

GABRIELA FONSECA EVANGELISTA

**DETERMINAÇÃO DE CLOROBENZENOS EM LODO DE
ESGOTO POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACLOPADA
A ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CG-EM)**

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.

Orientadora: **Prof.^a Gevany Paulino de Pinho**

Montes Claros
2012

Evangelista, Gabriela Fonseca.

E92d **Determinação de Clorobenzenos em lodo de Esgoto por**
2013 **cromatografia Gasosa Aclopada a Espectrometria de Massas**
 (CG-EM) / Gabriela Fonseca Evangelista. Montes Claros, MG:
 ICA/UFMG, 2013.
 68 f: il.

Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias, área de
concentração em Agroecologia) Universidade Federal de Minas
Gerais, 2013.

Orientadora: Prof.^a Gevany Paulino de Pinho.

Banca examinadora: Paulo Henrique Fidêncio, Reginaldo
Arruda Sampaio, Charles Martins Aguiar, Gevany Paulino de
Pinho.

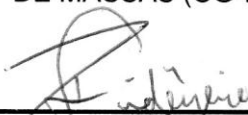
Inclui bibliografia: f. 61-68.

1. Biossólidos. 2. Contaminantes orgânicos. 3. Solos. I. Pinho,
Gevany Paulino de. II. Universidade Federal de Minas Gerais,
Instituto de Ciências Agrárias. III. Título.

CDU: 543

Gabriela Fonseca Evangelista

DETERMINAÇÃO DE CLOROBENZENOS EM LODO DE ESGOTO
POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA
DE MASSAS (CG-EM)



Prof Dr. Paulo Henrique Fidêncio
(UFVJM)



Prof Dr. Charles Martins Aguilar
(UFMG)



Prof. Dr. Reginaldo Arruda Sampaio
(UFMG)



Prof. Dr. Flaviano Oliveira Silvério
(Co-orientador - UFMG)



Profª. Dra. Gevany Paulino de Pinho
(Orientadora - UFMG)

Aprovada em 21 de dezembro de 2012.

Montes Claros
2012

DEDICO

A minha família, meu alicerce.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, ao Pai Celestial, por guiar e iluminar meus passos e dar-me forças em todos os momentos difíceis desta caminhada.

Aos meus amados pais, Terezinha e Joaquim, pelo amor e carinho, por acreditarem sempre nas minhas conquistas e por entenderem muitas vezes a minha ausência.

Ao meu irmão Lázaro, pelo amor e cumplicidade. E a meu primo Lucas que sempre acompanhou de perto a minha vida acadêmica.

À tia Maria, pelo apoio e imensa solidariedade durante todas as jornadas que me trouxeram até aqui.

Aos anjos amigos, em especial à Carmelita, por ajudarem na minha construção espiritual e fazer de mim uma pessoa melhor.

À orientadora Gevany e ao coorientador Flaviano, bases desse trabalho, pelo incentivo, apoio e toda compreensão quando necessário.

Aos colegas do Laboratório de Pesquisa em Agroquímica que participaram direta e indiretamente da execução deste trabalho, obrigada por cada momento vivido, em especial: Ane, Laila, Érica, Tiago, Joyce, Clara, Emanuella e Naruna.

À Companhia de Saneamento (COPASA/MG), pelo fornecimento das amostras.

Ao Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais (ICA-UFMG), pela infraestrutura disponibilizada.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), que através da bolsa REUNI - permitiu minha vivência com experiências didáticas do ensino superior.

À FAPEMIG e ao CNPq pelo auxílio financeiro, que permitiram a condução dessa pesquisa.

A todos, o meu muito obrigada!

“Direi do Senhor: Ele é o meu refúgio e a
minha fortaleza, o meu Deus, em quem confio”.

Salmo 91:2

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 1 – REFERENCIAL TEÓRICO

- FIGURA 1 -** Representação das estruturas químicas de nove clorobenzeno..... 19

CAPÍTULO 2 – DETERMINAÇÃO DE CLOROBENZENOS EM LODO DE ESGOTO POR EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO COM PURIFICAÇÃO EM BAIXA TEMPERATURA COMBINADO COM CROMATOGRAFIA GASOSA E ESPECTROMETRIA DE MASSAS

- GRÁFICO 1 -** Representação do cromatograma obtido a partir de análises por CG-EM: clorobenzenos em acetonitrila de 6,6 µg L⁻¹ a 20 µg L⁻¹ e padrão interno (PI) a 20 µg L⁻¹ em modo MIS. Identificação dos picos: (1) 1,3-CB, (2) 1,4-CB, (3) 1,2-CB, (4) 1,3,5-CB, (5) 1,2,4-CB, PI, (6) 1,2,3-CB, (7) 1,2,3,5-CB, (8) 1,2,4,5-CB e (9) 1,2,3,4-CB..... 41
- GRÁFICO 2 -** Representação da influência da fase extratora sobre a porcentagem de extração dos clorobenzenos (CB) da matriz lodo de esgoto... 43
- GRÁFICO 3 -** Representação da influência da temperatura sobre a porcentagem de extração dos clorobenzenos da matriz lodo de esgoto empregando a técnica ESL-PBT..... 47
- GRÁFICO 4 -** Representação do cromatograma do extrato obtido após a ESL-PBT: a) extrato de lodo fortificado com clorobenzenos de 6,6 µg L⁻¹ a 20 µg L⁻¹, b) extrato do lodo de leite de secagem. Identificação dos picos: (1) 1,3-CB, (2) 1,4-CB, (3) 1,2-CB, (4) 1,3,5-CB, (5) 1,2,4-CB, PI, (6) 1,2,3-CB, (7) 1,2,3,5-CB, (8) 1,2,4,5-CB e (9) 1,2,3,4-CB..... 50
- GRÁFICO 5 -** Representação do cromatograma obtido em análises por CG-EM-SCAN, dos extratos isentos de clorobenzenos: a) pelo método ESL-PBT e b) pela extração em sohxlet..... 55

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1 – REFERENCIAL TEÓRICO

- | | | |
|-----|---|----|
| 1 - | Características físico-químicas dos clorobenzenos | 18 |
| 2 - | Concentrações de clorobenzeno no solo estabelecidas pela resolução CONAMA, no375 de 2006..... | 23 |
| 3 - | Métodos utilizados para determinação de clorobenzenos em diversas matrizes..... | 24 |

CAPÍTULO 2 – DETERMINAÇÃO DE CLOROBENZENOS EM LODO DE ESGOTO POR EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO COM PURIFICAÇÃO EM BAIXA TEMPERATURA COMBINADO COM CROMATOGRAFIA GASOSA E ESPECTROMETRIA DE MASSAS

- | | | |
|-----|---|----|
| 1 - | Grupos de íons de clorobenzenos utilizados para análise cromatográfica (CG-EM) dos compostos na etapa de otimização do método..... | 35 |
| 2 - | Planejamento fatorial 23 para amostras de lodo de esgoto fortificadas (0,625 µg g ⁻¹)..... | 37 |
| 3 - | Porcentagens de extração média e desvio padrão relativo de cada um dos clorobenzenos, obtidos nos experimentos do planejamento fatorial para amostras de lodo de esgoto..... | 45 |
| 4 - | Porcentagens de recuperação média, efeitos de cada fator e interações entre os fatores (± estimativa do erro experimental) de extração de cada um dos clorobenzenos, obtidos nos experimentos do planejamento fatorial para amostras de lodo de esgoto..... | 46 |
| 5 - | Razão entre os coeficientes angulares (RCA) e lineares (RCL) das curvas analíticas obtidas em acetoneitrila e em extratos de lodo de esgoto..... | 48 |

6 -	Limite de detecção (LD), Limite de quantificação (LQ), linearidade do método para clorobenzenos em amostras de lodo de esgoto e limites máximos de resíduo (LMR) estabelecido pelo CONAMA.....	52
7	Porcentagem de recuperação dos clorobenzenos, após extração de amostras de lodo de esgoto fortificadas com três concentrações diferentes de cada composto.....	54
8 -	Vantagens da técnica de extração otimizada, ESL-PBT, em relação à técnica de extração tradicional, sohxlet.....	56
9 -	Concentrações dos compostos 1,4-CB, 1,2,4-CB e 1,2,3-CB em amostras de lodo coletadas na ETE de Montes Claros.....	58

ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT -	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ACN -	Acetonitrila
ACT -	Acetato de etila
Ag -	Prata
As -	Arsênio
CB -	Clorobenzenos
Cd -	Cádmio
Co -	Cobalto
CG -	Cromatografia Gasosa
Cr -	Cromo
Cu -	Cobre
DCE -	Detector de captura de elétrons
DCM -	Diclorometano
DPR -	Desvio Padrão Relativo
EM -	Espectrometria de massas
ESL-PBT -	Extração sólido-líquido com purificação em baixa temperatura
ETE -	Estação de Tratamento de Esgoto
FIG -	Figura
Hg -	Mercúrio
HPAs -	Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
INMETRO -	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade
LC -	Lodo centrifugado
LD -	Limite de Detecção
LMR -	Limite Máximo de Resíduo
LQ -	Limite de Quantificação
LST -	Lodo de secagem térmica
MEFS -	Microextração em fase sólida

MEFL -	Microextração em fase líquida
MG -	Minas Gerais
Min -	Minutos
NAF -	Naftaleno
NBR -	Norma Brasileira
ND -	Não detectado
Ni -	Níquel
Pb -	Chumbo
PI -	Padrão Interno
POPs -	Poluentes Orgânicos Persistentes
RCA -	Razão entre os coeficientes angulares
RCL -	Razão entre os coeficientes lineares
Sb -	Antimônio
Se -	Selênio
TAB -	Tabela
US EPA -	Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos
Zn -	Zinco

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1 – REFERENCIAL TEÓRICO.....	13
1	INTRODUÇÃO.....	13
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1	Lodo de Esgoto.....	15
2.1.1	Contaminantes no lodo de esgoto.....	16
2.2	Clorobenzenos.....	17
2.2.1	Fontes e atuações dos clorobenzenos no meio ambiente.....	19
2.3	Legislação para o uso agrícola do lodo de esgoto.....	22
2.4	Métodos de análises de clorobenzenos em lodo.....	23
2.4.1	Extração sólido-líquido com purificação em baixa temperatura (ESL-PBT).....	25
2	OBJETIVOS.....	27
2.1	Objetivos gerais.....	27
2.2	Objetivos específicos.....	27
	CAPÍTULO 2 – DETERMINAÇÃO DE CLOROBENZENOS EM LODO DE ESGOTO POR EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO COM PURIFICAÇÃO EM BAIXA TEMPERATURA COMBINADO COM CROMATOGRAFIA GASOSA E ESPECTROMETRIA DE MASSAS.....	28
	RESUMO.....	28
	ABSTRACT.....	29
1	INTRODUÇÃO.....	30
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	33
2.1	Amostras.....	33
2.2	Reagentes e soluções.....	33

2.3	Equipamentos e condição de análises.....	34
2.4	Procedimento analítico.....	35
2.4.1	Amostras de lodo de esgoto fortificadas.....	35
2.4.2	Extração sólido-líquido com purificação em baixa temperatura.....	36
2.5	Otimização dos parâmetros de extração.....	36
2.6	Efeito de matriz.....	38
2.7	Validação.....	38
2.8	Aplicação em amostras reais.....	38
2.9	Comparação entre os métodos de extração.....	39
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
3.1	Análise cromatográfica.....	40
3.2	Otimização da ESL-PBT.....	42
3.2.1	Avaliação da fase extratora.....	42
3.2.2	Planejamento fatorial.....	43
3.2.3	Efeito do aquecimento.....	47
3.1	Efeito de matriz.....	48
3.4	Validação.....	49
3.4.1	Seletividade.....	49
3.3.3	Limite de detecção, limite de quantificação e linearidade.....	51
3.3.4	Exatidão e precisão do método.....	53
3.3.5	Comparação entre métodos.....	54
3.4	Aplicação em amostras reais.....	56
4	CONCLUSÃO.....	60
	REFERÊNCIAS.....	61

CAPÍTULO 1 – REFERENCIAL TEÓRICO

1 INTRODUÇÃO

Diversos produtos químicos orgânicos têm sido amplamente utilizados na sociedade moderna, acarretando a geração de resíduos, cuja destinação consiste em águas residuárias, efluentes industriais e esgoto (CLARKE; SMITH, 2011).

