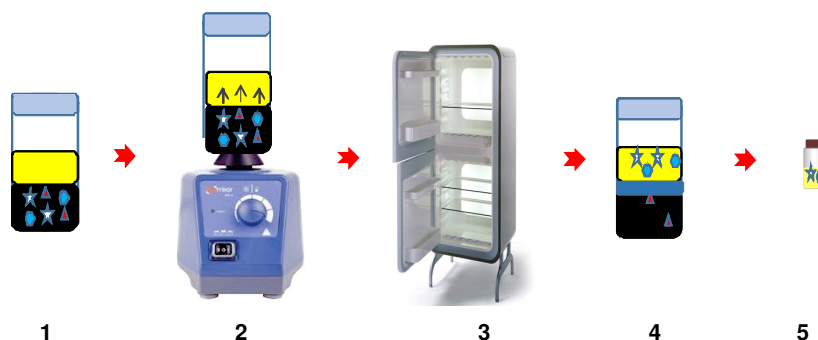
1.2.4 Extração sólido-líquido com purificação em baixa temperatura (ESL-PBT)

A partição por abaixamento de temperatura teve sua origem da técnica de Anglin e Mckinley (1960) que utilizaram para isolar pesticidas em plantas e tecidos animais. Entretanto, a temperatura usada para a separação era muito baixa (-78 °C), impedindo a utilização da técnica. Em 1964, Mcculley e Mckinley empregaram a purificação em baixa temperatura para análise de organoclorados em óleo.

Décadas depois, Lentza-rizos; Avaramides e Cherasco (2001) aplicaram a técnica na determinação de resíduos de pesticidas em óleo de oliva. E Goulart (2004) adaptou a metodologia de Mcculley e Mckinley, com a extração líquido-líquido para análise de deltametrina e cipermetrina em leite. Essa técnica permitiu determinar piretroides em leite por cromatografia gasosa, sem a necessidade de etapas de *clean up*. Posteriormente, a mesma técnica foi aplicada por Vieira (2005) e Vieira; Neves e Queiroz (2007) para a extração de piretroides em amostras de água e solo. E a partir de então, diversas modificações foram testadas, resultando na aplicação da técnica para amostras sólidas denominada de extração sólido-líquido com purificação em baixa temperatura (ESL-PBT).

O princípio da técnica consiste em colocar uma amostra sólida em contato com um solvente miscível em água por agitação para iniciar o equilíbrio dos analitos da matriz que serão extraídos pela fase orgânica. Posteriormente o sistema é submetido a baixas temperaturas (-20°C) por um tempo suficiente para promover a separação da fase orgânica. A amostra é congelada juntamente com a água e na fase orgânica ficam os analitos de interesse que migraram para a mesma por afinidade. A fase orgânica contendo os analitos é removida e o extrato analisado por cromatografia (GOURLART *et al.*, 2008; GOULART, 2010). A FIG. 3 representa o esquema do princípio da técnica.

Figura 3 - Representação esquemática do princípio da técnica ESL-PBT



Legenda: 1) Amostra sólida contendo os analitos de interesse e demais compostos da matriz, mais o solvente extrator. 2) Sistema submetido à agitação para o início do equilíbrio dos analitos na matriz. 3) Sistema submetido à baixa temperatura para congelamento da amostra e migração dos analitos para a fase orgânica líquida. 4) Separação das fases do sistema (matriz, água e extrato com os analitos). 5) Separação do extrato obtido para análise cromatográfica.

Fonte: Elaborada pela autora.

A ESL-PBT tem ganhado destaque como uma técnica alternativa que combina as etapas de extração e *clean up*. Essa técnica demonstra diversas vantagens se comparada a outras, pois é um método simples, prático, de elevada frequência analítica, reduzido número de etapas e com baixo consumo de solventes e amostras (PINHO, 2007; GOULART *et al.*, 2010). A ESL-PBT tem sido aplicada com alta eficiência de recuperação, baixos limites de detecção e quantificação para agrotóxicos em matrizes alimentares como água, tomate, matrizes gordurosas e lodo de esgoto (VIEIRA; NEVES; QUERIOZ, 2007; MARTHE *et al.*, 2010; PINHO *et al.*, 2012; BARBOSA *et al.*, 2014; MAIA, 2014).

1.2.5 Métodos de análise para DBDPs e DBFPs

Após realização das etapas de preparo de amostras segue-se para a quantificação dos analitos através da análise cromatográfica. A quantificação de DBDPs e DBFPs é considerada complexa porque são necessários métodos de elevada sensibilidade para determinar concentrações vestigiais e que simultaneamente permitam a identificação estrutural das diferentes DBDPs e DBFPs, o que não é fácil dada à complexidade das misturas.

A Agência de Proteção Americana (EPA) através da instrução normativa publicada em 1994 determina a utilização do método de análise por cromatógrafo a gás com coluna capilar de alta resolução (CGAR) / espectrometria de massa de alta resolução (EMAR) para a análise de DBDPs e DBFPs em amostras sólidas e semissólidas (US EPA, 1994). Apesar de ser o método oficial e o mais utilizado, a análise por esse cromatógrafo é de elevado custo.

A cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas é um dos métodos de análise que possui alta eficiência na separação, quantificação e confirmação das espécies de interesse presentes nos extratos pelo espectro de massas, pois fornece informações estruturais baseadas na fragmentação dos compostos (COLLINS *et al.*, 2006).

Nessa análise, primeiramente ocorre à separação dos analitos na coluna. A separação realiza-se em função da interação que os analitos têm com a fase líquida que recobre o interior da coluna (fase estacionária) pela sua polaridade. Essa etapa é uma das responsáveis pela resolução dos analitos. Em seguida, ocorre a detecção dos analitos em que o sinal químico é convertido em sinal elétrico e uma representação (cromatograma) é produzida com os picos (sinais dos analitos) no tempo em que foi originado (tempo de retenção) (COLLINS *et al.*, 2006).

1.2.6 Validação de métodos analíticos

A etapa de validação é utilizada como uma ferramenta para atestar a confiabilidade de um método em produzir dados confiáveis referentes a uma amostra. Essa avaliação é realizada após etapas de seleção, desenvolvimento e otimização do método (RIBANI *et al.*, 2004; SILVA; ALVES, 2006). No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO), disponibilizam roteiros para procedimentos de validação. Agências de regulação de âmbito internacional como a Comissão Europeia e a IUPAC também disponibilizam roteiros de validação.

Alguns parâmetros analíticos são testados no processo de validação e devem se adequar aos objetivos de uso do método. Como parâmetros de validação de métodos analíticos podem ser citados: seletividade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), linearidade, exatidão e precisão (RIBANI *et al.*, 2004). O efeito de matriz também é outro parâmetro importante a ser avaliado.

1.2.6.1 Seletividade

A seletividade é a capacidade de avaliar as substâncias de interesse na presença de interferências, como micro-organismos, impurezas e componentes da matriz que possam comprometer a análise em uma amostra complexa. (VESSMAN *et al.*, 2001).

A seletividade garante que o pico de resposta seja exclusivamente do composto de interesse. Se a seletividade não for assegurada, a linearidade, a exatidão e a precisão estarão seriamente comprometidas. Sendo assim, a seletividade é o primeiro passo no desenvolvimento e validação de um método instrumental de separação e deve ser reavaliada continuamente durante a validação e subsequente uso do método (USPC, 1999).

A seletividade pode ser obtida através da comparação do cromatograma da matriz isenta da substância de interesse (o branco) e a

matriz fortificada com a substância (padrão), sendo que, nesse caso, nenhum interferente deve eluir no tempo de retenção da substância de interesse, a qual deve estar bem separada dos demais compostos presentes na amostra (ICH, 1995).

Dependendo de como é estabelecida a identidade do analito, interferentes podem inibir a sua detecção e distorcer o seu sinal. Por outro lado, os interferentes também podem contribuir para que o sinal atribuído ao analito aumente a sua concentração (EURACHEM, 1998).

1.2.6.2 Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção (LD) representa a menor concentração do analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada. Já o limite de quantificação (LQ) constitui a menor concentração do analito capaz de ser quantificada com um nível aceitável de precisão e exatidão, sendo uma característica que define a capacidade de um método em quantificar de forma adequada um analito (ICH, 1995; EURACHEM, 1998).

São possíveis várias abordagens para a determinação dos limites de detecção e quantificação. Conforme o procedimento seja instrumental ou não, o LD e o LQ podem ser obtidos com base na avaliação visual, na relação sinal: ruído, no desvio padrão da resposta e da inclinação, no desvio padrão do branco e na curva de calibração (ICH, 1995).

Para procedimentos analíticos que mostram o ruído da linha de base o mais utilizado é a relação sinal: ruído. Para determinar essa relação é feita a comparação entre a medição dos sinais de amostras em baixas concentrações conhecidas do composto de interesse na matriz e um branco (matriz isenta do composto de interesse) dessas amostras. Assim, para o LD é estabelecida uma concentração mínima na qual a substância pode ser facilmente detectada. A relação sinal: ruído pode ser de 3:1 ou 2:1, proporções geralmente aceitas como estimativas do limite de detecção. Os mesmos critérios de LD podem ser adotados para o LQ, utilizando a relação de 10:1 (ICH, 1995).

1.2.6.3 Linearidade de resposta do método

A linearidade corresponde a uma faixa de concentração em que a resposta fornecida pelo método é proporcional a concentração do analito. O modelo linear de resposta é obtido quando, na análise de regressão do sinal analítico (Y) em função da concentração do analito (C) estabelecidos na curva de calibração, produz resposta esperada (ICH, 1995). Porém, a equação produzida pela regressão dos dados não é suficiente para averiguar a linearidade, fazendo-se necessária a utilização do método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO) como ferramenta matemática que gera uma equação para avaliação da linearidade (SOUZA; PINTO; JUNQUEIRA, 2007).

Para encontrar a função de regressão que minimize a soma das distâncias entre a função ajustada e os pontos observados, faz-se necessária a verificação das premissas relativas aos resíduos da regressão e ajuste ao modelo linear, que validam o uso do MMQO, como: investigação e exclusão de valores extremos pelo método dos resíduos padronizados Jackknife; normalidade dos resíduos pelo teste de Ryan-Joiner; homoscedasticidade dos resíduos pelo teste de Brown-Forsythe (Levene modificado); independência dos resíduos pelo teste de Durbin-Watson; e teste F para verificar a significância da regressão e ajuste do modelo linear (SOUZA; PINTO; JUNQUEIRA, 2007).

1.2.6.3.1 Valores extremos

O MMQO é muito sensível à presença de pontos de influência como valores extremos, sendo esses definidos por observações de uma amostra separada das demais, sugerindo que possam pertencer a uma população diferente ou serem resultados de erros de medição que afetam diretamente a estimativa dos parâmetros da equação da curva de calibração (BURKE, 2001).

O teste de Jackknife avalia a dispersão dos resíduos e trata-os com exclusão máxima de 22,2% dos dados. Ou seja, valores de J_{ei} maiores que o valor de $\pm t_{(1-\alpha/2, n-1)} s_{res}$ (t tabelado) são considerados valores

extremos e removidos até que a porcentagem de pontos excluídos seja menor ou igual a 22,2% do número original de dados, ou quando o ponto for a última replicata de um nível de concentração estudado (SOUZA; PINTO; JUNQUEIRA, 2007).

A estatística do teste de Jacknife é dada pela análise do resíduo padronizado de Jacknife (J_{ei}), calculado, utilizando-se a seguinte equação:

$$J_{ei} = \eta_i \sqrt{\frac{n-p-1}{n-p-\eta_i^2}}$$

Onde o resíduo padronizado (η_i) é dado por $\eta_i = e_i / S_{ei}$, (e_i = erro absoluto, S_{ei} = erro padrão do resíduo), p = número de parâmetros do modelo e n = número de pontos da curva analítica (SOUZA; PINTO; JUNQUEIRA, 2007).

1.2.6.3.2 Normalidade

A validade de interferências produzidas por estatísticas paramétricas em amostras finitas depende de premissas relacionadas ao tipo de distribuição, assim, faz-se necessário avaliar se as distribuições hipotetizadas são compatíveis com os dados. Não normalidade, por exemplo, é impeditiva para inferências baseadas nos testes de t e F (DUFOR *et al.*, 1998).

Ryan e Joiner (1976) apresenta um teste bastante simples, fácil de calcular, visto que não são necessárias tabelas especiais para sua computação, e que combina gráficos de probabilidade normal com um teste estatístico formal de correlação. O coeficiente de correlação de Ryan-Joiner (R) é a estatística desse teste. Quando coeficientes de correlação calculados são maiores que os valores críticos estabelecidos para esses coeficientes, os resíduos seguem distribuição normal, ou seja, os desvios da normalidade não são significativos.

Os resíduos são organizados em ordem crescente. Um gráfico dos valores dos resíduos ordenados e_i e versus os valores dos percentuais estimados para uma distribuição normal reduzida q_i (quantis normais – valor normal esperado) é construído (BAZILIO *et al.*, 2012). Os quantis normais são obtidos pela equação:

$$q_i = \varphi^{-1} \left\{ \frac{i - 3/8}{n + 1/4} \right\} \quad i = 1, \dots, n$$

Sendo φ^{-1} inverso de uma função de distribuição normal padrão. Assim, temos que O coeficiente de correlação (R_{eq}) entre i e q_i , que é calculado pela equação:

$$R_{eq} = \frac{S_{eq}}{\sqrt{S_{ee} - S_{qq}}}$$

Do qual S_{eq} é a somatória dos produtos cruzados de e (resíduos da linearidade) e q (quantis), S_{ee} é a soma dos quadrados dos desvios da média de e . E, por fim, S_{qq} , a soma dos quadrados dos desvios da média de q (BAZILIO *et al.*, 2012). Já o coeficiente de correlação crítico para gráficos de probabilidade normal em nível de significância de 95% ($\alpha = 0,05$) pode ser obtido por interpolação polinomial (SOUZA; PINTO; JUNQUEIRA, 2007), pela equação:

$$R_{crit(n)} \approx 1,0063 - \frac{0,1288}{\sqrt{n}} - \frac{0,6118}{n} + \frac{1,3505}{n^2}$$

1.2.6.3.3 Homoscedasticidade

Regressão linear pelo MMQO assume que cada nível da faixa tem uma variação absoluta constante (homoscedasticidade). Entretanto,

estudos de ensaios produzem dados que são heteroscedásticos, com valor relativo dos erros constantes (BOX, 1953).

Brown e Forsythe (1974) apresentam uma fórmula alternativa para o teste de Levene, pois para amostras muito pequenas, a validade desse teste fica prejudicada, devido à alta correlação entre os desvios de mesmo grupo. O teste de Brown e Forsythe – Levene modificado é robusto em condições de não normalidade, utiliza a mediana em lugar da média e o módulo dos desvios para minimizar possíveis problemas causados pela correlação entre os desvios de um mesmo grupo.

Teste de Brown e Forsythe – Levene modificado. O F de Levene (FL) é a estatística desse teste e quando a estatística tL calculada for menor que o t crítico, há homocedasticidade. Calcula-se o t_L pela equação:

$$t_L = \frac{(\bar{d}_1 - \bar{d}_2)}{\sqrt{(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}) s_p^2}}$$

Considera-se d_k = média dos módulos das diferenças entre o j-ésimo resíduo, a mediana de cada grupo $k = 1$ e $k = 2$; n_k = número de observações em cada grupo e a variância combinada (s_p^2) (SOUZA; PINTO; JUNQUEIRA, 2007).

1.2.6.3.4 Independência

Autocorrelação é uma correlação seriada dos resíduos da regressão. O MMQO assume que os resíduos são independentes, pois a autocorrelação dos resíduos afeta a variância das estimativas dos parâmetros obtidos pelo método mínimo quadrado e pode subestimar a estimativa da variância da regressão e os intervalos de confiança. Em testes de hipótese, pode levar a inferências equivocadas, indicando falsa significância dos regressores (DRAPER; SMITH, 1998).

O Teste de Durbin-Watson estuda a estrutura ou aleatoriedade dos resíduos da regressão, sendo frequentemente aplicado para determinar

autocorrelação de primeira ordem, avaliando assim, se os resíduos são independentes. A estatística do teste (d) é definida pela equação:

$$d = \frac{\sum_{i=1}^n (e_i - e_{i-1})^2}{\sum_{i=1}^n e_i^2}$$

Na estatística do teste existem dois limites críticos: d_L (limite inferior) e d_U (limite superior). Valores de d menor que d_L indicam autocorrelação e os resíduos não são independentes a um nível de significância, enquanto os valores de d maior que d_U indicam independência dos resíduos, sem autocorrelação entre eles (DURBIN; WATSON, 1951). Calculam-se d_L e d_U para $\alpha=0,05$ pelas seguintes equações:

$$d_L = 1,9693 - \frac{2,8607}{\sqrt{n}} - \frac{3,4148}{n} - \frac{16,6400}{n^2}$$

$$d_U = 1,9832 - \frac{3,0547}{\sqrt{n}} - \frac{1,3862}{n} - \frac{16,3662}{n^2}$$

A independência também pode ser demonstrada graficamente construindo-se um gráfico dos valores de e_i versus seus valores imediatamente anteriores e_{i-1} . Um perfil de distribuição aleatória nos quatro quadrantes indica independência. Se os pontos se concentram no primeiro e terceiro quadrantes, indicam correlação positiva, enquanto predominância dos pontos no segundo e quarto quadrantes indica correlação negativa (DURBIN; WATSON, 1951).

1.2.6.4 Exatidão e precisão

A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro. A exatidão é sempre considerada dentro de certos limites, a um dado nível de confiança, ou seja, aparece sempre

associada a valores de precisão. Os limites podem ser estreitos em níveis de concentração elevados e mais amplos em níveis de traços (ICH, 1995).

Os processos mais utilizados para avaliar a exatidão de um método são: materiais de referência; comparação de métodos; ensaios de recuperação e adição padrão. Nos ensaios de recuperação, a recuperação (ou fator de recuperação-R), é definida como a proporção da quantidade da substância de interesse, presente ou adicionada na porção analítica do material teste, que é extraída e passível de ser quantificada. Os intervalos aceitáveis de recuperação para análise de resíduos geralmente estão entre 70 e 120%, com precisão de até $\pm 20\%$ (GARP, 1999; THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002).

A precisão representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas. É considerada em três níveis diferentes: repetitividade; precisão intermediária; reprodutibilidade (RIBANI *et al.*, 2004). A precisão pode ser avaliada pelo desvio padrão relativo, obtido em experimentos de fortificação/recuperação do analito, normalmente menor que 20% (ICH, 1995; THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002; IMETRO, 2003).

1.2.6.5 Efeito de Matriz

Efeito de matriz é a interferência dos componentes da matriz na quantificação dos analitos na análise cromatográfica (GONZALEZ *et al.*, 2002). O efeito de matriz foi descrito pela primeira vez por Erney *et al.* (1993) que observaram modificações na resposta do pesticida durante a análise em amostras naturais. Isso ocorreu devido à extração de vários componentes da matriz, além dos pesticidas.

Com o efeito de matriz pode ocorrer uma superestimação dos resultados, pois quando as soluções padrão são preparadas em solvente puro e analisadas por cromatografia, mais sítios ativos do liner estão disponíveis para interagir com os analitos. E quando são realizadas as análises dos extratos, os analitos competem com os componentes da matriz pelos sítios ativos do liner, com isso, mais analitos são introduzidos na coluna

cromatográfica, sendo detectados e obtendo uma maior resposta em relação ao padrão no solvente (HAJSLVÁ; ZROSTLIKOVÁ, 2003).

A intensidade do efeito de matriz pode variar de uma amostra para outra, ou de acordo com a concentração do analito na matriz. E o próprio sistema cromatográfico pode influenciar na intensidade do efeito de matriz (PINHO, 2007).

A quantificação exata dos analitos em amostras ambientais é importante, sendo necessário o desenvolvimento de métodos para contornar o problema da alta recuperação de determinados compostos. As propostas a seguir são as mais comuns de serem encontradas em trabalhos científicos e em laboratórios oficiais para monitoramento de resíduos de agrotóxicos em matrizes complexas: curva analítica da matriz, analitos protetores, forma de injeção, limpeza dos extratos, função de correção e método de adição do padrão (PINHO *et al.*, 2009).

Diante do exposto acima, o monitoramento de 2,3,7,8-TCDF e de 2,3,7,8-TCDD em lodo de esgoto e solo para fins agrícolas é uma atividade fundamental para garantir a segurança desta aplicação. Para essa investigação, é necessária a proposição de novas metodologias que sejam menos laboriosas, menos onerosas e de baixo tempo de análise. O desenvolvimento de um método alternativo como a ESL-PBT, que reuni diversos atributos frequentemente desejados em uma técnica de extração, pode constituir uma alternativa econômica e eficiente em relação às metodologias atualmente disponíveis. Nesse sentido, seguem os objetivos estabelecidos para este trabalho, considerando que a ESL-PBT irá facilitar a execução das análises, tornando-as mais acessíveis e menos onerosas, podendo, assim, se consolidar como um novo método padrão de análises de 2,3,7,8-TCDF e de 2,3,7,8-TCDD em lodo de esgoto e solo.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo geral

Otimizar e validar a técnica de ESL-PBT de 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-*p*-dioxina e 2,3,7,8-tetraclorodibenzofurano em lodo de esgoto e solo e quantificação por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas.

1.3.2 Objetivos específicos

- Otimizar as condições de análise cromatográfica simultânea de 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-*p*-dioxina e 2,3,7,8-tetraclorodibenzofurano no lodo de esgoto e em solo por cromatografia gasosa e espectrometria de massas;
- Otimizar a extração sólido-líquido com purificação em baixa temperatura (ESL-PBT) de 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-*p*-dioxina e 2,3,7,8-tetraclorodibenzofurano em amostras de lodo de esgoto e de solo;
- Validar a metodologia otimizada;
- Empregar a metodologia otimizada e validada para a extração e quantificação de 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-*p*-dioxina e 2,3,7,8-tetraclorodibenzofurano em amostras de solo condicionado com lodo de esgoto obtidas no Instituto de Ciências Agrárias em Montes Claros - MG.

