

ÉERICA SOARES BARBOSA

**OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DA TÉCNICA DE EXTRAÇÃO
SÓLIDO-LÍQUIDO E PURIFICAÇÃO EM BAIXA
TEMPERATURA PARA HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS
AROMÁTICOS EM LODO DE ESGOTO**

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

Orientador: Prof. Flaviano Oliveira Silvério

Montes Claros

2012

Barbosa, Érica Soares.

**B238o
2012**

**Otimização e validação da técnica de extração sólido-líquido e purificação em baixa temperatura para hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em lodo de esgoto. Érica Soares Barbosa. Montes Claros, MG: ICA/UFMG, 2012.
66 f.: il.**

Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias, área de concentração em Agroecologia) Universidade Federal de Minas Gerais, 2012.

Orientador: Flaviano Oliveira Silvério.

Banca examinadora: Charles Martins Aguilhar, Fernando Colen, Paulo Henrique Fidêncio, Gevany Paulino de Pinho, Flaviano Oliveira Silvério.

Inclui bibliografia: f. 58-66.

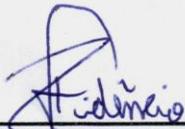
1. Lodo de esgoto – Contaminantes orgânicos. 2. Química agrícola. I. Silvério, Flaviano Oliveira. II. Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Agrárias. III. Título.

CDU: 628.3

Elaborada pela BIBLIOTECA COMUNITÁRIA DO ICA/UFMG

ÉRICA SOARES BARBOSA

OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DA TÉCNICA DE EXTRAÇÃO SÓLIDO-
LÍQUIDO E PURIFICAÇÃO EM BAIXA TEMPERATURA PARA
HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS EM LODO DE
ESGOTO



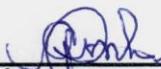
Prof. Dr. Paulo Henrique Fidêncio
(UFVJM)



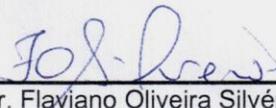
Prof. Dr. Charles Martins Aguiar
(ICA/UFMG)



Prof. Dr. Fernando Colen
(ICA/UFMG)



Prof.^a Dra. Gevany Paulino de Pinho
Coorientadora (ICA/UFMG)



Prof. Dr. Flaviano Oliveira Silvério
Orientador (ICA/UFMG)

Aprovada em 20 de dezembro de 2012.

DEDICO

Ao guerreiro e grande inspirador da minha vida, meu pai, Lázaro Soares Barbosa, que compartilhou comigo os momentos de lutas e vitórias e que não terá a oportunidade de viver este momento. A minha mãe, pelo exemplo de coragem e persistência.

AGRADECIMENTOS

Ao Senhor Deus pela oportunidade e pela conquista.

Aos Professores Flaviano Oliveira Silvério e Gevany Paulino de Pinho, pela orientação, por compartilhar conhecimentos, pela paciência e confiança, atitudes responsáveis pelo desenvolvimento deste trabalho.

Aos demais professores e funcionários da Instituição – ICA/UFMG – pela viabilidade da pesquisa.

Aos colegas Ane, Gabriela, Emanuella, Daiane, Laila, Clara, Joyce, Tiago, Tereza e aos demais companheiros de trabalho, pela dedicação, amizade e contribuição, sem os quais não teria sido possível conduzir este trabalho.

Aos meus pais Lázaro e Belizária, meus irmãos Matheus e Marcos a meu namorado Júnior e a todos os meus familiares e amigos que, muitas vezes usurpados da minha presença, mas não do meu amor, sempre torceram pelo meu sucesso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo suporte financeiro para que a pesquisa pudesse ser realizada.

A todos que de algum modo colaboraram para a conclusão dessa importante etapa da minha vida, o meu muito obrigado!

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1 – REFERENCIAL TEÓRICO

- 1 - Resumo das principais fontes emissoras de HPAs para a atmosfera no Brasil..... 19
- 2 - Concentrações máximas permitidas de HPAs prioritários estabelecidas pela EPA, em solos agrícolas (CONAMA) e em lodo de esgoto (UE)..... 24
- 3 - Dados comparativos dos métodos descritos na literatura para a determinação de HPAs no lodo de esgoto..... 27

CAPÍTULO 2 - OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DA TÉCNICA DE EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO E PURIFICAÇÃO EM BAIXA TEMPERATURA PARA HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS EM LODO DE ESGOTO

- 1 - Variáveis avaliadas no processo de otimização univariada da ESL-PBT de HPAs em amostras de lodo de esgoto..... 37
- 2 - Tempo de retenção dos 16 HPAs em acetonitrila por meio de gradiente no CLAE-UV..... 40
- 3 - Linearidade, equações da reta e razão entre os coeficientes angulares das curvas analíticas obtidas em extratos da matriz e em acetonitrila..... 50
- 4 - Validação dos HPAs: limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), precisão e exatidão..... 53
- 5 - Comparação entre os tempos de retenção dos HPAs obtidos em solvente puro e extração por soxhlet..... 55
- 6 - Resumo geral das vantagens obtidas no método otimizado, a ESL-PBT, em relação ao método de extração por soxhlet..... 56

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 1 - REFERENCIAL TEÓRICO

- Figura 1- Representação das estruturas químicas dos 16 HPAs prioritários segundo a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA)..... 20
- Figura 2- Representação esquemática simplificada do metabolismo de benzo[a]pireno em humanos, até a formação do derivado metabólito carcinogênico (BaP-7,8-diol-9,10-epóxido)..... 22

CAPÍTULO 2 - OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DA TÉCNICA DE EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO E PURIFICAÇÃO EM BAIXA TEMPERATURA PARA HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS EM LODO DE ESGOTO

- Gráfico 1- Representação do cromatograma da solução padrão dos 16 HPAS (TAB. 2) em ACN a 500 ppb..... 41
- Gráfico 2- Porcentagens de extração obtidas da ESL-PBT para 15 HPAs (TAB. 1): a) fase extratora com os solventes: acetonitrila (ACN), diclorometano (DCM), acetato de etila (ACT); b) homogeneização; c) Força iônica (0 g e 0,1 g de NaCl); d) influência do pH; e) Comparação entre pH 11,0, força iônica (0,1 g de NaCl) e a combinação dos fatores: força iônica + pH 11,0..... 44
- Gráfico 3- Representação da sobreposição dos espectros de absorção na região do UV-visível utilizando diferentes massas de sílica na etapa de *clean up* dos extratos de lodo de esgoto..... 48

Gráfico 4-	Representação da sobreposição de cromatogramas do extrato da matriz isenta de HPAs e do extrato contendo os 16 padrões de HPAs (550 ppb e o HPA 4 a 100 ppb).....	52
Gráfico 5-	Representação do cromatograma das análises realizadas por CLAE-UV de solução padrão de HPAs preparadas em extratos orgânicos de amostras de lodo obtidos pela técnica soxhlet.....	54

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1 - REFERENCIAL TEÓRICO.....	10
1	INTRODUÇÃO.....	10
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	12
2.1	Lodo de esgoto.....	12
2.2	Uso do lodo de esgoto na agricultura.....	14
2.3	Contaminantes comuns no lodo de esgoto.....	15
2.3.1	Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs)	17
2.3.2	HPAs e saúde humana.....	21
2.3.3	Concentrações máximas permitidas de HPAs no solo e lodo de esgoto.....	22
2.4	Métodos de extração e identificação dos HPAs em lodo.....	24
3	OBJETIVOS.....	30
3.1	Objetivo Geral.....	30
3.2	Objetivos Específicos.....	30
	 CAPÍTULO 2 - OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DA TÉCNICA DE EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO E PURIFICAÇÃO EM BAIXA TEMPERATURA PARA HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS EM LODO DE ESGOTO.....	 31
	RESUMO.....	31
	ABSTRACT.....	32
1	INTRODUÇÃO.....	33
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	35
2.1	Amostras de lodo.....	35
2.2	Reagentes e Soluções.....	35
2.3	Equipamentos.....	36
2.4	Condições Cromatográficas.....	36
2.5	Otimização da ESL-PBT.....	37
2.5.1	Parâmetros de Otimização.....	37
2.5.2	Procedimento.....	38
2.6	Extração por Soxhlet.....	38

2.7	Validação do Método.....	39
2.8	Avaliação do Efeito de Matriz.....	39
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
3.1	Condições Cromatográficas.....	39
3.2	Otimização da ESL-PBT.....	42
3.2.1	Fase Extratora.....	44
3.2.2	Homogeneização.....	45
3.2.3	Força Iônica.....	46
3.2.4	Influência do pH.....	46
3.2.5	Combinação dos Fatores.....	47
3.3	<i>Clean up</i> dos Extratos.....	47
3.4	Avaliação do Efeito de Matriz.....	48
3.5	Validação do Método.....	51
3.5.1	Seletividade.....	51
3.5.2	Limite de Detecção e Quantificação.....	52
3.5.3	Precisão e Exatidão.....	53
3.6	Comparação entre os Métodos.....	54
4	CONCLUSÃO.....	57
	REFERÊNCIAS.....	58

CAPÍTULO 1 - REFERENCIAL TEÓRICO

1 INTRODUÇÃO

O produto final das Estações de Tratamento de Esgoto (ETE), gerado a partir de águas residuais domésticas ou efluentes industriais, é denominado lodo de esgoto. Toneladas deste resíduo são produzidas a cada ano em diversos países e a disposição final deste material muitas vezes não é realizada de maneira sustentável. No Brasil, por exemplo, uma pesquisa realizada em 2001, constatou que 50% dos biossólidos são descartados em aterros sanitários, 15,1% como insumos na agricultura e 34,9% possuem “destinação indefinida” (ANDREOLI *et al.*, 2008; CESAR *et al.*, 2010).

A introdução deste material na agricultura e na recuperação de áreas degradadas tem sido, em muitos países, uma via econômica de reaproveitamento desde 1980. Essa prática é objeto de crescente interesse devido aos impactos ambientais decorrentes de outras opções de disposição e por ser econômica (VACA *et al.*, 2011). Fato também justificado pelos teores elevados de matéria orgânica e de nutrientes, capazes de incrementar níveis de fertilidade, porosidade, permuta catiônica, permeabilidade e agregabilidade aos solos (MOTTA; MAGGIORE, 2013).

No entanto, as estações de tratamento de esgoto podem coletar contaminantes provenientes de várias fontes, incluindo residências, indústrias e escoamento de ruas, que tendem a concentrar compostos indesejáveis em proporções variáveis no lodo de esgoto. Estes contaminantes podem ser de diferentes classes, como os poluentes orgânicos, metais pesados e micro-organismos patogênicos (CAI *et al.*, 2007a).

O lodo de esgoto contendo esses contaminantes indesejáveis e destinado à agricultura pode representar perigo para as plantas, animais, seres humanos e vida microbiana no solo. Atualmente, a Agência de Proteção Ambiental Americana (EPA) apresenta uma lista com mais de 120 poluentes prioritários. Entre esses, os dibenzo-*p*-dioxinas, furanos, bifenilas policlorados e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) estão entre os

contaminantes químicos orgânicos mais encontrados em lodo (CAI *et al.*, 2007a).

Esses poluentes orgânicos apresentam ação recalcitrante, cancerígena, e alguns são propensos a bioacumulação em organismos vivos. Por isso, a caracterização e, quando necessária, a redução de contaminantes no lodo de esgoto é importante para a disposição final na agricultura. Neste contexto, algumas agências reguladoras como o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) e a União Europeia (UE) estabelecem concentrações máximas permitidas de contaminantes no solo e lodo de esgoto, respectivamente.

Para determinar a presença de contaminantes com concentrações abaixo dos limites estabelecidos, métodos analíticos são empregados para a identificação e quantificação desses no lodo. As etapas para a determinação de compostos, geralmente requer 70 a 90% do tempo de análise. Os métodos tradicionais e modernos, tanto de extração, *clean up* e identificação dos analitos, visam obter dados robustos, sensíveis e confiáveis para a quantificação de poluentes. Assim, as técnicas a serem desenvolvidas devem garantir estes parâmetros e apresentar preferencialmente operações práticas e econômicas (ZULOAGA *et al.*, 2012).

A técnica de extração sólido-líquido e purificação em baixa temperatura (ESL-PBT) é um método promissor por ser prático e envolver as etapas de extração e purificação simultaneamente (SILVÉRIO *et al.*, 2012). Dessa forma, este trabalho objetivou otimizar, validar e comparar os resultados da ESL-PBT, com o método convencional de extração para análise de 16 HPAs prioritários em lodo de esgoto por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector ultravioleta (UV-VIS).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Lodo de Esgoto

A crescente produção de resíduos urbanos tem se tornado um problema decorrente do aumento gradativo e desordenado da população, da ocupação territorial e do crescimento acentuado dos bens de consumo. As estações de tratamento de esgoto (ETEs) são fundamentais no processo de tratamento da água, porém chegam a gerar milhões de toneladas de resíduos em todo o mundo a cada ano (PENA *et al.*, 2008). Esse produto das ETEs apresenta cor escura, odor desagradável, tem aparência pastosa e contém elevada quantidade de água, variando de 90% a 95% após a última etapa de tratamento (FERNANDES; SILVA, 1999). A composição pode variar em função do local de origem, ou seja, de uma área tipicamente residencial ou industrial, da época do ano e do processo utilizado na ETE (HUA, *et al.*, 2008).

Desaguamento é o nome dado ao processo de desidratação do lodo, após a etapa de tratamento das águas residuárias, e pode ser classificado em métodos de secagem natural e mecânicos (WERLE; WILK, 2010). Este processo favorece a redução de volume do resíduo, tornando-o com características mecânicas próximas a de um sólido. Além disso, possibilita a redução de custos com transporte e destinação final do lodo. O processo de desidratação é selecionado de acordo com o tipo do lodo e do porte da estação de tratamento (GONÇALVES *et al.*, 2001).

O processo de secagem natural em leitos de secagem é o método mais empregado em ETEs de menores portes. Os leitos constituem-se, geralmente por paredes de alvenaria ou concreto e fundo de concreto, apresentando forma retangular. Durante as primeiras 72 horas, a drenagem é a responsável pela eliminação da grande maioria do líquido; após esse período, o lodo adquire consistência pastosa e a perda de líquido passa a ocorrer basicamente pela evaporação superficial (GONÇALVES *et al.*, 2001).

A Federação Ambiental da Água (WEF - *Water Environmental Federation*) utilizava a denominação biossólido para designar o resíduo

produzido por estações de tratamento de esgotos domésticos, quando ele era utilizado de forma útil (FERNANDES; SILVA, 1999). Atualmente, as palavras lodo de esgoto ou biossólido referem-se aos resíduos gerados nos processos de tratamento de esgoto sanitário (APARICIO *et al.*, 2009; CONAMA, n° 375/2006).