O esgoto produzido é direcionado a Estações de Tratamento de Esgoto (ETEs), visando atender as diretrizes da legislação vigente de órgãos ambientais. Em uma ETE, através de etapas de operações unitárias, as concentrações de substâncias que conferem riscos ao meio ambiente são reduzidas (SAITO, 2007).

Ao ser tratado, o esgoto gera um subproduto de composição complexa conhecido como lodo de esgoto, resultante da sedimentação de sólidos suspensos provenientes das águas residuárias nas estações de tratamento de esgoto (CAI *et al.*, 2007a; SMITH, 2000; TSUTIYA *et al.*, 2001).

O lodo contém diversos nutrientes que trazem benefícios ao solo, mas também pode apresentar contaminantes químicos e microbiológicos em sua composição (PENA *et al.*, 2008). Entre os contaminantes químicos estão os clorobenzenos, que têm toxicidade aguda, além de serem carcinogênicos (VIDAL *et al.*, 2005). A contaminação ambiental com estes compostos é generalizada devido à importância destes produtos químicos para indústrias como intermediários, pesticidas e solventes (KOZANI *et al.*, 2007).

A investigação dos clorobenzenos em lodo de esgoto é necessária, uma vez que, ao aplicar o lodo no solo, esses compostos podem agregar-se facilmente a esta matriz, sendo absorvidos pelas plantas e, conseqüentemente, incorporados à cadeia alimentar. Além disso, podem ser arrastados por lixiviação, dependendo da sua

persistência no solo, e atingir diretamente águas superficiais e subterrâneas, agravando ainda mais os problemas ambientais (SHRESTHA *et al.*, 2009).

Para a utilização segura e adequada do lodo de esgoto no Brasil, a resolução n° 375 do Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA – estabeleceu limites da concentração dos clorobenzenos no solo que variam de 0,0065 a 0,7300 mg Kg⁻¹. Uma das principais dificuldades para implementação dessa regulamentação consiste na necessidade de técnicas de análise precisas, sensíveis, rápidas e de baixo custo para a determinação de rotina desses e outros poluentes no lodo de esgoto (APARÍCIO *et al.*, 2009; PENA *et al.*, 2010).

Para a extração de clorobenzenos em lodo de esgoto utiliza-se frequentemente a técnica de extração soxhlet, que é padronizada para análise de compostos orgânicos, e cuja extração é considerada satisfatória. Entretanto é uma técnica laboriosa com alto consumo de solventes (BANJO; NELSON, 2005). Uma alternativa é a utilização da técnica de extração sólido-líquido com purificação em baixa temperatura (ESL-PBT) que é prática, com número de etapas reduzido, baixo custo além de menor consumo de amostra e solventes orgânicos (GOULART *et al.*, 2010).

Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi propor a otimização e a validação da técnica ESL-PBT como alternativa aos métodos de extração tradicionais para a análise dos nove clorobenzenos, estabelecidos pela CONAMA n°375/2006 em amostras de lodo de esgoto.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Lodo de Esgoto

O esgoto, também conhecido como água residuária, é caracterizado pela presença de despejos ou rejeitos provenientes de diversas origens, sendo dividido em dois principais grupos: o esgoto sanitário e o esgoto industrial (SILVA, 2009).

A composição do esgoto industrial é muito diversificada e é atribuída ao tipo de processo industrial empregado. Já o esgoto de origem doméstica é constituído de 99,99% de água e 0,010% de sólidos. Estes sólidos são compostos por 70% de substâncias orgânicas (proteínas carboidratos, gorduras, lignina, aminoácidos) e 30% de substâncias inorgânicas (metais pesados, diversos tipos de sais e areia) (COSCIONE *et al.*, 2010; ROGERS, 1996).

O lodo de esgoto é constituído de água e sólido de aspectos granuloso, flocoso e coloidal (GRANDIN, 1992; TSUTIYA *et al.*, 2001), sendo uma matriz muito complexa resultante do tratamento primário, secundário e químico dos esgotos. O lodo primário é composto pelos sólidos sedimentáveis provenientes do esgoto bruto, recebido por decantadores primários. O lodo secundário, biológico ou biossólido tem sua produção associada a uma etapa biológica de decomposição da matéria orgânica do lodo, na qual gera-se uma biomassa microbiana. O lodo químico é resultante da precipitação química com sais metálicos ou cal para melhorar o desempenho do decantador primário e para o tratamento da fase líquida dos esgotos (ANDREOLI *et al.*, 2001).

O lodo gerado pode passar por vários processos como adensamento, estabilização, condicionamento, desidratação. Esses têm por finalidade aumentar o teor de sólidos e diminuir o número de organismos patogênicos. A partir da forma de processamento tem-se o lodo de digestão aeróbica e anaeróbica, desidratado com ajuda de

polieletrólito (torta de lodo), secos em leito de secagem ou secador térmico (lodo seco) (COSCIONE *et al.*, 2010; PEDROZA *et al.*, 2010).

A gestão desses resíduos é complexa e o seu gerenciamento oscila entre 20% e 60% do total consumido com a operação de uma estação de tratamento (ANDREOLI, 2001). Uma destinação alternativa para o lodo é a agricultura, pois são ricos em matéria orgânica e nutrientes e sua aplicação em solos e culturas gera menor impacto ambiental e menor valor econômico agregado à operação de uma ETE (BRIGHT; HEALEY, 2003; SILVA, 2009).

2.1.1 Contaminantes no lodo de esgoto

A elevada geração de lodo tornou-se uma preocupação ambiental quanto a sua disposição final. Buscando uma gerência economicamente viável, alternativas foram estudadas para o aproveitamento e/ou destinação dele. Entre essas alternativas, destacam-se o uso agrícola, a recuperação de solos e a aplicação em áreas florestais. O lodo possui em sua composição matéria orgânica e macronutrientes e micronutrientes que promovem melhoria nas condições físico-químicas do solo, além de combater a erosão pela formação de agregados (BOEIRA, 2009; CAMPOS; ALVES, 2008; GALDOS *et al.*, 2009; TSUTIYA *et al.*, 2001).

Os principais problemas associados ao reaproveitamento do lodo de esgoto ocorrem devido à presença de contaminantes orgânicos, metais de alta densidade e organismos patogênicos neste resíduo (DAI *et al.*, 2007; ZHENG *et al.*, 2007). A presença dos metais está relacionada às atividades industriais, e a concentração desses no lodo de esgoto dependerá exclusivamente da quantidade lançada de esgotos industriais às vazões de esgoto.

Dos íons metálicos contidos no lodo existem aqueles que são essenciais aos organismos em determinadas quantidades, tais como arsênio (As), cobalto (Co), cromo (Cr), cobre (Cu), selênio (Se) e zinco (Zn), e outros que podem afetar as plantas e animais, tais como prata (Ag), cádmio (Cd), chumbo (Pb), mercúrio (Hg), níquel (Ni) e antimônio (Sb) (TSUTIYA *et al.*, 2001).

O lodo de esgoto pode conter concentrações significativas de diversas classes de contaminantes orgânicos. Entre os que são mais encontrados estão os clorobenzenos (CB), hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), ésteres de ftalatos, fenóis não clorados, fenóis clorados e poluentes orgânicos persistentes (POPs). Embora essas substâncias apresentem baixas concentrações no lodo, elas podem apresentar sérios riscos à saúde e ao meio ambiente devido à toxicidade de alguns destes contaminantes (CAI *et al.*, 2007b).

2.2 Clorobenzenos

Os clorobenzenos CBs são formados pela substituição de até seis átomos de cloros com um anel aromático. De acordo com a quantidade de átomos de cloros substituídos ao benzeno, estes compostos são denominados monoclorobenzeno, diclorobenzenos, triclorobenzenos, tetraclorobenzenos, pentaclorobenzenos e hexaclorobenzenos. Eles possuem propriedades físico-químicas e diferentes aplicações comerciais.

Os clorobenzenos podem ser encontrados nas formas de sólidos ou cristais brancos e líquidos incolores. Estes compostos causam irritação nos olhos, na pele, nas mucosas e no sistema respiratório. São absorvidos pela pele ou podem ser ingeridos através de alimentos (RATHORE, 2012).

Na TAB. 1 encontram-se as características físico-químicas dos clorobenzenos citados pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA na resolução nº 375 de 2006.

TABELA 1
Características físico-químicas dos clorobenzenos

Substância	Massa molecular (g mol ⁻¹)	Solubilidade em água (g m ⁻³)	Pressão de Vapor (Pa)	Log Kow	Ponto de ebulição (°C)	Período de meia vida (horas)			
						Ar	Água	Solo	Sedimento
1,2-diclorobenzeno	147,0	118,0	196,0	3,4	178°C	550	1700	5500	17000
1,3-diclorobenzeno	147,0	120,0	307,0	3,4	173°C	550	1700	5500	17000
1,4-diclorobenzeno	147,0	83,0	90,2	3,4	173°C	550	1700	5500	17000
1,2,3-triclorobenzeno	181,5	21,0	28,0	4,1	218°C	550	1700	5500	17000
1,2,4-triclorobenzeno	181,5	40,0	61,0	4,1	214°C	550	1700	5500	17000
1,3,5-triclorobenzeno	181,5	5,3	32,0	4,1	208°C	550	1700	5500	17000
1,2,3,4-tetraclorobenzeno	215,9	7,8	5,2	4,5	254°C	1700	5500	5500	17000
1,2,4,5-tetraclorobenzeno	215,9	1,3	0,7	4,5	244°C	1700	5500	5500	17000
1,2,3,5-tetraclorobenzeno	215,9	3,6	9,8	4,5	246°C	1700	5500	5500	17000

Nota: Log Kow: coeficiente de partição octanol-água
Fonte: Adaptado de MACKAY *et al.*, 1992.