CAPÍTULO 2 – OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DA TÉCNICA DE ESL-PBT DE DIBENZO-*P*-DIOXINA E DIBENZOFURANO POLICLORADOS EM LODO DE ESGOTO

2.1 MATERIAL E MÉTODOS

2.1.1 Materiais

O padrão de 2,3,7,8-tetraclorodibenzenofurano (2,3,7,8-TCDF) grau analítico foi adquirido da Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) e o padrão e 2,3,7,8-tetraclorodibenzeno-*p*-dioxina (2,3,7,8-TCDD) grau analítico foi adquirido da SUPELCO (Solutions within, USA). Os solventes grau HPLC foram adquiridos: hexano da Sigma-Aldrich (St. Louis, USA), acetonitrila da J.T.Baker (USA) e acetato de etila da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil). Os solventes P.A. foram adquiridos: isopropanol da Carlo Erba (França) e o Tetraidrofurano da Dinâmica (São Paulo, Brasil). O reagente sulfato de sódio anidro foi obtido da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil) com grau de pureza superior a 99%.

2.1.2 Instrumentação

Os instrumentos utilizados foram vórtex da Phoenix (São Paulo, Brasil); centrífuga da Kindly (São Paulo, Brasil); soxtec da Marconi (São Paulo, Brasil); estufa da Ethik Technology (São Paulo, Brasil) e balança analítica da Shimadzu (São Paulo, Brasil).

2.1.3 Análises cromatográficas

A identificação e quantificação dos extratos de lodo de esgoto fortificado com os dois contaminantes foram realizadas em um cromatógrafo a gás da Agilent Technologies (GC 7890A) acoplado a um espectrômetro de massas (MS 5975C). Para promover a separação entre os picos dos compostos de interesse no menor tempo de análise, foram estabelecidas as

condições ideais de análise como a temperatura do forno, do injetor e do detector, vazão do gás de arraste e escolha do tipo de coluna cromatográfica. Seguem as condições analíticas otimizadas: coluna cromatográfica capilar DB-5 MS (Agilent Technologies) com fase estacionária 5% difenil e 95% dimetilpolisiloxano (30 m comprimento x 0,32 mm diâmetro interno x 0,25 µm espessura do filme interno). A programação de temperatura do forno iniciou em 140 °C, com taxa de aquecimento de 40 °C min⁻¹ até 200 °C, seguida da taxa de aquecimento de 4 °C min⁻¹ até 254 °C, em um tempo total de análise de 15 minutos. O Hélio (99,9999% de pureza) foi utilizado como gás de arraste a uma taxa de 0,8 mL min⁻¹. A temperatura do injetor *split* / *splitless* foi mantida em 280 °C. O volume da amostra injetado foi de 1 µL no modo de injeção sem divisão de fluxo (*splitless*), utilizando autoinjeter Combi PAL. O espectrômetro de massas foi operado no modo de ionização por impacto de elétrons a 70 eV. A interface foi mantida a 280 °C e a fonte de íons a 230 °C. O controle do instrumento e aquisição de dados foram feitos com o software ChemStation (E.02.02.1431 copyright © 1989-2011) da Agilent Technology.

As análises foram realizadas no modo monitoramento de íons seletivo (SIM) e a aquisição de dados dividida em dois grupos de íons. No grupo 1, consideraram-se os íons 303,9; 305,9 e 307,9 *m/z* e, no grupo 2, os íons 319,9; 321,9 e 323,9 *m/z*.

2.1.4 Preparo de soluções padrão

As soluções empregadas neste trabalho foram preparadas pela diluição das soluções dos padrões de 2,3,7,8-TCDF (50 mg L⁻¹ da Sigma-Aldrich) e de 2,3,7,8-TCDD (10 mg L⁻¹ da SUPELCO), em hexano grau CLAE-UV (Sigma-Aldrich) nas seguintes concentrações: 12 mg L⁻¹ (solução estoque) e 2 mg L⁻¹ (solução de trabalho) para o 2,3,7,8-TCDF e de 2 mg L⁻¹ (solução de trabalho) para o 2,3,7,8-TCDD. Em seguida, as soluções foram armazenadas em frasco âmbar à - 18 °C.

2.1.5 Preparo de amostras de lodo de esgoto fortificadas

A coleta das amostras de lodo de esgoto isentas de 2,3,7,8-TCDF e 2,3,7,8-TCDD ocorreu no leito de secagem na estação de tratamento de esgoto (ETE) da cidade de Juramento, Minas Gerais – Brasil. Em laboratório, as amostras de lodo de esgoto foram submetidas ao teste de umidade por gravimetria, em que 2,0000 g de amostra (cinco repetições) foram colocadas em estufa a 100°C, medindo-se a massa a cada hora até obter a massa constante.

Amostras de lodo de esgoto foram trituradas e alíquotas de 4,0000 g fortificadas com 100,0 µL de soluções padrão de 2,3,7,8-TCDF e de 2,3,7,8-TCDD em concentrações de 2 mg L⁻¹. As amostras fortificadas (4 µg kg⁻¹) ficaram por três horas em frasco aberto para evaporação do solvente.

2.1.6 ESL-PBT

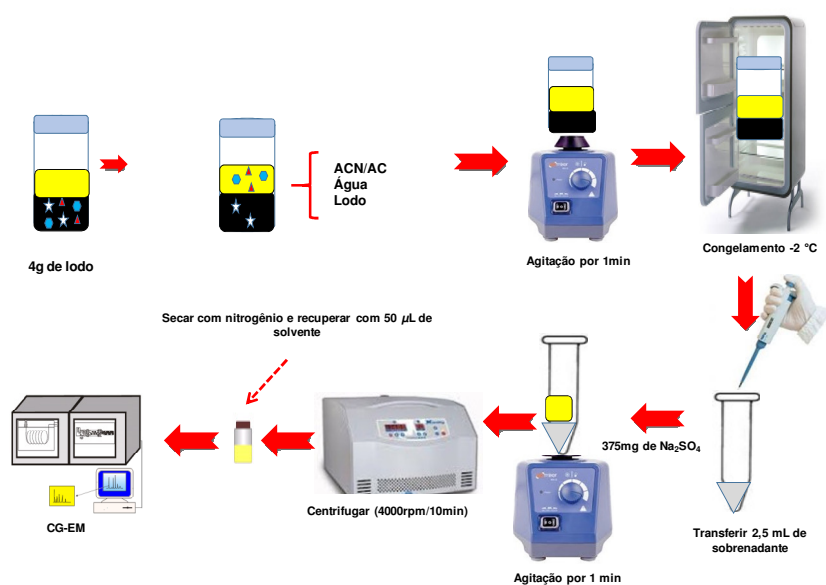
Os ensaios da extração sólido-líquido com purificação em baixa temperatura para análise dos dois contaminantes (2,3,7,8-TCDF e 2,3,7,8-TCDD) em amostras de lodo de esgoto foram adaptados da técnica descrita para extração de deltametrina e cipermetrina em leite (GOULART, 2004), para extração de bifenilas policloradas (MAIA, 2014) e Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) (BARBOSA *et al.*, 2014) em lodo de esgoto.

Em frasco de vidro transparente de 22 mL de capacidade, contendo 4,0000 g de lodo de esgoto fortificado, foram adicionados 3,1 mL de água destilada, pré-determinada no teste de umidade e, 8,0 mL da mistura extratora otimizada (6,50 mL de acetonitrila: 1,50 mL de acetato de etila), em seguida, o sistema foi homogeneizado em vórtex por um minuto. Posteriormente, a mistura foi resfriada em freezer a -20 °C por uma hora. Após a separação das fases pelo congelamento da fase aquosa e do lodo de esgoto, o líquido sobrenadante (2,5 mL) foi transferido para tubo de polipropileno de 15 mL, contendo 375 mg de sulfato de sódio anidro. Em seguida, o sistema passou por homogeneização em vórtex por um minuto e centrifugação a 4000 rpm por 10 minutos. O extrato foi concentrado sob

atmosfera de nitrogênio (N_2) e ressuspendido em 50 μ L de acetonitrila: acetato de etila, como ilustrado na FIG. 4 a seguir.

Após a extração, as concentrações dos analitos foram determinadas por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM).

Figura 4 - Representação das etapas da técnica de extração sólido-líquido com purificação em baixa temperatura (ESL-PBT) de 2,3,7,8-TCDF e de 2,3,7,8-TCDD em lodo de esgoto



Fonte: Elaborada pela autora.

2.1.7 Otimizações univariadas

2.1.7.1 Otimização da ESL-PBT

Para melhorar a eficiência da extração dos dois contaminantes (2,3,7,8-TCDF e 2,3,7,8-TCDD) em amostras de lodo de esgoto e obter extratos mais apropriados para análise cromatográfica, realizaram-se

otimizações univariadas, avaliando cinco fases extratoras como apresentado na TAB. 2.

Tabela 2 – Misturas extratoras avaliadas na ESL-PBT de 2,3,7,8-TCDF e de 2,3,7,8-TCDD em amostras de lodo de esgoto

Parâmetro	Misturas extratoras
Mistura Extratora	6,50 mL de acetonitrila
(8,00 mL)	8,00 mL de acetonitrila / 1,50 mL de acetato de etila
	8,00 mL de tetrahidofurano
	8,00 mL de isopropanol
	6,50 mL de isopropanol / 1,50 mL de acetato de etila

Fonte: Elaborada pela autora.

2.1.7.2 Otimização da extração do lodo de esgoto (soxtec)

As amostras de lodo de esgoto foram submetidas à extração em soxtec para remover interferentes e melhorar a detecção dos dois contaminantes (2,3,7,8-TCDF e 2,3,7,8-TCDD) na parte de validação do método. Para isso, procedeu-se ao estudo de alguns parâmetros da extração em soxtec apresentados na TAB. 3.

Tabela 3 – Parâmetros avaliados para a extração das amostras de lodo de esgoto por soxtec

Parâmetros	Quantidades
Amostras de Lodo de esgoto	6,0000 g
	14,0000 g
Tempo de extração	1 hora
	2 horas
	3 horas
	4 horas

Fonte: Elaborada pela autora.

2.1.8 Validação do método analítico

Para assegurar a confiabilidade do método analítico desenvolvido, esse foi submetido a uma validação. As figuras de mérito consideradas neste trabalho foram: seletividade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), linearidade, exatidão, precisão e efeito de matriz.

2.1.8.1 Seletividade

A seletividade do método foi avaliada comparando cromatogramas dos extratos obtidos após extração dos componentes da matriz (lodo de esgoto), isenta dos contaminantes (2,3,7,8-TCDF e 2,3,7,8-TCDD), com os cromatogramas dos extratos das amostras de lodo de esgoto, fortificadas na concentração ($10 \mu\text{g L}^{-1}$), preparadas e analisadas conforme as condições otimizadas. Esse procedimento foi realizado em seis replicatas independentes.

2.1.8.2 Limite de detecção e limite de quantificação

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram determinados fortificando amostras de lodo de esgoto com o 2,3,7,8-TCDF e o 2,3,7,8-TCDD nas menores concentrações aceitáveis e submetendo a ESL-PBT nas condições otimizadas e análise por CG-EM. Consideraram-se os limites como três e dez vezes o sinal da linha de base obtidos nas análises para o LD e LQ, respectivamente (ICH, 1995).

2.1.8.3 Linearidade de resposta do método

A linearidade de resposta do detector foi verificada pela curva analítica preparada em extrato da matriz em seis níveis de concentração, sendo obtida na faixa de concentração entre $1,25$ a $25 \mu\text{g L}^{-1}$, que corresponde a 16 a 312 ng kg^{-1} no lodo de esgoto, em três replicatas independentes para cada nível. Aplicou-se o método de regressão linear dos

mínimos quadrados aos dados experimentais para estimar os parâmetros de regressão. Os valores dispersos foram tratados e confirmados pelo teste de Jacknife com exclusão máxima de 22,2% dos dados. A avaliação da análise de regressão seguiu os parâmetros de normalidade (teste de Ryan & Joiner), homocedasticidade (teste de Levene - modificado), independência de resíduos (teste de Durbin & Watson).

2.1.8.4 Exatidão e Precisão

Entre as principais maneiras de avaliar a exatidão de um método pode-se recorrer aos ensaios de recuperação, comparação entre métodos e utilização de material de referência certificado (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002). Neste trabalho, avaliou-se a exatidão utilizando ensaios de recuperação nos três menores níveis de concentrações (1,25; 2,5 e 5 $\mu\text{g L}^{-1}$), correspondendo a 16; 31 e 62 ng kg^{-1} em lodo de esgoto. Essas amostras em triplicatas foram submetidas ao método de ESL-PBT e analisadas por CG-EM. Para cada nível, os valores de recuperação foram considerados aceitáveis entre 70 e 120% (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002).

A precisão do método de ESL-PBT e a análise por CG-EM foram verificadas sob condições de repetitividade. Essa repetitividade do método de extração dos dois contaminantes (2,3,7,8-TCDF e 2,3,7,8-TCDD) em amostras de lodo de esgoto foram determinadas, conforme sugerido por Thompson; Ellison e Wood (2002), pela realização de sete extrações idênticas dos dois contaminantes na concentração de 2,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ (correspondendo a 31 ng Kg^{-1} no lodo de esgoto), determinando o desvio padrão relativo (DPR). O critério de aceitabilidade para o DPR foi menor que 20% (RIBANE *et al.*, 2004).

2.1.8.5 Estudo do efeito de matriz

A variação da resposta do detector para os dois contaminantes (2,3,7,8-TCDF e 2,3,7,8-TCDD), associada ao efeito de matriz, foi avaliada em três concentrações de 1,25, 10 e 25 $\mu\text{g L}^{-1}$. Para isso, realizou-se a

comparação das áreas cromatográficas de injeções de soluções padrão desses contaminantes preparados em hexano com as áreas cromatográficas de injeções de extratos de lodo de esgoto fortificados com os contaminantes, determinando também o desvio padrão relativo (DPR). O experimento foi realizado em triplicata e a confirmação do efeito de matriz foi realizada pelo teste Duncan (5 % probabilidade).

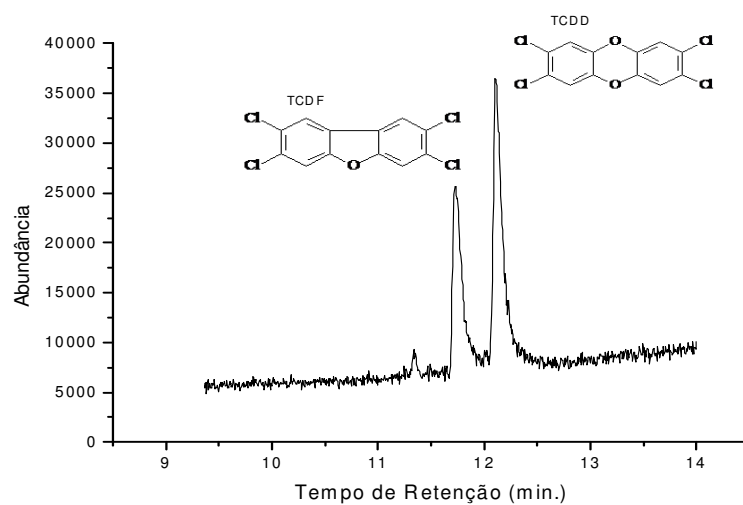
2.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.2.1 Análises Cromatográficas

As estruturas químicas das dioxinas podem apresentar de um a oito átomos de cloro ligados aos carbonos dos anéis aromáticos, resultando em 75 estruturas diferentes denominadas congêneres. Já os furanos policlorados podem apresentar até 135 congêneres, que juntos somam 210 substâncias diferentes que apresentam propriedades químicas semelhantes (WHO, 2000; HOOGENBOOM *et al.*, 2015). Desses, dois congêneres tetraclorados 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-*p*-dioxina (2,3,7,8-TCDD) e 2,3,7,8-tetraclorodibenzofurano (2,3,7,8-TCDF) apresentam elevada toxicidade ao ambiente e aos seres vivos. Tais compostos são detectados com maior frequência em episódios de contaminações ambientais, por isso, são considerados indicadores de contaminação ambiental (MASON *et al.*, 1987; WHO, 2000; OLSMAN *et al.*, 2007).

A primeira parte do trabalho envolveu o estudo das condições cromatográficas otimizadas para a separação e detecção desses compostos. O cromatograma de íons totais obtido para a solução padrão desses dois compostos em hexano é apresentado na FIG. 5.

Figura 5 – Representação do cromatograma de íons totais do 2,3,7,8-TCDF e do 2,3,7,8-TCDD em hexano na concentração de 1 mg L⁻¹

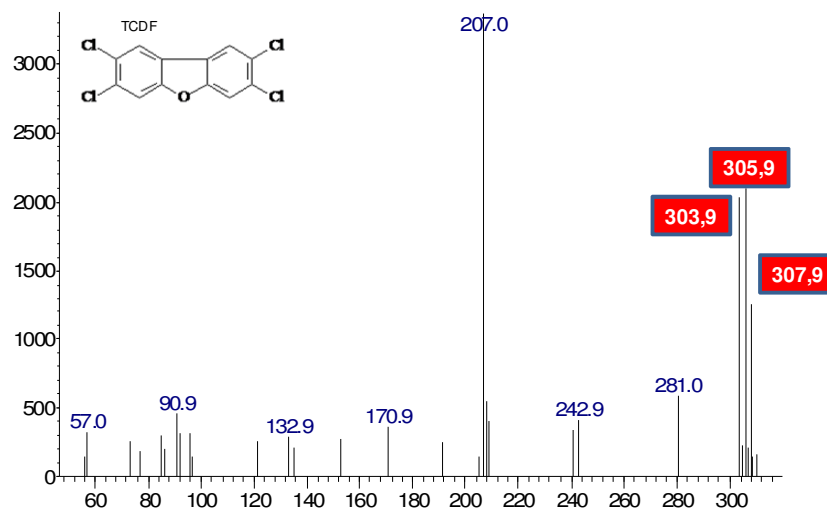


Fonte: Elaborada pela autora.

Visando melhorar a sensibilidade do espectrômetro de massas para esses dois compostos, foram otimizadas as condições para o monitoramento de íons seletivo (MIS). Os seus espectros de massas são apresentados na FIG. 6.

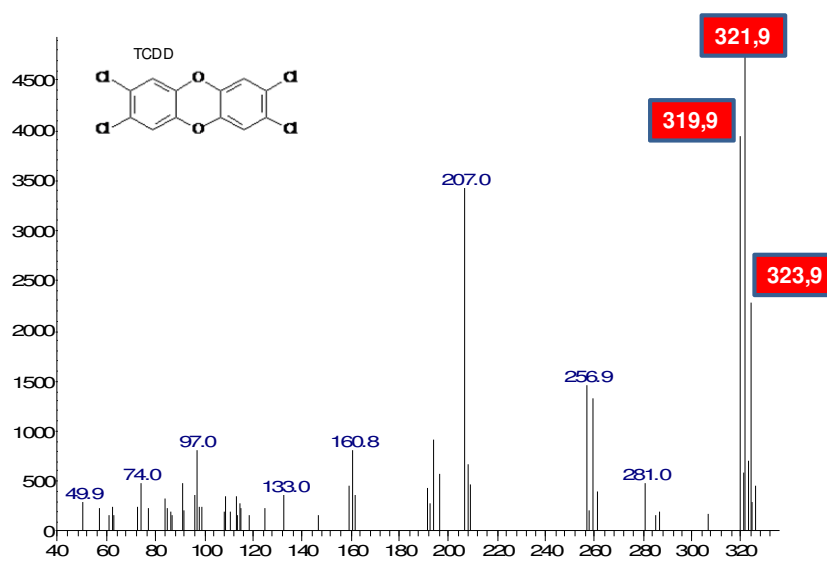
Figura 6 – Representação dos espectros de massas do 2,3,7,8-TCDF e do 2,3,7,8-TCDD obtidos sob o modo de impacto de elétrons a 70 eV

Abundance



m/z->

Abundance



m/z->

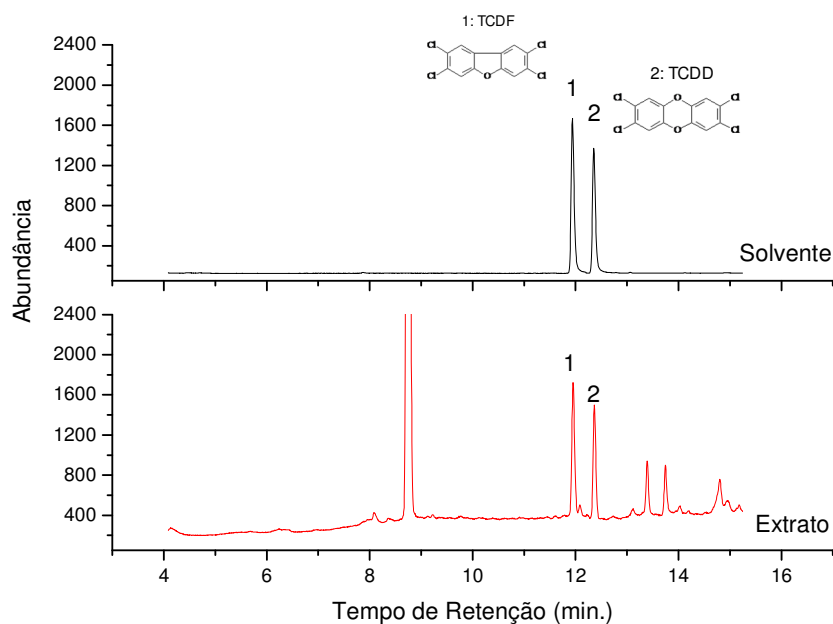
Fonte: Elaborada pela autora.

Neste estudo foram selecionados três íons para cada composto. Os íons definidos para o 2,3,7,8-TCDF foram os m/z 303,9; 305,9 e 307,9 e para o 2,3,7,8-TCDD foram os íons com m/z 319,9; 321,9 e 323,9. Esses íons foram selecionados por serem mais intensos nos espectros de massas e por serem específicos a esses compostos (US EPA, 1994).

Compostos que contêm átomo de cloro têm pico $M+2$ com intensidade aproximadamente igual a um terço da intensidade do pico do íon molecular, devido à presença de íons moleculares, contendo o isótopo ^{37}Cl . E o íon $M-2$ representa a perda de dois hidrogênios sendo um pico que confirma a presença do íon molecular (SILVERSTEIN; MEBSTER, 1998).

Após definidas as condições de trabalho do espectrômetro de massas, os cromatogramas obtidos para esses dois compostos em hexano e no extrato do lodo de esgoto fortificado na concentração de $25 \mu\text{g L}^{-1}$ são apresentados na FIG. 7.