O lodo de esgoto pode ser considerado rejeito quando todas as possibilidades de tratamento e recuperação por processos tecnológicos disponíveis e economicamente viáveis não apresentam disposição final ambientalmente adequada (Lei n° 12.305/2010, artigo 3, inciso XV). Por outro lado, a denominação resíduo sólido é utilizada quando a destinação final se procede, se propõe ou está obrigada a proceder, e cujas particularidades tornam inviáveis o seu lançamento na rede pública de esgotos ou em corpos d'água, ou exijam para isso soluções técnicas ou economicamente inviáveis em face da melhor tecnologia disponível (Lei n° 12.305/2010, artigo 3, inciso XVI).

Quanto à disposição final dos produtos gerados do tratamento de esgoto, o efluente tratado deve atender a padrões legais de qualidade para ser lançado no meio ambiente e, dependendo do processo utilizado, os gases gerados são reaproveitados ou tratados e lançados na atmosfera. Quanto à destinação do lodo, ainda é um grande desafio para as empresas de saneamento, públicas ou privadas. Sendo assim, é fundamental o envolvimento de todas as questões pertinentes ao sistema de descarte para que os problemas relacionados com a poluição ambiental sejam realmente minimizados (LIMA, 2010).

As possibilidades já utilizadas para a finalidade desse resíduo foram: disposição em aterro sanitário (aterro exclusivo ou em co-disposição com resíduos sólidos urbanos); reutilização industrial como a produção de agregado leve, fabricação de tijolos, cerâmica e produção de cimento; incineração exclusiva e co-incineração com resíduos sólidos urbanos; conversão em óleo combustível; disposição oceânica; recuperação de solos degradados, uso agrícola e florestal (BETTIOL; CAMARGO, 2006).

2.2 Uso do lodo de esgoto na agricultura

O lodo de esgoto é preferencialmente destinado à agricultura por muitos países, pois promove benefícios ao solo. Além disso, é uma alternativa econômica quando comparada aos fertilizantes comerciais (MOTTA; MAGGIORE, 2013; VACA *et al.*, 2011). Entre os benefícios, a matéria orgânica que compõe o lodo de esgoto atua como condicionador do solo, pois melhora a estrutura, a estabilidade dos agregados, a densidade e a porosidade. Em solos de textura arenosa possibilita maior capacidade de retenção de água e, a longo prazo, tolerância à erosão (GALDOS *et al.*, 2009).

A matéria orgânica do lodo de esgoto é provida basicamente de excrementos humanos, sendo uma mistura complexa de gorduras, proteínas, carboidratos, lignina, celulose, material húmico e ácidos graxos. Grande parte desse material está na forma de micro-organismos vivos e mortos que proporcionam maior superfície de sorção para resíduos orgânicos hidrofóbicos (ROGERS, 1996; SILVA, 2009). Além disso, o lodo também apresenta quantidades significativas de nutrientes como nitrogênio (que pode variar entre 0% e 56%), fósforo, potássio, cálcio e magnésio que são importantes para o crescimento vegetal (MOTTA; MAGGIORE, 2013).

O solo cultivado ao ser tratado com esse resíduo pode apresentar a mesma disponibilidade de nutrientes que o solo que recebeu adubação mineral. Esse fato é observado no trabalho de Bueno (2011), que avaliou o impacto do lodo de esgoto na qualidade do solo que recebeu aplicações sucessivas desse resíduo por sete anos na cultura de milho. Estudando a produtividade no mesmo vegetal, Zuba Junio *et al.*, (2012) verificaram que o lodo de esgoto da ETE do município de Juramento, MG, ao ser aplicado no solo, favoreceu o aumento dos teores de nutrientes no solo e nas folhas do milho.

O lodo de esgoto já foi empregado em diversas culturas, como arroz, aveia, trigo, pastagens, feijão, soja, girassol, café, pêssego (BETTIOL; CAMARGO, 2006), pinhão-manso (PRATES *et al.*, 2011) entre outros. Este resíduo sólido também foi utilizado com sucesso em espécies florestais, em

especial no cultivo de eucalipto e de espécies nativas do cerrado, em que se observou a melhoria das propriedades físicas, químicas e biológicas do solo (ALVES *et al.*, 2007; COLODRO; ESPÍNDOLA, 2006). Vale ressaltar que a aplicação de lodo atualmente é restrita, para evitar contaminações à saúde, por isso a resolução nº 375/2006 do CONAMA determina a proibição do uso de qualquer classe de lodo de esgoto ou produto derivado em pastagens, cultivo de olerícolas, tubérculos, raízes, culturas inundadas e demais culturas cuja parte comestível entra em contato com o solo.

Essa resolução também estabelece condições para utilizar o lodo em solos não agrícolas, principalmente próximo à aquíferos e do domínio público (CONAMA, nº 375/2006). No entanto, esta prática é adotada por alguns países europeus (como na restauração de áreas degradadas onde ocorreram queimadas). A recuperação do solo, nestes ambientes, além de ser favorecida pela adição de nutrientes, ocorre pela ação de micro-organismos heterotróficos ali presentes. Estes degradam a matéria orgânica do lodo para obter energia e, conseqüentemente, aumentam a microbiota do meio (ANDRÉS *et al.*, 2011).

2.3 Contaminantes comuns no lodo de esgoto

Os resíduos das estações de tratamento de esgoto podem conter concentrações significativas de muitas classes de contaminantes. Isso dependerá da origem e dos processos físico-químicos envolvidos no tratamento do esgoto, que tendem a concentrar poluentes como os pesticidas, metais, patógenos (bactérias, vírus, fungos e ovos de helmintos), solventes industriais, plastificantes e poluentes orgânicos (OLUSEYI *et al.*, 2011). Essa grande variedade de compostos e organismos indesejáveis pode afetar o solo, as plantas, entrar na cadeia alimentar e atingir os animais e a saúde humana (TOBISZEWSKI; NAMIESNIK, 2012).

Os metais com densidade superior a 4 g/cm³ constituem a principal fonte inorgânica poluidora do solo e da água. Uma quantidade elevada de íons metálicos como cádmio, níquel, zinco, chumbo e cobre no solo pode diminuir o rendimento das culturas devido à toxicidade e ao risco de

bioacumulação e biomagnificação na cadeia alimentar (COSCIONE *et al.*, 2009). Podem ser introduzidos no ambiente, principalmente, através de fertilizantes, pesticidas, combustão de carvão e óleo, emissões veiculares, mineração, fundição, refinamento e incineração de resíduos urbanos e industriais (SCHWANZ *et al.*, 2008; TAVARES; CARVALHO, 1992).

A presença desses metais é analisada no trabalho de Galdos *et al.* (2009) que estudaram o efeito da aplicação de lodo de esgoto na contaminação de águas superficiais por meio da enxurrada proveniente de solo agrícola cultivado com milho. Foi observado que os volumes de água e de sedimentos perdidos por enxurrada diminuíram com a aplicação do lodo. Porém, a aplicação do resíduo aumentou a concentração de íons metálicos na água e no sedimento, especialmente do zinco que estava presente em alta concentração no lodo de esgoto utilizado.

Dos compostos orgânicos, mais de 300 produtos químicos foram identificados em lodo de esgoto. Na classe dos poluentes orgânicos emergentes (POE) está qualquer composto químico presente em diversas matrizes, que não necessitam ser persistentes para causar efeitos negativos à saúde humana e ao meio ambiente. Os mais detectados são monocíclicos aromáticos, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, bifenilas policloradas, ésteres de ácido ftálico, dibenzo-*p*-dioxinas e furanos, pesticidas organoclorados, clorobenzenos, aminas, nitrosaminas e fenóis (CAI *et al.*, 2007a). Embora sejam de importância, a maioria dos POEs não é monitorada ou ainda não possuem legislação regulatória correspondente (SILVA; COLLINS, 2011).

Os poluentes orgânicos persistentes (POPs) constituem uma classe de substâncias químicas resistentes à degradação químico-biológica. São preocupantes devido às características de semivolatilidade, baixa solubilidade em água e pressão de vapor, além da bioacumulação em tecidos humanos e animais (KATSOYIANNIS; SAMARA, 2007). Esses aspectos favorecem a persistência destes compostos no ambiente. Os POPs podem interferir no sistema endócrino, danificar o sistema imunológico, provocar o cancro, causar doenças do sistema nervoso, alterações e mutações

genéticas. Além disso, podem gerar impactos sobre os seres humanos e afetar adversamente a capacidade de procriação (WANG *et al.*, 2008).

A Resolução 375/2006 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) destaca 12 tipos diferentes de POPs, que são Aldrin, Clordano, Dieldrin, DDT (Dicloro-difenil-tricloroetano), Dioxinas, Furanos, Endrin, Heptacloro, Hexaclorobenzeno, Mirex, PCBs e Toxafeno. Essas substâncias tóxicas surgiram através de diversos processos industriais e de descarte de produtos comerciais, sendo lançados diretamente nos corpos d'água ou na rede de esgotos (SILVA; COLLINS, 2011).

2.3.1 Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs)

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) são compostos orgânicos amplamente distribuídos no ambiente e são formados por dois ou mais anéis benzênicos fundidos. Geralmente, se tornam menos solúveis em água e menos voláteis à medida que aumenta a massa molecular do composto, ou seja, aumenta o caráter hidrofóbico. Podem ser encontrados no estado líquido ou sólido, apresentam ponto de ebulição maior do que 80 °C (sob pressão atmosférica normal), baixa biodegradabilidade e elevada persistência no solo (COTTA *et al.*, 2009).

São gerados pela combustão incompleta de material orgânico durante os processos naturais ou antropogênicos. Nos processos que envolvem altas temperaturas, como a queima de combustíveis motores, geralmente são formados HPAs de massa molecular elevada. Por outro lado, na reação de combustão da madeira são produzidos os de menor massa (TOBISZEWSKI; NAMIESNIK, 2012). Quando os carbonos da combustão não são completamente oxidados a dióxido de carbono, são gerados fragmentos de hidrocarbonetos, que podem interagir entre si e produzir estruturas policíclicas complexas. Os mecanismos pelos quais ocorre esse processo são complexos e é objeto de investigação de químicos e toxicologistas (OLUSEYI *et al.*, 2011).

Nas estações de tratamento de esgoto, a maior parte dos HPAs é removida das águas residuais (até 90%), concentrando-se no lodo, devido à

baixa solubilidade em água e alta capacidade de adsorção em partículas sólidas. Como consequência, a concentração de HPAs no lodo de esgoto varia muito de alguns microgramas até várias centenas de miligramas por quilo de matéria seca, dependendo da origem das águas residuais bem como do nível de mineralização da matéria orgânica (PENA *et al.*, 2010).

As áreas urbanas são importantes fontes de HPAs devido à queima de combustíveis domésticos, emissões industriais, exaustores de carros, escoamentos superficiais de vias e deposições atmosféricas. Como consequência, as águas pluviais e residuais levam quantidades relativamente elevadas desses poluentes para os sistemas de esgoto (PENA *et al.*, 2008).

As atividades brasileiras produtoras de HPAs resultam em um total de 7.346 t/ano. A queima de lenha representa 83,8%, e as queimadas 11,1% deste total. Nos países desenvolvidos a incineração controlada de resíduos é uma das principais fontes de HPAs. Enquanto no Brasil, devido ao escasso número de incineradores instalados, esta atividade é inferior a 0,1% do total das emissões (ALMEIDA *et al.*, 2007). A TAB. 1 mostra as principais fontes emissoras de HPAs para a atmosfera no Brasil.

TABELA 1

Resumo das principais fontes emissoras de HPAs para a atmosfera no Brasil

Fontes de HPAs	Massa emitida (10⁶ g/ano de 7 HPAs)	Massa emitida (10⁶ g/ano de 16 HPAs)
Fogão a lenha	380,0	6.100,0
Lareira	6,0	32,0
Carvão	-	2,0
Queima de madeira industrial	-	36,0
Óleo combustível destilado	-	11,0
Produção primária de alumínio	41,0	140,0
Craqueamento catalítico	1,1	22,0
Produção de coque	3,3	41,0
Indústria de papel	0,4	70,0
Queimadas	310	820,0
Fumaça de cigarro (g/cigarro)	5,7	38,0
Total	747,5 t/ano	7.312 t/ano

Fonte: Adaptado de Almeida *et al.*, 2007.

Os HPAs permanecem por longos períodos no ambiente e representam um importante grupo de micropoluentes orgânicos xenobióticos, devido à alta capacidade de distribuição no meio (atmosfera, água e solo). São encontrados em matrizes ambientais como em misturas extremamente complexas contendo numerosos isômeros em uma faixa extensa de concentração (COTTA *et al.*, 2009).

Há mais de 100 tipos diferentes de HPAs, e 16 deles, como mostrado na FIG. 1, são considerados como poluentes prioritários segundo o CWA (*Clean Water Act*) da EPA (*Environmental Protection Agency*). Sua ação carcinogênica tem sido observada, principalmente, em compostos tri-, tetra-, penta- e hexacíclicos (QUEIROZ *et al.*, 2009).

O CWA da EPA classifica estes compostos em dois grupos, sendo que o primeiro é constituído por sete compostos com potencial carcinogênico, que

são: benzo[*a*]antraceno, benzo[*a*]pireno, benzo[*b*]fluoranteno, benzo[*k*]fluoranteno, criseno, dibenzo[*a,h*]antraceno e indeno[1,2,3-*c,d*]pireno). O segundo grupo compreende os nove compostos que não são poluentes isoladamente, mas podem inibir ou aumentar as respostas de outros HPAs carcinogênicos. Este grupo é composto por: acenafteno, acenaftileno, antraceno, benzo[*g,h,i*]perileno, fluoranteno, fluoreno, naftaleno, fenantreno e pireno (QUEIROZ *et al.*, 2009).

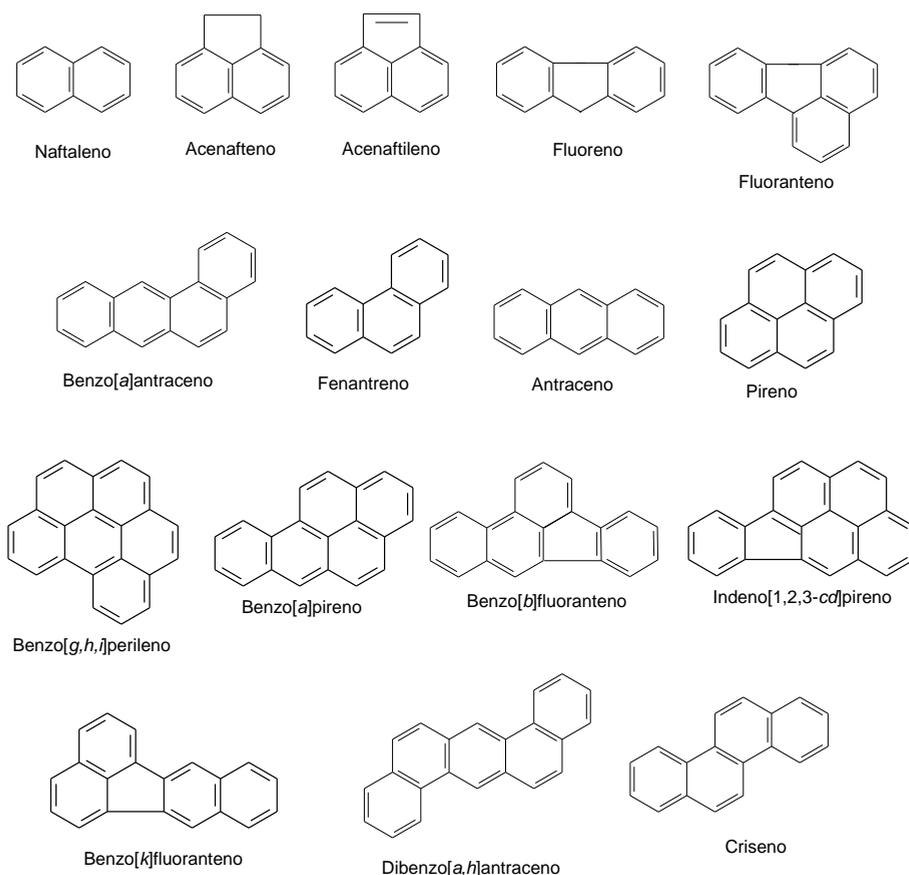


FIGURA 1- Representação das estruturas químicas dos 16 HPAs prioritários segundo a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA).