O aumento da quantidade de halogênios no anel benzênico dos clorobenzenos aumenta as características hidrofóbicas ($> \log K_{ow}$), toxicológicas, bem como o poder de adsorção no solo (FIELD; ALVAREZ, 2008; MACLEOD; MACKAY, 1999). Esses compostos quando lançados em águas se adsorvem em material particulado e sedimentos, podendo provocar bioconcentração em organismos vivos (RATHORE, 2012). A FIG. 1 apresenta as estruturas químicas dos CBs e seus isômeros.

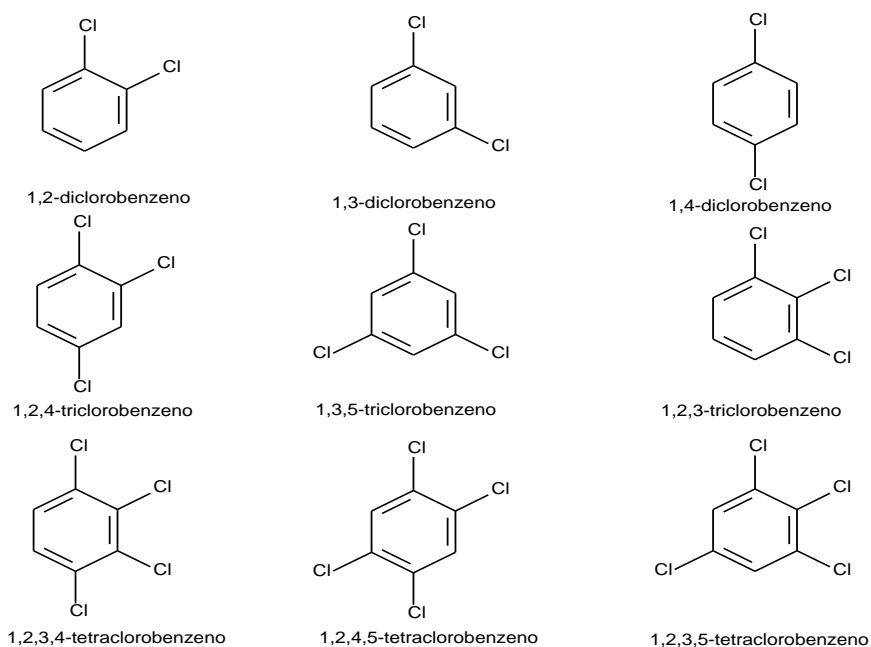


FIGURA 1 – Representação das estruturas químicas de nove clorobenzenos.
Fonte: Da autora.

2.2.1 Fontes e atuações dos clorobenzenos no meio ambiente

Os CBs são compostos voláteis e geralmente são emitidos por produtos de limpeza domésticos, removedores de tintas, produtos farmacêuticos, solventes para limpeza de máquinas, materiais gráficos,

intermediários na síntese de pesticidas, desodorantes e purificadores de ar (KAMAREI *et al.*, 2010). Possuem características tóxicas, compreendem um grupo importante de contaminantes ambientais e são citados como poluentes prioritários pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos - USEPA (GUERIN, 2008; SAITO, 2007; WANG *et al.*, 2007).

Devido à diversificada utilização, estes compostos encontram-se difundidos no meio ambiente e podem ser encontrados em efluentes industriais (ROHAC *et al.*, 1999), solo, água superficial e subterrânea (CHISVERT *et al.*, 2009; KOZANI *et al.*, 2007; VENINGEROVÁ *et al.*, 1997), ar (POPP *et al.*, 2000), biota (VORKAMP *et al.*, 2004), sedimentos (OLIVER; NICOL, 1982), fertilizantes (MO *et al.*, 2008) e no lodo de esgoto (CAI *et al.*, 2007a; CAI *et al.*, 2007b; HARRISON *et al.*, 2006; MIN-JIAN *et al.*, 1991). Ainda há relatos do acúmulo desses compostos em tecido adiposo de humanos e outros seres vivos, justificado pela sua baixa solubilidade em água e por serem quimicamente estáveis (FU, 2011; MORITA *et al.*, 1975; ROHAC *et al.*, 1999).

A contaminação do ambiente com compostos orgânicos voláteis gera preocupação com a saúde, visto que alguns destes compostos têm efeitos adversos, incluindo o potencial carcinogênico (VIDAL *et al.*, 2005). Estudos recentes apontam que fontes de clorobenzenos como os agrotóxicos, produtos de limpeza e purificadores de ar são matrizes de interesse na pesquisa do câncer de mama (ZOTA *et al.*, 2010). De acordo com Butterworth (2007) e Rodriguez (2012), o composto 1,4-diclorobenzeno apresenta evidências para o mecanismo de ação tumoral e provavelmente é carcinogênico para humanos. Além disso, em pesquisa realizada com o 1,2,4,5 – tetraclorobenzeno, resultados sugeriram que este também é um possível causador de tumores no fígado de ratos, podendo promover a formação de focos pré-neoplásicos (GUSTAFSON *et al.*, 1998).

Compostos como o hexaclorobenzeno e o 1,2,4-triclorobenzeno podem afetar as funções fisiológicas e comportamentais mesmo em concentrações baixas (VIDAL *et al.*, 2005). Um estudo realizado por uma mistura desses dois compostos foi administrada em ratos para avaliar comportamentos neurológicos e concluiu-se que as doses de tais poluentes ambientais representaram riscos potenciais de ansiedade e/ou consequências agressivas em indivíduos expostos, incluindo os seres humanos (VALKUSZ *et al.*, 2011).

Pesquisas realizadas com animais marinhos da Groelândia, Ártico, Svalbard e Islândia mostram que entre os clorobenzenos, o hexaclorobenzeno foi o principal componente detectado em quase todas as amostras. Os clorobenzenos se acumulam na cadeia alimentar marinha de forma semelhante aos poluentes orgânicos persistentes, sendo encontrados em concentrações maiores nas baleias brancas, baleias minke e no narval (VORKAMP *et al.*, 2004).

No rio Xijiang, localizado na China, estudos em plantas daninhas relataram a presença dos clorobenzenos como agente poluidor, sendo detectados quase todos os clorobenzenos. Este rio é a principal fonte de água para cerca de 4,5 milhões de população urbana e 28,7 milhões de população rural. Esta contaminação pode ser causada pelas descargas de efluentes industriais, além do uso extensivo de agrotóxico na agricultura (DU *et al.*, 2007).

Contaminação de solos com clorobenzenos também são descritas e alternativas para eliminar esses compostos do solo já foram propostas (SONG *et al.*, 2012). Considerando que a degradação fotoquímica dos clorobenzenos seja muito lenta, a degradação microbiológica foi estudada como técnica potencial à remoção desses compostos, em que bactérias são capazes de usar esses compostos como fonte de carbono e energia, sob condições aeróbias (GUERIN, 2008; WANG *et al.*, 2007).

2.3 Legislação para o uso agrícola do lodo de esgoto

A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos - US EPA publicou em 1993 o código de regulação federal que estabelece padrões para uso e disposição de lodos de esgoto. Entretanto, limites máximos tolerados de contaminantes orgânicos não foram incluídos. O Conselho Diretor da Comunidade Econômica Europeia divulgou a Diretiva 86/278/EEC para proteção do ambiente quando o lodo de esgoto é utilizado na agricultura. Nessa Diretiva foi estabelecida a dose máxima de aplicação anual de lodo de esgoto no solo e também os limites máximos de metais pesados nessas duas matrizes (EUROPEAN COMMISSION, 1986).

No Brasil, a legislação em vigor define critérios e procedimentos, para o uso agrícola de lodos de esgoto gerados em estações de tratamento de esgoto sanitário e seus produtos derivados por meio da Resolução Nº 375, de 29 de agosto de 2006 do Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA.

Na TAB. 2 são apresentadas as concentrações permitidas dos clorobenzenos no lodo de esgoto para aplicação em solo segundo a resolução CONAMA 375/2006.

TABELA 2
Concentrações de clorobenzeno no solo estabelecidas pela resolução
CONAMA, nº375 de 2006

Clorobenzenos	Concentração permitida no solo (mg Kg⁻¹)
Isômeros do Diclobenzeno	
	0,7300
1,2 – Diclorobenzeno	0,3900
1,3 – Diclorobenzeno	0,3900
1,4 – Diclorobenzeno	
Isômeros do Triclobenzeno	
	0,0100
1,2,3 – Triclorobenzeno	0,0110
1,3,5 – Triclorobenzeno	0,5000
1,2,4 – Triclorobenzeno	
Isômeros do Tetraclobenzeno	
	0,0065
1,2,3,5 – Tetraclorobenzeno	0,1600
1,2,3,4 – Tetraclorobenzeno	0,0100
1,2,4,5 – Tetraclorobenzeno	

Fonte: Resolução nº 375 de 2006 do Conselho Nacional do Meio Ambiente
- CONAMA.

2.4 Métodos de análises de clorobenzenos em lodo

A determinação de contaminantes orgânicos no lodo de esgoto é obtida através das etapas de extração dos analitos, purificação dos extratos para remover interferentes (*clean up*) e a quantificação é realizada por cromatografia gasosa (CG) ou cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (QUEIROZ *et al.*, 2009). Compostos voláteis e que possuem boa estabilidade térmica são amplamente analisados por cromatografia gasosa. Já a maioria dos compostos termicamente instáveis e com baixa volatilidade são analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (SONG *et al.*, 2011).

Na TAB. 3, uma variedade de técnicas de extração, quantificação e identificação comumente utilizadas para clorobenzenos é apresentada.

TABELA 3
Métodos utilizados para determinação de clorobenzenos em diversas matrizes

Matriz analisada	Método de extração	Método de análise	Referências
Sedimentos, água e peixes	Soxhlet por 24h	CG-DCE	OLIVER; NICOL, 1982
Lodo	Soxhlet por 6h	CG-DCE	MIN-JIAN; JONES, 1994
Vegetais, solo e água	Soxhlet por 8h	CG-DCE	VENINGEROVÁ <i>et al.</i> , 1997
Solo	Microextração em fase sólida por <i>headspace</i>	CG-EM*	SANTOS <i>et al.</i> , 1997
Lodo de esgoto	15 mL de diclorometano e 30 mL de éter dietílico – sonicadas e centrifugadas	CG-EM	LEGA <i>et al.</i> , 1997
Solo	Microextração em fase sólida (MEFS)	CG-EM*	SARRION <i>et al.</i> , 1998
Solo	Microextração em fase líquida (MEFL) por <i>headspace</i>	CG-DCE	SHEN; LEE, 2003
Lodo	Soxhlet por 24h	CG-EM	CAI <i>et al.</i> , 2007a
Lodo e palha de arroz	Soxhlet por 24h	CG-EM	CAI <i>et al.</i> , 2007b

Notas: CG: Cromatografia Gasosa; EM: Espectrômetro de Massas DCE: Detector de Captura de Elétrons; *Cromatografia gasosa acoplada ao detector espectrômetro de massas de armadilha de íons
Fonte: Da autora.

A técnica de extração Soxhlet tem sido muitas vezes preferida por ser um método padronizado. No entanto, também requer elevados volumes de solventes e pode degradar compostos termolábeis, além de um longo tempo de extração, em torno de 6 a 24 horas (BANJO; NELSON, 2005). Já as microextrações em fase sólida e em fase líquida, apesar de serem técnicas rápidas e isentas do uso de solventes, possuem alto custo do conjunto de fibras, além de serem específicas ao analito em estudo (SANTOS NETO; SIQUEIRA, 2005).