Figura 7 – Representação dos cromatogramas obtidos no modo MIS do 2,3,7,8-TCDF e do 2,3,7,8-TCDD em hexano ($25 \mu\text{g L}^{-1}$) e no extrato de lodo de esgoto fortificado ($25 \mu\text{g L}^{-1}$)



Fonte: Elaborada pela autora.

Pelas características dos cromatogramas da FIG. 7, observou-se que as condições de análise empregada, como a programação de temperatura, coluna cromatográfica utilizada, fluxo do gás de arraste, possibilitaram uma boa separação dos compostos avaliados. Ao fazer uma comparação dos cromatogramas, percebeu-se que o cromatograma do extrato de lodo de esgoto apresenta sinais em aproximadamente 9, 13.5, 13.9 e 14.9 minutos, atribuídos a compostos da matriz lodo de esgoto. Além disso, verificou-se que a linha de base se tornou mais irregular e com mais ruídos, ou seja, a relação sinal: ruído (s/n) diminuiu. Entretanto, os sinais dos analitos, 2,3,7,8-TCDF e 2,3,7,8-TCDD, apresentaram intensidades semelhantes nos dois cromatogramas.

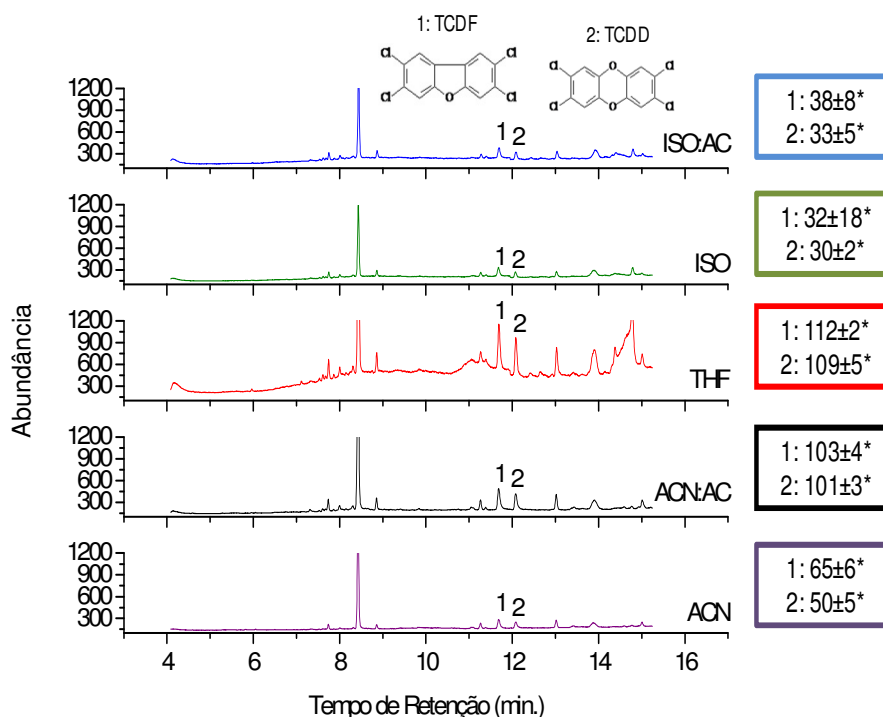
2.2.2 Otimizações univariadas

2.2.2.1 Otimização da ESL-PBT

O primeiro passo para otimizar a metodologia de extração sólido-líquido com purificação em baixa temperatura (ESL-PBT) é definir o volume de água a ser adicionado à amostra de lodo de esgoto. Estudos anteriores mostraram que a proporção ótima de solvente orgânico: água é de 8 mL:4 mL (VIEIRA; NEVES; QUEIROZ, 2007; MARTHE *et al.*, 2010). Por isso, determinou-se que o teor de água presente no lodo de esgoto é de 20 % em massa. Esse valor corresponde a 0,9 mL de água em 4 g de amostra de lodo de esgoto. Dessa forma, para completar o volume final de água, foram adicionados 3,1 mL de água à amostra de lodo de esgoto.

Em seguida, foi realizado um estudo para definir a melhor fase extratora. Embora a acetonitrila seja tradicionalmente utilizada na ESL-PBT como solvente extrator (PINHO *et al.*, 2010), neste estudo foram avaliadas cinco fases extratoras (8,00 mL de acetonitrila, 6,50 mL de acetonitrila / 1,50 mL de acetato de etila, 8,00 mL de tetraidrofurano, 8,00 mL de isopropanol e 6,50 mL de isopropanol / 1,50 mL de acetato de etila) para a extração do 2,3,7,8-TCDF e do 2,3,7,8-TCDD em lodo de esgoto. Os resultados obtidos estão apresentados na FIG. 8.

Figura 8 – Representação dos cromatogramas no modo MIS do 2,3,7,8-TCDF e do 2,3,7,8-TCDD



Legenda: nos extratos de lodo de esgoto com as fases extratoras: ACN: acetonitrila; ACN:AC: acetonitrila / acetato de etila; THF: tetraidrofurano; ISO: isopropanol e ISO:AC: isopropanol / acetato de etila, na concentração de $25 \mu\text{g L}^{-1}$.

Fonte: Elaborada pela autora.

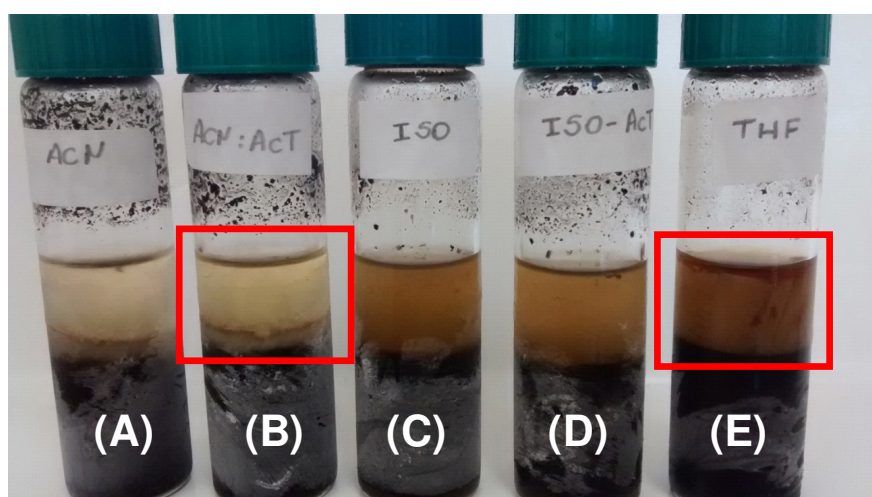
Nota: * Recuperação (%) (média ± DPR).

Observou - se que as fases extratoras constituídas pelo THF ou por acetonitrila / acetato de etila na proporção de 6,50 mL: 1,50 mL apresentaram as maiores taxas de extração para os dois compostos, com valores superiores a 100% e um DPR menor que 6 (FIG. 8). Entretanto, a fase extratora constituída apenas pelo THF resultou em um cromatograma com muitos sinais atribuídos a interferentes extraídos do lodo, como pôde ser

observado na FIG. 8. Esses compostos podem sujar ou danificar o sistema cromatográfico, por isso escolheu-se a fase extratora constituída por acetonitrila / acetato de etila na proporção de 6,50 mL: 1,50 mL, pois o cromatograma apresentou menor número de sinais interferentes. Estudos anteriores têm empregado essa fase extratora, como exemplo Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos - HPA (BARBOSA *et al.*, 2014).

Vale destacar que as fotos dos extratos preparados com cada uma dessas fases extratoras são apresentados na FIG. 9. Observou-se que o extrato preparado utilizando o THF ficou mais escuro, o que indica uma maior extração de interferentes. Por outro lado, o extrato preparado, utilizando como fase extratora somente a acetonitrila ou a acetonitrila / acetato de etila na proporção de 6,50 mL:1,50 mL, resultou em extrato mais claro, sugerindo a extração de um menor número de interferentes. Esses resultados corroboram os encontrados nos cromatogramas da FIG. 8.

Figura 9 – Representação da foto dos vials contendo os extratos do lodo de esgoto, após congelamento



Legenda: obtidos utilizando como fase extradoras: (A) acetonitrila; (B) acetonitrila / acetato de etila; (C) isopropanol; (D) isopropanol / acetato de etila e (E) tetraidrofurano.

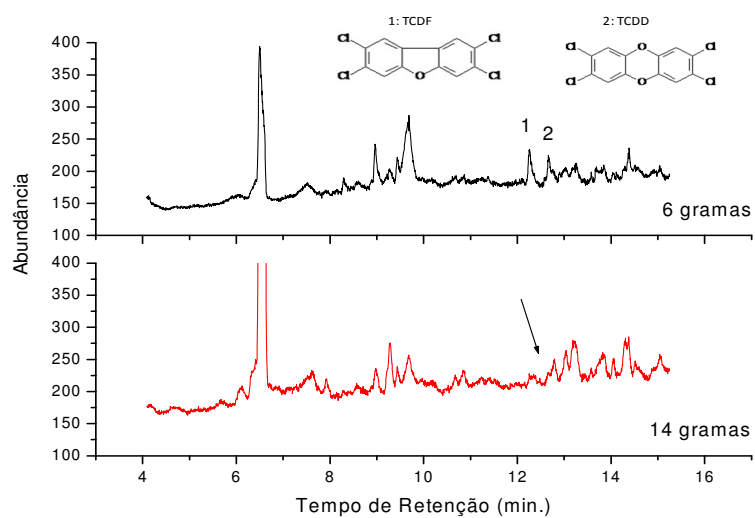
Fonte: Elaborada pela autora.

Por tudo isso, definiu-se que a fase extratora constituída por acetonitrila / acetato de etila na proporção de 6,50 mL:1,50 mL é a mais adequada para extração de 2,3,7,8-TCDF e de 2,3,7,8-TCDD, em lodo de esgoto.

2.2.2.2 Extração do lodo de esgoto utilizando soxtec

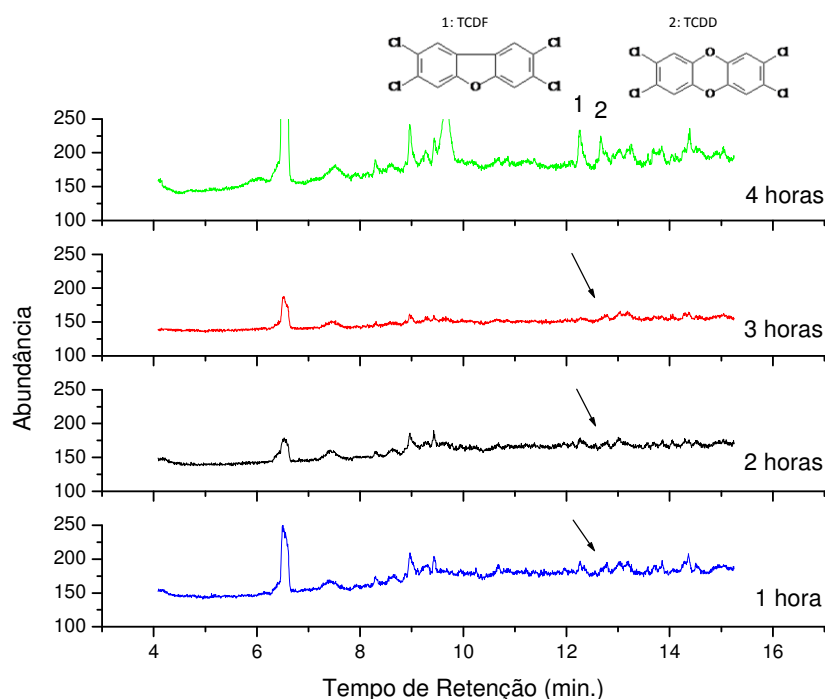
Na etapa de validação do método, as amostras de lodo de esgoto foram submetidas à extração em soxtec com acetonitrila para extrair interferentes e melhorar a detecção dos dois contaminantes (2,3,7,8-TCDF e 2,3,7,8-TCDD) em concentrações muito baixas. Para isso, inicialmente dois parâmetros da extração em soxtec foram estudados. O primeiro parâmetro considerou a massa de amostra em dois níveis (6,0000 e 14,0000 g). O segundo parâmetro considerou o tempo de extração em quatro níveis (1, 2, 3 e 4 horas). Os resultados desse estudo são apresentados nas FIG. 10 e 11.

Figura 10 - Representação dos cromatogramas obtidos no modo MIS do 2,3,7,8-TCDF e do 2,3,7,8-TCDD no extrato de lodo de esgoto fortificado ($0,5 \mu\text{g L}^{-1}$) após tratamento em soxtec, empregando 6,0000 e 14,0000 g de amostra



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 11 - Representação dos cromatogramas obtidos no modo MIS do 2,3,7,8-TCDF e do 2,3,7,8-TCDD no extrato de lodo de esgoto fortificado ($0,5 \mu\text{g L}^{-1}$) após tratamento em soxtec, empregando 1, 2, 3 e 4 horas de extração



Fonte: Elaborada pela autora.

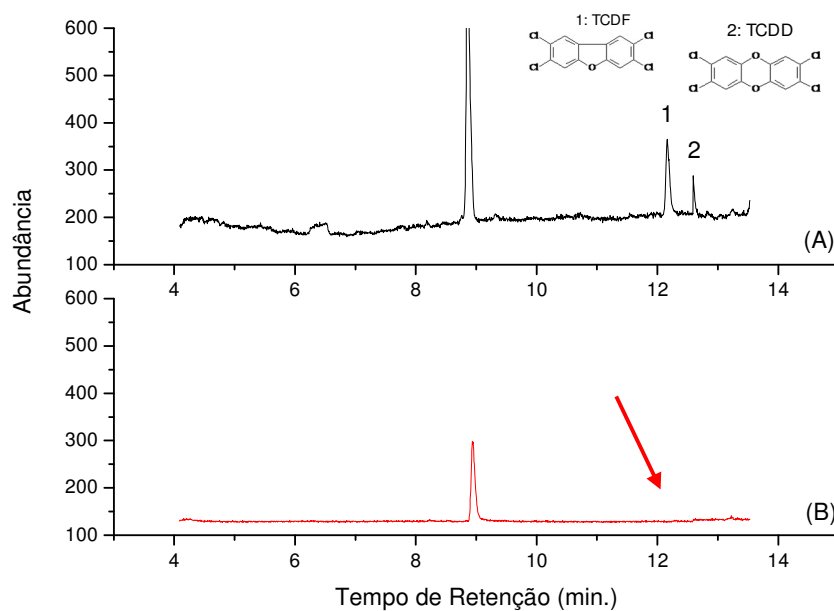
Observou-se que as amostras de 6,0000 g de lodo de esgoto resultaram em cromatogramas com menor número interferentes, o que permitiu detectar os dois compostos (2,3,7,8-TCDF e 2,3,7,8-TCDD) em extratos de lodo de esgoto. De forma similar, somente após quatro horas de extração, foi possível detectar esses dois compostos nos cromatogramas obtidos das amostras de lodo de esgoto. Por isso, essas condições foram empregadas para a preparação do lodo de esgoto para a ESL-PBT de 2,3,7,8-TCDF e de 2,3,7,8-TCDD no processo de validação.

2.2.3 Validação

2.2.3.1 Seletividade

A seletividade do método foi confirmada através da comparação dos cromatogramas do extrato de lodo de esgoto fortificado com 2,3,7,8-TCDF e 2,3,7,8-TCDD, na concentração de $10 \mu\text{g L}^{-1}$, e do extrato de lodo de esgoto sem adição desses analitos (extrato branco) (FIG. 12).

Figura 12 - Representação dos cromatogramas dos extratos de lodo de esgoto obtidos após a ESL-PBT: (A) fortificado com o 2,3,7,8-TCDF e o 2,3,7,8-TCDD na concentração de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ e (B) amostra de lodo isenta desses analitos (branco)



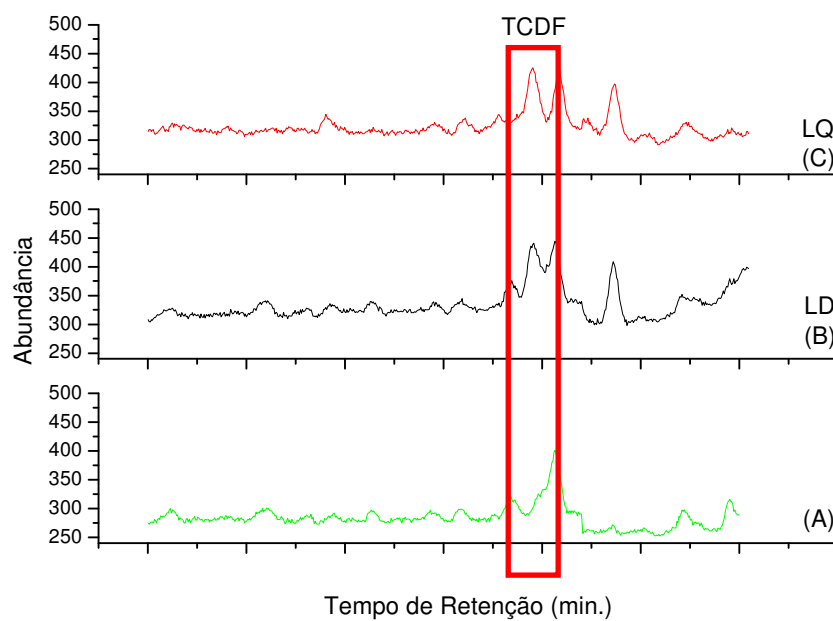
Fonte: Elaborada pela autora.

Observa-se a ausência de sinais nos mesmos tempos de retenção do 2,3,7,8-TCDF e do 2,3,7,8-TCDD durante as análises de extratos de lodo de esgoto isento desses compostos, demonstrando a seletividade do método proposto.

2.2.3.2 Limite de detecção e limite de quantificação

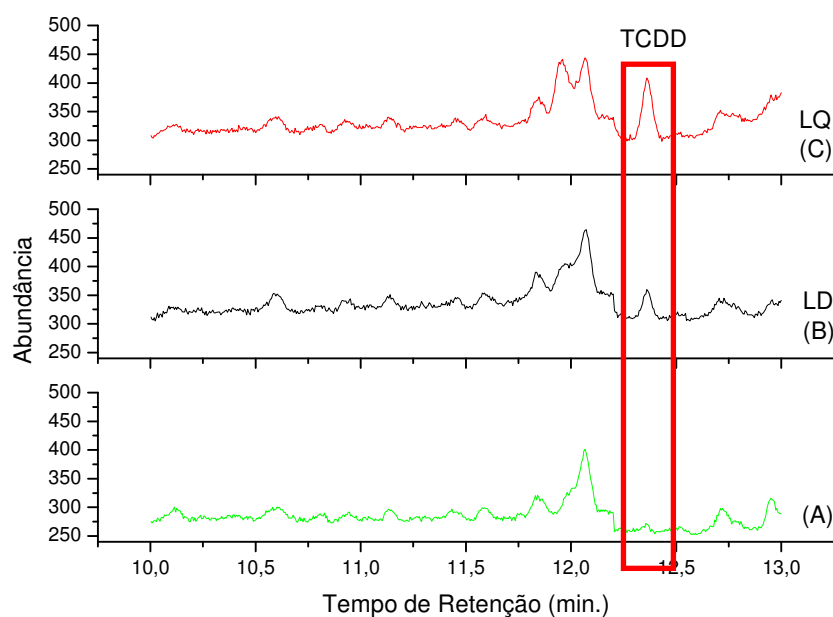
Em análises cromatográficas, o limite de detecção (LD) pode ser definido como a menor concentração do analito de interesse que pode ser diferenciada do ruído da linha de base do sistema cromatográfico com segurança. Essa concentração não implica que o analito seja quantificado. Já o limite de quantificação (LQ) é a menor quantidade do analito que pode ser quantificada com exatidão (INMETRO, 2003). O limite de detecção foi determinado como a concentração que gerou um sinal três vezes a da relação sinal:ruído de cada composto no cromatograma. Já o limite de quantificação foi determinado como a concentração que gerou um sinal dez vezes maior do que a relação sinal:ruído, como mostrado nas FIG. 13 e 14.

Figura 13 – Representação dos cromatogramas dos extratos de lodo de esgoto obtidos após a ESL-PBT: (A) isento desses analitos (branco), (B) fortificado com o 2,3,7,8-TCDF, na concentração de $0,625 \mu\text{g L}^{-1}$ (LD) e (C) fortificado com o 2,3,7,8-TCDF, na concentração de $1,25 \mu\text{g L}^{-1}$ (LQ)



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 14 - Representação dos cromatogramas dos extratos de lodo de esgoto obtidos após a ESL-PBT: (A) isento desses analitos (branco), (B) fortificado com o 2,3,7,8-TCDD, na concentração de $0,3125 \mu\text{g L}^{-1}$ (LD) e (C) fortificado com o 2,3,7,8-TCDD, na concentração de $0,625 \mu\text{g L}^{-1}$ (LQ)



Fonte: Elaborada pela autora.

Na FIG. 13, observa-se que o limite de detecção para o 2,3,7,8-TCDF em extrato de lodo de esgoto fortificado, na concentração de $0,625 \mu\text{g L}^{-1}$, correspondendo a 8 ng kg^{-1} . E na FIG. 14, o limite de detecção para o 2,3,7,8-TCDD em extrato de lodo de esgoto fortificado, na concentração de $0,3125 \mu\text{g L}^{-1}$, corresponde a 4 ng kg^{-1} .

Os limites de quantificação DBDPs e DBFPs são apresentados na literatura em termos da concentração em toxicidade equivalente (TEQ). Esse termo é obtido através da multiplicação da concentração do composto,

no limite de quantificação, pelo valor do seu fator de toxicidade equivalente (TEF). Esse parâmetro é relativo e compara a toxicidade dos vários congêneres com o 2,3,7,9-TCDD, considerado como padrão (TEF = 1), devido sua alta toxicidade, seguido pelo 2,3,7,8-TCDF com TEF de 0,1. Esses valores de TEF são utilizados rotineiramente pela NATO/CCMS (1988 a, b).