Fonte: Da autora.

2.3.2 HPAs e saúde humana

Os HPAs podem ser utilizados como indicadores do nível de poluição do meio ambiente, resultante das atividades humanas (CHUNG *et al.* 2008; ORTIZ *et al.*, 2012). A persistência dos HPAs no meio também é uma propriedade consequente da massa molecular de cada composto. Os que apresentam menor massa, como naftaleno e antraceno, são degradados facilmente, apresentando tempo de meia vida que varia de 9 a 43 dias no sedimento. Entretanto, a maioria apresenta alta lipofilicidade podendo ser facilmente bioacumulados no meio ambiente e nos tecidos de plantas e animais (ALMEIDA *et al.*, 2007).

Existem diferentes possibilidades de exposição humana aos HPAs, seja por inalação ou absorção dérmica (NETTO *et al.*, 2000). No entanto, a principal via destes poluentes tóxicos é a cadeia alimentar (KHAN; CAO, 2012). O potencial carcinogênico e mutagênico, é atribuída aos HPAs com três ou mais anéis aromáticos, pois são mais tóxicos e apresentam relevância para a saúde pública (KALF *et al.* 1995; KHAN; CAO, 2012).

O primeiro relato de câncer ocasionado pela combustão de produtos orgânicos foi publicado em 1775, na Inglaterra. O fato foi atribuído à elevada incidência de cânceres de escroto em limpadores jovens de chaminés. Mais de um século após esta publicação, a atividade carcinogênica foi atribuída ao benzo[a]pireno (NETTO *et al.*, 2000). Atualmente, sabe-se que este HPA é o carcinogênico mais potente do grupo e é comumente encontrado na fumaça dos cigarros (WANG *et al.*, 2012).

Para que se tornem mutagênicos, como o benzo[a]pireno, é necessário que os HPAs cancerígenos sofram ativação metabólica preliminar. Esta ativação é decorrente de uma pequena falha do organismo humano que ao desenvolver a capacidade de desintoxicar produtos químicos estranhos por meio de enzimas, permite que algumas moléculas de HPAs sejam convertidas em epóxidos (WANG *et al.*, 2012). Estes metabólitos são bons eletrófilos que reagem com os grupos nitrogenados das moléculas de DNA e RNA, provocando alterações no código genético, e consequentes anomalias de divisão celular, iniciando a longo prazo a carcinogênese (NETTO *et al.*,

2000). A FIG. 2 representa a formação do derivado metabólico cancerígeno do benzo[*a*]pireno.

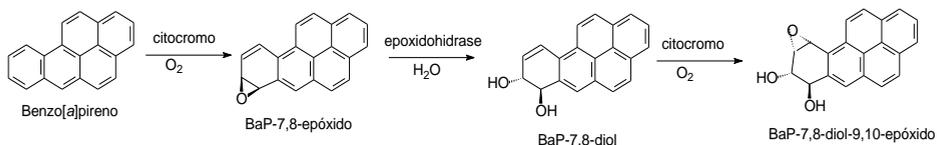


FIGURA 2- Representação esquemática simplificada do metabolismo de benzo[*a*]pireno em humanos, até a formação do derivado metabólito carcinogênico (BaP-7,8-diol-9,10-epóxido).

Fonte: Adaptado de Wang *et al.*, 2012.

Além desses problemas com a saúde, já foi observado também em estudos envolvendo ensaios biológicos *in vitro* e *in vivo* que os HPAs podem atuar como interferentes endócrinos, ligando-se aos receptores hormonais e produzir um efeito antagonista, pois estes compostos apresentarem estruturas similares aos esteróides sexuais (GHISELLI; JARDIM, 2007). E quando presentes na atmosfera podem causar problemas respiratórios, prejudicando a função pulmonar e causar bronquite (TOBISZEWSKI; NAMIESNIK, 2012; TSAPAKIS; STEPHANOU, 2005).

2.3.3 Concentrações máximas permitidas de HPAs no solo e lodo de esgoto

Devido às preocupações relacionadas aos danos ocasionados por poluentes orgânicos, as agências ambientais regulatórias dos países desenvolvidos vêm tentando estabelecer procedimentos de caracterização e controle de substâncias prejudiciais ao meio ambiente e mais especificamente à saúde humana. Atualmente, a EPA apresenta uma lista com mais de 120 poluentes prioritários e a Comissão Européia sobre Meio Ambiente estabelecem 132 compostos como sendo perigosos ao meio ambiente (SILVA; COLINS, 2011).

No Brasil, ainda não há regulamentações que estabeleçam limites máximos aceitáveis de contaminantes orgânicos no lodo de esgoto. Contudo,

na resolução nº 375 de 2006, do Conselho Nacional do Meio Ambiente, os HPAs são considerados como substâncias orgânicas potencialmente tóxicas a serem determinadas no lodo de esgoto ou produto derivado. Além disso, estabelece as concentrações máximas permissíveis de seis, dos 16 HPAs prioritários, no solo (como representado na TAB. 2).

A regulamentação da União Européia (UE) limita como 6 mg kg^{-1} a concentração máxima da massa de 11 HPAs no lodo de esgoto para uso agrícola, incluído o HPA benzo[*a*]fluoranteno, que não é classificado como poluente prioritário pela EPA, como pode ser visto na TAB. 2.

TABELA 2

Concentrações máximas permitidas de HPAs prioritários estabelecidas pela EPA, em solos agrícolas (CONAMA) e em lodo de esgoto (UE)

Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos		CONAMA (mg kg⁻¹)	UNIÃO EUROPÉIA ($\Sigma = 6 \text{ mg kg}^{-1}$)
1	Naftaleno	0,12	-
2	Acenatileno	-	.
3	Fluoreno	-	P ⁽¹⁾
4	Acenafteno	-	P
5	Fenantreno	3,3	-
6	Antraceno	-	-
7	Fluoranteno	-	P
8	Pireno	-	P
9	Criseno	-	-
10	Benzo[a]antraceno	0,025	P
11	Benzo[b]fluoranteno	-	P
12	Benzo[k]fluoranteno	0,38	P
13	Benzo[a]pireno	0,052	P
14	Dibenzo[a,h]antraceno	-	-
15	Indeno[1,2,3-c,d]pireno	0,031	P
16	Benzo[g,h,i]perileno	-	P

Nota: ⁽¹⁾P: HPAs presentes na soma dos 11 compostos que resulta no total de 6 mg Kg⁻¹.

Fonte: Resolução n°375 do CONAMA, 2006; Working document on Sludge da União Européia, 2000.

2.4 Métodos de extração e identificação dos HPAs em lodo

Para a determinação de contaminantes orgânicos em níveis baixos de concentração em amostras ambientais, comumente é seguido três importantes etapas, que consistem na (1) extração do analito de interesse da

matriz; (2) purificação dos extratos através da remoção de interferentes (*clean up*) e (3) identificação e quantificação do contaminante presente na amostra por técnicas instrumentais, como a cromatografia gasosa (CG) e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Todas estas etapas são críticas e podem influenciar nos resultados das análises (QUEIROZ *et al.*, 2009).

A extração dos HPAs de lodo é uma etapa crucial, pois estes compostos hidrofóbicos geralmente encontram-se fortemente adsorvidos na matriz. Por isso, diversos métodos analíticos, visando boas porcentagens de recuperação, foram desenvolvidos para a análise destes contaminantes. Entre os métodos tradicionais de extração de HPAs em diferentes matrizes, destacam-se a extração feita em soxhlet, ultrassonicação e agitação mecânica. Porém, estas são técnicas laboriosas e que geram grandes quantidades de resíduos de solventes que podem ocasionar problemas ambientais (PENA *et al.*, 2008).

Recentemente, técnicas rápidas que utilizam menores quantidades de solventes orgânicos e com maior sensibilidade para os analitos na matriz, como extração por fluido supercrítico (EFS), extração por solvente pressurizado (ESP) e extração por micro-ondas (EM) foram aplicadas, apesar do custo considerável dos equipamentos (CAVALCANTE *et al.*, 2008).

Em 1994, a extração realizada pelo método soxhlet (Soxtec, comercialmente) foi aprovado pela EPA como um método padrão para a extração de compostos orgânicos semivoláteis e não-voláteis de matrizes sólidas (ZULOAGA *et al.*, 2012). A extração é realizada em três etapas: ebulição, lavagem e recuperação do solvente (CAI *et al.*, 2007a). Nessa técnica é comum o uso de solventes como o tolueno, hexano ou acetona e tem sido muitas vezes preferida por ser uma técnica padronizada, com recuperações aceitáveis, se comparadas com técnicas como extração assistida por micro-ondas (EM), extração por solvente pressurizado (ESP) e particularmente extração por fluido supercrítico (EFS). Dependendo do solvente utilizado, pode-se gastar mais tempo com a extração (QUEIROZ *et al.*, 2009).

A extração por ultrassom ocorre em curto espaço de tempo e oferece boa recuperação dos analitos, quando comparada com a extração por Soxhlet e a agitação mecânica, uma vez que há o uso de um equipamento simples e de fácil operação. Para melhorar a recuperação obtida, usa-se um solvente polar, como acetona ou metanol, minimizando-se, assim, a necessidade da secagem das amostras antes da extração (COTTA *et al.*, 2009).

A TAB. 3 mostra uma comparação geral dos parâmetros previamente publicados das técnicas de extração para a determinação de HPAs em amostras de lodo de esgoto (PENA *et al.*, 2008).

TABELA 3

Dados comparativos dos métodos descritos na literatura para a determinação de HPAs no lodo de esgoto

Parâmetros	Soxhlet	Soxhlet	Ultrassom	EFS ⁽¹⁾	ESP ⁽²⁾	EM ⁽³⁾
Amostra (g)	1,0	2,5	1,0	1,0	2,5	0,2
Fase extratora	Tolueno	Hex-DCM (1:1) ⁽⁴⁾	Metanol	CO ₂ (5%Tolueno)	Hex-DCM (1:1)	Hexano
Volume de Solvente	80 mL	150 mL	50 mL	11.5 mL	60 mL	10 mL
Tempo de extração	8h	18h	25 min	40 min	20 min	23 min
Clean up	-	SPE+ CPG ⁽⁵⁾	SPE ⁽⁶⁾	-	EFS+ CPG	EFS
Determinação	CLAE-Flu	CG-EM/EM ⁽⁷⁾	CLAE-Flu ⁽⁷⁾	CLAE-Flu	CG-EM/EM	CLAE-Flu
Eficiência (%)	63-99	66-92	50-99	35-95	60-93	91-101

Notas: ⁽¹⁾Extração por fluido supercrítico; ⁽²⁾Extração por solvente pressurizado; ⁽³⁾Extração por micro-ondas; ⁽⁴⁾Diclorometano-hexano; ⁽⁵⁾Extração em fase sólida e cromatografia de permeação em gel; ⁽⁶⁾Extração em fase sólida; ⁽⁷⁾Cromatografia gasosa/espectrometria de massas; ⁽⁸⁾Cromatografia líquida de alta eficiência e detecção por fluorescência; ⁽⁹⁾Valores associados com processos de evaporação de solvente, foram tidos em conta para o cálculo de recuperação.

Fonte: Adaptado de Pena *et al.*, 2008.

A extração sólido-líquido e purificação em baixa temperatura (ESL-PBT) é uma técnica recente e promissora que foi desenvolvida para simplificar a etapa de *clean up*. O método consiste na adição de fase extratora à amostra na proporção 2:1. Em seguida, o sistema é homogeneizado e resfriado. Geralmente, a fase extratora utilizada é composta por solventes orgânicos miscíveis e com temperatura de congelamento inferior à água. O *clean up* ocorre quando o material sólido é aprisionado na fase aquosa congelada. Os analitos migram, preferencialmente, para a fase orgânica, a qual é isolada e depois analisada (GOULART *et al.*, 2012; VIEIRA *et al.*, 2007).

Esta técnica é vantajosa por ser simples e utilizar menor quantidade de solventes orgânicos, permitindo a quantificação de compostos em nível de partes por bilhão (JUHLER, 1997). Utilizando esse mesmo princípio, Goulart (2004) desenvolveu uma metodologia, para a extração e análise de deltametrina e cipermetrina em leite. Posteriormente, foi utilizada para outras matrizes, como análise de agrotóxicos em amostras de água (SILVÉRIO *et al.*, 2012; VIEIRA *et al.*, 2007), batata, mel (PINHO *et al.*, 2010a), sulfonamidas em fígado suíno (LOPES, *et al.*, 2011) e benzodiazepinas em urina humana (MAGALHÃES *et al.*, 2012).

A complexidade da matriz pode ocasionar dificuldades para a quantificação dos analitos, sendo necessária a realização de uma etapa de purificação (*clean up*) do extrato, após a extração com solvente. Essa etapa reduz as interferências e o efeito-matriz, além de garantir a manutenção do sistema cromatográfico (PICÓ *et al.*, 2004; PRESTES *et al.*, 2009). A eficiência do processo depende da solubilidade dos compostos no eluente e do tipo de interação do analito com a matriz e com o adsorvente (como a sílica, e sílica ligada ao grupo octadecila (C-18) e ao octila C-8) utilizado na dispersão da amostra (PINHO *et al.*, 2009).

Os principais métodos de limpeza de extratos provenientes de lodo de esgoto são: a eliminação de enxofre, a extração em fase sólida (SPE), a extração com permeação em gel e a combinação de extração e *clean-up* na extração com líquido pressurizado (ZULOAGA *et al.*, 2012). A EFS é o método mais utilizado, no qual o extrato líquido é vertido em cartuchos

contendo adsorvente apropriado e, em seguida, é realizada a eluição dos compostos com solvente (SILVA; COLLINS, 2011). Embora a SPE apresente vantagens em relação aos métodos clássicos, tais como praticidade e sensibilidade, esta técnica apresenta algumas limitações, pois, dependendo da interação do analito com o adsorvente, é necessário o uso de solventes tóxicos para a dessorção (BARRIONUEVO; LANÇAS, 2001).