Cada uma das técnicas têm o seu mérito e a escolha depende de vários fatores, incluindo custo do equipamento, custo operacional, quantidade de solvente orgânico requerida, número de amostras que podem ser extraídas por unidade de tempo e disponibilidade de métodos padronizados (ZULOAGA *et al.*, 2012).

Dessa forma, novas técnicas de extração para análise dos clorobenzenos devem ser investigadas, a fim de minimizar os solventes residuais e reduzir o tempo e os procedimentos analíticos. Uma alternativa às tradicionais técnicas é a extração sólido-líquido com purificação em baixa temperatura (ESL- PBT), por ser simples, de baixo custo, utilizar quantidades reduzidas de solvente (SILVÉRIO *et al.*, 2012) e ainda não ter sido empregada para análise de clorobenzenos em lodo de esgoto.

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

A extração sólido-líquido com purificação em baixa temperatura (ESL-PBT), de forma semelhante à extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (ELL-PBT), é um método alternativo para a extração de analitos em matrizes sólidas e complexas. Essas técnicas já foram aplicadas respectivamente em extratos orgânicos de tomate, maçã, solo, batata, fígado, alcatra, manteiga e extratos orgânicos de

amostras de leite, mel e água para a análise de agrotóxico (GOULART *et al.*, 2008; MARTHE *et al.*, 2010; PINHO *et al.*, 2010a; PINHO *et al.*, 2010b; PINHO *et al.*, 2010c; SILVÉRIO *et al.*, 2012; VIEIRA *et al.*, 2007).

A técnica consiste em colocar a amostra sólida em contato com um solvente menos denso que a água e com ponto de fusão abaixo de -20°C; o sistema é, então, agitado e posteriormente levado ao *freezer* por um tempo até que ocorra a separação de fases. Durante o resfriamento, a matriz é congelada com a fase aquosa e o solvente orgânico líquido, juntamente com os analitos de interesse; depois, é separado e analisado por cromatografia (VIEIRA *et al.*, 2007).

A vantagem desta técnica é que, em uma única etapa, é possível obter extratos mais limpos, que podem ser diretamente analisados por cromatografia em fase gasosa, sem a necessidade de um *clean up*. Além da praticidade, possui número de etapas reduzido, baixo consumo de amostra e solventes orgânicos (PINHO *et al.*, 2010b).

A otimização do solvente de extração, tempo de homogeneização, pH, força iônica e temperatura de extração podem viabilizar a aplicação da técnica ESL-PBT para a análise de clorobenzenos em lodo de esgoto.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

- Otimizar e validar a ESL-PBT para a extração e quantificação de nove compostos orgânicos presentes em amostras de lodo de esgoto, conforme especificação na Resolução do CONAMA nº375 de 2006.

2.2 Objetivos específicos

- Estabelecer as condições de análise simultânea de 9 compostos orgânicos (1,2-diclorobenzeno, 1,3-diclorobenzeno, 1,4-diclorobenzeno, 1,2,3-triclorobenzeno, 1,2,4-triclorobenzeno, 1,3,5-triclorobenzeno, 1,2,3,4-tetraclorobenzeno, 1,2,4,5-tetraclorobenzeno, 1,2,3,5-tetraclorobenzeno, por cromatografia gasosa acoplada a detector de espectrometria de massas (CG-EM);
- Otimizar e validar a extração e quantificação destes compostos em amostras de lodo fortificados, empregando a ESL-PBT;
- Comparar o método proposto com o método de referência (sohxlet);
- Empregar a metodologia otimizada, ESL-PBT, para o monitoramento dos compostos em amostras de lodo, coletadas mensalmente no período de um ano, na estação de tratamento de esgoto de Montes Claros-MG.

CAPÍTULO 2 – DETERMINAÇÃO DE CLOROBENZENOS EM LODO DE ESGOTO POR EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO COM PURIFICAÇÃO EM BAIXA TEMPERATURA COMBINADO COM CROMATOGRAFIA GASOSA E ESPECTROMETRIA DE MASSAS

RESUMO

Os clorobenzenos são compostos orgânicos voláteis, tóxicos, persistentes no ambiente e possuem capacidade de bioacumulação em organismos vivos. Estão presentes em várias matrizes ambientais, entre elas o lodo de esgoto. Este trabalho realizou a otimização, validação e aplicou a técnica de extração sólido-líquido com purificação em baixa temperatura para análise de nove clorobenzenos em lodo de esgoto. Este método de extração é promissor por ser prático e econômico em relação aos demais métodos de extração de clorobenzenos. As análises foram realizadas por cromatografia gasosa acoplada com o detector de espectrometria de massas. Após a otimização univariada da fase extratora, um planejamento fatorial foi empregado para avaliar a influência das variáveis pH, força iônica e tempo de homogeneização. Em seguida, foi otimizado o tempo de aquecimento para extração dos compostos. O método mostrou-se seletivo, com limite de detecção e quantificação abaixo de $4,1 \mu\text{g kg}^{-1}$ e $12,5 \mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente, e as porcentagens de extração foram cerca de 70% e com desvio padrão relativo inferior a 12,97% para os clorobenzenos analisados. No monitoramento mensal das amostras de lodo foram detectados três compostos: 1,4-CB, 1,2,4-CB e 1,2,3-CB. Destes, apenas o 1,2,3-CB foi quantificado em concentrações acima do máximo aceitável de clorobenzenos em solo agrícola conforme a resolução nº375/2006 do Conselho Nacional do Meio Ambiente.

Palavras-chave: Biossólidos. Contaminantes orgânicos. Métodos de Extração. Amostras reais.

CHAPTER 2 - DETERMINATION OF CHLOROBENZENES IN SEWAGE SLUDGE BY SOLID-LIQUID EXTRACTION WITH PURIFICATION AT LOW TEMPERATURE COMBINED WITH GAS CHROMATOGRAPHY AND MASS SPECTROMETRY

ABSTRACT

Chlorobenzenes are volatile organic compounds, toxic, persistent in the environment with the ability to bioaccumulate in living organisms. They are present in several environmental matrices, among them the sewage sludge. This work constitutes the optimization, validation and application of the solid-liquid extraction with purification at low temperature technique for the analysis of nine chlorobenzenes in sewage sludge. This extraction method is promising because it is practical and economical in comparison to other methods of extraction of chlorobenzenes. Analyses were performed by gas chromatography coupled with mass spectrometry detector. After optimization of the univariate extraction phase, a factorial design was used to evaluate the influence of pH, ionic strength and homogenization time. Afterwards, the heating time for extraction of compounds was optimized. The method proved to be selective, with a limit of detection and quantification below 4.1 mg kg⁻¹ and 12.5 mg kg⁻¹, respectively, and the extraction percentages were about 70% and relative standard deviation less than 12.97% for the chlorobenzenes analyzed. In the monthly monitoring of the sludge samples three compounds were detected: 1,4-CB, 1,2,4-CB and 1,2,3-CB. From these, only the 1,2,3-CB was quantified at concentrations above the maximum acceptable chlorobenzenes in agricultural soil, according to the resolution n ° 375/2006 of the National Council on the Environment.

Keywords: Biosolids. Organic contaminants. Extraction methods. Real samples.

1 INTRODUÇÃO

Clorobenzenos são substâncias químicas utilizadas amplamente na indústria como solventes orgânicos, agrotóxicos, fluidos dielétricos, desodorantes e intermediários na síntese de compostos químicos (KOZANI *et al.*, 2007). Quando expostos ao meio ambiente, são altamente tóxicos, podendo apresentar atividade carcinogênica, teratogênica e mutagênica. Além disso, esses compostos são persistentes no ambiente e possuem capacidade de bioacumulação em organismos vivos (KHAN *et al.*, 2008; MACLEOD *et al.*, 1999).

Esses contaminantes podem ser encontrados em várias matrizes ambientais, tais como solo, águas superficiais e subterrâneas (CHISVERT *et al.*, 2009; KOZANI *et al.*, 2007; VENINGEROVÁ *et al.*, 1997), ar (POPP *et al.*, 2000), biota (VORKAMP *et al.*, 2004), sedimentos (OLIVER; NICOL, 1982), fertilizantes (MO *et al.*, 2008) e no lodo de esgoto (CAI *et al.*, 2007b; HARRISON *et al.*, 2006; MIN-JIAN *et al.*, 1991).

O lodo de esgoto é um subproduto do tratamento do esgoto doméstico e/ou industrial e possui uma composição química muito complexa (PENA *et al.*, 2008; SILVA, 2009). As características desse subproduto dependem, principalmente, da origem e do grau de tratamento nas Estações de Tratamento de Esgoto (ETE) (TSUTIYA *et al.*, 2001). Uma das formas de disposição final do lodo de esgoto é o aproveitamento como condicionador e fertilizante de solos agrícolas e florestais, em virtude da riqueza de nutrientes e de matéria orgânica (BOEIRA *et al.*, 2009; CAMPOS; ALVES, 2008; GALDOS *et al.*, 2009). O lodo já foi aplicado a diversas culturas como girassol (MAIO *et al.*, 2011), eucalipto (GUEDES *et al.*, 2006), *Acacia mangium* (DUARTE *et al.*, 2011), milho, feijão (RODRIGUES *et al.*, 2006), entre outros. No entanto, se utilizado de forma arbitrária, pode trazer problemas ao ambiente, devido à presença de patógenos, metais com densidade superior a 4

g/cm^3 e contaminantes orgânicos como, por exemplo, os clorobenzenos (PENA *et al.*, 2008).

Para a utilização segura e adequada do lodo de esgoto, a resolução n°375/2006 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) estabeleceu limites de concentração dos clorobenzenos no solo que variam de 6,5 a $730 \mu\text{g Kg}^{-1}$.

O monitoramento de clorobenzenos em lodo de esgoto, tradicionalmente tem sido realizado utilizando o soxhlet, mas esse procedimento é laborioso e consome elevada quantidade de solventes orgânicos (CAI *et al.*, 2007b; VENINGEROVÁ *et al.*, 2007; MIN-JIAN; JONES, 1994). Outras técnicas também têm sido utilizadas para a extração dos clorobenzenos, como o *headspace* (GUERIN, 2008; SILVA, 2009), microextração em fase sólida (SARRION *et al.*, 1998), microextração em fase sólida e em fase líquida por *headspace* (SANTOS *et al.*, 1997; SHEN; LEE, 2003).

Diante da carência de técnicas de extração modernas de clorobenzenos em lodo de esgoto e da complexidade da matriz, a técnica de extração sólido-líquido com purificação em baixa temperatura (ESL-PBT) apresenta-se como uma alternativa promissora. Essa técnica tem sido aplicada para análise de contaminantes em amostras de tomate (PINHO *et al.*, 2010a), água (SILVÉRIO *et al.*, 2012), manteiga (MARTHE *et al.*, 2010), entre outros.

O princípio da técnica baseia-se no congelamento da amostra com o abaixamento da temperatura e a extração dos analitos para uma fase orgânica líquida. O método tem apresentado algumas vantagens em relação a outras técnicas de extração, como praticidade, número de etapas reduzidas, baixo consumo de amostras e solventes orgânicos. Além disso, possui compatibilidade de análises dos extratos por cromatografia gasosa e líquida de alta eficiência utilizando diferentes detectores (GOULART *et al.*, 2010).