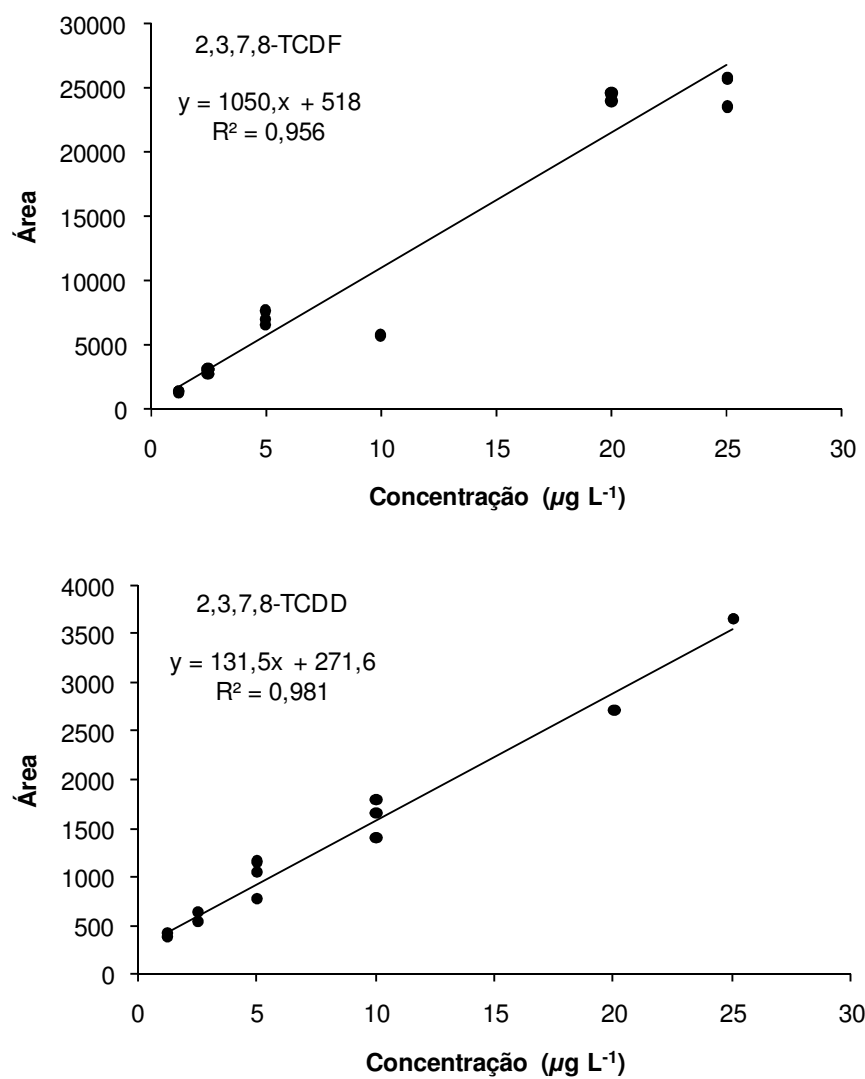
Para a determinação do limite de quantificação, antes da ESL-PBT, o lodo de esgoto foi submetido ao preparo descrito no item 2.2.2.2 deste estudo. O extrato obtido da ESL-PBT foi concentrado sob atmosfera de nitrogênio e ressuspendido na fase extratora.

Nessas condições, foi possível chegar ao limite de quantificação de $1,6 \text{ ng kg}^{-1} \text{ TEQ}$ para o 2,3,7,8-TCDF correspondendo a $1,25 \mu\text{g L}^{-1}$ no extrato. E para o 2,3,7,8-TCDD, o limite de quantificação foi de $8 \text{ ng kg}^{-1} \text{ TEQ}$ correspondendo a $0,625 \mu\text{g L}^{-1}$ no extrato (FIG. 13 e 14). Esses valores estão acima dos estabelecidos pela US EPA, porém abaixo dos definidos pelas outras agências internacionais.

2.2.3.3 Linearidade de resposta do método

A linearidade da resposta do detector foi avaliada utilizando seis níveis de concentração, incluindo o limite de quantificação e a concentração utilizada na otimização do método. As concentrações foram igualmente espaçadas na faixa avaliada. Replicatas de cada ponto de calibração forneceram informações sobre a variabilidade inerente das medidas das respostas (erro puro). Os dados de calibração foram obtidos por regressão linear e os coeficientes de determinação (R^2) foram superiores a 0,95 (FIG. 15).

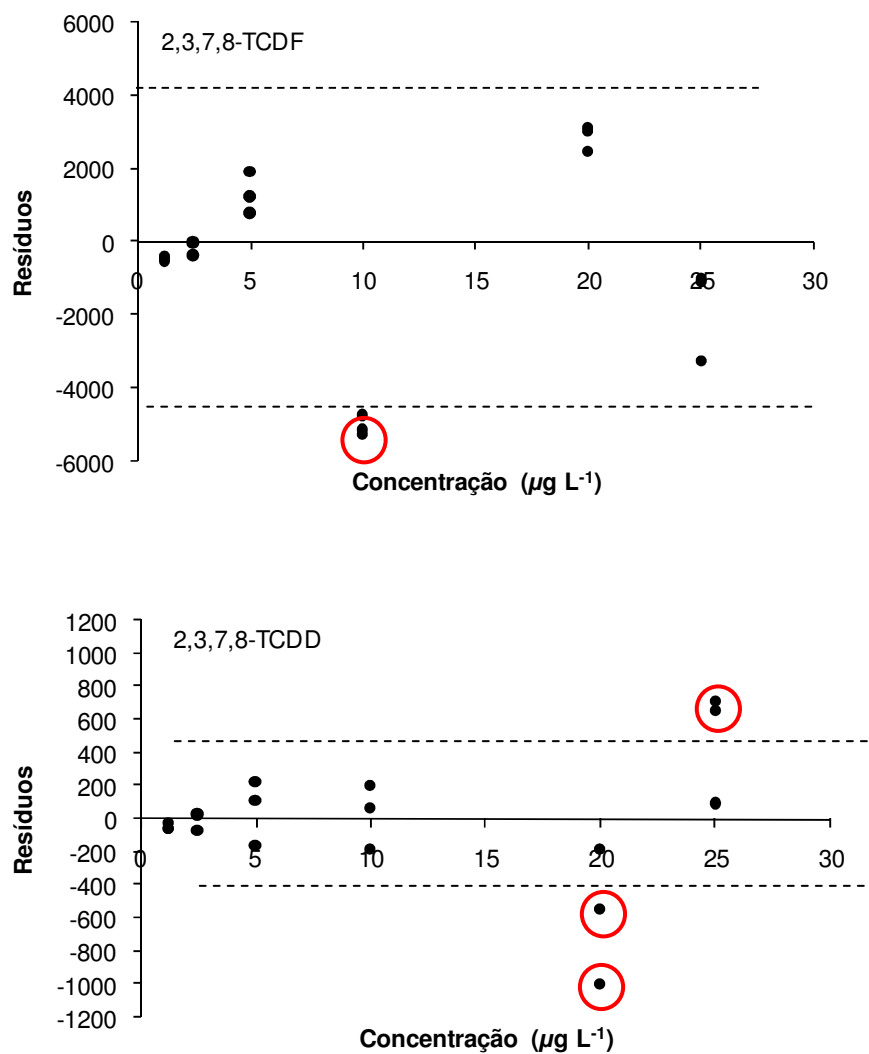
Figura 15 - Representação das curvas de calibração obtidas na avaliação da linearidade para o 2,3,7,8-TCDF e o 2,3,7,8-TCDD em extrato de lodo de esgoto fortificado, na faixa de concentração entre 1,25 a 25 $\mu\text{g L}^{-1}$, com respectivas equações e coeficientes de determinação (R^2)



Fonte: Elaborada pela autora.

Para avaliar a linearidade considerou-se o Método dos Mínimos Quadrados Ordinários (MMQO). Os valores dispersos foram confirmados pelo teste de resíduos de Jackknife, com número máximo de valores extremos removidos de 22,2% das 18 replicatas (GRAF. 1). O diagnóstico desses pontos permitiu tratar aqueles que afetavam claramente o ajuste do modelo.

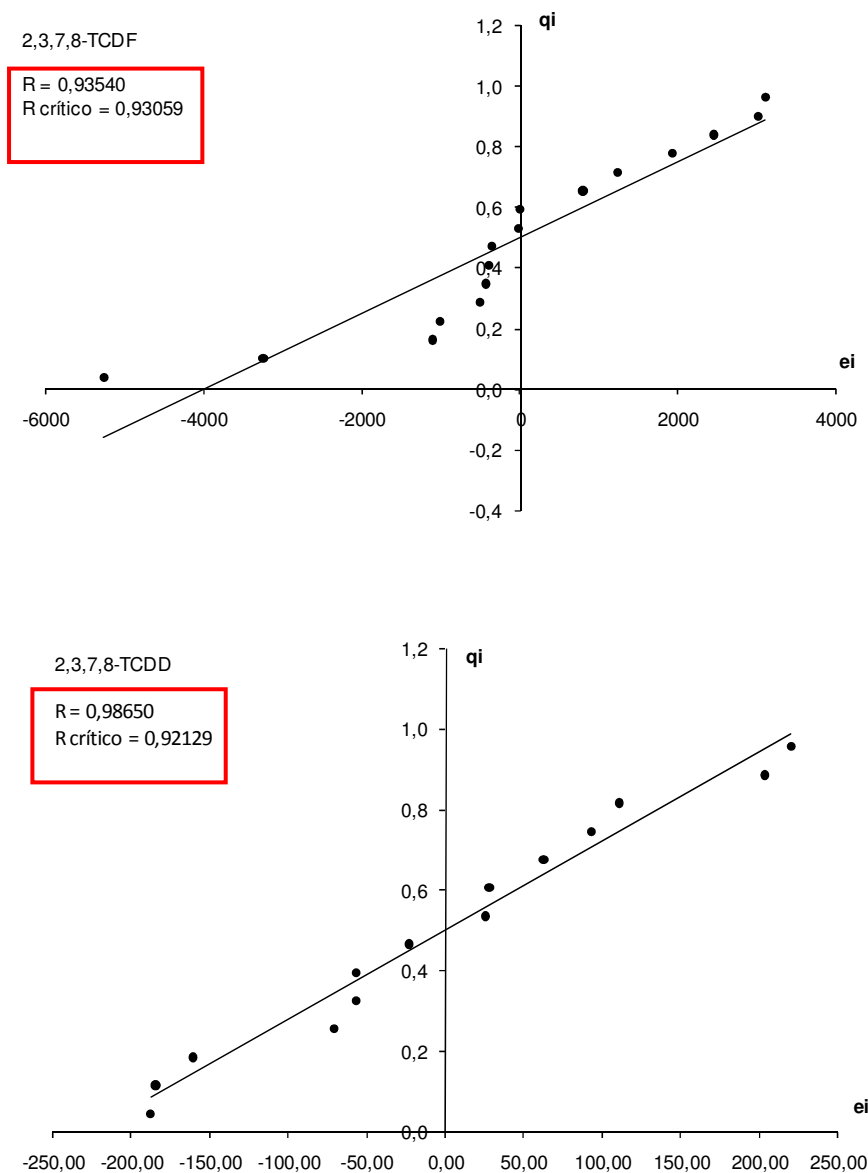
Gráfico 1 – Representação dos gráficos exploratórios dos resíduos da regressão das curvas de 2,3,7,8-TCDF e de 2,3,7,8-TCDD em extrato de lodo de esgoto fortificado, após exclusão dos valores extremos diagnosticados pelo teste de resíduos padronizados Jackknife, com $\alpha = 0,05$. e_i = resíduo da regressão, $-\dots-\dots = \pm t_{1-\alpha/2; n-2} S_{res}$, α = significância



Fonte: Elaborada pela autora.

Foi verificada uma distribuição normal dos resíduos de regressão pelo teste de Ryan-Joiner (GRAF. 2), com coeficientes de correlação calculados superiores aos valores críticos e desvio de normalidade não significativo para as curvas de 2,3,7,8-TCDF e de 2,3,7,8-TCDD.

Gráfico 2 – Representação dos gráficos de probabilidade normal das curvas de 2,3,7,8-TCDF e de 2,3,7,8-TCDD em extrato de lodo de esgoto fortificado. R: coeficiente de correlação de Ryan-Joiner. Rcrítico: valor crítico estabelecido, α = significância, e_i = resíduo da regressão, q_i = valor normal esperado



Fonte: Elaborada pela autora.

A homocedasticidade dos resíduos foi confirmada pela estatística t de Levene. A estatística de Levene t_L de 0,839 e 0,783 ficou inferior ao t crítico= 2,10, respectivamente para o 2,3,7,8-TCDF e o 2,3,7,8-TCDD, demonstrando a distribuição homogênea dos resíduos.

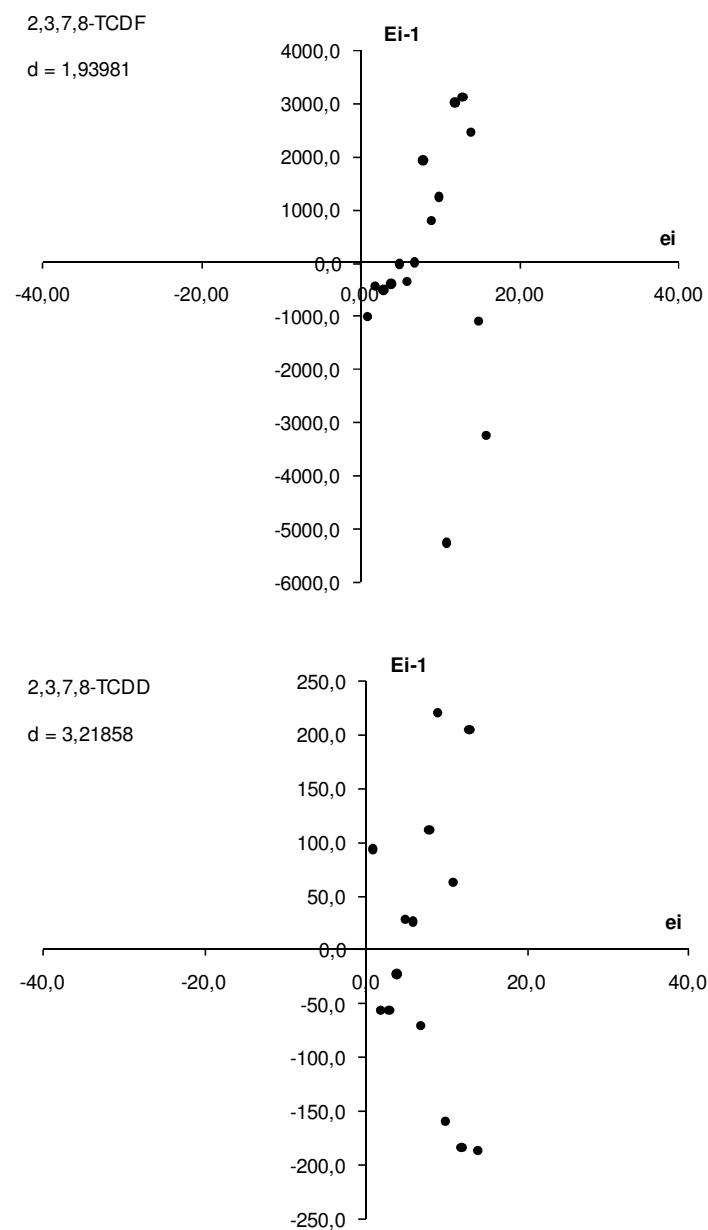
A independência dos resíduos da regressão foi evidenciada pelo teste de Durbin-Watson, que apresentou limites inferiores (d_L) e superiores (d_U) menores que a estatística d , ao nível de significância de $\alpha = 0,05$, revelando que não houve autocorrelação (TAB. 4), entretanto não foi observado perfil de distribuição homogênea dos pontos nos quatro quadrantes dos gráficos (GRAF. 3).

Tabela 4 – Representação da independência dos resíduos de regressão das curvas analíticas de 2,3,7,8-TCDD e 2,3,7,8-TCDF teste de Durbin-Watson

COMPOSTOS	Estatística		
	D	D_L	d_U
2,3,7,8-TCDD	3,21858	1,04573	1,42484
2,3,7,8-TCDF	1,93981	1,1057	1,37009

Legenda: d = estatística de Durbin-Watson; d_L = limite inferior; d_U = limite superior. Significância $\alpha = 0,05$.

Gráfico 3 – Representação da independência dos resíduos de regressão com distribuição dos pontos para o 2,3,7,8-TCDF e o 2,3,7,8-TCDD



Fonte: Elaborada pela autora.

Notas: d = estatística de Durbin-Watson, e_i = resíduo da regressão

Foi observada alta significância da regressão ($\alpha = 0,001$) para os dois compostos (TAB. 5). A confirmação das três premissas (normalidade, homoscedasticidade e independência) indicou adequação do uso do MMQO, sem ponderações, para estimativa dos parâmetros de regressão.

Tabela 5 – Estatística da análise de variância da regressão para as curvas de 2,3,7,8-TCDD e 2,3,7,8-TCDF analisadas

COMPOSTOS	Estatística	
	F	$F_{crítico}$
2,3,7,8-TCDD	$6,43 \times 10^2$	$8,59 \times 10^{-12}$
2,3,7,8-TCDF	$3,09 \times 10^2$	$6,05 \times 10^{-11}$

Notas: F = estatística do teste; $F_{crítico}$ = valor de F tabelado.

2.2.3.4 Exatidão e precisão

A figura de mérito exatidão avalia a proximidade dos valores encontrados com o valor verdadeiro (real). A exatidão foi avaliada utilizando ensaios de recuperação nas concentrações 1,25; 2,5 e 5 $\mu\text{g L}^{-1}$. As porcentagens de recuperação variaram entre 78 e 109% (TAB. 6), atendendo às recomendações da IUPAC de 70 a 120% (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002). O estudo de precisão avalia a concordância entre os resultados. A precisão foi avaliada sob condições de repetibilidade na concentração 2,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ e os resultados considerados satisfatórios, pois o desvio padrão relativo (DPR) foi inferior a 20 % (TAB. 6). Vale ressaltar que o lodo de esgoto é uma matriz complexa, pois possui uma composição química diversificada e que pode variar de acordo com a origem da amostra, podendo comprometer a exatidão e precisão do método.

Tabela 6 – Exatidão e precisão do método para determinação do 2,3,7,8-TCDF e 2,3,7,8-TCDD em extratos de lodo de esgoto fortificado

Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação (%) (média $\pm$ DPR)	
	2,3,7,8-TCDF	2,3,7,8-TCDD
1,25 ^a	97 $\pm$ 5	103 $\pm$ 5
2,5 ^b	99 $\pm$ 5	78 $\pm$ 14
5 ^a	109 $\pm$ 8	82 $\pm$ 19

Notas: ^a média de 3 repetições. ^b média de 7 repetições.

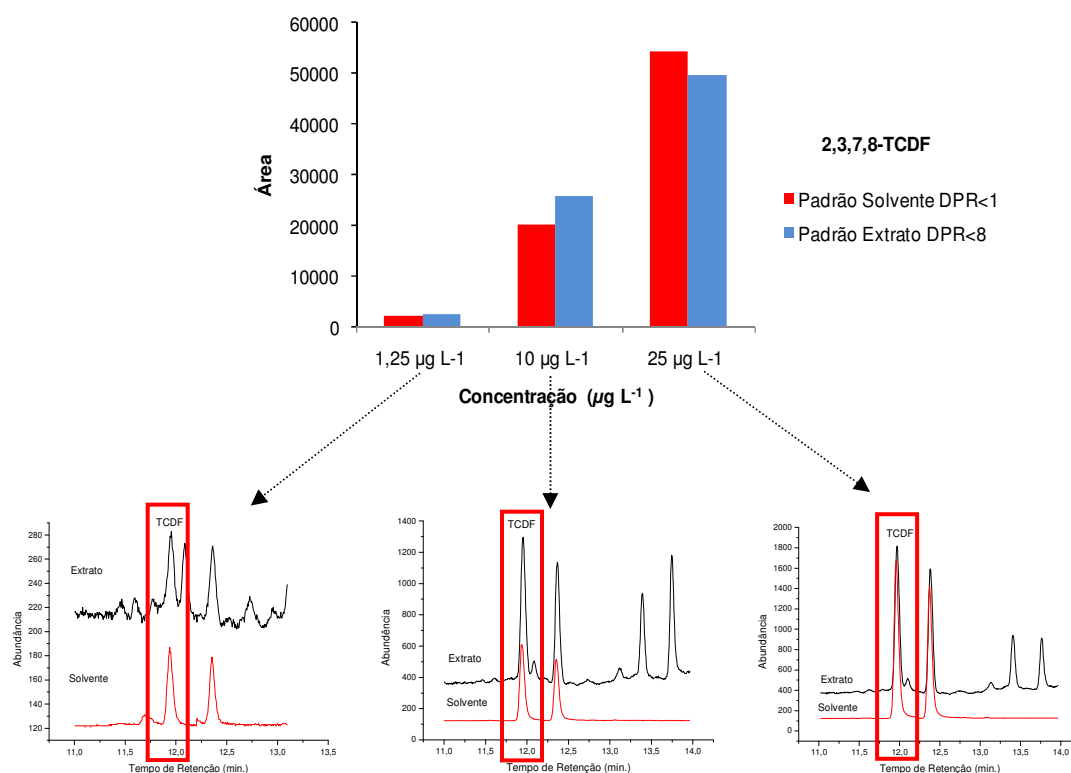
2.2.3.5 Estudo do Efeito de Matriz

Os dois compostos estudados podem adsorver no injetor, coluna e/ou detector do sistema cromatográfico, apresentando respostas diferentes quando a solução padrão é preparada em solvente puro ou em extrato da matriz. Esse fenômeno é denominado efeito de matriz ou alteração da resposta cromatográfica, induzido pelos componentes da matriz (ERNEY *et al.*, 1993; PINHO *et al.*, 2009; PINHO *et al.*, 2010). A confirmação do efeito de matriz foi realizada pelo teste Duncan (5 % probabilidade). Na concentração de 1,25 $\mu\text{g L}^{-1}$ não houve diferenças estatísticas nas áreas dos padrões no solvente (hexano) e no extrato da matriz (lodo de esgoto) (FIG. 16 e 17).