A identificação e quantificação de compostos orgânicos voláteis e semi-voláteis encontrados no lodo de esgoto, frequentemente, é realizada por cromatografia gasosa (CG). Acoplado ao CG, o detector de ionização em chamas (DIC) pode ser utilizado para a determinação de HPAs e hidrocarbonetos alifáticos, porém o detector de espectrometria de massas (EM) é a técnica preferida, pois possibilita limites de detecção em níveis de ng g^{-1} (ZULOAGA *et al.*, 2012).

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) também é utilizada para a análise de compostos no lodo, pois as colunas de fase reversa possibilitam a separação de grande número de compostos orgânicos (MORET; CONTE, 2000). Os detectores de absorção espectrofotométrica na faixa do ultravioleta (UV) e por fluorescência são comumente utilizados nos equipamentos de CLAE para análise de compostos que absorvem na região do ultravioleta ou são fluorescentes, como os HPAs (SILVA ; COLLINS, 2011). Villar *et al.*, (2004) fizeram uma comparação entre os detectores de arranjo de diodos (DAD) e fluorescência e os resultados foram satisfatórios na análise de HPAs em lodo de esgoto. Além disso, estes detectores são preferíveis por se tratarem de equipamentos de mais baixo custo quando comparados com CLAE-EM.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Otimizar e validar a metodologia extração sólido-líquido e purificação a baixa temperatura (ESL-PBT) para a extração e quantificação de 16 hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em amostras de lodo de esgoto provenientes da estação de tratamento de esgoto de Juramento, Minas Gerais.

3.2 Objetivos Específicos

- Estabelecer as condições para a determinação simultânea de 16 HPAs (benzo[*a*]antraceno, benzo[*a*]pireno, benzo[*b*]fluoranteno, benzo[*k*]fluoranteno, criseno, dibenzo[*a,h*]antraceno, indeno[1,2,3-*c,d*]pireno, acenafteno, acenaftileno, antraceno, benzo[*g,h,i*]perileno, fluoranteno, fluoreno, naftaleno, fenantreno e pireno) por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e detector UV-visível;
- Otimizar a quantificação dos HPAs em amostras de lodo na Extração Sólido – Líquido e Purificação em Baixa Temperatura (ESL-PBT); e
- Realizar a técnica de referência, soxhlet, e comparar os resultados obtidos com a metodologia otimizada.

CAPÍTULO 2- OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DA TÉCNICA EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO E PURIFICAÇÃO EM BAIXA TEMPERATURA PARA HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS EM LODO DE ESGOTO

RESUMO

Foi otimizado um procedimento analítico simples e de baixo custo para a identificação e quantificação de 16 HPAs em amostras de lodo de esgoto coletadas em estação de tratamento de efluentes. O método é baseado na extração sólido-líquido e purificação em baixa temperatura (ESL-PBT) utilizando acetonitrila e acetato de etila como mistura extratora. Diferentes parâmetros de otimização foram avaliados: procedimento de homogeneização, influência do pH, força iônica e *clean up* dos extratos. Os extratos foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de ultravioleta (CLAE-UV). A complexidade da matriz resultou em porcentagens de recuperação superiores a 63,4% para 11 HPAs. Os coeficientes de determinação das curvas analíticas foram superiores a 0,99 e os limites de detecção e de quantificação foram inferiores a 0,06 e 0,15 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente. Os limites obtidos no método otimizado foram abaixo das concentrações máximas de HPAs aceitáveis pela União Européia. As características analíticas da ESL-PBT foram comparadas com a técnica referência soxhlet para extração de HPAs em matrizes sólidas.

Palavras-chave: Biossólidos. Contaminantes Orgânicos. Métodos de Extração. CLAE-UV.

CHAPTER 2- OPTIMIZATION AND VALIDATION OF THE SOLID-LIQUID EXTRACTION TECHNIQUE AND LOW TEMPERATURE PURIFICATION FOR POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS IN SEWAGE SLUDGE

ABSTRACT

A simple and low cost analytical procedure was optimized for the identification and quantification of 16 PAHs in samples of sewage sludge collected at wastewater treatment plant. The method is based on solid-liquid extraction and purification at low temperature (SLE-PLT) using acetonitrile and ethyl acetate as extraction mixture. Different optimization parameters were evaluated: homogenization procedure, influence of pH, ionic strength and clean-up of extracts. The extracts were analyzed by high performance liquid chromatography coupled with UV detector (HPLC-UV). The complexity of the matrix resulted in recovery percentages above 63.4% to 11 PAHs. The coefficients of determination of standard curves were greater than 0.99 and the limits of detection and quantification were less than 0.06 and 0.15 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectively. The limits obtained in the optimized method were below the maximum concentrations of PAHs accepted by the European Union. The analytical characteristics of SLE-PLT were compared with soxhlet reference technique for extraction of PAHs in solid matrices.

Keywords: Biosolids. Organic Contaminants. Extraction Methods. HPLC-UV.

1 INTRODUÇÃO

Lodo de esgoto é um resíduo sólido gerado após o tratamento das águas residuárias nas Estações de Tratamento de Esgotos (ETEs). Esse material é um substrato adequado a terrenos agrícolas e florestais (ZHAI *et al.*, 2011). Porém, os processos físico-químicos envolvidos no tratamento do esgoto tendem a concentrar contaminantes neste resíduo, como os poluentes orgânicos emergentes (PENA *et al.*, 2008). Entre estes, os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) constituem a classe dos compostos formados por dois ou mais anéis aromáticos fundidos (SANCHEZ-BRUNETE *et al.*, 2007).

A Agência de Proteção Ambiental Americana (EPA) classifica 16 HPAs como prioritários. Essa classificação envolve tanto aqueles que podem ser potencialmente cancerígenos ou mutagênicos, quanto aqueles que podem atuar inibindo ou aumentando as respostas de outros HPAs carcinogênicos (QUEIROZ *et al.*, 2009). A contaminação humana através do lodo pode ocorrer por contato ou pelo destino final inadequado dos resíduos, que contamina o solo, a água, a biota e o ar (NETTO *et al.*, 2000; TOBISZEWSKI; NAMIESNIK, 2012). Entre as normas internacionais, a mais adotada é a da União Europeia que define 6 mg kg^{-1} de massa seca, a concentração máxima aceitável de 11 HPAs em lodo de esgoto para uso agrícola (PENA *et al.*, 2010).

A Resolução Brasileira nº 375 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA, 2006) estabelece concentrações máximas toleráveis em mg kg^{-1} , no solo, para os seguintes HPAs: Benzo[*a*]antraceno (0,025), Benzo[*a*]pireno (0,052), Benzo[*k*]fluoranteno (0,38), Indeno[1,2,3-*c,d*]pireno (0,031), Naftaleno (0,12) e Fenantreno (3,3).

Para a análise de HPAs, a extração é a etapa crucial, pois são hidrofóbicos e encontram-se fortemente adsorvidos na matriz de lodo. Entre os métodos de extração, o soxhlet foi adotado pela EPA, em 1994, como técnica padrão para extrair compostos orgânicos semivoláteis e não voláteis de matrizes sólidas, como o lodo de esgoto (ZULOAGA *et al.*, 2012). Porém,

este procedimento exige longos períodos de extração (6 a 24 h) e elevado volume de solventes orgânicos (OLUSEYI *et al.*, 2011).

Apesar do custo considerável, novas alternativas têm sido utilizadas, como o ultrassom, agitação mecânica, fluido supercrítico, solvente pressurizado e micro-ondas (ZULOAGA *et al.*, 2012). Recentemente, a extração sólido-líquido e a purificação em baixa temperatura (ESL-PBT) têm sido adotadas para análise de agrotóxicos em diversas matrizes alimentares como água (VIEIRA *et al.*, 2007), mel (PINHO *et al.*, 2010a) e algumas matrizes gordurosas (MARTHE *et al.*, 2010). O método consiste na adição de solvente orgânico à amostra, que é homogeneizada e colocada a -20 °C até que ocorra a formação de um sistema bifásico. Os analitos de interesse migram para a fase orgânica líquida por afinidade (PINHO *et al.*, 2010a).

O *clean up* dos extratos visa minimizar a presença de interferentes, bem como as substâncias lipídicas em amostras de lodo. A extração em fase sólida, a cromatografia de permeação em gel e colunas de imunoafinidade são comumente empregadas para análises de HPAs (PENA *et al.*, 2008). Os adsorventes mais utilizados são a sílica e alumina (EPA), associadas a solventes apolares na eluição destes compostos (CAVALCANTE *et al.*, 2008).

As etapas de separação e detecção de HPAs em amostras sólidas são descritas no método 8310 da EPA, usando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção no ultravioleta (UV) e fluorescência (COTTA *et al.*, 2009). Devido às colunas de fase reversa o CLAE pode separar um grande número de isômeros de HPAs, que são difíceis na cromatografia gasosa (CG). No entanto, a CG acoplada à espectrometria de massas (método 8100) confere melhor eficiência na resolução de compostos com menor massa molecular (MORET; CONTE, 2000).

Neste trabalho foi otimizada e validada a ESL-PBT por ser um método prático, de baixo custo e que utiliza menor volume de solventes que os métodos tradicionais. A técnica foi aplicada para a determinação de 15 HPAs prioritários, por CLAE UV, em lodo de esgoto e comparada à técnica de referência soxhlet.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostras de lodo

Amostras de lodo de esgoto utilizadas para otimizar o método foram obtidas do leito de secagem da estação de tratamento de esgoto de Juramento (MG, Brasil) que recebe apenas águas residuais de origem urbana. As amostras foram peneiradas em tamiz com tela de 1 mm, e em seguida, armazenadas na geladeira em frascos de vidro com tampa.

A umidade do lodo foi avaliada por gravimetria após secagem de 2,00 g da amostra em estufa a 105°C por 3,5 horas (PENA *et al.*, 2008). O teste foi realizado com cinco repetições.

2.2 Reagentes e Soluções

Soluções padrão estoque, de concentração 500 mg L⁻¹, foram preparadas individualmente. Entre os 16 HPAs, sete com grau de pureza superior a 91,4% (m/m) foram preparados em acetonitrila (Acenafteno, Acenaftileno, Antraceno, Fenantreno, Fluoranteno, Naftaleno e Pireno), e nove com grau de pureza superior a 96,0% (m/m) (Benzo[*a*]antraceno, Benzo[*a*]pireno, Benzo[*b*]fluoranteno, Benzo[*g,h,i*]perileno, Benzo[*k*]fluoranteno, Criseno, Dibenzo[*a,h*]antraceno, Fluoreno e Indeno[1,2,3-*c,d*]pireno) foram preparadas em diclorometano.

A partir das soluções estoque, foi preparada uma solução de trabalho em acetonitrila, contendo os 16 HPAs com concentração de 25,0 mg L⁻¹, exceto o acenafteno que foi diluído para 5,0 mg L⁻¹. Para evitar a fotodegradação dos HPAs, todas as soluções foram armazenadas em frascos âmbar a 4°C na geladeira (SANCHEZ-BRUNETE *et al.*, 2007).

Os 16 padrões de HPAs foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Acetonitrila, metanol, isopropanol, diclorometano e acetato de etila grau CLAE-UV foram obtidos da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil). Cloreto de sódio anidro (≥ 99%) também da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil). Na etapa de *clean up* foram avaliados os adsorventes: Florisil da Mallinckrodt Chemicals

(Estados Unidos), Carvão ativo da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil), C18 da Fluka (Estados Unidos) e sílica-gel de Carvalhaes (Alemanha).

2.3 Equipamentos

Foi utilizado o aparelho de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) ProStar 325 da Varian, equipado com duas bombas ProStar 210-218, injetor manual com alça de injeção de 20 μL e detector de UV-visível. Para a separação dos 15 HPAs, utilizou-se uma coluna analítica de fase reversa da Varian C-18 (150 mm x 4,60 mm e partículas de 5 μm).

Para o preparo de amostras utilizou-se: (1) banho ultrassônico da Unique (São Paulo, Brasil); (2) mesa agitadora da Nova Ética (São Paulo, Brasil) a 175 oscilações por minutos; (3) vórtex da Phoenix (São Paulo, Brasil). Além disso, espectrofotômetro Cary 60 (Mulgrave, Austrália) e pHmetro microprocessado da Quimis (São Paulo, Brasil).

2.4 Condições Cromatográficas

Acetonitrila (ACN) e água Milli-Q foram utilizadas como fase móvel para as análises cromatográficas. O gradiente de eluição iniciou com 78% de ACN e fluxo de 1 mL min^{-1} durante oito minutos. Em sequência, entre oito e 12 minutos houve uma rampa linear até 100% de ACN e rampa decrescente de fluxo para 0,5 mL min^{-1} . A condição permaneceu até 18 minutos, e seis minutos seguintes foram necessários para estabelecer o equilíbrio da coluna na condição inicial. A temperatura de análise foi mantida a 22° C e o detector foi programado para operar em 224 nm.

2.5 Otimização da ESL-PBT

2.5.1 Parâmetros de otimização

Foram otimizadas as seguintes variáveis para a metodologia proposta: composição da fase extratora, procedimento de homogeneização, influência do pH, alteração da força iônica e *clean up* como representado na TAB.1.

TABELA 1

Variáveis avaliadas no processo de otimização univariada da ESL-PBT de HPAs em amostras de lodo de esgoto

Variáveis	Níveis
Força Iônica	2,3 mL de água 2,3 mL + 0,1 g de NaCl
pH	3,00; 7,00 e 11,00
Fase Extratora (8 mL)	Acetonitrila (ACN) Acetonitrila/Diclorometano (5mL/3mL) Acetonitrila/Acetato de etila (7mL/1mL) Acetonitrila/Acetato de etila (6mL/2mL) Acetonitrila/Acetona (6mL/2mL) Isopropanol/Hexano (6,5mL/1,5mL)
Homogeneização	Vórtex (1 e 5 minutos) Ultrassom (10 minutos) Mesa agitadora (40°C por 40 minutos)
<i>Clean up</i>	Sílica gel, Florisil, C18 e Carvão ativo

Fonte: Da autora.

2.5.2 Procedimento

Para a otimização da técnica de ESL-PBT, amostras de lodo de esgoto foram fortificadas com 100,0 μL da solução de trabalho contendo 16 HPAs e deixadas em repouso por três horas. À amostra fortificada, foram adicionados 2,3 mL de fase aquosa (TAB.1) e 8,0 mL de mistura extratora (TAB.1). O sistema foi homogeneizado (TAB.1) e, em seguida, mantido a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 1 hora para o completo congelamento da fase aquosa.

A fase líquida do sistema bifásico foi vertida em uma coluna de vidro (20 cm x 1,5 cm diâmetro interno) contendo adsorvente (TAB.1). O fluxo foi controlado para $0,5\text{ mL min}^{-1}$ e utilizou-se acetonitrila como eluente. Os extratos obtidos foram recuperados em balão de 5,0 mL. Em seguida, 0,3 mL foram filtrados em membrana de *nylon* $0,45\text{ }\mu\text{m}$ e armazenados a 4°C até o momento das análises por CLAE-UV.