Este trabalho otimizou e validou a ESL-PBT para análise dos nove clorobenzenos especificados pelo CONAMA (n° 375/2006), em amostras de lodo de esgoto por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. As características e os resultados obtidos no método otimizado foram comparados ao método referência, o soxhlet. A ESL-PBT foi aplicada em amostras reais de lodo para o monitoramento de clorobenzenos durante o período de 11 meses. As amostras foram coletadas mensalmente.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostras

As amostras de lodo de esgoto utilizadas para otimizar o procedimento metodológico foram obtidas da Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) de Juramento-MG e eram provenientes apenas de esgoto doméstico. As amostras foram coletadas em pontos aleatórios no leito de secagem, como indicado pelas normas da ABNT/NBR 10007:2004. Em seguida, foram armazenadas em frascos de vidro no refrigerador a 4°C. Para determinar o teor de umidade do lodo pelo método gravimétrico, 2,00 g de amostras em triplicata foram deixadas em estufa a 105 °C por 5 horas (PENA *et al.*, 2008).

2.2 Reagentes e soluções

Os padrões 1,2-Diclorobenzeno (1,2-CB), 1,3-Diclorobenzeno (1,3-CB), 1,4-Diclorobenzeno (1,4-CB), 1,2,3-Triclorobenzeno (1,2,3-CB), 1,2,4-Triclorobenzeno (1,2,4-CB), 1,3,5-Triclorobenzeno (1,3,5-CB), 1,2,3,4-Tetraclorobenzeno (1,2,3,4-CB), 1,2,3,5-Tetraclorobenzeno (1,2,3,5-CB), 1,2,4,5-Tetraclorobenzeno (1,2,4,5-CB) e o padrão interno (PI) naftaleno (NAF) grau analítico foram fornecidos pela Sigma- Aldrich (St. Louis, USA).

Soluções padrão estoque dos nove clorobenzenos e do naftaleno foram preparadas individualmente em acetonitrila na concentração de 500 mg L⁻¹ e armazenadas em temperatura de 4°C. A partir da diluição das soluções estoque, foi preparada uma solução padrão de trabalho contendo os nove clorobenzenos e outra contendo o naftaleno na concentração de 25 mg L⁻¹ em mesmo solvente.

Acetonitrila, acetato de etila e diclorometano, grau CLAE-UV, obtidos da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil) foram utilizados como

solventes. Também foram utilizados sulfato de sódio anidro, cloreto de sódio (NaCl) e hidróxido de sódio da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil) com grau de pureza superiores a 99%. Foi utilizada a sílica gel, 230-400 mesh, (Carvalhaes, Alemanha) condicionada com a mistura de acetonitrila, diclometano e acetato de etila e, em seguida, seca em estufa a ± 45 °C.

2.3 Equipamentos e condição de análises

Na otimização e validação do método de extração foram utilizados o vórtex da Phoenix (São Paulo, Brasil) e o pHmetro microprocessado da Quimis (São Paulo, Brasil).

As análises foram realizadas no cromatógrafo a gás da Agilent Technologies (CG 7890A) acoplado ao espectrômetro de massas (MS 5975C) e coluna capilar HP-5 MS (Agilent Technologies) com fase estacionária 5% fenil e 95% metilpolisiloxano (30 m comprimento x 0,32 mm diâmetro interno x 0,25 μm espessura do filme interno). Hélio (99,99999% de pureza) foi utilizado como gás de arraste a uma taxa de 1,2 mL min^{-1} . O injetor *split/splitless* foi mantido a 280 °C. A temperatura da coluna cromatográfica foi mantida a 70 °C permanecendo por 4 minutos. Em seguida, foi aquecida a uma taxa de 5 °C min^{-1} até 180 °C. Após a separação dos compostos, a temperatura da coluna foi elevada até 300 °C, permanecendo por 3 minutos (*post run*). O volume da amostra introduzido foi de 1 μL no modo de injeção com divisão de fluxo (*split*) a uma razão de 1:5, utilizando um injetor Combi PAL. O espectrômetro de massas foi operado com ionização por impacto de elétrons a 70 eV e um analisador de massas tipo quadrupolo. A interface foi mantida a 240 °C e a fonte de íons a 230 °C.

Na otimização do método, a aquisição de dados foi realizada no modo de varredura total (*scan*) na faixa de 50-450 (m/z). Na validação, as análises foram feitas no modo monitoramento de íons seletivo (MIS) e

a aquisição de dados foi dividida em três grupos de íons, como representado na TAB. 1.

TABELA 1

Grupos de íons de clorobenzenos utilizados para análise cromatográfica (CG-EM) dos compostos na etapa de otimização do método

Grupo	Compostos	$t_r^{(1)}$	m/z	
1	Diclorobenzenos	1,3-CB	6,73	84, 111,
		1,4-CB	6,91	146, 148,
		1,2-CB	7,56	150;
2	Triclorobenzenos e PI ⁽²⁾	1,3,5-CB	10,43	74, 109,
		1,2,4-CB	11,76	128, 145,
		1,2,3-CB	12,80	180;
		Naftaleno	-	
3	Tetraclorobenzenos	1,2,3,5-CB	16,01	89, 108,
		1,2,4,5-CB	16,07	143, 179,
		1,2,3,4-CB	17,36	216.

Notas: ⁽¹⁾ Tempo de retenção; ⁽²⁾ Padrão Interno
Fonte: Da autora.

2.4 Procedimento analítico

2.4.1 Amostras de lodo de esgoto fortificadas

Para a otimização do método, amostras de lodo de leite de secagem (isentas dos clorobenzenos) foram peneiradas (16 mesh) e homogeneizadas. Uma massa de 4,00 g de amostra foi aferida em frasco de vidro transparente de 22,0 mL (*via*) e fortificada com 100 μ L de solução de trabalho, contendo os nove clorobenzenos, na concentração de 25,0 mg L⁻¹. As amostras fortificadas (0,625 mg kg⁻¹) foram deixadas em repouso por três horas, à temperatura ambiente, em frasco fechado.

2.4.2 Extração sólido-líquido com purificação em baixa temperatura

Aos frascos contendo 4,00 g de amostras de lodo fortificadas foram adicionados 2,40 mL de água destilada e 8,00 mL de fase extratora. Em seguida, este sistema foi homogeneizado em vórtex e resfriado a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 45 min. Após o congelamento do lodo com a água, a fase orgânica ainda líquida foi transferida para uma coluna cromatográfica de vidro (20 cm de comprimento x 10 mm de diâmetro) contendo 1,50 g de sulfato de sódio anidro e 2,00 g de sílica. O fluxo foi mantido a $0,50\text{ mL min}^{-1}$ e a coluna cromatográfica foi eluída com acetonitrila até obter o volume final de 5,00 mL de extrato. Ao eluato foram adicionados $100\text{ }\mu\text{L}$ de naftaleno (padrão interno) na concentração de $25,0\text{ mg L}^{-1}$. Em seguida, $1,00\text{ mL}$ dos extratos foi filtrado em membrana de *nylon* de $0,45\text{ }\mu\text{m}$ e transferido para *vial* de injeção. Os *vials* foram armazenados em geladeira a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento da análise por CG-EM. O procedimento de extração foi realizado em triplicata, juntamente com um branco, para avaliar a possível presença dos clorobenzenos e/ou interferentes, que poderiam influenciar na etapa de quantificação.

2.5 Otimização dos parâmetros de extração

A otimização do método ESL-PBT para os clorobenzenos foi dividida em três etapas: 1) avaliação da fase extratora; 2) emprego de um planejamento fatorial completo de 2^3 fatores e dois níveis; 3) avaliação da temperatura de extração. A composição da fase extratora (monofásica) foi obtida a partir dos solventes acetonitrila (ACN), acetato de etila (ACT) e diclorometano (DCM). Quatro fases extratoras foram avaliadas com diferentes proporções entre os solventes: (1) 6,50 mL de acetonitrila, 1,00 mL de acetato de etila e 0,50 mL de diclorometano; (2)

7,30 mL de acetonitrila e 0,70 mL de diclorometano; (3) 7,00 mL de acetonitrila e 1,00 mL acetato de etila; (4) 8,00 mL de acetonitrila.

Um planejamento fatorial completo de três fatores e dois níveis foram utilizados para obter extratos com maiores taxas de recuperação dos clorobenzenos. Adotou-se a combinação dos fatores: (1) tempo de homogeneização em vórtex, (2) pH e (3) força iônica (TAB. 2).

TABELA 2
Planejamento fatorial 2^3 para amostras de lodo de esgoto fortificadas ($0,625 \mu\text{g g}^{-1}$)

Ensaio	Fatores codificados			Fatores originais		
	F1	F2	F3	Tempo de Homogeneização (min)	pH	Força iônica (g de NaCl)
1	-	-	-	2	7,0	0
2	+	-	-	5	7,0	0
3	-	-	+	2	7,0	0,48
4	+	-	+	5	7,0	0,48
5	-	+	-	2	14	0
6	+	+	-	5	14	0
7	-	+	+	2	14	0,48
8	+	+	+	5	14	0,48

Fonte: Da autora.

O planejamento fatorial 2^3 requer 8 ensaios em duplicatas, totalizando 16 experimentos. Para os níveis mais baixos foram empregados os sinais negativos e para os níveis mais altos, sinais positivos. Para avaliar os efeitos dos fatores deste planejamento fatorial foram usadas as porcentagens de recuperação obtidas para cada um dos clorobenzenos após extração nas amostras de lodo de esgoto, empregando a ESL-PBT.

Dessa forma, os ensaios foram delineados da seguinte maneira: às amostras fortificadas foram acrescidas 2,40 mL de água destilada com pH 7,00 e 14,0 para o fator (2), correspondentes aos respectivos níveis (-) e (+); 0 g e 0,48 g de NaCl para o fator (3), que correspondem

sequeencialmente aos níveis (-) e (+). Em seguida, foram acrescentados 8 mL de fase extratora e o sistema foi homogeneizado, fator (1), em vórtex por 2 min (-) 5 min (+). Após a homogeneização, o sistema foi resfriado a -18°C por 45 min.

Para melhorar a eficiência de extração de clorobenzenos, avaliou-se também o efeito do aquecimento das amostras no procedimento da ESL-PBT. Após a adição de 2,40 mL de água destilada no lodo de esgoto fortificado com clorobenzenos, as amostras foram submetidas ao aquecimento a 50 °C em banho-maria por 10 e 25 min. Em seguida, a fase extratora foi adicionada e o sistema homogeneizado.

2.6 Efeito de matriz

Para observar o efeito de matriz na ESL-PBT de clorobenzenos em amostras de lodo e na análise por CG-EM, foi realizado o estudo de superposição de matriz. Dessa forma, foram preparadas duas curvas analíticas: uma em extrato da matriz e outra no solvente acetonitrila nas faixas de concentração de cada composto.