Nas concentrações de 10 e de 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ as médias foram consideradas estatisticamente diferentes ($p < 0,05$), confirmando que o efeito de matriz foi detectado nas análises por CG-EM para os dois compostos, apresentando diferenças significativas nas respostas cromatográficas em hexano e no extrato de lodo de esgoto. Na concentração de 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ houve uma superestimação dos resultados analíticos, o que caracterizou um efeito de matriz positivo. Já na concentração de 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ pode-se observar uma redução das áreas correspondentes dos analitos no extrato com relação ao

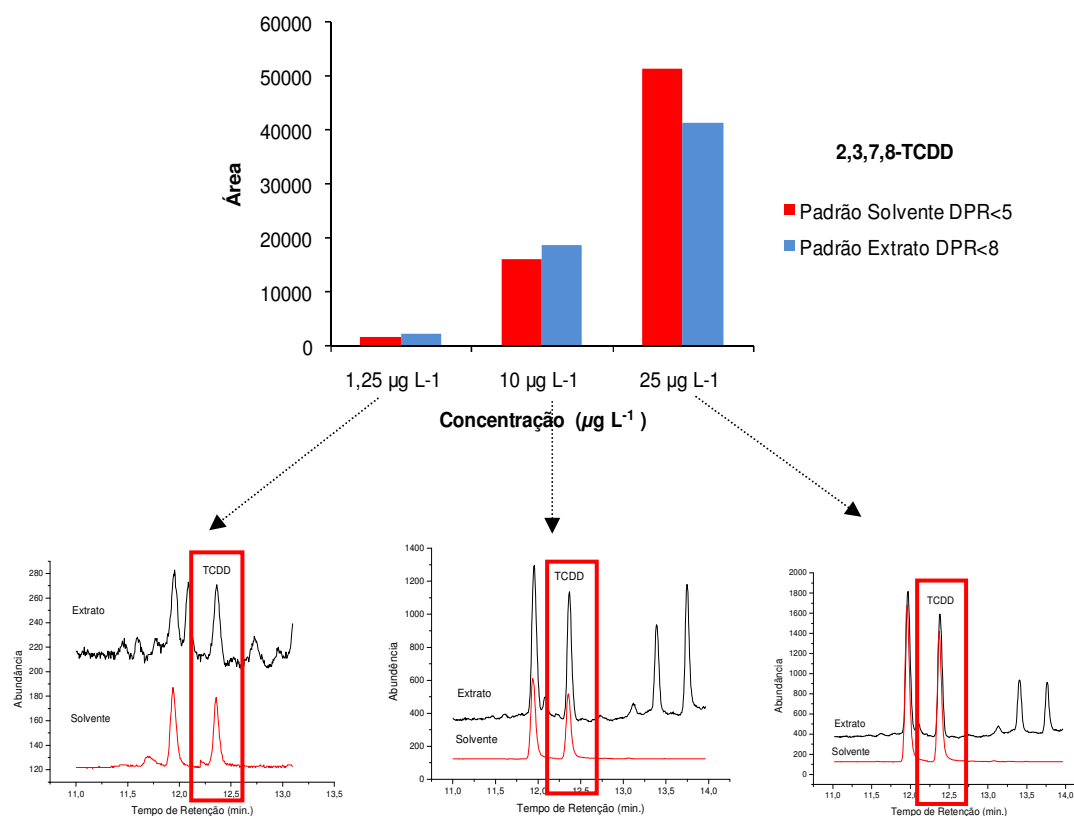
solvente com o aumento da concentração, caracterizando um efeito de matriz negativo (FIG. 16 e 17).

Figura 16 – Representação dos gráficos do efeito de matriz nas concentrações 1,25; 10 e 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ em hexano (■) e no extrato da matriz (■) fortificados com o 2,3,7,8-TCDF, com os cromatogramas de comparação dessas análises nas três concentrações estudadas



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 17 – Representação dos gráficos do efeito de matriz nas concentrações 1,25; 10 e 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ em hexano (■) e no extrato da matriz (■) fortificados com o 2,3,7,8-TCDD, com os cromatogramas de comparação dessas análises nas três concentrações estudadas



Fonte: Elaborada pela autora.

Os resultados mostraram que as respostas cromatográficas dos dois contaminantes em solvente (hexano) e em extrato de lodo de esgoto são diferentes, o que revela um efeito de matriz. Entretanto, a alteração na resposta cromatográfica para esses dois compostos não se adequou aos modelos de efeito de matriz já descritos na literatura (HAJSLVÁ; ZROSTLIKOVÁ, 2003; PINHO, 2007; PINHO *et al.*, 2010). Para comprovar

esse resultado, experimento foi realizado novamente e os resultados obtidos foram similares, revelando o mesmo comportamento de efeito de matriz. Por isso, essa etapa do trabalho poderá ser realizada em estudos posteriores visando compreender melhor o perfil do efeito de matriz para esses compostos.

CAPÍTULO 3 – OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DA TÉCNICA DE ESL-PBT DE DIBENZO-*P*-DIOXINA E DIBENZOFURANO POLICLORADOS EM SOLO

3.1 MATERIAL E MÉTODOS

3.1.1 Materiais

O padrão de 2,3,7,8-tetraclorodibenzenofurano (2,3,7,8-TCDF) em grau analítico foi adquirido da Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) e o padrão e 2,3,7,8-tetraclorodibenzeno-*p*-dioxina (2,3,7,8-TCDD) em grau analítico foi adquirido da SUPELCO (Solutions within, USA). Os solventes grau HPLC foram adquiridos: hexano da Sigma-Aldrich (St. Louis, USA), acetonitrila da J.T.Baker (USA) e acetato de etila da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil). O sulfato de sódio anidro foi obtido da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil) com grau de pureza superior a 99%.

3.1.2 Instrumentação

Os instrumentos utilizados foram vórtex da Phoenix (São Paulo, Brasil); centrífuga da Kindly (São Paulo, Brasil); estufa da Ethik Technology (São Paulo, Brasil) e balança analítica da Shimadzu (São Paulo, Brasil).

3.1.3 Análises cromatográficas

A identificação e quantificação dos extratos de solo fortificado com os dois contaminantes foram realizadas em um cromatógrafo a gás da Agilent Technologies (GC 7890A) acoplado a um espectrômetro de massas (MS 5975C). Para promover a separação entre os picos dos compostos de interesse no menor tempo de análise, foram estabelecidas as condições ideais de análise, como a temperatura do forno, do injetor e do detector, vazão do gás de arraste e escolha do tipo de coluna cromatográfica. Seguem as condições analíticas otimizadas: coluna cromatográfica capilar DB-5 MS

(Agilent Technologies) com fase estacionária 5% difenil e 95% dimetilpolisiloxano (30 m comprimento x 0,32 mm diâmetro interno x 0,25 µm espessura do filme interno). A programação de temperatura do forno iniciou em 140 °C, com taxa de aquecimento de 40 °C min⁻¹ até 200 °C, seguida da taxa de aquecimento de 4 °C min⁻¹ até 254 °C, em um tempo total de análise de 15 minutos. O Hélio (99,9999% de pureza) foi utilizado como gás de arraste a uma taxa de 0,8 mL min⁻¹. A temperatura do injetor *split / splitless* foi mantida em 280 °C. O volume da amostra injetado foi de 1 µL, no modo de injeção sem divisão de fluxo (*splitless*), utilizando autoinjeter Combi PAL. O espectrômetro de massas foi operado no modo de ionização por impacto de elétrons a 70 eV. A interface foi mantida a 280 °C e a fonte de íons a 230 °C. O controle do instrumento e a aquisição de dados foram feitos com o software ChemStation (E.02.02.1431 copyright © 1989-2011) da Agilent Technology.

As análises foram realizadas no modo monitoramento de íons seletivo (SIM) e a aquisição de dados dividida em dois grupos de íons. No grupo 1 consideraram-se os íons 303,9; 305,9 e 307,9 *m/z* e, no grupo 2, os íons 319,9; 321,9 e 323,9 *m/z*.

3.1.4 Preparo de soluções padrão

As soluções empregadas neste trabalho foram preparadas pela diluição das soluções dos padrões de 2,3,7,8-TCDF (50 mg L⁻¹ da Sigma-Aldrich) e de 2,3,7,8-TCDD (10 mg L⁻¹ da SUPELCO), em hexano grau CLAE-UV (Sigma-Aldrich) nas seguintes concentrações: 12 mg L⁻¹ (solução estoque) e 2 mg L⁻¹ (solução de trabalho) para o 2,3,7,8-TCDF e de 2 mg L⁻¹ (solução de trabalho) para o 2,3,7,8-TCDD. Em seguida, as soluções foram armazenadas em frasco âmbar à - 18 °C.

3.1.5 Preparo de amostras de solo fortificadas

As amostras de solo isentas de 2,3,7,8-TCDF e 2,3,7,8-TCDD foram coletadas em Montes Claros – MG, Brasil com cavadeira, a uma profundidade de 5 a 15 cm em uma área que apresenta as seguintes

coordenadas geográficas: 16° 40.721 'S e 43° 52.841 'W. Em laboratório, as amostras de solo foram submetidas ao teste de umidade por gravimetria, em que 2,0000 g de amostra (cinco repetições) foram colocadas em estufa a 100°C, sendo realizada a medição da massa a cada hora até obter massa constante.

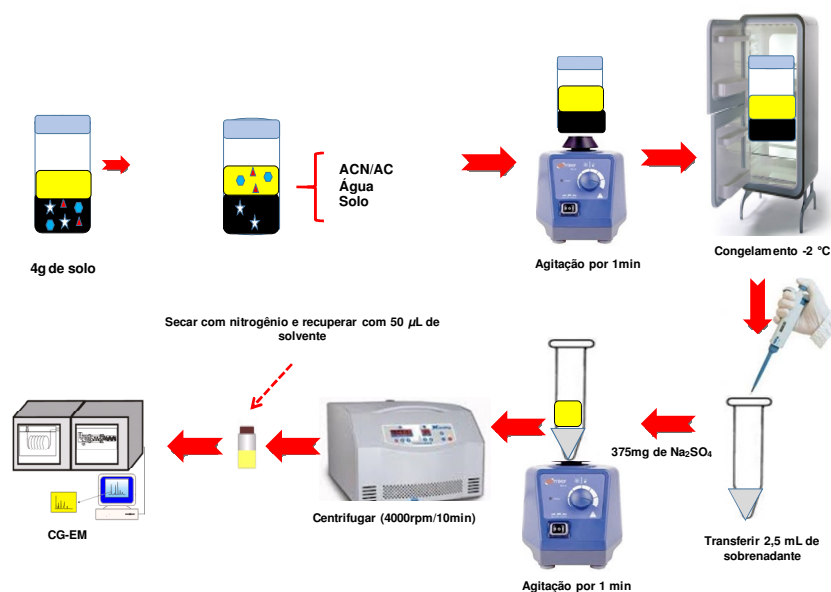
Amostras de solo foram trituradas e alíquotas de 4,0000 g fortificadas com 100,0 µL de soluções padrão de 2,3,7,8-TCDF e de 2,3,7,8-TCDD em concentrações de 2 mg L⁻¹. As amostras fortificadas (4 µg kg⁻¹) foram deixadas por três horas em frasco aberto para evaporação do solvente.

3.1.6 ESL-PBT

Os ensaios da extração sólido-líquido e purificação em baixa temperatura para análise dos dois contaminantes (2,3,7,8-TCDF e 2,3,7,8-TCDD) em amostras de solo foram adaptados da técnica descrita para extração de deltametrina e cipermetrina em leite (GOULART, 2004), para extração de bifenilas policloradas (MAIA, 2014) e Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) (BARBOSA *et al.*, 2014) em lodo de esgoto.

Em frasco de vidro transparente de 22 mL de capacidade, contendo 4,0000 g de solo fortificado, foram adicionados 3,8 mL de água destilada, pré-determinada no teste de umidade e, 8,0 mL de mistura extratora otimizada (6,50 mL de acetonitrila: 1,50 mL de acetato de etila). Em seguida, o sistema foi homogeneizado em vórtex por um minuto. Posteriormente, a mistura foi resfriada em freezer a -20 °C por uma hora. Após a separação das fases pelo congelamento da fase aquosa e do solo, o líquido sobrenadante (2,5 mL) foi transferido para tubo de polipropileno de 15 mL, contendo 375 mg de sulfato de sódio anidro. Em seguida, o sistema foi homogeneizado em vórtex por um minuto e centrifugado a 4000 rpm por 10 minutos. O extrato foi concentrado sob atmosfera de nitrogênio (N₂) e ressuspenso em 50 µL de acetonitrila: acetato de etila, como ilustrado na FIG 18. Após a extração, determinaram-se as concentrações dos analitos por cromatógrafo a gás acoplado à espectrometria de massas (CG-EM).

Figura 18 – Representação das etapas da extração sólido-líquido com purificação em baixa temperatura (ESL-PBT) de 2,3,7,8-TCDF e de 2,3,7,8-TCDD em solo



Fonte: Elaborada pela autora.

3.1.7 Validação do método analítico

Para assegurar a confiabilidade do método analítico desenvolvido, esse foi submetido a uma validação. As figuras de mérito consideradas neste trabalho foram: seletividade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), linearidade, exatidão, precisão e efeito de matriz.

3.1.7.1 Seletividade

Avaliou-se a seletividade do método comparando cromatogramas dos extratos obtidos após extração dos componentes da matriz (solo) isenta dos contaminantes (2,3,7,8-TCDF e 2,3,7,8-TCDD), com

os cromatogramas dos extratos das amostras de solo fortificadas na concentração de $5 \mu\text{g L}^{-1}$, preparadas e analisadas conforme as condições otimizadas. Esse procedimento foi realizado em seis replicatas independentes.

3.1.7.2 Limite de detecção e limite de quantificação

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram determinados a partir da fortificação de amostras de solo com o 2,3,7,8-TCDF e o 2,3,7,8-TCDD nas menores concentrações aceitáveis e submetendo a ESL-PBT nas condições otimizadas com análise por CG-EM. Consideraram-se os limites como três e dez vezes o sinal da linha de base obtidos nas análises para o LD e LQ, respectivamente (ICH, 1995).

3.1.7.3 Linearidade de resposta do método

A linearidade de resposta do detector foi verificada pela curva analítica preparada em extrato da matriz em cinco níveis de concentração e obtida na faixa de concentração entre $1,25$ a $20 \mu\text{g L}^{-1}$, que corresponde a 16 ng kg^{-1} a 250 ng kg^{-1} no solo, em três replicatas independentes para cada nível. Aplicou-se o método de regressão linear dos mínimos quadrados aos dados experimentais para estimar os parâmetros de regressão. Os valores dispersos foram tratados e confirmados pelo teste de Jackknife com exclusão máxima de 22,2% dos dados. A análise de regressão foi avaliada pelos parâmetros de normalidade (teste de Ryan & Joiner), homocedasticidade (teste de Levene - modificado), independência de resíduos (teste de Durbin & Watson).

3.1.7.4 Exatidão e precisão

Entre as principais maneiras de avaliar a exatidão de um método, pode-se recorrer aos ensaios de recuperação, comparação entre métodos e utilização de material de referência certificado (THOMPSON;

ELLISON; WOOD, 2002). Neste trabalho, a exatidão foi avaliada utilizando ensaios de recuperação em três níveis de concentrações (1,25; 2,5 e 5 $\mu\text{g L}^{-1}$), correspondentes a 16; 31 e 62 ng kg^{-1} de solo. Essas amostras em triplicatas foram submetidas ao método de ESL-PBT e analisadas por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. Para cada nível, os valores de recuperação foram considerados aceitáveis entre 70 e 120% (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002).

A precisão do método de ESL-PBT e a análise por CG-EM foram verificadas sob condições de repetitividade. Essa repetitividade do método de extração dos dois contaminantes (2,3,7,8-TCDF e 2,3,7,8-TCDD) em amostras de solo foi determinada, conforme sugerido por Thompson; Ellison e Wood (2002), com a realização de sete extrações idênticas dos dois contaminantes na concentração de 2,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ (correspondendo a 31 ng Kg^{-1} no solo), o que determinou o desvio padrão relativo (DPR). O critério de aceitabilidade para o DPR foi menor que 20 % (RIBANI *et al.*, 2004).

3.1.7.5 Estudo do efeito de matriz

A variação da resposta do detector para os dois contaminantes (2,3,7,8-TCDF e 2,3,7,8-TCDD), associada ao efeito de matriz, foi avaliada nas concentrações de 1,25; 10 e 25 $\mu\text{g L}^{-1}$. Para isso, realizou-se a comparação das áreas cromatográficas de injeções de soluções padrão desses contaminantes preparados em hexano com as áreas cromatográficas de injeções de extratos de solo fortificados com os contaminantes, determinando também o desvio padrão relativo (DPR). O experimento foi realizado em triplicata e a confirmação do efeito de matriz pelo teste Duncan (5 % probabilidade).

3.1.8 Amostras reais

O método validado foi aplicado para monitoramento de 2,3,7,8-TCDF e de 2,3,7,8-TCDD em amostras de solo tratado com lodo de esgoto, coletadas no Instituto de Ciências Agrárias (ICA) da Universidade Federal de

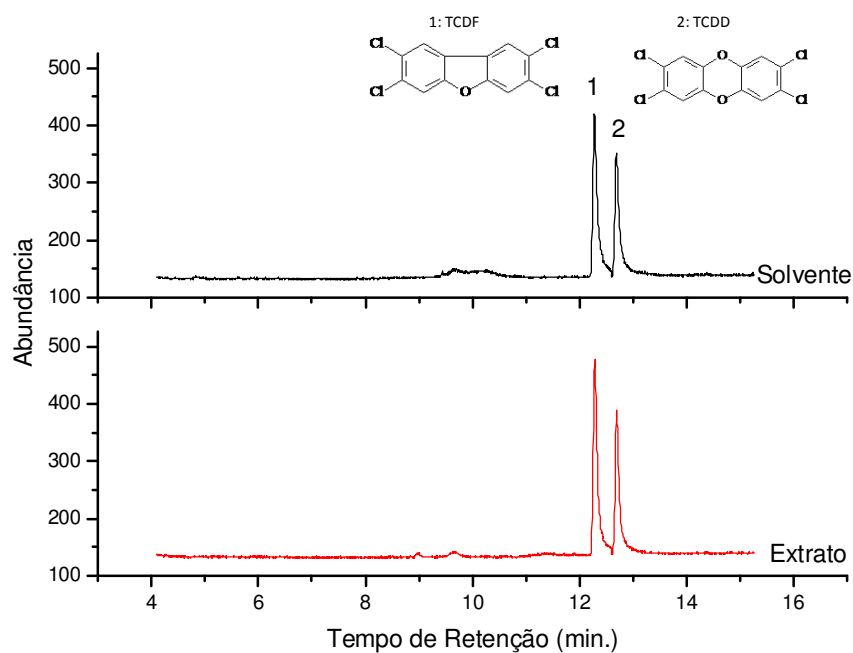
Minas Gerais (UFMG), situado no município de Montes Claros - MG, cujas coordenadas geográficas são 16º 41' S e 43º 50' W e altitude de 646,29 m. As amostras foram de experimentos de cultivo do milho (*Zea mays*), sendo utilizado o híbrido Dekalb 390, de ciclo precoce (115 dias), com alta resistência ao acabamento e grãos semiduros, cuja demanda em adubação é: 160 kg ha⁻¹ de Nitrogênio (N), 120 kg ha⁻¹ de P₂O₅ e 90 kg ha⁻¹ de K₂O. De acordo com essa demanda e a concentração de N disponível, para os diferentes lodos de esgoto, os tratamentos, foram: – Adubação com lodo de esgoto solarizado, parcialmente desidratado em centrífuga e secado ao sol (lodo contendo 10,59 kg t⁻¹ de nitrogênio disponível, o que proporcionou dose de 15,11 t ha⁻¹); – Adubação com lodo de esgoto seco a 350 °C, por 30 minutos (lodo contendo 6,34 kg t⁻¹ de nitrogênio disponível, o que proporcionou dose de 25,25 t ha⁻¹). A demanda de adubação esta relacionada com a concentração de nitrogênio disponível no lodo de esgoto de acordo com a resolução nº 375 do CONAMA (2006).

3.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.2.1 Análise cromatográfica

A condição cromatográfica utilizada para a determinação e quantificação de 2,3,7,8-TCDF e de 2,3,7,8-TCDD em lodo de esgoto também foi adequada para analisar esses compostos no solo. Os cromatogramas obtidos em hexano e em extrato de solo fortificado apresentaram boa resolução dos sinais e sem interferentes nos tempos de retenção dos compostos analisados (FIG. 19).

Figura 19 - Representação dos cromatogramas obtidos no modo MIS do 2,3,7,8-TCDF e do 2,3,7,8-TCDD em hexano ($10 \mu\text{g L}^{-1}$) e no extrato de solo fortificado ($10 \mu\text{g L}^{-1}$)



Fonte: Elaborada pela autora.

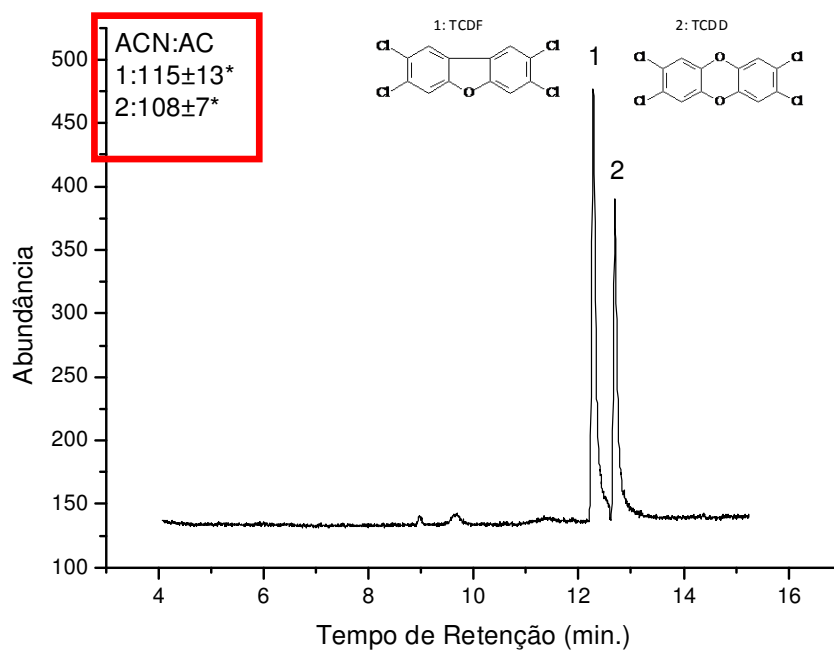
Pelas características dos cromatogramas da FIG. 19, observou-se que as condições de análise cromatográfica empregadas, como a programação de temperatura, coluna cromatográfica, fluxo do gás de arraste, possibilitaram uma boa separação dos compostos avaliados. Comparando os cromatogramas da amostra fortificada com o da solução padrão dos analitos, pode-se observar que os cromatogramas são muito semelhantes, inclusive na intensidade dos sinais.