2.6 Extração por soxhlet

Uma massa de 20,0 g das amostras de lodo foram fortificadas, deixadas em repouso e submetidas à dessulfuração por meio da adição de cobre ativado em ácido clorídrico a 10% (v/v). A extração e limpeza dos extratos foram conduzidas com base no protocolo sugerido pela EPA (métodos 3540C, 3630) e Cai *et al.*, (2007b). As amostras foram transferidas para cartuchos de celulose, e submetidas à extração em soxhlet, durante 24 h com 250 mL de acetona /diclorometano (1:1, v/v) a $80,0\text{ }^{\circ}\text{C}$. Os cartuchos foram previamente lavados seguindo o mesmo procedimento no soxhlet.

Os extratos foram recuperados em 5,00 mL no evaporador rotatório ($55,0\text{ }^{\circ}\text{C}$). Para a limpeza, o concentrado foi vertido em uma coluna de vidro (25 cm x 1,5 cm de diâmetro interno) empacotada com 3,00 cm de alumina, seguida por 10,0 cm de sílica e 2,00 cm sulfato de sódio anidro. Posteriormente, 20,0 mL de diclorometano foram utilizados para a eluição. A fração recolhida foi concentrada e recuperada para 0,50 mL em acetonitrila.

2.7 Validação do Método

Os parâmetros analíticos da ESL-PBT como seletividade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), linearidade do método, precisão e exatidão foram avaliados conforme sugerido pelo protocolo da principal agência regulatória do Brasil (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial - INMETRO, 2010).

A análise de variância e o teste de amplitudes múltiplas de Duncan (em nível de 5% de probabilidade) foram realizados para verificar a existência de diferenças significativas entre as variáveis otimizadas.

2.8 Avaliação do efeito de matriz

Para avaliar o efeito de matriz nas análises por CLAE-UV foram construídas duas curvas analíticas contendo os 16 HPAs, sendo uma em solvente puro (ACN) e outra no extrato da matriz. Das curvas analíticas foram obtidas as equações da reta por regressão linear utilizando o método dos mínimos quadrados. Os efeitos produzidos pelos componentes da matriz foram avaliados pela razão entre os coeficientes angulares obtidos de cada HPA na matriz e os coeficientes angulares obtidos em acetonitrila.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Condições Cromatográficas

As condições cromatográficas otimizadas com gradiente de fluxo e de fase móvel permitiram melhor resolução dos sinais e a separação de 14 dos 16 HPAs. Os tempos de retenção de cada composto estão representados na TAB. 2. Apenas os analitos 9 e 10 não foram separados de forma eficiente, pois co-eluíram, como mostrado no GRAF. 1. Resultados semelhantes foram encontrados por Liu *et al.*, (2003) e Kumari *et al.*, (2012).

TABELA 2

Tempo de retenção dos 16 HPAs em acetonitrila por meio de gradiente no CLAE-UV

	HPAs	t_r⁽¹⁾ (min)
1	Naftaleno	3,57
2	Acenaftileno	3,88
3	Fluoreno	4,77
4	Acenafteno	5,01
5	Fenantreno	5,32
6	Antraceno	5,73
7	Fluoranteno	6,72
8	Pireno	7,55
9/ 10	Criseno/ Benzo[a]antraceno	9,39
11	Benzo[b]fluoranteno	12,21
12	Benzo[k]fluoranteno	12,51
13	Benzo[a]pireno	13,23
14	Dibenzo[a,h]antraceno	14,23
15	Indeno[1,2,3-c,d]pireno	15,92
16	Benzo[g,h,i]perileno	16,33

Nota: ⁽¹⁾ t_r: tempo de retenção.

Fonte: Da autora.

O comprimento de onda 224 nm foi determinado espectrofotometricamente para cada solução de 5,00 mg L⁻¹ de HPA apresentando absorvância similar para maior parte destes. Esse comprimento de onda também foi adotado em trabalhos anteriores (COTTA *et al.*, 2009; SOUZA, 2008).

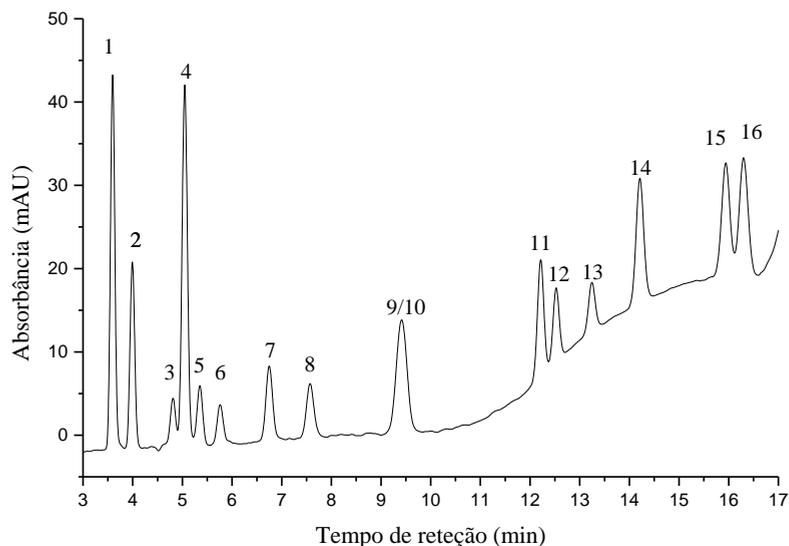


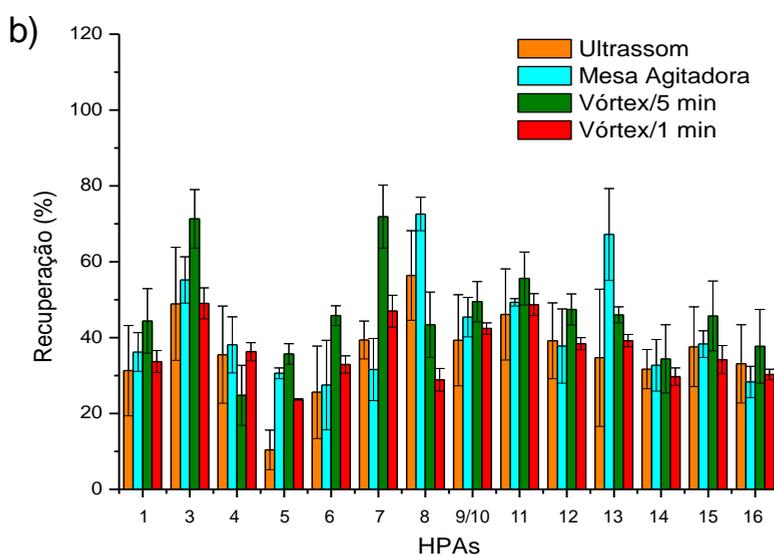
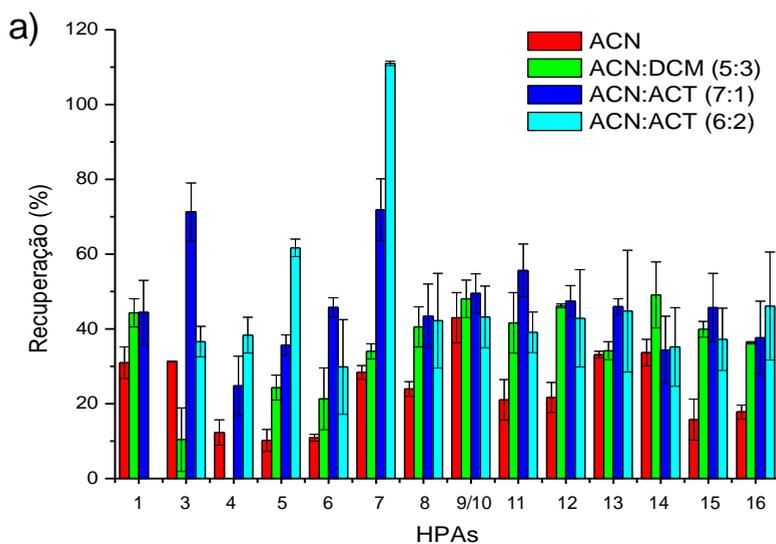
GRÁFICO 1- Representação do cromatograma da solução padrão dos 16 HPAS (TAB. 2) em ACN a 500 ppb.

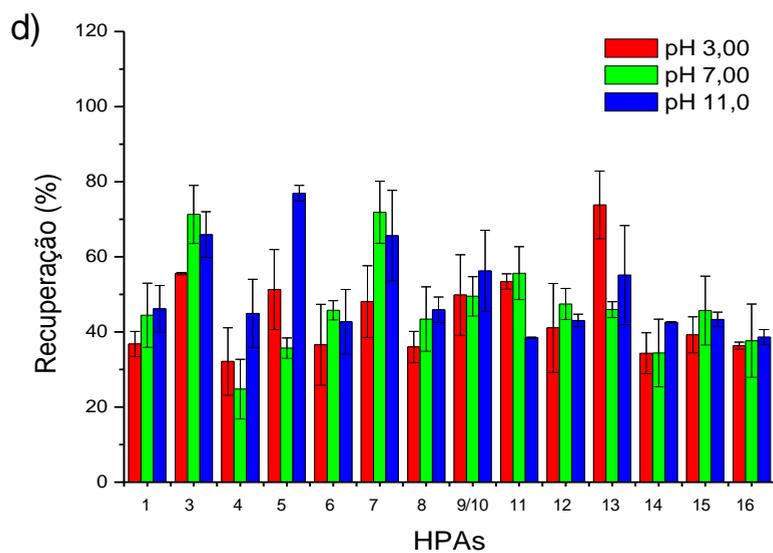
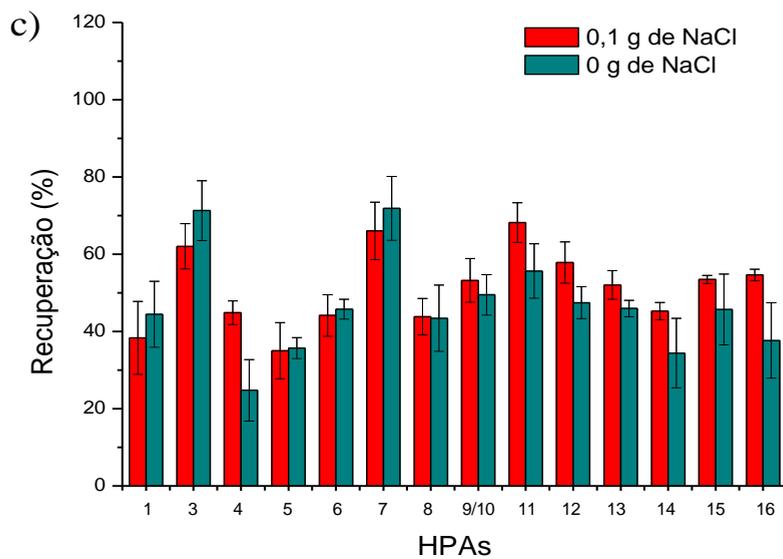
Fonte: Da autora.

Nessas condições cromatográficas, os HPAs de menor cadeia (compostos 1 a 8) foram separados em oito minutos com a proporção de fase móvel com 22,0% de água e 78,0% de acetonitrila. Já os HPAs 11 a 16 foram separados com a fase móvel constituída de 100% de ACN e redução da taxa de fluxo da fase móvel. Os compostos 9 e 10 foram estudados como um único sinal na otimização do método. Entretanto, uma condição especial foi desenvolvida para confirmar a presença de cada um e quantificá-los individualmente. Solução padrão contendo apenas estes dois analitos foram analisados por CLAE-UV, com fluxo isocrático de $1,40 \text{ mL min}^{-1}$ e 100% de ACN, sendo que criseno e benzo[*a*]antraceno apresentaram tempo de retenção de 1,30 e 2,22 minutos, respectivamente. Trabalhos anteriores têm relatado a dificuldade em analisar HPAs por CLAE utilizando colunas cromatográficas com 15 cm de comprimento, pois mostraram a separação e quantificação de apenas 12 dos 16 HPAs (LIU *et al.*, 2003; SOUZA *et al.*, 2008).

3.2 Otimização da ESL-PBT

As porcentagens de extração de 15 HPAs em cada uma das condições otimizadas são mostrados no GRAF. 2a-e. O HPA 2 (acenaftileno) foi excluído das análises por apresentar tempo de retenção igual a um interferente extraído da matriz lodo de esgoto e que apresentou um sinal intenso.





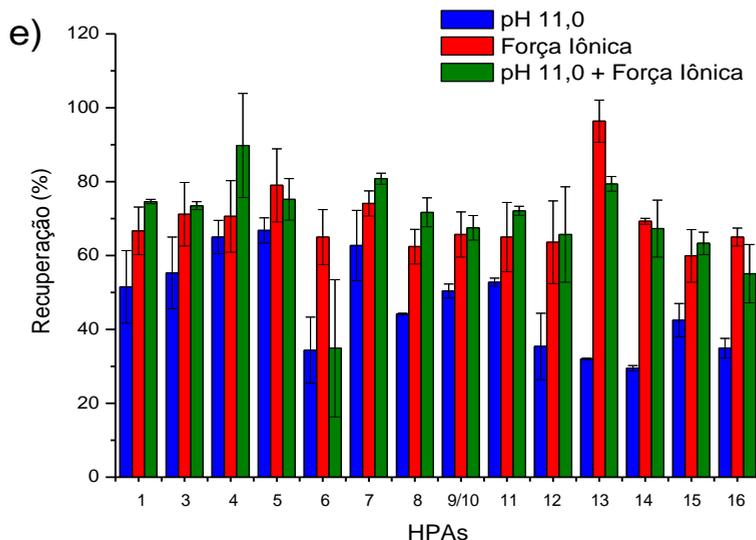


GRÁFICO 2- Porcentagens de extração obtidas da ESL-PBT para 15 HPAs (TAB. 1): a) fase extratora com os solventes: acetonitrila (ACN), diclorometano (DCM), acetato de etila (ACT); b) homogeneização; c) Força iônica (0 g e 0,1 g de NaCl); d) influência do pH; e) Comparação entre pH 11,0, força iônica (0,1 g de NaCl) e a combinação dos fatores: força iônica + pH 11,0.

Fonte: Da autora.

3.2.1 Fase Extratora

Trabalhos anteriores têm mostrado que a técnica de ESL-PBT apresenta maior eficiência de extração quando a proporção fase extratora: água for igual a 8,00 mL : 4,00 mL (PINHO *et al.*, 2010a). No teste de umidade, as amostras de lodo apresentaram 42,5 % (m/m) de água, por isso 2,30 mL de água foram adicionados às amostras.

O princípio da técnica consiste na formação de fase única entre a fase orgânica e fase aquosa com rompimento do equilíbrio apenas pelo abaixamento da temperatura. Entretanto, foi observada separação de fases

nas condições ambientes devido à complexidade da matriz avaliada. Dessa forma, as proporções de fase extratora, representados no GRAF. 2-a, foram baseadas na solubilidade destas na fase móvel (22,0 % de água e 78,0 % de acetonitrila). A partir deste princípio, seis proporções de solventes orgânicos foram avaliadas, como mostrado na TAB. 1.