2.7 Validação

Para assegurar a credibilidade, o método analítico proposto foi validado em relação às principais figuras de mérito: seletividade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), linearidade, precisão e exatidão, conforme sugerido pelo Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade - INMETRO (BRASIL, 2010).

2.8 Aplicação em amostras reais

O método otimizado e validado foi utilizado para o monitoramento de clorobenzenos em amostras de lodo provenientes da estação de

tratamento de esgoto de Montes Claros - MG. As amostras coletadas são derivadas da etapa de centrifugação (torta de lodo) e da secagem térmica a 300 °C (lodo seco). O teor de umidade das amostras é cerca de $\pm 72\%$ (m/m) e 20% (m/m), respectivamente.

Essas amostras foram coletadas mensalmente, no período de dezembro de 2011 a outubro de 2012. Após a coleta, foram devidamente armazenadas em refrigerador a 4 °C até o momento das análises.

2.9 Comparação entre os métodos de extração

A técnica ESL-PBT foi comparada à de extração em sohxlet. O procedimento utilizado por essa técnica tradicional foi baseado nos métodos modificados 3540C e 3630 estabelecidos pela EPA para análise de compostos orgânicos em amostras sólidas e por CAI *et al.*, 2007b.

Aproximadamente 20,0 g de amostras de lodo fortificadas foram envolvidas em cartuchos de papel de filtro com pedaços de cobre previamente ativados. Os cartuchos foram colocados no extrator sohxlet e a extração foi realizada com 250 mL de fase extratora constituída de acetona:diclorometano (1:1, v/v) durante 24 horas. Os extratos obtidos foram concentrados em evaporador rotatório e recuperados em 5 mL de acetona:diclorometano (1:1, v/v).

Em seguida, os extratos foram submetidos ao *clean up* utilizando colunas cromatográficas empacotadas com algodão, 3,00 cm de alumina, 10,0 cm de sílica gel e 2,00 cm de sulfato de sódio. Os extratos foram eluídos com 20,0 mL de diclorometano e recolhidos em balão de 25,0 mL. Os extratos foram novamente concentrados em evaporador rotatório e recuperados em 0,50 mL de acetonitrila.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Análise cromatográfica

Os extratos obtidos na etapa de otimização foram analisados por CG-EM no modo *scan*. Observou-se nessas análises que os clorobenzenos são eluídos no início da corrida cromatográfica, enquanto que a maioria dos componentes da matriz são eluídos em maiores temperaturas. Dessa forma, a coluna cromatográfica era submetida a uma isoterma em temperatura elevada (300°C) para limpeza do sistema cromatográfico.

Na etapa de validação, os extratos obtidos foram analisados no modo monitoramento de íons seletivos (MIS), como mostra o GRAF. 1., pois a relação sinal/ruído permitiu quantificar valores inferiores da concentração dos clorobenzenos.

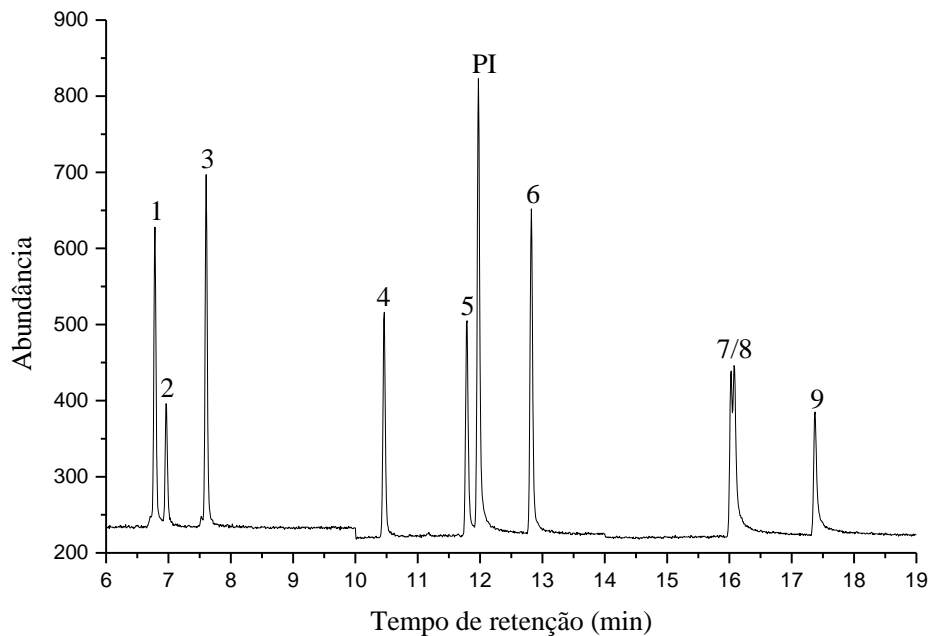


GRÁFICO 1 - Representação do cromatograma obtido a partir de análises por CG-EM: clorobenzenos em acetonitrila de $6,6 \mu\text{g L}^{-1}$ a $20 \mu\text{g L}^{-1}$ e padrão interno (PI) a $20 \mu\text{g L}^{-1}$ em modo MIS. Identificação dos picos: (1) 1,3-CB, (2) 1,4-CB, (3) 1,2-CB, (4) 1,3,5-CB, (5) 1,2,4-CB, PI, (6) 1,2,3-CB, (7) 1,2,3,5-CB, (8) 1,2,4,5-CB e (9) 1,2,3,4-CB.

Nota: PI - padrão interno, naftaleno.

Fonte: Da autora.

Pode-se verificar que apenas os isômeros 1,2,3,5-CB ($t_R=16,01$ min) e 1,2,4,5-CB ($t_R=16,07$ min) não foram bem resolvidos. Entretanto, a coeluição parcial não impediu a quantificação individual de ambos isômeros. Resultados semelhantes foram encontrados por BARRO *et al.*, (2004) e KOZANI *et al.*, (2007) em análises por CG.

3.2 Otimização da ESL-PBT

Lodo de esgoto é uma matriz muito complexa apresentando interferentes que variam de uma amostra para outra, e requer uma metodologia de análise muito eficiente. A extração sólido-líquido com purificação em baixa temperatura, embora tenha sido aplicada em análises de matrizes alimentares, nunca foi empregada para análises em amostras de lodo. Nesse sentido, alguns parâmetros da técnica proposta foram avaliados para obter maior eficiência de extração e menor número de interferentes provenientes da amostra.

3.2.1. Avaliação da fase extratora

Os resultados obtidos com as diferentes fases extratoras de clorobenzenos em lodo de esgotos estão apresentados no GRA. 2. Estes resultados foram submetidos à análise de variância e quando significativos ($p<0,05$), aplicou-se o teste de Duncan (5%).

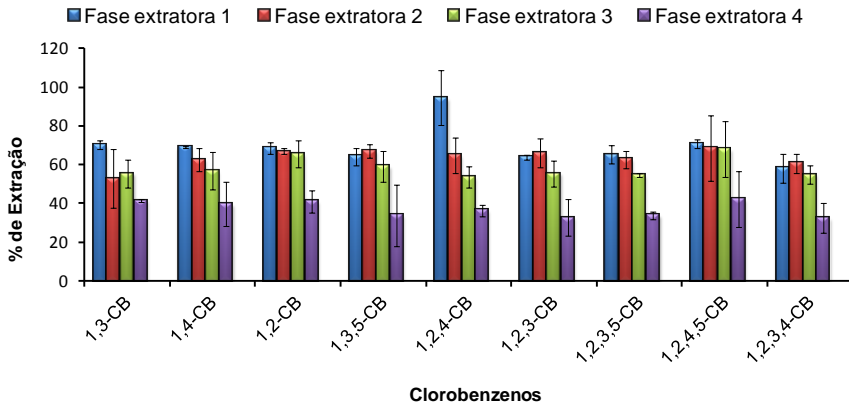


GRÁFICO 2 - Representação da influência da fase extratora sobre a porcentagem de extração dos clorobenzenos (CB) da matriz lodo de esgoto.

Fonte: Da autora.

Observou-se que a ACN apresentou a menor porcentagem de extração para todos os compostos quantificados, variando de 32 a 42% de extração. As demais fases extratoras avaliadas (ACN:ACT:DCM, ACN:DCM, ACN:ACT) possuem resultados semelhantes entre si e melhores porcentagens de extração do que a ACN. Porém, destaca-se a fase extratora acetonitrila/acetato de etila/diclorometano que apresenta maior porcentagem de extração para os compostos 1,3-CB e 1,4-CB. A extração para todos os clorobenzenos analisados foi de 58 a 94%.

3.2.2 Planejamento fatorial

As condições empregadas em cada ensaio e as porcentagens médias de extração obtidas no planejamento fatorial completo 2^3 estão descritas na TAB.3.

As taxas de recuperação dos oito ensaios foram submetidas à análise estatística com o objetivo de avaliar a influência significativa de cada um dos fatores isoladamente bem como das interações entre os fatores em suas taxas de recuperação. Na TAB. 4 estão apresentadas

resumidamente as taxas médias de recuperação de cada um dos clorobenzenos, o efeito de cada fator, suas interações e as estimativas do erro experimental. As estimativas dos efeitos correspondem a influências significativas ao nível de 95% de probabilidade.

Verificou-se que o tempo de homogeneização influenciou significativamente ao nível de 95% de probabilidade pelo teste *t* na porcentagem de extração do 1,2,4,5-CB e 1,2,3,4-CB, aumentando em 9,69 e 11,1%, respectivamente. Esses resultados poderiam ser explicados pelo maior tempo de contato entre amostra e mistura extratora favorecendo a migração dos clorobenzenos para a fase orgânica (ZHOU *et al.*, 2008). Já a variação do pH não influenciou significativamente na extração dos clorobenzenos estudados.

Embora a adição de sal seja comum em diversos métodos de extração, pois diminui a solubilidade dos compostos orgânicos na fase aquosa e favorece a extração para a fase orgânica, neste trabalho ela apresentou efeito contrário (TAB. 3 e 4). Além de diminuir a extração para 1,3-CB, 1,2-CB, 1,2,4-CB e 1,2,3,4-CB, a presença do sal provocou um aumento dos ruídos da linha de base dos cromatogramas. Isso pode ser justificado pela complexidade da matriz, bem como pela maior extração de interferentes. Observou-se, também, que há um efeito de interação entre os fatores (1) e (3), ou seja, quando a extração é realizada com maior tempo de homogeneização e acréscimo da força iônica, a porcentagem de extração do 1,2,3,4-CB reduziu significativamente cerca de 6,13%.

Para favorecer a extração dos analitos de interesse foi adotada a interação dos fatores (1) e (2), maior tempo de homogeneização e meio básico na otimização. Esta interação elevou as porcentagens de extração dos clorobenzenos a valores que variaram de 59,26% a 73,40%. Possivelmente, esses fatores positivos podem ser decorrentes da neutralização dos lipídeos (pelo meio básico) e do maior tempo de contato entre a fase extratora e a amostra.