3.2.2 ESL-PBT

O primeiro passo para a extração sólido-líquido com purificação em baixa temperatura (ESL-PBT) é definir o volume de água a ser adicionado à amostra de solo. Estudos anteriores mostraram que a proporção ótima de solvente orgânico: água é de 8 mL: 4 mL (MARTHE *et al.*, 2010; VIEIRA; NEVES; QUEIROZ, 2007). Por isso, determinou-se que o teor de água presente no solo é de 4 % em massa. Esse valor corresponde a 0,2 mL de água em 4 g de amostra de solo. Dessa forma, para completar o volume final de água, foram adicionados 3,8 mL de água à amostra de solo.

Em seguida, verificou-se se a fase extratora (6,50 mL de acetonitrila / 1,50 mL de acetato de etila) empregada para a extração de 2,3,7,8-TCDF e do 2,3,7,8-TCDD em lodo de esgoto poderia ser empregada para as amostras de solo. Os resultados mostraram que essa fase extratora apresentou porcentagens de extração superiores a 100% para os dois analitos, com valores de DPR inferiores a 13% (FIG. 20).

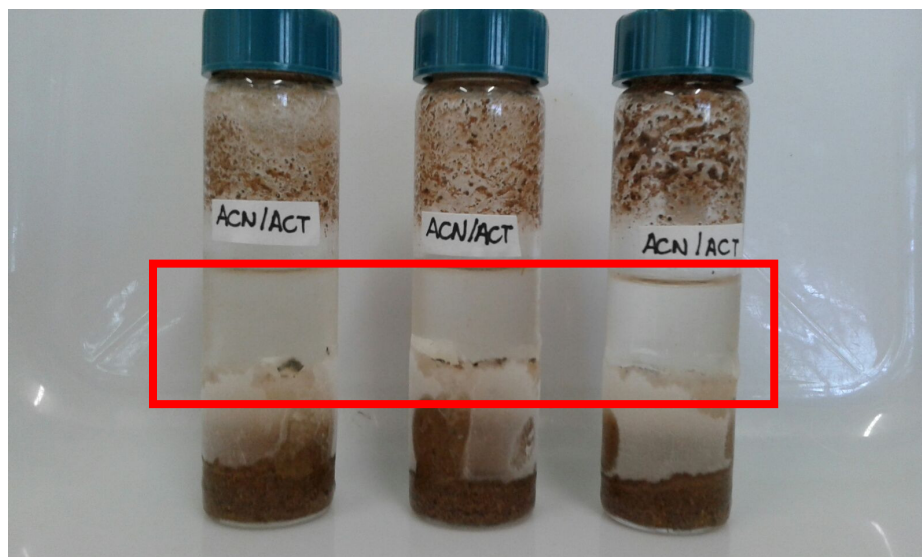
Figura 20 – Representação dos cromatogramas no modo MIS do 2,3,7,8-TCDF e do 2,3,7,8-TCDD no extrato de solo fortificado na concentração de $10 \mu\text{g L}^{-1}$, com as fase extratora ACN:AC: acetonitrila / acetato de etila



Fonte: Elaborada pela autora.

Nota: * Recuperação (%) (média ± DPR).

Figura 21 – Representação da foto dos *vials*, contendo os extratos do solo, após congelamento, obtidos utilizando como fase extratora acetonitrila / acetato de etila



Fonte: Elaborada pela autora.

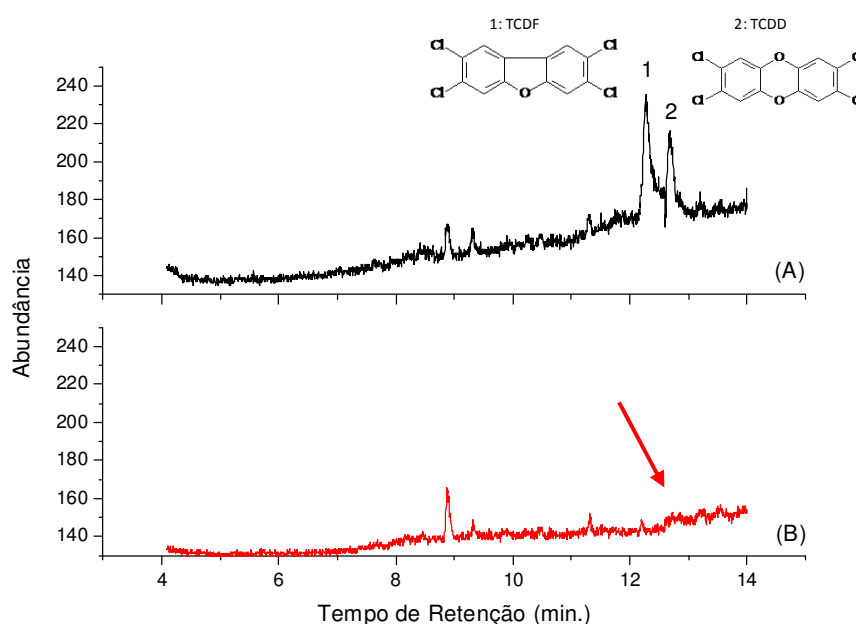
Observou-se que os extratos de solo preparados com esta fase extratora, FIG. 21, resultaram em extratos mais claros que com o lodo de esgoto, indicando a extração de menor número de interferentes. Esses resultados corroboram os encontrados no cromatograma da FIG. 20, pois o cromatograma obtido não apresentou sinais de compostos da matriz solo. Por isso, de forma similar ao lodo de esgoto, esta fase extratora foi definida para extração de 2,3,7,8-TCDF e de 2,3,7,8-TCDD em solo, empregando a ESL-PBT.

3.2.3 Validação

3.2.3.1 Seletividade

A seletividade do método foi confirmada através da comparação dos cromatogramas do extrato de solo fortificado com o 2,3,7,8-TCDF e o 2,3,7,8-TCDD na concentração de $5,0 \mu\text{g L}^{-1}$ e do extrato de solo sem adição desses analitos (FIG. 22).

Figura 22 – Representação dos cromatogramas dos extratos de solo obtidos após a ESL-PBT: (A) fortificado com o 2,3,7,8-TCDF e o 2,3,7,8-TCDD na concentração de $5,0 \mu\text{g L}^{-1}$ e (B) amostra de solo isenta desses analitos (branco)



Fonte: Elaborada pela autora.

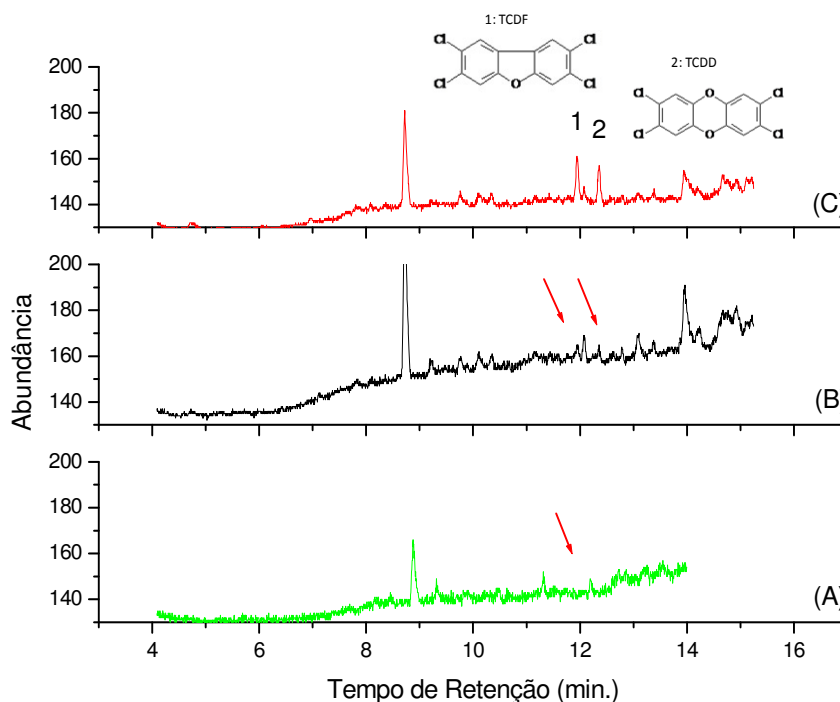
Observou-se a ausência de sinais nos mesmos tempos de retenção do 2,3,7,8-TCDF e do 2,3,7,8-TCDD durante as análises de extratos

de solo isento, desses compostos, demonstrando a seletividade do método proposto.

3.2.3.2 Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção (LD) para métodos cromatográficos representa a menor quantidade do analito estudado, podendo ser diferenciada do ruído do sistema com segurança, entretanto, a detecção não implica que o analito seja quantificável. Já o limite de quantificação (LQ) é a menor quantidade do analito que pode ser quantificada com exatidão (INMETRO, 2003). O limite de detecção foi determinado como a concentração que gerou um sinal três vezes a da relação sinal: ruído de cada composto no cromatograma. Já o limite de quantificação ficou determinado como a concentração que gerou um sinal dez vezes maior do que a relação sinal: ruído como mostrado na FIG. 23.

Figura 23 - Representação dos cromatogramas dos extratos de solo obtidos após a ESL-PBT: (A) isento desses analitos (branco), (B) fortificado com o 2,3,7,8-TCDF e o 2,3,7,8-TCDD na concentração de $0,08 \mu\text{g L}^{-1}$ (LD) e (C) fortificado com o 2,3,7,8-TCDF e o 2,3,7,8-TCDD na concentração de $0,16 \mu\text{g L}^{-1}$ (LQ)



Fonte: Elaborada pela autora.

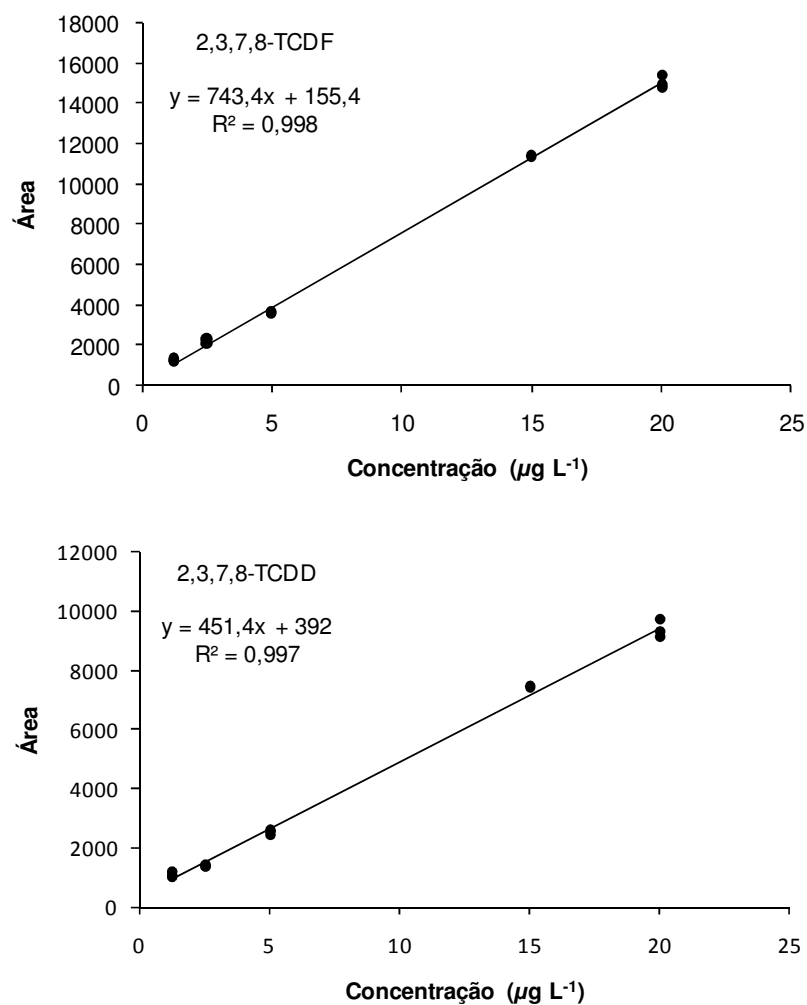
Nessa FIG. 23, observa-se que o limite de detecção para os dois analitos estudados em extratos de solo pode ser estimado em 1 ng kg^{-1} no solo. Já o valor do limite de quantificação obtido em $50 \mu\text{L}$ do extrato para 2,3,7,8-TCDF foi de $0,2 \text{ ng kg}^{-1} \text{ TEQ}$ e em relação ao 2,3,7,8-TCDD foi de $2 \text{ ng kg}^{-1} \text{ TEQ}$ no solo. Tais valores estão acima dos estabelecidos pelas US EPA (1994) que determinou 1 ng kg^{-1} em amostras sólidas. Entretanto, estão abaixo dos valores definidos pela Comunidade Europeia (ECC, 2001) que

estabelece o limite de 5 ng kg^{-1} TEQ de solo. Valores superiores a 100 ng kg^{-1} TEQ são considerados relativamente elevados e reduzem a possibilidade de utilizar o solo devido à contaminação e nível de toxicidade.

3.2.3.3 Linearidade de resposta do método

A linearidade da resposta do detector foi avaliada utilizando cinco níveis de concentração, incluindo a concentração utilizada na otimização do método. As concentrações foram igualmente espaçadas na faixa avaliada. Replicatas de cada ponto de calibração forneceram informações sobre a variabilidade inerente das medidas das respostas (erro puro). Os dados de calibração foram obtidos por regressão linear e os coeficientes de determinação (R^2) ficaram superiores a 0,99 (FIG. 24).

Figura 24 – Representação das curvas de calibração obtidas para o 2,3,7,8-TCDF e o 2,3,7,8-TCDD em extrato de solo, na faixa de concentração entre 1,25 a 20,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, com respectivas equações e coeficientes de determinação (R^2)

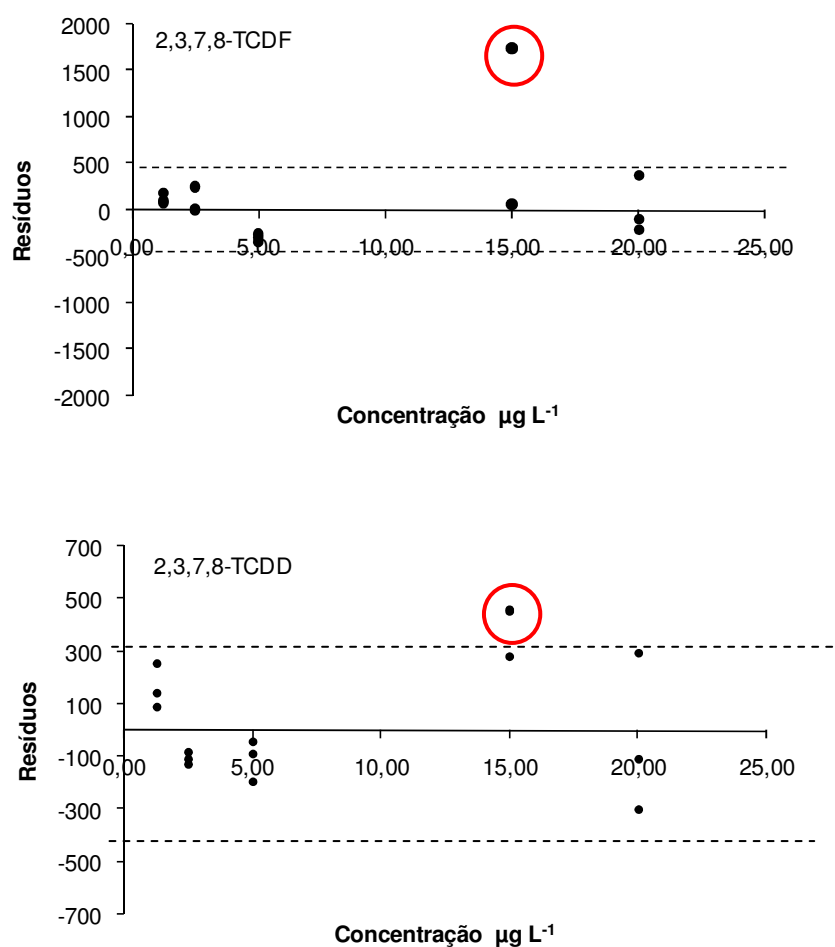


Fonte: Elaborada pela autora.

Avaliou-se a linearidade pelo Método dos Mínimos Quadrados Ordinários (MMQO). Os valores dispersos foram confirmados pelo teste de resíduos de Jackknife, com número máximo de valores extremos removidos de

22,2 % das 15 replicatas (GRAF. 4). O diagnóstico desses pontos permitiu remover aqueles que afetavam claramente o ajuste do modelo.

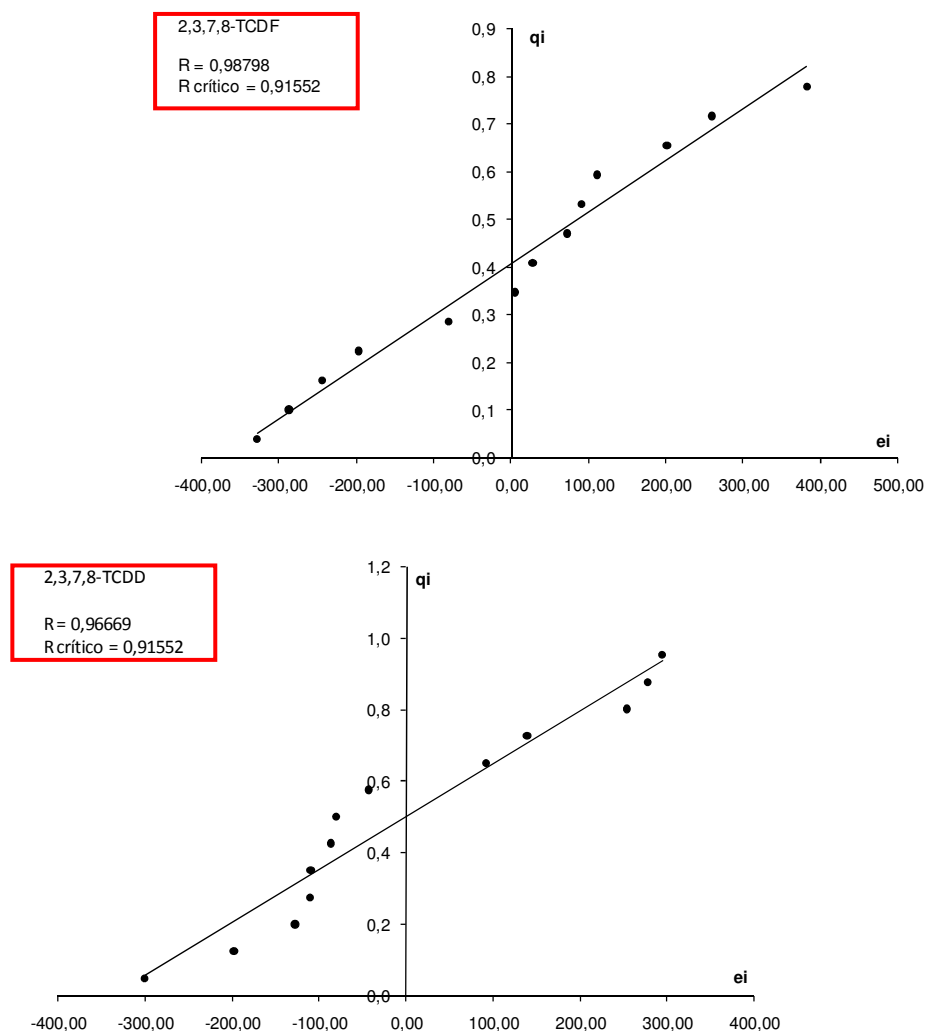
Gráfico 4 - Representação dos gráficos exploratórios dos resíduos da regressão das curvas de 2,3,7,8-TCDF e 2,3,7,8-TCDD em extrato de solo, após exclusão dos valores extremos diagnosticados pelo teste de resíduos padronizados Jackknife, com $\alpha = 0,05$. e_i = resíduo da regressão, $--- = \pm t_{(1-\alpha/2; n-2)} S_{res}$, α = significância



Fonte: Elaborada pela autora.

Verificou-se a distribuição normal dos resíduos de regressão pelo teste de Ryan-Joiner (GRAF. 5), com coeficientes de correlação calculados superiores aos valores críticos e desvio de normalidade não significativo para as curvas de 2,3,7,8-TCDF e de 2,3,7,8-TCDD.

Gráfico 5 - Representação dos gráficos de probabilidade normal das curvas de 2,3,7,8-TCDF e 2,3,7,8-TCDD em extrato de solo. R: coeficiente de correlação de Ryan-Joiner. R crítico: valor crítico estabelecido, α = significância, e_i = resíduo da regressão, q_i = valor normal esperado



Fonte: Elaborada pela autora.

A homocedasticidade dos resíduos foi confirmada pela estatística t de Levene. A estatística de Levene t_L de 0,317 e 0,534 foi inferior ao t crítico = 2,10, respectivamente para 2,3,7,8-TCDF e 2,3,7,8-TCDD, demonstrando a distribuição homogênea dos resíduos.