As misturas isopropanol:hexano e acetona:acetonitrila não foram representadas por extrair um número significativo de interferentes com tempo de retenção igual ao de vários HPAs. Acetonitrila proporcionou recuperação inferior a 43,0% ($DPR \leq 6,69$) dos analitos de interesse, possivelmente devido ao acentuado caráter polar deste solvente. Os HPAs possuem estruturas químicas com anéis aromáticos fundidos, sendo que os de massas moleculares menores (2 a 4 anéis aromáticos) apresentam menor caráter lipofílico em relação aos de maiores massas moleculares (CAVALCANTE *et al.*, 2008). Por isso foi estudado o uso de misturas de solventes orgânicos.

Fase extratora constituída por diclorometano e hexano tem sido relatada em trabalhos anteriores para extração de HPAs (PENA *et al.*, 2010; ZHAI *et al.*, 2011). No entanto, a fase extratora constituída por acetonitrila:diclorometano proporcionou extrações inferiores a 49,0% ($DPR \leq 8,7\%$). Além disso, o HPA 3 não foi detectado.

A mistura acetonitrila e acetato de etila (7:1) proporcionou porcentagens de extração entre 25,0 ($\pm 7,9$) e 72,0% ($\pm 8,2$) na ESL-PBT. Além disso, apresentou menores valores de desvio padrão (≤ 10) e menor elevação da linha de base. O acetato de etila tem sido utilizado para determinação de HPAs em diferentes matrizes como salmão (FORSEBERG *et al.*, 2011) e aguardente (BETTIN ; FRANCO, 2005). Este solvente apresenta caráter apolar e favorece a extração dos HPAs de maior cadeia carbônica (HPAs n° 9, 10, 11 e 15), enquanto que a acetonitrila favorece a extração dos demais HPAs (n° 1, 3, 4, 5 e 6).

3.2.2 Homogeneização

Os resultados obtidos nos procedimentos de agitação estão representados no GRAF. 2-b. A homogeneização em vórtex por um minuto e

em banho ultrassônico não apresentaram resultados satisfatórios, pois foram inferiores a 56,0% para os 15 HPAs. Embora a mesa agitadora com aquecimento (40°C) tenha favorecido significativamente a extração dos compostos 8 e 13, o modo de homogeneização por vórtex durante 5 minutos possibilitou maiores porcentagens de extração para 11 compostos estudados, com porcentagens variando entre 35,0 ($\pm 2,7$) a 72,0% ($\pm 8,3$).

3.2.3 Força Iônica

A substituição de 2,30 mL de água destilada por igual volume de solução aquosa de NaCl (0,1 g) na técnica de ESL-PBT favoreceu a extração dos HPAs de cadeia carbônica maior (HPAs n° 4, 11, 12, 13, 14, 15 e 16), que se encontravam fortemente adsorvido na matriz (teste de Duncan em nível de 5% de probabilidade). Os resultados estão representados no GRAF. 2-c. Esse efeito positivo é devido à solvatação dos íons pelas moléculas de água, que facilita a migração dos HPAs para a fase orgânica (efeito *salting out*).

3.2.4 Influência do pH

A adição de 2,30 mL de solução aquosa em pH 3,00, favoreceu a extração de apenas um composto analisado (12), como mostrado no GRAF. 2-d. No entanto, a adição de 2,3 mL de solução aquosa em pH 11,0, elevou a porcentagem de extração, em média 20,1%, dos HPA 4, 5 e 14 quando comparados ao pH 7,00 ($p \leq 0,05$). Resultados semelhantes foram encontrados na técnica de dispersão da matriz em fase sólida em meio básico, também para extração de HPA em amostras de lodo de esgoto, com aumento nas extrações de 20,0 a 60,0% (PENA *et al.*, 2008). Nessa condição de pH, ácidos graxos presentes na matriz são mais solúveis em água e, conseqüentemente, menor extração de interferentes e maior extração dos compostos de interesse.

3.2.5 Combinação dos fatores

Após a otimização univariada dos parâmetros homogeneização, força iônica e pH, as melhores condições foram combinadas (vórtex 5 minutos e 2,30 mL de solução salina em pH 11,0) e as porcentagens de extração obtidas para os 15 HPAs variaram de 35,0 a 90,0% (os resultados estão apresentados no GRAF. 2-e). Este ensaio possibilitou aumento significativo (teste de Duncan em nível de 5% de probabilidade) na recuperação de 60% dos HPAs em estudo.

3.3 *Clean up* dos Extratos

Os adsorventes carvão, sílica, florisil e C-18 são tradicionalmente utilizados para limpeza de extratos de matrizes como o lodo de esgoto (ZULOAGA *et al.*, 2012). O carvão ativado favoreceu a obtenção de extratos incolores. Entretanto, foi verificada redução expressiva na porcentagem de recuperação dos HPAs, devido ao forte caráter adsortivo do carvão. Resultados semelhantes foram relatados na literatura, com redução de 56,0 a 95,0% dos analitos no lodo de esgoto (OLESZCZUK *et al.*, 2012). Florisil, sílica gel e C18 apresentaram pouca diferença no *clean up* dos extratos. Sendo assim, optou-se pela sílica, pois seu custo é significativamente menor, além de ser o adsorvente recomendado pela EPA para *clean up* de extratos em análise de HPAs.

A massa do adsorvente foi determinada eluindo os extratos de amostras de lodo isentos de HPAs (brancos) na coluna contendo as massas de 0,50; 1,00; 1,50 e 2,00 g de sílica. Os eluentes foram analisados em espectrofotômetro na região de 190 a 280 nm do UV/visível, como mostra o GRAF. 3. Os resultados indicaram que o aumento da massa de sílica favoreceu a limpeza dos extratos de lodo obtidos pela ESL-PBT, pois 2,00 g apresentou menor absorbância dos componentes da matriz. Maior quantidade de adsorvente aumenta a superfície de contato e retenção de interferentes polares presentes nos extratos (VILLAR *et al.*, 2009).

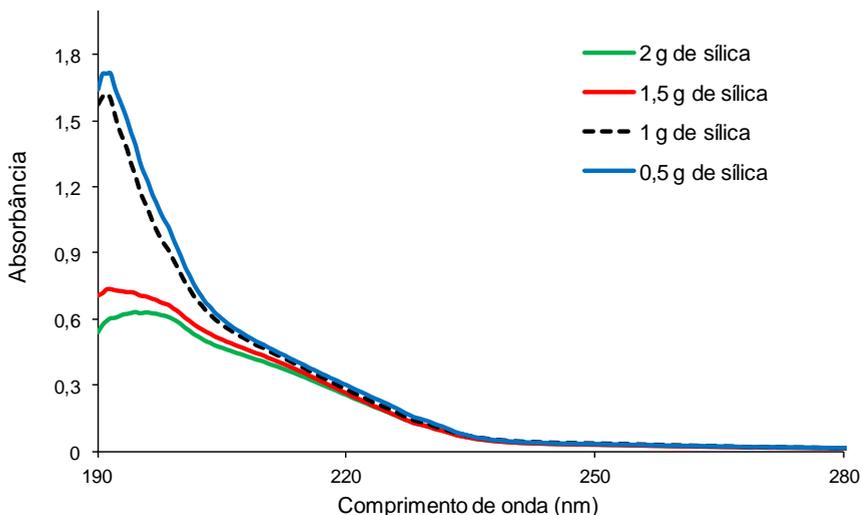


GRÁFICO 3- Representação da sobreposição dos espectros de absorção na região do UV-visível utilizando diferentes massas de sílica na etapa de *clean up* dos extratos de lodo de esgoto.

Fonte: Da autora.

3.4 Avaliação do efeito de matriz

Amostras complexas como as de lodo de esgoto apresentam influência significativa dos componentes da matriz, prejudicando as análises cromatográficas (SILVA; COLLINS, 2011; ZULOAGA *et al.*, 2012). O teste de variância demonstrou o efeito de matriz pelas diferenças significativas entre as áreas dos HPAs quando preparados em extratos de amostras de lodo e em solvente orgânico. Conseqüentemente, para os 15 HPAs analisados, foram observadas diferenças nos coeficientes angulares e lineares das curvas preparadas no extrato da matriz e em solvente puro. Nesta comparação, há indícios de que os componentes da matriz contribuem para introduzir erros sistemáticos nos resultados, sendo eles proporcionais e constantes (GONZÁLES *et al.*, 2002; PINHO *et al.*, 2010b).

Na TAB. 3, os valores da razão entre os coeficientes angulares (extrato da matriz e solvente) quando inferiores a 1,00 indicam efeito de matriz negativo, ou seja, a resposta cromatográfica para todos os compostos

estudados reduzem significativamente na presença dos componentes da matriz durante as análises por CLAE-UV. Dessa forma, a quantificação dos HPAs foi realizada utilizando curva analítica com sete concentrações dos analitos preparadas em extratos orgânicos de amostras de lodo. A resposta cromatográfica mostrou-se linear com coeficiente de determinação (r^2) superior a 0,99 para os 15 compostos estudados tanto na matriz quanto em solvente puro (TAB. 3).

TABELA 3

Linearidade, equações da reta e razão entre os coeficientes angulares das curvas analíticas obtidas em extratos da matriz e em acetonitrila

Dados da calibração						
HPAs	($\mu\text{g g}^{-1}$)	r^2 - Matriz	r^2 - ACN ⁽¹⁾	Matriz	ACN	RC ⁽²⁾
1	0,025-0,875	0,9953	0,9906	$y = 4,227x - 0,081$	$y = 7,143x + 0,127$	0,592
3	0,050-0,875	0,9903	0,9937	$y = 0,420x + 0,031$	$y = 0,599x + 0,031$	0,700
4	0,038-0,875	0,9971	0,9961	$y = 5,894x - 0,019$	$y = 6,256x + 0,064$	0,942
5	0,125-0,875	0,9987	0,9983	$y = 0,422x + 0,417$	$y = 1,385x + 0,009$	0,305
6	0,125-0,875	0,9974	0,9968	$y = 0,691x - 0,028$	$y = 0,953x + 0,121$	0,725
7	0,150-0,875	0,9998	0,9987	$y = 2,087x + 0,574$	$y = 2,608x + 0,075$	0,800
8	0,088-0,875	0,9974	0,9988	$y = 0,912x + 0,053$	$y = 1,917x + 0,052$	0,476
9/10	0,100-0,875	0,9939	0,9953	$y = 5,899x + 0,120$	$y = 10,65x - 0,197$	0,554
11	0,050-0,875	0,9901	0,9981	$y = 1,211x + 0,080$	$y = 1,840x + 0,018$	0,658
12	0,050-0,875	0,9973	0,9977	$y = 1,962x + 0,088$	$y = 3,984x - 0,080$	0,492
13	0,150-0,875	0,9973	0,9941	$y = 0,788x + 0,199$	$y = 1,211x + 0,234$	0,651
14	0,050-0,875	0,9988	0,9979	$y = 2,620x - 0,046$	$y = 7,077x - 0,190$	0,370
15	0,025-0,875	0,9905	0,9972	$y = 1,752x + 0,156$	$y = 6,270x + 0,070$	0,280
16	0,025-0,875	0,9975	0,9936	$y = 3,173x + 0,220$	$y = 5,122x + 0,071$	0,620

Notas: ⁽¹⁾ACN: acetonitrila; ⁽²⁾RC: Razão entre os coeficientes angulares dos compostos na matriz pelos coeficientes angulares obtidos no solvente puro.

Fonte: Da autora.

3.5 Validação do Método

3.5.1 Seletividade

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 seletividade do método, mesmo após diferentes etapas de *clean up*. As análises cromatográficas por CLAE-UV funcionam como um *screen* de amostras de lodo, sendo que as amostras com sinais detectados no mesmo tempo de retenção dos HPAs são submetidas às análises por espectrometria de massas.

No GRAF. 4 é apresentado um cromatograma típico de amostras de lodo (branco) comparado com o cromatograma de solução padrão de HPAs por CLAE-UV. Os sinais presentes com mesmo tempo de retenção dos HPAs são interferentes da matriz, esses resultados foram comprovados em análises por CG-EM. Problemas associados com seletividade de análises de contaminantes em amostras de lodo foram descritos na literatura (BUSETTI *et al.*, 2006; SAMARAS *et al.*, 2011; VILLAR *et al.*, 2004). Conforme discutido anteriormente, o HPA n° 2 (acenaftileno) apresentou um interferente significativo, por isso foi eliminado do trabalho.

Alguns estudos que envolvem desenvolvimento de metodologia utilizam lodo sintético obtidos por empresas certificadas (PENA *et al.*, 2008). Nestes casos, não ocorre detecção de muitos interferentes da matriz, favorecendo a seletividade do método. No entanto, há um custo considerável de aquisição e não representa qualitativamente o lodo de esgoto natural.

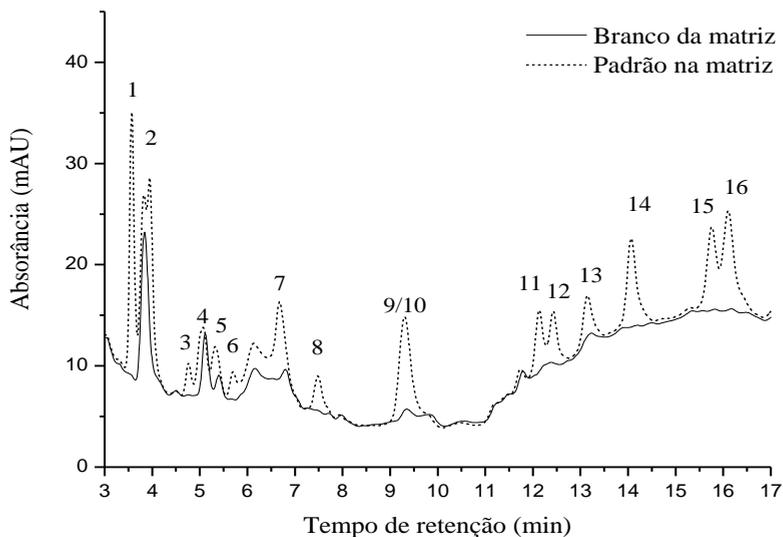


GRÁFICO 4- Representação da sobreposição de cromatogramas do extrato da matriz isenta de HPAs e do extrato contendo os 16 padrões de HPAs (550 ppb e o HPA 4 a 100 ppb).

Fonte: Da autora.

3.5.2 Limite de Detecção e Quantificação

Os valores de limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) para o método proposto foram determinados considerando três e dez vezes a intensidade do sinal do ruído cromatográfico. Os resultados encontrados estão apresentados na TAB. 4. O LQ obtido para os HPAs, exceto benzo[a]antraceno e benzo[a]pireno, foi menor que os valores regulamentados para HPAs no solo, conforme a resolução brasileira. Vale destacar que as somas das concentrações no limite de quantificação obtidas para os 15 HPAs ($\Sigma = 1,05 \text{ mg kg}^{-1}$) foram inferiores às concentrações máximas estabelecidas pela União Européia para lodo de esgoto ($6,0 \text{ mg kg}^{-1}$ a soma de 11 HPAs).