TABELA 3

Porcentagens de extração média e desvio padrão relativo de cada um dos clorobenzenos, obtidos nos experimentos do planejamento fatorial para amostras de lodo de esgoto

Ensaio	TH ⁽¹⁾ Fator(1)	pH Fator(2)	FI ⁽²⁾ Fator(3)	1,3- CB	1,4- CB	1,2- CB	1,3,5- CB	1,2,4- CB	1,2,3- CB	1,2,3,5- CB	1,2,4,5- CB	1,2,3,4- CB
1	-	-	-	55,85 (3,57)	56,29 (3,95)	53,42 (5,00)	50,06 (4,98)	50,19 (10,91)	49,61 (5,45)	41,75 (5,70)	59,18 (5,84)	43,93 (8,08)
2	+	-	-	61,66 (9,30)	60,58 (9,68)	62,00 (9,11)	58,74 (7,62)	58,99 (7,61)	62,74 (8,69)	54,60 (8,03)	72,33 (7,80)	60,10 (5,48)
3	-	-	+	46,85 (7,99)	55,01 (4,72)	50,20 (3,92)	47,63 (1,83)	45,85 (4,20)	44,84 (1,07)	39,59 (8,11)	49,82 (2,73)	41,40 (2,97)
4	+	-	+	52,54 (11,67)	50,85 (3,92)	48,23 (11,02)	48,00 (6,38)	49,03 (5,09)	51,01 (8,00)	46,45 (2,71)	62,96 (0,90)	48,62 (3,90)
5	-	+	-	55,69 (8,67)	60,83 (11,47)	59,55 (10,16)	52,46 (10,86)	54,42 (6,18)	54,06 (9,57)	48,79 (5,58)	58,34 (7,08)	43,58 (5,43)
6	+	+	-	62,27 (2,89)	63,65 (7,01)	62,27 (3,21)	59,74 (4,31)	62,42 (2,47)	62,20 (3,33)	59,26 (3,86)	73,40 (0,58)	61,89 (3,15)
7	-	+	+	53,18 (6,78)	54,33 (10,86)	52,16 (3,93)	51,79 (6,34)	48,18 (9,83)	50,42 (8,63)	51,67 (3,52)	65,22 (2,22)	46,01 (5,97)
8	+	+	+	47,56 (1,89)	49,16 (10,63)	49,41 (2,14)	49,14 (2,14)	49,52 (1,73)	48,83 (7,54)	44,57 (7,01)	62,64 (4,20)	48,77 (4,16)

Notas: ⁽¹⁾ TH: Tempo de Homogeneização; ⁽²⁾ FI: Força Iônica

Fonte: Da autora.

TABELA 4

Porcentagens de recuperação média, efeitos de cada fator e interações entre os fatores (\pm estimativa do erro experimental) de extração de cada um dos clorobenzenos, obtidos nos experimentos do planejamento fatorial para amostras de lodo de esgoto

	1,3-CB	1,4-CB	1,2-CB	1,3,5-CB	1,2,4-CB	1,2,3-CB	1,2,3,5-CB	1,2,4,5-CB	1,2,3,4-CB
RM (%) ^(a)	54,45 \pm 0,98	56,34 \pm 1,06	54,66 \pm 0,84	52,20 \pm 0,53	52,33 \pm 0,71	52,96 \pm 0,66	48,33 \pm 0,67	62,99 \pm 0,63	49,29 \pm 0,57
(1) TH ^(b)	3,12 \pm 1,96	-0,56 \pm 2,12	1,65 \pm 1,69	3,42 \pm 1,06	5,33 \pm 1,42	6,46 \pm 1,31	5,77 \pm 1,34	9,69\pm1,26*	11,11\pm1,14*
(2) pH	0,45 \pm 1,96	1,31 \pm 2,12	2,39 \pm 1,69	2,18 \pm 1,06	2,62 \pm 1,42	1,83 \pm 1,31	5,48 \pm 1,34	3,83 \pm 1,26	1,55 \pm 1,14
(3) FI ^(c)	-8,84\pm1,96*	-8,00 \pm 2,12	-9,31\pm1,69*	-6,11 \pm 1,06	-8,36\pm1,42*	-8,38 \pm 1,31	-5,53 \pm 1,34	-5,65 \pm 1,26	-6,18\pm1,14*
(1) e (2)	-2,64 \pm 1,96	-0,62 \pm 2,12	-1,66 \pm 1,69	-1,11 \pm 1,06	-0,66 \pm 1,42	-3,19 \pm 1,31	-4,09 \pm 1,34	-3,45 \pm 1,26	-0,58 \pm 1,14
(1) e (3)	-3,08 \pm 1,96	-4,11 \pm 2,12	-4,01 \pm 1,69	-4,56 \pm 1,06	-3,07 \pm 1,42	-4,17 \pm 1,31	-5,89 \pm 1,34	-4,41 \pm 1,26	-6,13\pm1,14*
(2) e (3)	0,23 \pm 1,96	-2,50 \pm 2,12	-0,82 \pm 1,69	0,48 \pm 1,06	-1,21 \pm 1,42	-0,13 \pm 1,31	-0,38 \pm 1,34	3,71 \pm 1,26	0,83 \pm 1,14
(1), (2) e (3)	-3,02 \pm 1,96	0,12 \pm 2,12	1,27 \pm 1,69	-0,41 \pm 1,06	-0,26 \pm 1,42	-0,69 \pm 1,31	-2,89 \pm 1,34	-4,41 \pm 1,26	-1,65 \pm 1,14

Notas: ^(a) RM: Recuperação média; ^(b) TH: tempo de homogeneização; ^(c) Força Iônica. *Efeito estatisticamente significativo ao nível de 95% de probabilidade pelo teste t.

3.2.3 Efeito do aquecimento

A temperatura afeta o equilíbrio de partição dos clorobenzenos presentes na amostra de lodo e a fase extratora. No GRA. 3 são apresentados os resultados das porcentagens de extração dos clorobenzenos em condições de temperatura a 25 °C e 50 °C (aquecido em banho-maria). Os resultados foram submetidos à análise de variância e, quando significativos ($p < 0,05$), aplicou-se o teste de Duncan (5%).

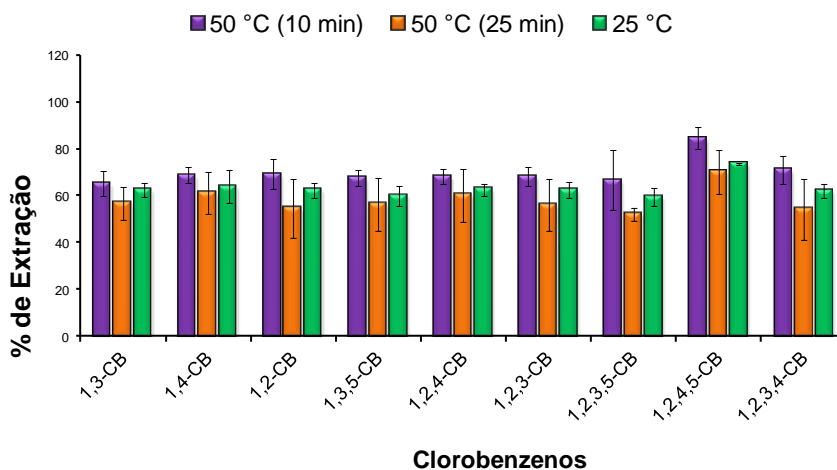


GRÁFICO 3- Representação da influência da temperatura sobre a porcentagem de extração dos clorobenzenos da matriz lodo de esgoto empregando a técnica ESL-PBT.

Fonte: Da autora.

Apenas para os compostos 1,4-CB e 1,2,4-CB não foram verificadas diferenças significativas ($p < 0,05$) quanto à influência da temperatura de aquecimento na porcentagem de extração. Para os demais clorobenzenos, as condições ótimas de extração foram alcançadas aquecendo o sistema a 50 °C. Além disso, estudos comparativos dos tempos de aquecimento por 10 e 25 minutos mostraram que tempos prolongados (25 min) diminuem a extração dos clorobenzenos. Provavelmente, ocorrem perdas por volatilização desses compostos. Resultados semelhantes foram encontrados por KAMAREI *et al.*, (2010).

3.1 Efeito de matriz

O efeito dos coextrativos na resposta cromatográfica dos clorobenzenos foi avaliado pela comparação entre duas curvas analíticas do extrato da matriz e em acetonitrila. Quando somente o coeficiente angular varia caracteriza-se um erro sistemático proporcional, já quando o coeficiente linear varia existe um erro sistemático constante (PINHO *et al.*, 2010b). As duas curvas analíticas preparadas em acetonitrila e extrato de lodo apresentaram coeficientes angulares e lineares diferentes para os clorobenzenos nas análises por CG-EM. A razão entre os coeficientes angulares (matriz/solvente) e coeficientes lineares (matriz/solvente) foram diferentes de 1 como são mostrados na TAB. 5.

TABELA 5

Razão entre os coeficientes angulares (RCA) e lineares (RCL) das curvas analíticas obtidas em acetonitrila e em extratos de lodo de esgoto

Compostos	Faixa de concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Razão coeficientes angulares	Razão coeficientes lineares
1,3-CB	6,7 a 650	1,06	-0,33
1,4-CB	3,3 a 650	1,07	4,96
1,2-CB	6,7 a 650	1,02	-0,48
1,3,5-CB	3,3 a 650	0,96	0,60
1,2,4-CB	6,7 a 650	1,09	0,19
1,2,3-CB	8,0 a 650	1,05	-0,21
1,2,3,5-CB	5,2 a 650	1,41	-0,81
1,2,4,5-CB	8,0 a 650	1,08	0,10
1,2,3,4-CB	10 a 650	1,37	-3,47

Fonte: Da autora.

Observou-se que para sete clorobenzenos avaliados o efeito de matriz afeta mais significativamente o coeficiente linear (erro sistemático constante). Neste tipo de erro, provavelmente novos sítios de adsorção

são formados no injetor do CG, os quais retêm os clorobenzenos durante as análises cromatográficas e menores concentrações são quantificadas no detector espectrômetro de massas. Dessa forma, para minimizar os erros decorrentes do efeito de matriz, as curvas analíticas foram preparadas adicionando os padrões no extrato da matriz.

3.4 Validação

3.4.1 Seletividade

A seletividade do método proposto foi avaliada comparando os cromatogramas do extrato branco da matriz (lodo de esgoto) e o extrato fortificado com os nove clorobenzenos. Após investigações constatou-se a presença do composto 1,4-CB no lodo de esgoto. Entretanto, nenhum interferente foi observado nos demais tempos de retenção (GRA. 4).