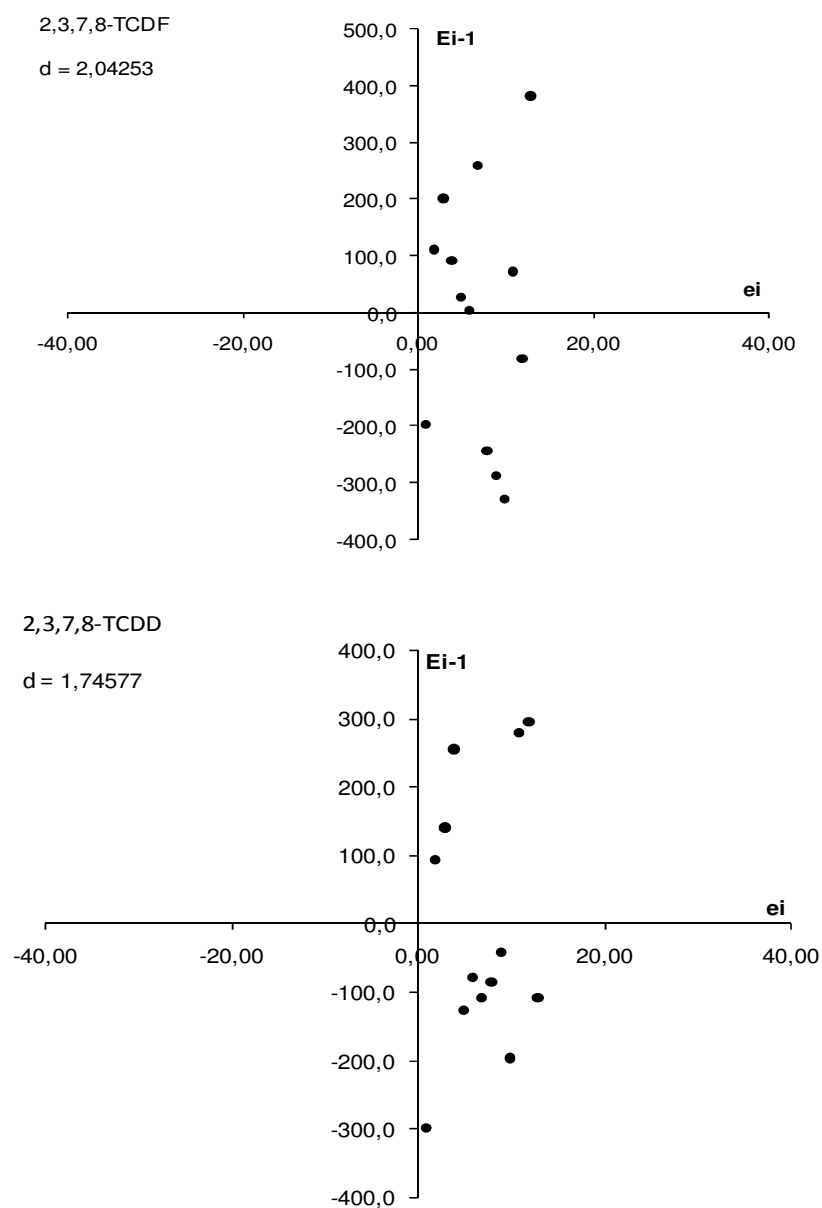
A independência dos resíduos da regressão foi evidenciada pelo teste de Durbin-Watson, que apresentaram limites inferiores (d_L) e superiores (d_U) menores que a estatística d , ao nível de significância de $\alpha = 0,05$, significando que não houve autocorrelação (TAB. 7), entretanto, não foi observado perfil de distribuição homogêneo dos pontos nos quatro quadrantes dos gráficos (GRAF. 6).

Tabela 7 – Representação da independência dos resíduos de regressão das curvas analíticas de 2,3,7,8-TCDD e 2,3,7,8-TCDF teste de Durbin-Watson

COMPOSTOS	Estatística		
	D	D_L	d_U
2,3,7,8-TCDD	1,74577	1,01167	1,33945
2,3,7,8-TCDF	2,04253	1,01167	1,33945

Notas: d = estatística de Durbin-Watson; d_L = limite inferior; d_U = limite superior. Significância $\alpha = 0,05$.

Gráfico 6 – Representação da independência dos resíduos de regressão com distribuição dos pontos para o 2,3,7,8-TCDF e o 2,3,7,8-TCDD.



Fonte: Elaborada pela autora.

Notas: d = estatística de Durbin-Watson, e_i = resíduo da regressão.

Foi observada alta significância da regressão ($\alpha = 0,001$) para os dois compostos (TAB. 8). A confirmação das três premissas (normalidade, homoscedasticidade e independência) indicou adequação do uso do MMQO, sem ponderações, para estimativa dos parâmetros de regressão.

Tabela 8 – Estatística da análise de variância da regressão para as curvas de 2,3,7,8-TCDD e 2,3,7,8-TCDF analisados

COMPOSTOS	Estatística	
	<i>F</i>	<i>F</i> _{crítico}
2,3,7,8-TCDD	$3,73 \times 10^3$	$2,79 \times 10^{-15}$
2,3,7,8-TCDF	$7,77 \times 10^3$	$4,98 \times 10^{-17}$

Notas: *F* = estatística do teste; *F*_{crítico} = valor de *F* tabelado.

3.2.3.4 Exatidão e precisão

A figura de mérito de exatidão avalia a proximidade dos valores encontrados com o valor verdadeiro (real). A exatidão foi avaliada utilizando ensaios de recuperação nas concentrações 1,25; 2,5 e 5 $\mu\text{g L}^{-1}$. As porcentagens de recuperação variaram entre 81 e 99% (TAB. 9), atendendo as recomendações da IUPAC de 70 a 120% (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002). O estudo de precisão avalia a concordância entre os resultados. A precisão foi avaliada sob condições de repetibilidade na concentração 2,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ e os resultados considerados satisfatórios, pois o DPR foi inferior a 12 % (TAB. 9).

Tabela 9 – Exatidão e precisão do método para determinação do 2,3,7,8-TCDF e do 2,3,7,8-TCDD em solo fortificado

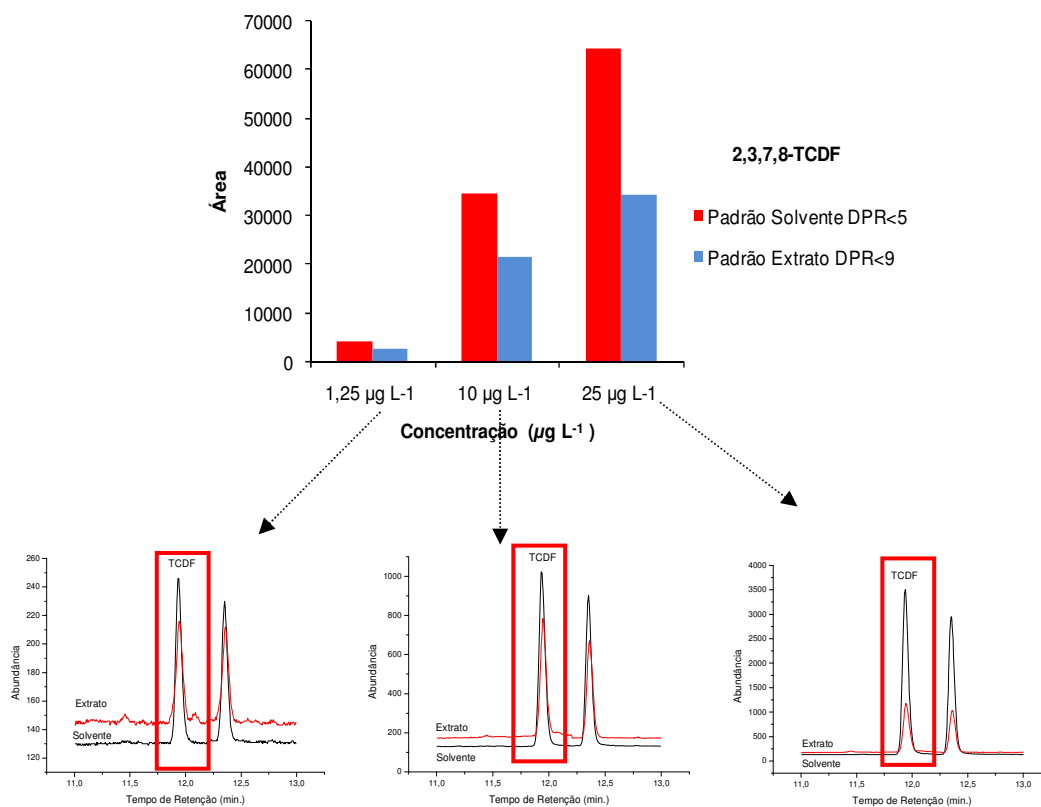
Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação (%) (média±DPR)	
	2,3,7,8-TCDF	2,3,7,8-TCDD
1,25 ^a	97±5	82±7
2,5 ^b	91±11	95±10
5 ^a	96±1	99±3

^a média de 3 repetições. ^b média de 7 repetições

3.2.3.5 Efeito de matriz

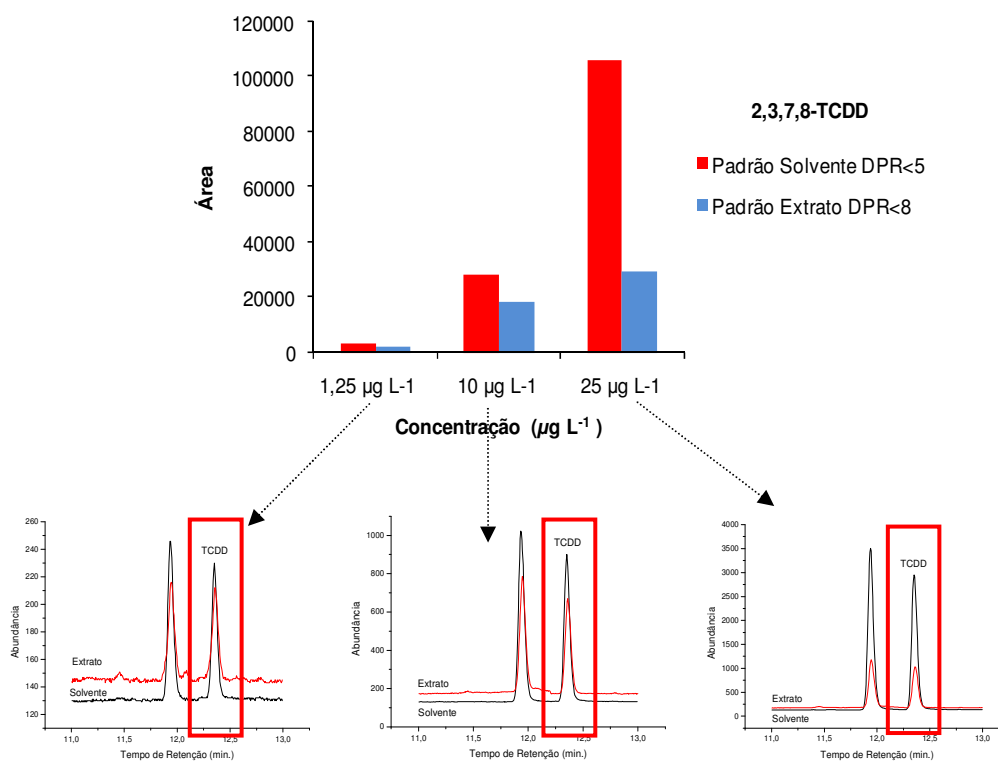
Os dois compostos estudados podem adsorver no injetor, coluna e/ou detector do sistema cromatográfico, apresentando respostas diferentes quando a solução padrão é preparada em solvente puro ou no extrato da matriz. Esse fenômeno é denominado efeito de matriz ou alteração da resposta cromatográfica induzida pelos componentes da matriz (ERNEY *et al.*, 1993; PINHO *et al.*, 2009; PINHO *et al.*, 2010). O efeito de matriz foi detectado nas análises por CG-EM para os dois compostos, apresentando diferenças significativas nas respostas cromatográficas em hexano e no extrato de solo obtido após a ESL-PBT. Pode-se observar uma redução das áreas correspondentes dos analitos no extrato com relação ao solvente com o aumento da concentração, caracterizando um efeito de matriz negativo (FIG. 26 e 27).

Figura 26 – Representação dos gráficos do efeito de matriz nas concentrações 1,25; 10 e 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ em hexano (■) e no extrato da matriz (■) fortificados com o 2,3,7,8-TCDF, com os cromatogramas de comparação dessas análises nas três concentrações estudadas



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 27 – Representação dos gráficos do efeito de matriz nas concentrações 1,25; 10 e 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ em hexano (■) e no extrato da matriz (■) fortificados com o 2,3,7,8-TCDD, com os cromatogramas de comparação dessas análises nas três concentrações estudadas



Fonte: Elaborada pela autora.

3.2.4 Aplicação em amostra real

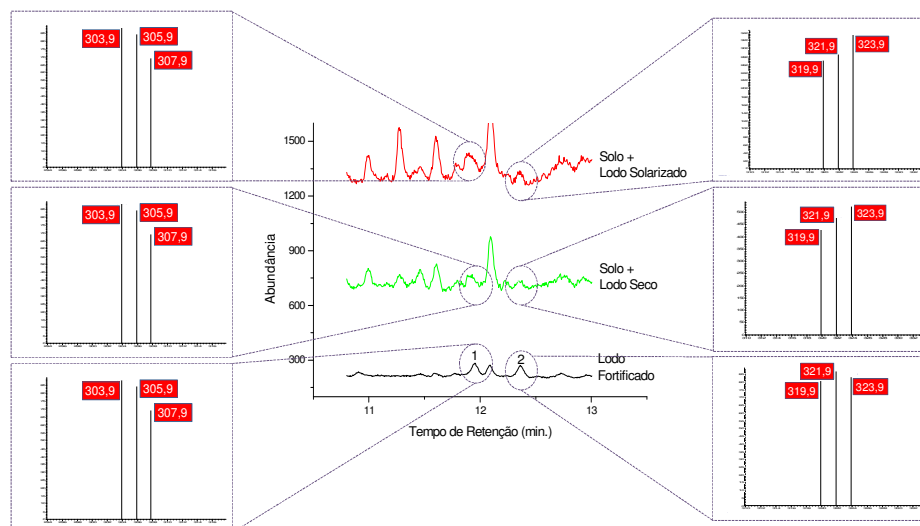
As amostras analisadas foram coletadas no Instituto de Ciências Agrárias da UFMG em Montes Claros – MG. Essas amostras de solo, coletadas em experimentos de cultivo de milho (*Zea mays*), cuja demanda de lodo de esgoto solarizado adicionado ao solo foi de 15,11 t ha⁻¹ e de lodo de esgoto seco adicionado ao solo foi de 25,25 t ha⁻¹.

O 2,3,7,8-TCDF foi detectado, mas não quantificado, pois o sinal detectado no mesmo tempo de retenção desse composto nas amostras de solo tratado com lodo de esgoto (solarizado e seco) foi menor que o sinal detectado no extrato de lodo fortificado com 2,3,7,8-TCDF na concentração de $1,25 \mu\text{g L}^{-1}$, sendo esse o limite de quantificação em lodo de esgoto (FIG. 28).

A confirmação da presença do 2,3,7,8-TCDF nas amostras analisadas foi realizada através da comparação dos espectros de massas desse contaminante, obtidos sob o modo de impacto de elétrons, em que a intensidade dos sinais dos íons com m/z 303,9; 305,9 e 307,9 foi semelhante (FIG. 28).

O 2,3,7,8-TCDD não foi detectado nas amostras de solo tratado com lodo de esgoto (solarizado e seco), apesar de ter sido observado um sinal no mesmo tempo de retenção desse composto (FIG. 28). A confirmação da ausência desse contaminante nas amostras se deu através da comparação dos espectros de massas do 2,3,7,8-TCDD, obtidos sob o modo de impacto de elétrons, em que a intensidade dos sinais dos íons com m/z 319,9; 321,9 e 323,9 não foi semelhante (FIG. 28).

Figura 28 – Representação dos cromatogramas obtidos no modo MIS de extrato de lodo de esgoto fortificado com o 2,3,7,8-TCDF e o 2,3,7,8-TCDD, na concentração de $1,25 \mu\text{g L}^{-1}$ e extratos de solos condicionados com lodo de esgoto seco e solarizado, bem como dos espectros desses compostos em cada extrato analisado.



Fonte: Elaborada pela autora.

Com base nesse contexto, as amostras de solo tratado com lodo de esgoto podem ser utilizadas para fins agrícolas, pois a concentração de 2,3,7,8-TCDF encontrado nas amostras analisadas foi menor que as concentrações determinadas nas resoluções internacionais como a resolução da União Europeia (EU, 2001) e Comissão Europeia (ECC, 2001), ($100 \text{ ng kg}^{-1} \text{ TEQ}$), EPA Victoria (2004), ($50 \text{ ng kg}^{-1} \text{ TEQ}$).

A presença de contaminantes no solo tratado com lodo de esgoto analisado pode estar associada à deposição de partículas atmosféricas ou de dejetos contaminados de efluentes industriais no esgoto (CLARKE; SMITH, 2011).

CONCLUSÃO

Neste trabalho, a metodologia de extração (ESL-PBT) é otimizada e validada para determinação de 2,3,7,8-TCDF e de 2,3,7,8-TCDD em lodo de esgoto e solo. O método é simples, de fácil execução e com gasto reduzido de solventes orgânicos e amostras em relação ao método de referência (soxhlet).

Durante a otimização da ESL-PBT é realizado um planejamento de misturas para avaliar a influência da polaridade da mistura extratora na porcentagem de extração de 2,3,7,8-TCDF e de 2,3,7,8-TCDD em lodo de esgoto e solo. A mistura composta por 6,50 mL de acetonitrila e 1,50 mL de acetato de etila proporciona extrações superiores a 100 % com DPR menores que 13 %, tanto para o lodo de esgoto quanto para o solo. Os extratos obtidos na ESL-PBT para o lodo de esgoto apresentam coloração mais intensa que a do solo. Isso ocorre devido a matriz lodo de esgoto ser mais complexa e possuir uma composição química diversificada, extraíndo dela, além dos analitos de interesse outros interferentes.

Os resultados obtidos nos parâmetros de validação, como seletividade, limites de detecção e quantificação, linearidade, precisão e exatidão indicam que o método de ESL-PBT é eficiente para a extração de 2,3,7,8-TCDF e de 2,3,7,8-TCDD, possibilitando as análises cromatográficas das amostras e determinação desses contaminantes em lodo de esgoto e solo. Os LQ para o lodo de esgoto são de $1,6 \text{ ng kg}^{-1} \text{ TEQ}$ para o 2,3,7,8-TCDF e de $8 \text{ ng kg}^{-1} \text{ TEQ}$ de 2,3,7,8-TCDD no lodo de esgoto. Já no solo o LQ é de $0,2 \text{ ng kg}^{-1} \text{ TEQ}$ para o 2,3,7,8-TCDF e de $2 \text{ ng kg}^{-1} \text{ TEQ}$ de 2,3,7,8-TCDD.

É evidenciada a presença de efeito de matriz nas análises realizadas com lodo de esgoto e solo, entretanto, novos estudos deverão ser realizados visando compreender os perfis do efeito de matriz apresentados para esses compostos.

Com base nesse contexto, a ESL-PBT representa uma alternativa viável para o monitoramento de 2,3,7,8-TCDF e de 2,3,7,8-TCDD em lodo de esgoto e solo para fins agrícolas.

REFERÊNCIAS

- ANDREOLI, C.V., *et al.* Tratamento e disposição final de lodo de esgoto no Paraná. **Sanare**, Curitiba, v.1, n.1, p. 10-16, 1994.
- ANDREOLI, C. V. **Resíduos sólidos no saneamento, processos de reciclagem e disposição final**. 1. ed. Rio de Janeiro: Rima, 2001.
- ANDREOLI, C. V., TAMANIN, C. R., HOLSBACH, B., PEGORINI, E. S., NEVES, P. S. Uso de lodo de esgoto na produção de substrato vegetal. In: **Biossólidos**: alternativas de uso de resíduos do saneamento. Rio de Janeiro: ABES, 2006.
- ANGLIN, C.; MCKINLEY, W.P. Procedure for cleanup of plant extracts prior to analyses for DDT and related pesticides, **Jornal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 8, p. 186-189, 1960.
- ANTUNES, P.; VIANA P.; VINHAS T.; CAPELO J.L.; RIVERA, J.; GASPAR, M.S.M. Optimization of pressurized liquid extraction (PLE) of dioxin-furans and dioxin-like PCBs from environmental samples. **Talanta**, v. 75, p. 916–925, 2008.
- BARBOSA, E. S.; EVANGELISTA, G. F.; PIMENTA, E. M.; SILVÉRIO, F. O.; PINHO, G. P. Optimization and validation of solid-liquid extraction and purification at low temperature of PAHs in sewage sludge. **Química Nova**, v. 37, p. 404-410, 2014.
- BATAGLIA, O.C.; BERTON, R.S.; CAMARGO, O.A. & VALADARES, J.M.A.S. Resíduos orgânicos como fontes de nitrogênio para capim-braquiária. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, Viçosa, v.7, p.277-284, 1983.
- BAZILIO, F. S.; BOMFIM, M. V. J.; ALMEIDA, R. J. D.; ABRANTES, S. D. M. P. **Uso de planilha eletrônica na verificação da adequação de curva analítica ao modelo linear**. 2012.
- BETTIOL, W., CAMARGO, O. A. **Impacto ambiental do uso agrícola do lodo de esgoto**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000.
- BRASIL. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA)**. Instrução Normativa nº: 08, de 18 de maio de 1999. Determina que todos os estabelecimentos fabricantes de farelo de polpa cítrica destinados à alimentação animal estejam devidamente registrados no setor competente do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasília, DF.
- BOX, G. E. P. N. Non-normality and tests on variances. **Biometrika**, v. 40, p. 318-335, 1953.

BROWN, N. B.; FORSYTHE, A. B. Robust tests for the equality of variances. **Journal of the American Statistical Association**, v. 69, p. 364-367, 1974.p

BURKE, S. Regression and calibration. LC GC, p. 13-18, 2001.

CAI, Q. Y.; MO, C. H.; WU, Q. T.; ZENG, Q. Y.; KATSOYIANNIS, A. Occurrence of organic contaminants in sewage sludges from eleven wastewater treatment plants. **Chemosphere**, v. 68, p. 1751–1762, 2007.

CHAGAS, W. F. **Estudo de patógenos e metais em lodo digerido bruto e higienizado para fins agrícolas, das estações de tratamento de esgotos da ilha do governador e da Penha no estado do Rio de Janeiro**. 2000. 89f. Dissertação (Mestrado) - Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública, Rio de Janeiro, 2000.

CLARKE, B.; PORTER, N.; SYMONS, R.; BLACKBEARD, J.; ADES, P.; MARRIOTT, P. Dioxin-like compounds in Australian sewage sludge: review and national survey. **Chemosphere**, v. 72, p. 1215–1228, 2008.

CLARKE, B. O.; SMITH, S. R. Review of 'emerging' organic contaminants in biosolids and assessment of international research priorities for the agricultural use of biosolids. **Environment International**, v. 37, p. 226–247, 2011.