TABELA 4

Validação dos HPAs: limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), precisão e exatidão

HPAs	LD	LQ	Recuperação (%) média \pm DPR ⁽³⁾		
	$\mu\text{g g}^{-1}$	$\mu\text{g g}^{-1}$	1 x LQ ⁽¹⁾	2 x LQ ⁽²⁾	5 x LQ ⁽¹⁾
1	0,010	0,025	75,3 \pm 6,6	74,4 \pm 10,6	39,5 \pm 0,8
3	0,021	0,050	73,0 \pm 1,3	39,2 \pm 3,8	64,3 \pm 7,0
4	0,016	0,038	53,9 \pm 1,0	75,7 \pm 11,7	63,2 \pm 4,6
5	0,052	0,125	69,1 \pm 7,4	75,0 \pm 4,6	76,0 \pm 6,6
6	0,052	0,125	35,0 \pm 2,8	47,3 \pm 7,6	69,9 \pm 8,9
7	0,063	0,150	81,0 \pm 1,9	80,9 \pm 3,6	66,3 \pm 7,2
8	0,036	0,088	54,5 \pm 7,2	71,0 \pm 3,8	59,5 \pm 8,7
9/10	0,042	0,100	67,2 \pm 11,0	67,5 \pm 2,1	55,0 \pm 7,8
11	0,021	0,050	51,2 \pm 7,9	72,7 \pm 5,3	52,3 \pm 9,8
12	0,021	0,050	46,5 \pm 0,1	64,6 \pm 5,1	53,3 \pm 7,4
13	0,063	0,150	64,5 \pm 9,2	69,9 \pm 5,7	47,2 \pm 3,9
14	0,021	0,050	50,6 \pm 5,1	57,2 \pm 9,0	32,1 \pm 4,5
15	0,010	0,025	80,4 \pm 0,4	63,4 \pm 0,5	49,0 \pm 5,3
16	0,010	0,025	58,7 \pm 8,7	55,6 \pm 2,0	63,7 \pm 8,2

Notas: ⁽¹⁾Média de três repetições; ⁽²⁾ Média de sete repetições; ⁽³⁾ DPR: Desvio Padrão Relativo.

Fonte: Da autora.

3.5.3 Precisão e Exatidão

A precisão do método proposto foi avaliada em termos de repetitividade e os resultados encontrados são apresentados na TAB. 4. O desvio padrão relativo de sete extrações idênticas dos HPAs (concentração 2 x LQ) foram satisfatórios, com valores inferiores a 11,7%. Matrizes complexas como amostras de lodo de esgoto são aceitos com até 20% de desvio padrão relativo (RIBANI *et al.*, 2004).

A exatidão foi determinada por ensaios de recuperação com concentrações próximas ao LQ, sendo uma, duas e três vezes o limite de quantificação para cada HPA (INMETRO, 2010).

3.6 Comparação entre os métodos

A extração de HPAs em soxhlet é o método de referência. Entretanto, apenas 11 dos 15 HPAs foram quantificados (GRAF. 5) e as porcentagens de recuperação, como mostrado na TAB. 5, variaram de 9,28 ($\pm 50,3$) a 70,0% ($\pm 5,7$). Não houve diferenças significativas entre os resultados das duas técnicas para os HPAs nº 4, 6, 9/10 e 11 pelo teste de Duncan com 95% de probabilidade. A ESL-PBT foi superior na recuperação dos compostos nº 1, 3, 5, 7, 8 e 12.

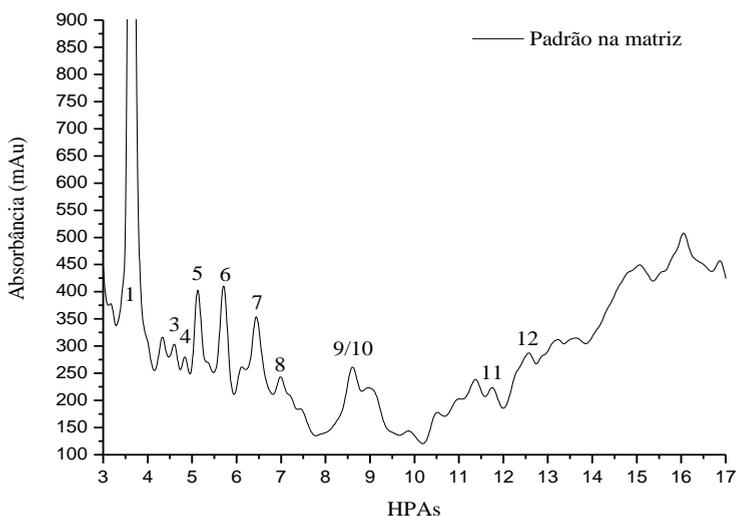


GRÁFICO 5- Representação do cromatograma das análises realizadas por CLAE-UV de solução padrão de HPAs preparadas em extratos orgânicos de amostras de lodo obtidos pela técnica soxhlet.

Fonte: Da autora.

Na extração em soxhlet foi observada a presença de interferentes, possivelmente devido ao tempo de contato excessivo entre o solvente e a

amostra. Além disso, foi necessário valores de massa quatro vezes maior e volume de solventes orgânicos superiores a ESL-PBT (31,25 vezes). Também, foi verificada variação no tempo de retenção de alguns HPAs extraídos pelo sohxlet, como mostrado na TAB. 5.

TABELA 5

Comparação entre os tempos de retenção dos HPAs obtidos em solvente puro e extração por sohxlet

HPAs		$t_r^{(1)}$	t_r	Recuperação	DPR ⁽²⁾
		ACN	Sohxlet	(%)	
1	Naftaleno	3,57	3,63	40,36	6,02
3	Fluoreno	4,77	4,61	62,08	3,81
4	Acenafteno	5,01	4,84	9,28	50,3
5	Fenantreno	5,32	5,13	47,39	1,94
6	Antraceno	5,73	5,71	31,77	9,54
7	Fluoranteno	6,72	6,45	55,88	12,44
8	Pireno	7,55	6,99	56,39	6,65
9/10	Criseno/ Benzo[a]antraceno	9,39	8,59	59,52	5,08
11	Benzo[b]fluoranteno	12,21	11,77	79,38	23,21
12	Benzo[k]fluoranteno	12,51	12,57	64,16	24,07
13	Benzo[a]pireno	13,23	-	-	-
14	Dibenzo[a,h]antraceno	14,23	-	-	-
15	Indeno[1,2,3-c,d]pireno	15,92	-	-	-
16	Benzo[g,h,i]perileno	16,33	-	-	-

Notas: ⁽¹⁾ t_r : tempo de retenção; ⁽²⁾ DPR: Desvio Padrão Relativo.

Fonte: Da autora.

Na TAB.6 está representado um resumo geral das vantagens obtidas no método otimizado, a extração sólido-líquido e purificação em baixa temperatura, em relação ao método referência, o sohxlet, na extração dos 15 HPAs prioritários.

TABELA 6

Resumo geral das vantagens obtidas no método otimizado, a ESL-PBT, em relação ao método de extração por soxhlet

Parâmetro	ESL-PBT⁽¹⁾	Soxhlet	Comparação
Tempo de extração ⁽²⁾ (h)	1,1	24	≈ 23 x
Amostra (g)	4,0	20	4 x
Solventes ⁽²⁾ (mL)	8,0	≥ 250	≈ 31,25 x
Compostos extraídos	15	11	100% e 73%
% de recuperação superior	6 compostos ⁽³⁾	-	-
DPR ⁽⁴⁾ (%)	0,61-18,6	1,94 – 50,3	-
Recuperação (%)	35-90	9,2-79	-

Notas: ⁽¹⁾ESL-PBT: Extração-Sólido Líquido e Purificação em Baixa Temperatura ⁽²⁾Valores referentes a uma amostra de lodo de esgoto; ⁽³⁾ Dos 11 analitos extraídos pelo soxhlet e comparados à ESL-PBT, seis HPAs apresentaram recuperações inferiores (extraídos por soxhlet) e recuperação estatisticamente semelhantes a ESL-PBT para cinco HPAs; ⁽⁴⁾DPR: Desvio Padrão Relativo.

Fonte: Da autora.

4 CONCLUSÃO

O método desenvolvido de extração e análise simultânea para HPAs em lodo de esgoto mostrou vantagens em relação ao soxhlet. O método foi prático, econômico e com número de etapas reduzido. A análise cromatográfica por CLAE-UV apresentou resultados eficientes na separação dos compostos utilizando coluna cromatográfica com dimensões menores que citadas pela literatura. Mesmo diante da complexidade da matriz e presença de interferentes, o método apresentou para os 15 HPAs limites de quantificação inferiores ao máximo permitido pela UE (6 mg kg^{-1} a soma de 11 HPAs) em lodo de esgoto. Estudos futuros podem ser realizados com diferentes amostras de lodo de esgoto para aplicação do método.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, F. A.; CENTENO, A. J.; BISINOTI, M. C.; JARDIM, W. F. Substâncias tóxicas persistentes (STP) no Brasil. **Química Nova**, v. 30, p. 1976-1985, 2007.

ALVES, M. C.; SUZUKI, L. G. A., SUZUKI, L. E. A. S. Densidade do solo e infiltração de água como indicadores da qualidade física de um Latossolo Vermelho distrófico em recuperação. **Revista Brasileira Ciência do Solo**, v. 31, p. 617-625, 2007.

ANDREOLI, C. V.; GARBOSSA, L. H. P.; LUPATINI, G.; PEGORINI, E. S. Wastewater sludge management: a Brazilian approach. In: **Global atlas of excreta, wastewater sludge, and biosolids management: moving forward the sustainable and welcome uses of a global resource**, 2008, p. 131-146.

ANDRÉS, P.; MATEOS, E.; TARRASÓN, D.; CABRERA, C.; FIGUEROLA, B. Effects of digested, composted, and thermally dried sewage sludge on soil microbiota and mesofauna. **Applied Soil Ecology**, v. 48, p. 236–242, 2011.

APARICIO, I.; SANTOS, J. L.; ALONSO, E. Limitation of the concentration of organic pollutants in sewage sludge for agricultural purposes: A case study in South Spain. **Waste Management**, v. 29, p. 1747–1753, 2009.

BARRIONUEVO, W. R.; LANÇAS, F. M. Extração em fase sólida (SPE) e micro extração em fase sólida (SPME) de piretróides em água. **Química Nova**, São Paulo, v. 24, 2001.

BETTIN, S. M.; FRANCO, D. W. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em aguardentes. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, p. 234-238, 2005.

BETTIOL, W.; CAMARGO, O. A. A disposição de lodo de esgoto em solo agrícola. In: _____. **Lodo de esgoto: impactos ambientais na agricultura**. Jaguariúna: EMBRAPA Meio Ambiente, 2006. cap. 2, p. 25-35.

BRASIL. Lei Nº 12.305/2010. **Política Nacional de Resíduos Sólidos; altera a Lei no 9.605, de 12 de fevereiro de 1998; e dá outras providências**, 2010. Disponível em <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato/2007-2010/2010/lei/112305.htm>. Acesso em: 05 jan. 2013.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional de Meio Ambiente - CONAMA. Resolução n. 375, de 29 de agosto de 2006. Define critérios e procedimentos, para o uso agrícola de lodos de esgoto gerados em estações de tratamento de esgoto sanitário e seus produtos derivados, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] Republica Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 30 ago. 2006. Disponível em: <www.fundagresorg.br/biossolido/images/downloads/res_conama37506>. Acesso em: 03 ago. 2011.

BUENO, J. R. P.; BERTON, R. S.; SILVEIRA, A. P. D.; CHIBA, M. K.; ANDRADE, C. A.; MARIA, I. C. Chemical and microbiological attributes of an oxisol treated with successive applications of sewage sludge. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 35, p. 1461-1470, 2011.

BUSETTI, F.; HEITZ, A.; CUOMO, M.; BADOER, S.; TRAVERSO, P. Determination of sixteen polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous and solid samples from an Italian wastewater treatment plant. **Journal of Chromatography A**, v. 1102, p.104–115, 2006.

CAI, Q-Y.; MO, C-H.; WU, Q-T.; ZENG, Q-Y.; KATSOYIANNIS, A.; FERARD, J-F. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)-contaminated sewage sludge by different composting processes. **Journal of Hazardous Materials**, 142, p. 535–542, 2007a.

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, China. **Chemosphere**, v. 68, p.1751–1762, 2007b.

CAVALCANTE, R. M.; DE LIMA, D. M.; CORREIA, L. M.; NASCIMENTO, R. F.; SILVEIRA, E. R.; FREIRE, G. S. S.; VIANA, R. B. Técnicas de extrações e procedimentos de clean-up para a determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em sedimentos da costa do Ceará. **Química Nova**, v. 31, p. 1371-1377, 2008.

CESAR, R.; ALVARO, T.; SILVA, M.; COLONESE, J.; MOREIRA, C.; POLIVANOV, H.; EGLER, S.; BIDONE, E.; CASTILHOS, Z. Biodisponibilidade de contaminantes em solos brasileiros tratados com lodo de esgoto: uma abordagem ecotoxicológica utilizando bioensaios com organismos aquáticos e edáficos. **Geochimica Brasiliensis**, v. 24, p. 41-49, 2010.

CHUNG, N. J.; CHO, J. Y.; PARK, S. W.; HWANG, S. A.; PARK, T. L. Polycyclic aromatic hydrocarbons in soils and crops after irrigation of wastewater discharged from domestic sewage treatment plants. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 81, p. 124–127, 2008.

COLODRO, G.; ESPINDOLA, C. R. Alterações na fertilidade de um Latossolo degradado em resposta à aplicação de lodo de esgoto. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 28, p.1-15, 2006.

COSCIONE, A. R.; de ABREU, C. P.; SANTOS, G. C. G. Chelating agents to solubilize heavy metals from oxisols contaminated by the addition of organic and inorganic residues. **Scientia Agricola**, v. 66, p. 64-70, 2009.

COTTA, J. A. O.; REZENDE M. O. O.; LANDGRAF, M. D. Avaliação de solventes de extração por ultrassom usando-se cromatografia líquida de alta

eficiência para a determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em solos contaminados. **Química Nova**, v. 32, p. 2026-2033, 2009.

COUNCIL OF THE EUROPEAN COMMUNITY (European Union - EU). **Working document on Sludge**, 3rd Draft, Brussels, 2000, p. 13.

EPA - Environmental Protection Agency. **Method 3550C, Soxhlet extraction**. US, Washington, DC, 1996. Disponível em: <http://www.epa.gov/epaoswer/hazwaste/test/pdfs/3550b.pdf>. Acesso em: 07 ago. 2012.

EPA - Environmental Protection Agency. **Method 3630, Silica gel cleanup**. US, Washington, DC, 1996. Disponível em: <http://www.epa.gov/epaoswer/hazwaste/test/pdfs/3630c.pdf>. Acesso em: 07 ago. 2012.