COLLINS, C. H., BRAGA, G. L., BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**, 1. ed. Campinas: ed: UNICAMP, 2006. 453p.

CONAMA - CONSELHO NACIONAL DE MEIO AMBIENTE. Resolução 375. Critérios e procedimentos, para uso agrícola de lodos de esgoto sanitário e seus produtos derivados. Brasília, agosto de 2006.

CONAMA - CONSELHO NACIONAL DE MEIO AMBIENTE. Resolução 420. **Critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas**. Brasília, dezembro de 2009.

DESCHAMPS, C.; FAVARETTO, N. Efeito do lodo de esgoto complementado com fertilidade mineral na produtividade e desenvolvimento da cultura de feijoeiro e do girassol. **Sanare**, Curitiba, v.8, p. 33-38, 1997.

DIAZ-CRUZ, M. S.; GARCIA-GALAN, M.J.; GUERRA, P.; JELIC, A.; POSTIGO, C.; ELJARRAT, E.; FARRE, M.; LOPEZ DE ALDA, M.J.; PETROVIC, M.; BARCELO, D. Analysis of selected emerging contaminants in sewage sludge. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 28, p. 1263–1275, 2009.

DOI, H.; BABA, T.; TOHYANA C.; NOHANA K. Functional activation of arylhydrocarbon receptor (AhR) in primary T cells by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. **Chemosphere**, v. 52, p. 655-662, 2003.

DRAPER, N. R.; SMITH, H. **Applied regression analysis**. New York: wiley. 1998. 706 p.

DUFOUR, I.R.; FARHAT, A.; GARDIOL, L.; KHALAF, L. Simulation-based finite sample normality tests in linear regressions. **Econometrics Journal**, v. 1, p. 154-173, 1998.

DURBIN, J.; WATSON, G. S. Testing for serial correlation in least squares regression. **Biometrika**, v. 38, p. 159-178, 1951.

EC.European Commission. **Organic Contaminants in Sewage Sludge For Agricultural Use**. In: Langenkamp, H., Part, P. (Eds.). European Commission Joint Research Centre Institute for Environment and Sustainability Soil and Waste Unit, 2001.

EC. (European Commission DG Environment). **Compilation of EU Dioxin Exposure and Health**, 1999.

ECC. Communication from the Commission to the Council, the European Parliament and the Economic and Social Committee, 2001, Community Strategy for Dioxins, Furans and Polychlorinated Biphenyls", Commission of the European Communities, 2001.

EICHBAUM, K.; BRINKMANN, M.; BUCHINGER, S.; REIFFERSCHIED, G.; HECKER, M.; GIESY, J. P.; ENGWALL, M.; VAN BAVEL, B.; HOLLERT, H. In vitro bioassays for detecting dioxin-like activity: application potentials and limits of detection, a review. **Science of the Total Environment**, v. 487, p. 37–48, 2014.

ELJARRAT, E.; CAIXACH, J.; RIVERA, r. Extraction of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans from solid samples using the randall technique. **Chemosphere**, v. 40, p. 187-193, 2000.

ELJARRAT, E.; CAIXACH, J.; RIVERA, J. A comparison of TEQ contributions from PCDDs, PCDFs and dioxin-like PCBs in sewage sludges from Catalonia, Spain. **Chemosphere**, v. 51, p. 595–601, 2003.

EPA Victoria. Guidelines for Environmental Management: biosolids Land Application. Melbourne, 2004.

ERNEY, D. R.; GILLESPIE, A. M.; GILVYDIS, D. M.; POOLE, C. F. Explanation of the matrix-induced chromatographic response enhancement of organophosphorus pesticides during open tubular column gas chromatography with spitless or hot on-column injection and flame photometric detection. **Journal of the Chromatography**, v. 638, p. 57-63, 1993.

EU. European Union. Working Document on Sludge: Third Draft. Brussels, 2001.

EURACHEM Guide. The Fitness for Purpose of Analytical Methods: A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. EURACHEM Working Group. First English Edition 1.0. 1998.

FEDRIZZI, F. **Aproveitamento do lodo de esgoto na produção de artefatos de concreto- tubo de concreto de seção circular**. 2012. 205p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

FERNANDES, F.; SOUZA, S. G. Estabilização de Lodo de Esgoto. In Androli, C.V. (coord.), **Resíduos sólidos do saneamento: processamento, reciclagem e disposição final**. Rio de Janeiro: ABES, 2001. 282p.

FIEDLER, H. Sources of PCDD/PCDF and Impact on the Environment. **Chemosphere**, v. 32, n. 1, p. 55-64, 1996.

FISCHER, B. Receptor-mediated of chlorinated hydrocarbons. **Andrologia**, v. 32, p. 279-283, 2000.

FONTS, I.; GEA, G; AZUARA, M; ÁBREGO, J; ARAUZO, J. Sewage sludge pyrolysis for liquid production: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, p. 2781-2805, 2012.

FYTILI, D., ZABANIOTOU, A. Utilization of sewage sludge in EU application of old and new methods – a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.12, p. 116–140, 2007.

GARP- Grupo de Analistas de Resíduos Pesticidas. **Manual de resíduos pesticidas em alimentos**. 1999.

GODOY, L. C. A logística na destinação do lodo de esgoto. **Revista Tecnologia , Gestão, Humanismo**, v. 2, 2013.

GONZALEZ, F. J. E.; TORRES, M. E. H.; LOPEZ, E. A.; CUADROS-RODRIGUEZ, L.; VIDALA, J. L. M. Matrix-effects of vegetable commodities in electron-capture detection applied to pesticide multiresidue analysis, **Journal of Chromatography A**, v. 966, p. 155-165, 2002.

GOULART, S. M. **Extração de deltametrina e cipermetrina de leite e análise por cromatografia**. 2004. 60f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2004.

GOULART, S. M.; QUEIROZ, M. E. L. R.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, J. H. Low-temperature clean-up method for the determination of pyrethroids in milk using gas chromatography with electron capture detection. **Talanta**, v. 75, p. 1320-1323, 2008.

GOULART, S. M. Avaliação da técnica de extração com partição em baixa temperatura na análise de carbamatos em alimentos e bebidas. 2010. 158p. Tese (Doutorado em Agroquímica) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2010.

GOULART, S.M.; ALVES, R.D.; PAULA, W. X.; QUEIROZ, J. H.; NEVES, A.A.; QUEIROZ, M.E.L.R. Determination of carbamates in beverages by liquid-liquid extraction with low temperature partitioning and liquid chromatography. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, p. 1154-1165, 2012.

GRIBBLE GW. The natural production of chlorinated compounds. **Environmental Science and Technology**, v. 28, p. 310-319, 1994.

HAJSLOVÁ, J.; ZROSTLIKOVÁ, J. Matrix effects in (ultra) trace analysis of pesticide residues in food biotic matrices, **Journal of Chromatography A**, v. 1000, p. 181-197, 2003.

HOOGENBOOM, R.; TRAAG, T.; FERNANDES, A.; ROSE, M. European developments following incidents with dioxins and PCBs in the food and feed chain. **Food Control**, v. 50, p. 670-683, 2015.

IARC Monographs, Evaluation of Carcinogenic Risk to humans: Polychlorinated Dibenzo-para-dioxins and Dibenzofurans, WHO, 1997, v. 69.

ICH - International Conference on Harmonisation. **Validation of Analytical Procedures: Methodology**, Q2B (CPMP/ICH/281/95), 1995.

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaios Químicos**, DOQ-CGCRE-008, 2003.

ISCHIAM, M.; PERAZOLLI, C.; MASCHIO, R.; CAMPOSTRINI, R. Pyrolysis study of sewage by TG-MS and TG-GC-MS coupled analyses. **Journal of Thermal Analysis Calorimetry**, v. 87, p. 567-574, 2007.

JONES, K.; ALCOCK, R. Organic contaminants in sewage sludges. **The Science of the Total Environment**, v. 185, p. 216, 1996.

KATSOYIANNIS, A., SAMARA, C. The fate of dissolved organic carbon (DOC) in the wastewater treatment process and its importance in the removal of wastewater contaminants. **Environmental Science and Pollution Research** . v. 14, p. 284-292, 2007.

KIM, E. J.; OH, J. E.; CHANG, Y. S. Effects of forest fire on the level and distribution of PCDD/Fs and PAHs in soil. **Science of the Total Environment**, v. 311n. 1-3, p. 177-189, 2003.

LAMPARSKI, L.L., NESTRICK, T.J., STENGER, V.A. Presence of chlorodibenzo dioxins in a sealed 1933 sample of dried municipal sewage sludge. **Chemosphere**, v. 13, p. 361, 1984.

LEIVA, C.; AHUMADA, I.; BETSABET, S.; RICHTER, P. Polychlorinated biphenyl behavior in soils amended with biosolids. **Chemosphere**, v. 79, p. 273–277, 2010.

LENTZA-RIZOS, C.; AVRAMIDES E. J.; CHERASCO, F. Low-temperature clean-up method for the determination of organophosphorus insecticides in olive oil. **Journal of Chromatography A**, v. 912, p. 135-142, 2001.

LI, X.; KE, Z.; DONG, Z. PCDDs and PCDFs in sewage sludges from two wastewater treatment plants in Beijing, China. **Chemosphere**, v. 82, p. 635–638, 2011.

LIN, L. F.; LEE, W. J. ; LI, H. W.; WANG, M. S.; CHANG-CHIEN, G. P. Characterization and inventory of PCDD/F emissions from cold-fired Power plants and other sources em Taiwan. **Chemosphere**, v. 68, n. 9, p. 1642-1649, 2007.

LU, M.; WU, X. J.; ZENG, C.; LIAO, Y. Distribution of PCDD/Fs and organometallic compounds in sewage sludge of wastewater treatment plants in China. **Environmental Pollution**, v. 171, p. 78-84, 2012.

MAIA, M. R. **Determinação de bifenilas policloradas em lodo de esgoto por cromatografia gasosa e espectrometria de massas**. 2014. 82p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais, Montes Claros. 2014.

MANNILA, M.; KOISTINENA, J.; VARTIAINENA, T. Development of supercritical fluid extraction with a solid-phase trapping for fast estimation of toxic load of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins-dibenzofurans in sawmill soil. **Journal of Chromatography**, v. 975, p. 189–198, 2002.

MARPLE, L., BRUNCK, R., THROOP, L. Water solubility of 2,3,7,8,-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. **Environmental Science and Technology**, v. 20, p. 180-182, 1986.

MARTHE, D. B.; BITTENCOURT, L. M.; QUEIROZ, M. E. L. R.; NEVES, A. A. Desenvolvimento de metodologia para determinação de piretroides em manteiga. **Química Nova**, v. 33, p. 1389-1393, 2010.

MASON, G., ZACHAREWSKI, T., DENOMME, M., SAFE, L., SAFE, S. Polybrominated dibenzo-*p*-dioxins and related compounds: quantitative in vivo and in vitro structure-activity relationships. **Toxicology**, v.44, p. 245–255, 1987.

MCCULLEY, K. A.; MCKINLEY, W. P. Determination of chlorinated pesticide residues in fat by electron capture gás chromatography. **Journal of the Association Official Analytical Chemists**, v. 47, p. 652-659, 1964.

MELO, W.J.; MARQUES, M.O.; SANTIAGO, G.; CHELLI, R.A. & LEITE, S.A.S. Efeito de doses crescentes de lodo de esgoto sobre frações de matéria orgânica e CTC de um Latossolo cultivado com cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, Viçosa, v. 18, p. 449-455, 1994.

MELO, W. J.; MARQUES, M. O. **Potencial do lodo de esgoto como fonte de nutrientes para as plantas**: impacto ambiental do uso do lodo de esgoto. Jaguariúna: EMBRAPA Meio Ambiente, 2000.

MOCARELLI, P. Seveso: a teaching story. **Chemosphere**, v. 43, n. 4-7, p. 391-402, 2001.

NATO/CCMS. 1988a. Pilot Study on International Information Exchange on Dioxins and Related Compounds: International Toxicity Equivalency Factor (I-TEF) Method of Risk Assessment for Complex Mixtures of Dioxins and Related Compounds. Report No. 176. North Atlantic Treaty Organization, Committee on the Challenges of Modern Society, Report Number 176, August, 1988.

NATO/CCMS. 1988b. Pilot Study on International Information Exchange on Dioxins and Related Compounds: Scientific Bases for the Development of the International Toxicity Equivalency Factor (I-TEF) Method of Risk Assessment for Complex Mixtures of Dioxins and Related Compounds. North Atlantic Treaty Organization, Committee on the Challenges of Modern Society, Report Number 178, December, 1988.

NUVOLARI, A. **Esgoto sanitário: coleta, transporte, tratamento e reuso agrícola**. 2. ed. São Paulo: Blucher, 2011. 565p.

OLSMAN, H.; ENGWALL, M.; KAMMANN, U.; KLEMP, M.; OTTE, J.; VAN BAVEL, B.; HOLLERT, H. Relative differences in aryl hydrocarbon receptor-mediated response for 18 polybrominated and mixed halogenated dibenzo-p-dioxins and -furans in cell lines from four different species. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 26, p. 2448-2454, 2007.

OTERO, M.; SÁNCHEZ, M. E.; GARCÍA, A. I.; MORÁN, A. Simultaneous thermogravimetric-mass spectrometric study on the co-combustion of coal and sewage sludges. **Journal of Thermal Analysis Calorimetry**, v. 86, p. 489-495, 2006.

OZCAN, S.; TOR, A.; MEHMET, E. A. Investigation on the levels of heavy metals, polycyclic aromatic hydrocarbons, and polychlorinated biphenyls in sewage sludge samples and ecotoxicological testing. **Clean: Soil, Air, Water**, v. 41, p. 411-418, 2013.

PEREIRA, M.S. Polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDD), dibenzofurans (PCDF) and polychlorinated biphenyls (PCB): main sources, environmental behavior and risk to man and biota. **Química Nova**, v. 27, n. 6, p. 934-943, 2004.

PINHO, G. P. **Extração de pesticidas em amostras de tomate pelas técnicas de: extração sólido-líquido e purificação em baixa temperatura (ESL-PBT) e dispersão da matriz em fase sólida (DMFS) para análise em cromatografia gasosa**. 2007. 98p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2007.

PINHO, G. P.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, M. E. L. R.; SILVÉRIO, F.O. Efeito de matriz na quantificação de agrotóxicos por cromatografia gasosa. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 987-995, 2009.

PINHO, G. P.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, M. E. L. R.; SILVÉRIO, F.O. Pesticide determination in tomatoes by solid-liquid extraction with purification at low temperature and gas chromatography. **Food Chemistry**, v. 121, s.n., p. 251-256, 2010.

PINHO, G. P.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, M. E. L. R.; SILVÉRIO, F. O.; MARTHE, D. B. Influence of Tomato Components in the Quantification of Four Pesticides by Gas Chromatography. **Journal of the Brazilian Chemistry Society**, v. 23, p. 294-300, 2012.

QUAB, U.; FERMANN, M.; BROKER, G. The European dioxin ir emission inventory Project-final reults. **Chemosphere**, v. 54, p. 1319-1327, 2004.

RAPPE, C., ANDERSSON, R., KARLAGANIS, G., BONJOUR, R. PCDDs and PCDFs in samples of sewage sludge from various areas in Switzerland. **Organohalogen Compounds**, v. 20, p. 79-84, 1994.

RAPPE, C., ANDERSSON, R., BONNER, M., COOPER, K., FIEDLER, H., HOWELL, F. PCDDs and PCDFs in municipal sewage sludge and effluent from potw in the state of Mississippi, USA. **Chemosphere**, v. 36, p. 315-328, 1998.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, p. 771-780, 2004.

RORDORF, B.F. Prediction of vapor pressures, boiling points and enthalpies of fusion for twenty-nine halogenated dibenzo-p-dioxins and fifty-five dibenzofurans by vapor pressure correlation method. **Chemosphere**, v. 18, p. 783-788, 1989.

RYAN, T.A.; JOINER, B.L. **Normal probability plots and for normality**. The state College: Pennsylvania State University, 1976.

SHEN W.; GUO, Q.; WANG, H.; YANG, X.; LIU, Y.; ZHANG, Y. Product composition of pyrolyzed sewage sludge and adsorption of methylene blue by porous material derived from it. **Environmental Engineering Science**, v. 25, p. 99-105, 2008.

SILVA, A. P.; ALVES, M. C. C. Como iniciar a validação de métodos analíticos. In: CONGRESSO E FEIRA DA QUALIDADE EM METROLOGIA, São Paulo, Brasil, 2006. **Anais...** São Paulo, Brasil, 2006.

SILVA, F.C.; BOARETTO, A. E. JUNIOR, C. H. A.; BERTON, R. S. BASSO, L. C.; BARBIERI, V. Impactos da aplicação de lodo de esgoto na cultura da cana-de-açúcar e no ambiente. **Holos Environment**, v. 10, p. 62. 2010.

SILVERSTEIN, R. M.; MEBSTER, F. X. **Spectrometric Identification of Organic Compounds**. 6. ed. New York, USA: John Wiley, 1998. 482 p.

SMITH, S. R. A critical review of the bioavailability and impacts of heavy metals in municipal solid waste composts compared to sewage sludge. **Environment International**, v. 35, p. 142–156, 2009.

SONG, M.; CHU, S.G.; LETCHER, R.J.; SETH, R. Fate, partitioning, and mass loading of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) during the treatment processing of municipal sewage. **Environmental Science Technology**, v. 40, p. 6241–6246, 2006.

SOUZA, S. V. C.; SILVA, G.; DINIZ, M.H.G.M.; SANTOS, E.V.; LIMA, J. A.; TEODORO, J. C. Determinação de resíduos de avermectinas em fígado bovino por cromatografia líquida de alta eficiência. **Ciência e tecnologia de alimentos**, v. 23, p. 54-58, 2007.

SOUZA, S. V. C.; PINTO, C. T.; JUNQUEIRA, R. G. In-house method validation: Application in arsenic analysis. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 20, n. 3, p. 241-247, 2007.

TADEO, J.; SANCHEZ-BRUNETE, C.; ALBERO, B.; GARCIA-VALCARCEL, A.; PEREZ, R. A. Analysis of emerging organic contaminants in environmental solid samples. **Central European Journal of Chemistry**, v. 10, p. 480–520, 2012.

TELLIARD, W.A., MCCARTY, H.B., KING, J.R., HOFFMAN, J.B. USEPA national sewage sludge survey results for polychlorinated dibenzo-pdioxins and polychlorinated didenzofurans. **Organohalogen Compd.**, v.2, p. 307–310, 1990.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single laboratory validation of methods of analysis. IUPAC, **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, p. 835–855, 2002.

TORRE, A. L.; ALONSO, E.; CONCEJERO, M. A.; SANZ, P.; MARTÍNEZ, M. A. Sources and behaviour of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs), polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans (PCDD/Fs) in Spanish sewage sludge. **Waste Management**, v. 31, p. 1277-1284, 2011.

TSUTYA, M. T. Alternativas de disposição final de biossólidos gerados em estações de tratamento de esgoto. In: BETTIOL, W. e CAMARGO, O. A. **Impacto ambiental do uso agrícola do lodo de esgoto**. Jaguariúna: EMBRAPA Meio Ambiente, 2000, p.69-106.

UNGER, M.; ASPLUND, L.; HAGLUND, P.; MALMVARN, A.; ARNOLDSSON, K.; GUSTAFSSON, O. Polybrominated and mixed brominated/chlorinated dibenzo-p-dioxins in sponge (*Ephydatia fluviatilis*) from the Baltic Sea. **Environmental Science and Technology**, v. 43, p. 8245–8250, 2009.

USPC. United States Pharmacopeia Convention; **US Pharmacopeia 24**, Validation of Compendial Methods <1225>, Rockville, 1999.

US EPA. **National sewage sludge survey**: availability of information and data, and anticipated impacts of proposed regulations; proposed rule. Federal Register, v. 55, p. 47210–47283, 1990.

US EPA. Method 1613: Tetra- through Octa- Chlorinated Dioxins and Furans by Isotope Dilution HDGC/HRMS. US Environmental Protection Agency – Engineering and Analysis Division Washington, 1994.

VESSMAN, J.; STEFAN, R. I.; STADEN, J. F. V.; DANZER, K.; LINDNER, W.; BURNS, D. T.; FAJGELJ, A.; MÜLLER, H. Selectivity in analytical chemistry. **Pure and Applied Chemistry**, v. 73, p. 1381 1386, 2001.

VIEIRA, H. P. **Otimização e validação da extração simultânea de piretróides em água e solo e análise por cromatografia gasosa**. 2005. 65f. Dissertação (mestrado em agroquímica) – Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2005.

VIEIRA, H. P.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, M. E. L. Otimização e validação da técnica de extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (ELL-PBT) para piretróides em água e análise por CG. **Química Nova**, v. 30, p. 535-540, 2007.

VON SPERLING, M. **Lodo de esgotos: tratamento e disposição final**. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental – UFMG; Companhia de Saneamento do Paraná, 2001. 484p.

WEBER, R.; BERTRAM, K.. Relevance of BFRs and thermal conditions on the formation pathways of brominated and brominated-chlorinated dibenzodioxins and dibenzofurans. **Environment International**, v. 29, p. 699–710, 2003.

WEERASINGHE, N.C.A., GROSS, M.L., LISK, D.J. Polychlorinated dibenzodioxins and polychlorinated dibenzofurans in sewage sludges. **Chemosphere**, v. 14, p. 557–564, 1985.

WHO. World Health Organization Polychlorinated Dibenzo-para-dioxins and Dibenzofurans. **Environmental Health Criteria Series**, v. 88, 1989.

WHO. Consultation on assessment of the health risk of dioxins; reevaluation of the tolerable daily intake (TDI): executive summary. **Food Additives and Contaminants**, v. 17, p. 223-240, 2000.

YU, Y.; HUANG, Q.; CUI, J.; ZHANG, K.; TANG, C.; PENG, X. Determination of pharmaceuticals, steroid hormones, and endocrine-disrupting personal care products in sewage sludge by ultra-high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 399, p. 891–902, 2011.

ZEITOUNI, R. F. **Análise crítica da norma CETESB P 4.230 “Aplicação de lodos de sistemas de tratamento biológico em áreas agrícolas- Critérios para projeto e operação**. 2005. 267f. Dissertação (Mestrado) - Instituto Agrônômico de Campinas, Campinas, 2005.