FORSBERG, N. D.; WILSON, G. R.; ANDERSON, K. A. Determination of Parent and Substituted Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in High-Fat Salmon Using a Modified QuEChERS Extraction, Dispersive SPE and GC-MS. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, 59, p. 8108–8116, 2011.

GALDOS, M. V.; MARIA, I. C. de; CAMARGO, O. A. de; DECHEN, S. C. F. Sewage Sludge Application on Cultivated Soils: Effects on Runoff and Trace Metal Load. **Scientia Agrícola**. Piracicaba, v. 66, p. 368-376, 2009.

GHISELLI, G.; JARDIM, W. F. Interferentes endócrinos no ambiente. **Química Nova**, v. 30, p. 695-706, 2007.

GONÇALVES, R. F. et al. **Desidratação de Lodo de Esgotos**. In: ANDREOLI, C. V.; SPERLING, M. V.; FERNANDES, F. Resíduos sólidos de saneamento: processamento, reciclagem e disposição final. Belo Horizonte, 2001. v. 6, p. 64-65.

GONZÁLEZ, F. J. E.; TORRES, M. E. H.; LÓPEZ, E. A.; CUADROS-RODRIGUEZ, L.; VIDAL, J. L. M. Matrix-effects of vegetable commodities in electron-capture detection applied to pesticide multiresidue analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 996, p. 155-164, 2002.

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

GOULART, S. M.; ALVES, R. D.; de PAULA, W. X.; QUEIROZ, J. H.; NEVES, A. A.; DE QUEIROZ, M. A. L. R. Determination of Carbamates in Beverages by Liquid-Liquid Extraction with Low Temperature Partitioning and Liquid Chromatography. **Journal of Brazilian Chemical Society**, 23, p. 1154-1165, 2012.

HUA, L.; WEY-XIANG, W.; LIU, W.; XUE, Y.; TIENTCHEN, C. M.; CHEN, Y. X. Heavy Metals and PAHs in Sewage Sludge from Twelve Wastewater

Treatment Plants in Zhejiang Province1. **Biomedical and Environmental Sciences**, v. 21, p. 345-352, 2008.

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. Orientações sobre validação de métodos analíticos. Documento de caráter orientativo. DOQ-CGCRE-008, 2010.

JUHLER, R. K. Optimized method for the determination of organophosphorus pesticides in meat and fatty matrices. **Journal of Chromatography A**, v. 786, p. 145-153, 1997.

KALF, D. F.; CROMMENTUIJN, G. H.; POSTHUMUS, R.; VAN DE PLASSCHE, E. J. Integrated environmental quality objectives for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). **National Institute of Public Health and the Environment**, Bilthoven, p. 12, 1995.

KATSOYIANNIS, A.; SAMARA, C. Comparison of active and passive sampling for the determination of persistent organic pollutants (POPs) in sewage treatment plants **Chemosphere**, v. 67, p. 1375–1382, 2007.

KHAN, S.; CAO, Q. Human health risk due to consumption of vegetables contaminated with carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. **Journal of Soils and Sediments**, v. 12, p. 178–184, 2012.

KUMARI, R.; CHATURVEDI, P.; ANSARI, N. G.; MURTHY, R. C.; PATEL, D. K. Optimization and Validation of an Extraction Method for the Analysis of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Chocolate Candies. **Journal of Food Science**, v. 71, 2012.

LIMA, M. R. P. **Uso de estufa agrícola para secagem e higienização de lodo de esgoto**. 2010. 30 f. Tese (Doutorado em Engenharia Hidráulica) - Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, 2010.

LIU, J. F.; GUI-BIN, J.; YU-GUANG, C.; YA-QI, C.; QING-XIANG, Z.; JING-TIAN, H. Use of Ionic Liquids for Liquid-Phase Microextraction of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. **Analytical Chemistry**, v. 75, p. 5870-5876, 2003.

LOPES, R. P.; AUGUSTI, D. V.; DE SOUZA, L. F.; SANTOS, F. A.; LIMA, J. A.; VARGAS, E. A.; AUGUSTI, R. Development and validation (according to the 2002/657/EC regulation) of a method to quantify sulfonamides in porcine liver by fast partition at very low temperature and LC-MS/MS. **Analytical Methods**, v.3 , p.606, 2011.

MAGALHÃES, E. J.; NASCENTES, C. C.; AUGUSTI, R.; QUEIROZ, M. E. L. R.; SILVA, J. C. C.; AFONSO, R. J. C. F.; A. M. Fast Determination of Benzodiazepines in Human Urine via Liquid-Liquid Extraction with Low Temperature Partitioning and LC-HRMS. **American Journal of Analytical Chemistry**. v. 3, p. 118-124, 2012.

MARTHE, D. de B.; BITTENCOURT, L. M.; QUEIROZ, M. E. L. R.; NEVES, A. A. Desenvolvimento de metodologia para determinação de piretróides em manteiga. **Química Nova**, v. 6, p. 1389-1393, 2010.

MORET, S.; CONTE, L. S. Polycyclic aromatic hydrocarbons in edible fats and oils: occurrence and analytical methods. **Journal of Chromatography A**, v. 882, p. 245–253, 2000.

MOTTA, S. R.; MAGGIORE, T. Evaluation of nitrogen management in maize cultivation grows on soil amended with sewage sludge and urea. **European Journal of Agronomy**, v. 45, p. 59– 67, 2013.

NETTO, A. D. P.; MOREIRA, J. C.; DIAS, A. E. X. O.; ARBILLA, G.; FERREIRA, L. F. V.; OLIVEIRA, A. S.; BAREK, J. Avaliação da contaminação humana por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAS) e seus derivados nitrados (NHPAS): uma revisão metodológica. **Química Nova**, v. 23, p. 765-773, 2000.

OLESZCZUK, P.; HALE, S. E.; LEHMANN, J.; CORNELISSEN, G. Activated carbon and biochar amendments decrease pore-water concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in sewage sludge. **Bioresource Technology**, v. 111, p. 84–91, 2012.

OLUSEYI, T.; OLAYINKA, K.; ALO, B.; SMITH, R. M. Improved Analytical Extraction and Clean-up Techniques for the Determination of PAHs in Contaminated Soil Samples. **International Journal of Environmental Research**, v. 5, p. 681-690, 2011.

ORTIZ, R.; VEGA, S.; GUTIE´RREZ, R.; GIBSON, R.; SCHETTINO, B.; RAMIREZ, M. D. L. Presence of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Top Soils from Rural Terrains in Mexico City. **Bulletin of Environmental Contamination Toxicology**, v. 88, p. 428–432, 2012.

PENA, M. T.; CASAIS, M. C.; MEJUTO, M. C.; CELA, R. Development of a matrix solid-phase dispersion method for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in sewage sludge samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 626, p. 155–165, 2008.

PENA, M. T.; CASAIS, M. C.; MEJUTO, M. C.; CELA, R. Development of a sample preparation procedure of sewage sludge samples for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons based on selective pressurized liquid extraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 425–435, 2010.

PÉREZ, S.; GUILLAMÓN, M.; BARCELÓ, D. Quantitative analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in sewage sludge from wastewater treatment plants. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 938, p. 57-65, 2001.

PICÓ, Y.; BLASCO, C.; FONT, G.; Environmental and food applications of LC–tandem mass spectrometry in pesticide-residue analysis: An overview. **Mass Spectrometry Reviews**. v. 23, p. 45, 2004.

PINHO, G. P. de.; NEVES, N. A.; DE QUEIROZ, M. E. L. R.; SILVÉRIO, F. O. Optimization of the liquid–liquid extraction method and low temperature purification (LLE–LTP) for pesticide residue analysis in honey samples by gas chromatography. **Food Control**. V. 21, p. 1307, 2010a.

PINHO, G. P. de.; SILVÉRIO, F. O.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, M. E. L. R.; STARLING, M. A. V. M. Influência dos Constituintes Químicos dos Extratos de Diferentes Matrizes na Resposta Cromatográfica de Agrotóxicos. **Química Nova**, v. 33, p. 909-913, 2010b.

PINHO, G. P.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, M. E. L. R. Análise de resíduos de agrotóxicos em tomates empregando dispersão da matriz em fase sólida (DMFS) e cromatografia gasosa. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, 2009.

PRATES, B. de S. F.; ARRUDA, S. R.; WILIAN JUNIO, de S.; FERNANDES, L. A.; ZUBA JUNIO, R. G.; MATTANA, S. H. Crescimento e teores de macronutrientes em pinhão manso adubado com lodo de esgoto e silicato de cálcio e magnésio. **Revista Caatinga**, v. 24, p. 101-112, 2011.

PRESTES, O. D.; FRIGGI, C. A.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. QuEcHeRs – um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 32, p. 1620-1634, 2009.

PROGRAMA DE PESQUISA EM SANEAMENTO BÁSICO – PROSAB. **Manual Prático Para a Compostagem de Biossólidos**. FERNANDES, F.; SILVA, S. M. C. P. D. 1999.

QUEIROZ, S. C. N.; FERRACINI, V. L.; DE SOUZA, D. R. C. **Métodos de extração de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em amostra de solo, sedimento e lodo**. Documento 79, Jaguariúna: EMBRAPA Meio Ambiente, 2009, 15 p.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, p. 771-780, 2004.

ROGERS, H. R. Source, behavior and fate of organic contaminants during sewage treatment and in sewage sludges. **Science of the total Environment**, v. 185, p. 3-26, 1996.

SAMARAS, V. G.; THOMASIDIS, S. N.; STASINAKIS, A. S.; LEKKAS., T. D. An analytical method for the simultaneous trace determination of acidic pharmaceuticals and phenolic endocrine disrupting chemicals in wastewater

and sewage sludge by gas chromatography-mass spectrometry. **Analytical Bioanal Chemistry**, v. 399, p. 2549–2561, 2011.

SANCHEZ-BRUNETE, C.; MIGUEL, E.; JOS´S.; TADEO, L. Analysis of 27 PAH by matrix solid-phase dispersion and isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry in sewage sludge from the Spanish area of Madrid. **Journal of Chromatography A**, v. 1148, p. 219–227, 2007.

SCHWANZ, M.; FERREIRA, J. J.; FRÖEHLICH, P.; ZUANAZZI, J. A. S.; HENRIQUES, A. T. Análise de metais pesados em amostras de *Peumus boldus* Mol. (Monimiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 18, p. 98-101, 2008.

SILVA, C. G. A. DA.; COLLINS, C. H. Aplicações de cromatografia líquida de alta eficiência para o estudo de poluentes orgânicos emergentes. **Química Nova**, v. 34, p. 665-676, 2011.

SILVÉRIO, F. O.; SILVA, J. G. S.; AGUIAR, M. C. S.; CACIQUE, A. P.; PINHO, G. P. de. Análise de agrotóxicos em água usando extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura por cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, v. 35, p. 2052-2056, 2012.

SOUZA, R. C, de.; MATOS, M. A. C. **Metodologia para determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em sedimentos e solos periféricos à represa São Pedro – Juiz de Fora, MG**. 2008. 86 f. Dissertação (Mestrado em Química), Universidade Federal de Juiz de Fora, 2008.

TAVARES, T. M.; CARVALHO, F. M. Avaliação da exposição de populações humanas a metais pesados no ambiente: exemplos do Recôncavo Bahiano. **Química Nova**, v.15, p.147-153, 1992.

TIAN, W.; BAI, J.; LIU, K.; SUN, H.; ZHAO, Y. Occurrence and removal of polycyclic aromatic hydrocarbons in the wastewater treatment process. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 82, p. 1–7, 2012.

TOBISZEWSKI, M.; NAMIESNIK, J. Review: PAH diagnostic ratios for the identification of pollution emission sources. **Environmental Pollution**, v. 162, p. 110-119, 2012.

TSAPAKIS, M.; STEPHANOU, E.G. Occurrence of gaseous and particulate polycyclic aromatic hydrocarbons in the urban atmosphere: study of sources and ambient temperature effect on the gas/particle concentration and distribution. **Environmental Pollution**, v. 133, p. 147-156, 2005.

US EPA - United States Environmental Protection Agency. **Clean Water Act: Priority Pollutants**. Disponível em: <<http://www.epa.gov/waterscience/methods/Pollutants.htm>>. Acesso em: 13 dez. 2011.

VACA, R.; LUGO, J.; MARTÍNEZ, R.; ESTELLER, M. V.; ZAVALA, H. Effects of sewage sludge and sewage sludge compost amendment on soil properties and *Zea mays* L. plants (heavy metals, quality and productivity). **Revista Internacional Contaminación Ambiental**, v. 27, p. 303-311, 2011.

VIEIRA, H. P.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, M. E. L. Otimização 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.

VILLAR, P.; CALLEJÓN, M.; ALONSO, E.; JIMÉNEZ, J.C.; GUIRAÚM, A. Optimization and validation of a new method of analysis for polycyclic aromatic hydrocarbons in sewage sludge by liquid chromatography after microwave assisted extraction, **Analytica Chimica Acta**, v. 524, p. 295-304, 2004.

VILLAR, P.; VILLAR, M.; CALLEJO'N, M.; PE'REZ, J. L.; JIME'NEZ, J. C.; ALONSO, E., GUIRAU'M. A. Evolution of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and heavy metals in sludge samples from conventional activated sludge wastewater treatment plants. **Environmetrics**, v. 20, p. 561-574, 2009.

WANG, D.; YU, P.; ZHANG, Y.; CUI, Y.; SUN, C.-H. The determination of persistent organic pollutants (POPs) in the colostrums of women in preterm labor. **Clinica Chimica Acta**, v. 397, p. 18-21, 2008.

WANG, J.; ZHONG, Y.; CARMELLA, S. G.; HOCHALTER, J. B.; RAUCH, D.; OLIVER, A.; JENSEN, J.; HATSUKAMI, D. K.; UPADHYAYA, P.; HECHT, S. S.; ZIMMERMAN, C. L. Phenanthrene Metabolism in Smokers: Use of a Two-Step Diagnostic Plot Approach to Identify Subjects with Extensive Metabolic Activation. **The journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 342, p. 750-760, 2012.

WERLE, S.; WILK, R. K. A review of methods for the thermal utilization of sewage sludge: The Polish perspective. **Renewable Energy**, v. 35, p. 1914-1919, 2010.

ZHAI, J.; TIAN, W.; LIU, K. Quantitative assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons in sewage sludge from wastewater treatment plants in Qingdao, China. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 180, p. 303-311, 2011.

ZUBA JUNIO, G. R.; SAMPAIO, R. A.; NASCIMENTO, A. L.; CARNEIRO, J. P.; SANTOS, L. D. T.; FERNANDES, L. A. Produção de milho adubado residualmente com composto de lodo de esgoto e fosfato de Gafsa. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.16, p.1289-1297, 2012

ZULOAGA, O.; NAVARRO, P.; BIZKARGUENAGA, E.; IPARRAGUIRRE, A.; VALLEJO, A.; OLIVARES, M.; PRIETO, A. Overview of extraction, clean-up

and detection techniques for the determination of organic pollutants in sewage sludge: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 736, p. 7-29, 2012.