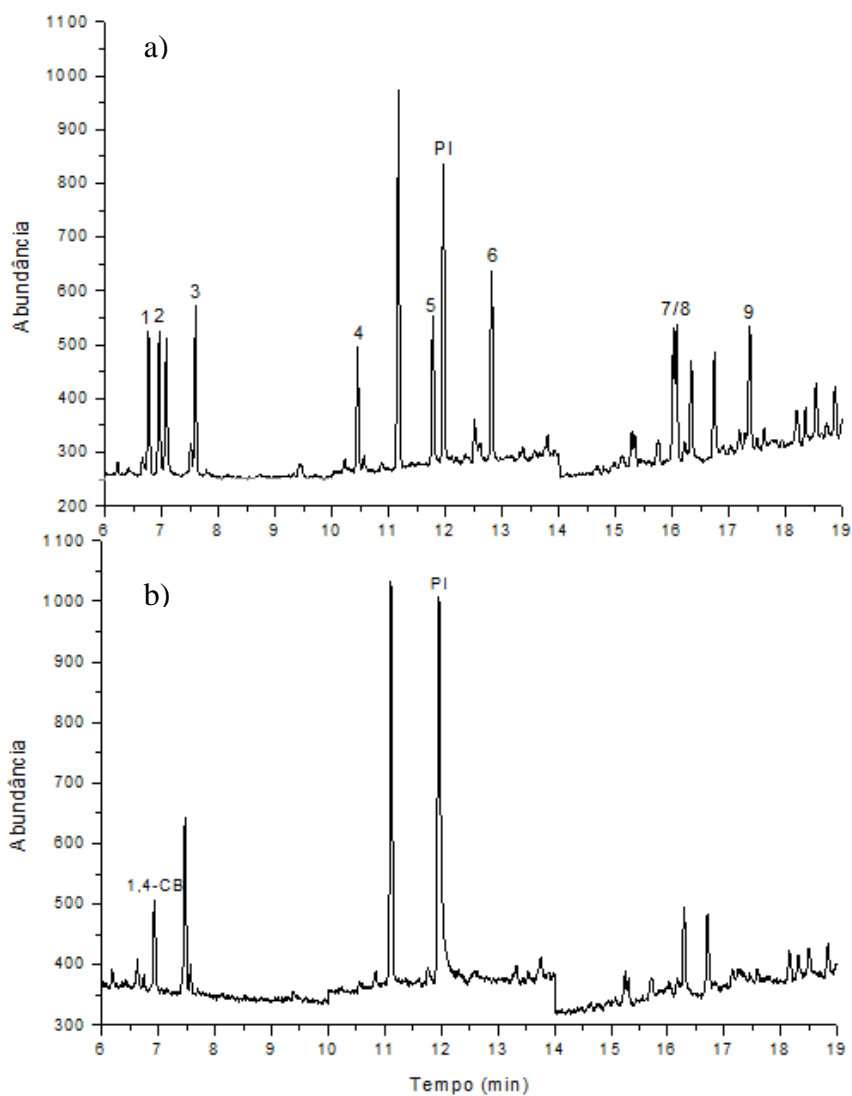


GRÁFICO 4- Representação do cromatograma do extrato obtido após a ESL-PBT: a) extrato de lodo fortificado com clorobenzenos de $6,6 \mu\text{g L}^{-1}$ a $20 \mu\text{g L}^{-1}$, b) extrato do lodo de leite de secagem. Identificação dos picos: (1) 1,3-CB, (2) 1,4-CB, (3) 1,2-CB, (4) 1,3,5-CB, (5) 1,2,4-CB, PI, (6) 1,2,3-CB, (7) 1,2,3,5-CB, (8) 1,2,4,5-CB e (9) 1,2,3,4-CB.

Fonte: Da autora.

3.3.3 Limite de detecção, limite de quantificação e linearidade

O limite de detecção foi determinado utilizando branco da amostra com adição da menor concentração aceitável dos nove clorobenzenos. O valor do LD foi adotado considerando cerca de três vezes o sinal da linha de base obtidos na análise por CG-EM da matriz lodo de esgoto. Os resultados encontrados para os compostos foram inferiores a $3,75 \mu\text{g Kg}^{-1}$ (TAB.6).

TABELA 6

Limite de detecção (LD), Limite de quantificação (LQ), linearidade do método para clorobenzenos em amostras de lodo de esgoto e limites máximos de resíduo (LMR) estabelecido pelo CONAMA.

Dados da calibração					
Compostos	Equações	r^2	LD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LMR ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
1,3-CB	$y = 0,020078x - 0,083181$	0,9993	2,51	8,37	390
1,4-CB	$y = 0,021881x + 0,332743$	0,9995	1,24	4,13	390
1,2-CB	$y = 0,028166x - 0,099944$	0,9988	2,51	8,37	730
1,3,5-CB	$y = 0,020417x + 0,260001$	0,9972	1,24	4,13	500
1,2,4-CB	$y = 0,019625x + 0,038475$	0,9986	2,51	8,37	11,0
1,2,3-CB	$y = 0,020257x - 0,063167$	0,9970	3,00	10,0	10,0
1,2,3,5-CB	$y = 0,019036x - 0,119194$	0,9945	1,95	6,50	6,50
1,2,4,5-CB	$y = 0,016744x + 0,015221$	0,9995	3,00	10,0	10,0
1,2,3,4-CB	$y = 0,017415x - 0,112893$	0,9999	3,75	12,5	16,0

Fonte: Da autora.

O limite de quantificação dos clorobenzenos analisados na matriz lodo de esgoto foi determinado considerando cerca de 10 vezes o sinal da linha de base (ruído) obtido para amostras isentas do analito (branco). Os valores obtidos para os nove clorobenzenos foram inferiores a $12,5 \mu\text{g Kg}^{-1}$. Esses valores são inferiores aos limites máximos de resíduos estabelecidos pela resolução da CONAMA n° 375 de clorobenzenos em amostras de solo (TAB. 5). Este parâmetro foi adotado uma vez que não há ainda limites máximos permissíveis de clorobenzenos estabelecidos para amostras de lodo de esgoto.

A linearidade de resposta do detector foi avaliada por meio de extratos de amostras de lodo fortificados com nove concentrações conhecidas, que variaram de 4,10 a $812 \mu\text{g Kg}^{-1}$, obtidos a partir da ESL-PBT. As respectivas equações da reta foram obtidas por regressão linear e os coeficientes de determinação (r^2) foram superiores a 0,99 para os nove compostos (TAB. 6).

3.3.4 Exatidão e precisão do método

Para avaliar a exatidão do método, amostras da matriz lodo de esgoto isenta de clorobenzenos foram fortificadas nas concentrações de 1 x LQ, 2 x LQ e 5 x LQ. A porcentagem de recuperação dos nove clorobenzenos foram superiores a 63,96%. A precisão foi avaliada pelo desvio padrão relativo (DPR) dos resultados de sete repetições da extração dos clorobenzenos em amostras de lodo fortificadas na concentração de 2 x LQ. O DPR foi inferior a 12,97 % para todos os compostos, sendo que para matrizes complexas é aceitável um DPR de até 20% (RIBANI *et al*, 2004). Os dados obtidos estão apresentados na TAB.7.

TABELA 7

Porcentagem de recuperação dos clorobenzenos, após extração de amostras de lodo de esgoto fortificadas com três concentrações diferentes de cada composto

Compostos	Recuperação (%) (média ± DPR)		
	1 x LQ ^a	2 x LQ ^b	5 x LQ ^a
1,3-CB	66,71±3,15	67,88±2,33	66,43±9,87
1,4-CB	108,01±12,9	100,59±6,39	98,46±4,16
1,2-CB	66,18±4,90	64,21±5,87	63,96±11,23
1,3,5-CB	70,21±1,97	66,33±5,15	67,72±11,59
1,2,4-CB	70,30±11,9	72,47±6,46	69,68±11,83
1,2,3-CB	70,26±12,5	69,21±5,21	71,23±11,07
1,2,3,5-CB	70,39±9,61	71,81±13,66	69,11±4,30
1,2,4,5-CB	73,32±6,29	69,68±4,41	72,22±11,97
1,2,3,4-CB	69,43±1,69	67,46±7,82	67,34±12,21

Notas: ^a Média de três repetições do limite de quantificação; ^b Média de sete repetições do limite de detecção.

Fonte: Da autora.

3.3.5 Comparação entre métodos

No GRAF. 5 estão apresentados os cromatogramas dos extratos obtidos pela técnica ESL-PBT e pela extração em sohxlet no modo scan. Os extratos foram obtidos de amostras isentas de clorobenzenos e no TAB. 8 estão representados algumas vantagens obtidas na técnica otimizada.

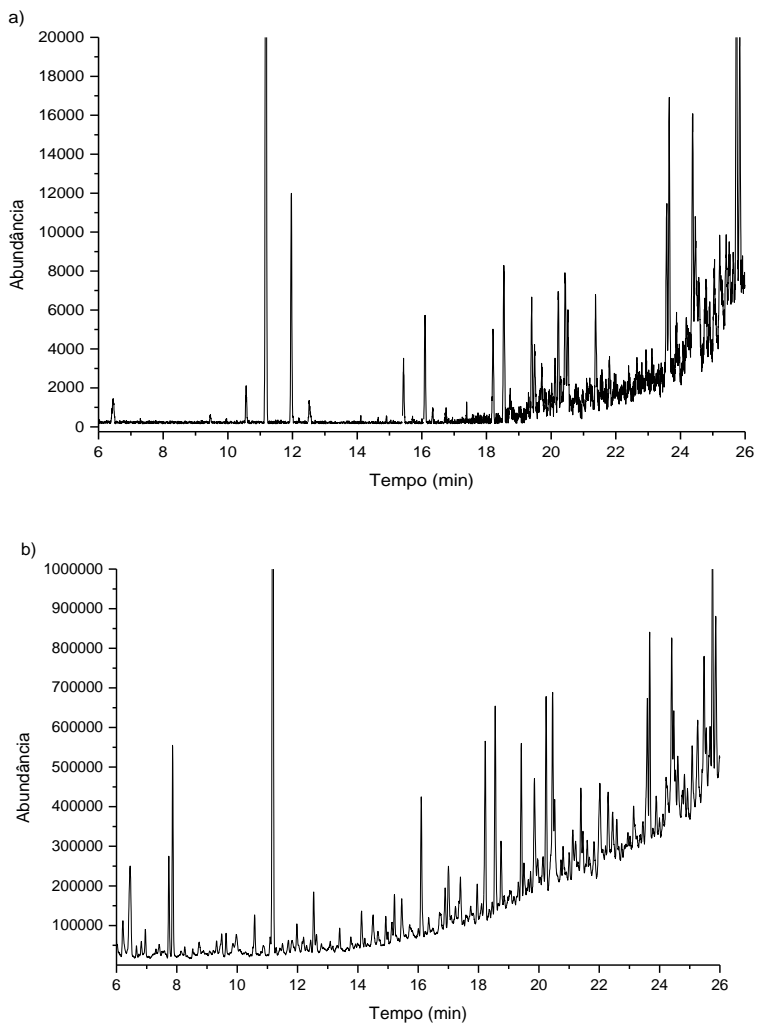


GRÁFICO 5- Representação do cromatograma obtido em análises por CG-EM-SCAN, dos extratos isentos de clorobenzenos: a) pelo método ESL-PBT e b) pela extração em sohxlet.

Fonte: Da autora.

Foi observado que a quantidade de componentes da matriz extraída utilizando o sohxlet é superior a ESL-PBT, requerendo manutenção do sistema cromatográfico com maior frequência. As

porcentagens de extração obtidas pela ESL-PBT em relação ao sohxlet (CAI *et al.* 2007a), foram superiores para o composto 1,4-CB e valores semelhantes para o composto 1,2,4-CB. Para os demais compostos, a extração em sohxlet apresentou melhor eficiência (TAB. 8). Entretanto, avaliando a relação custo/benefício, a ESL-PBT foi vantajosa, pois apresentou menor gasto de solvente, tempo de determinação dos clorobenzenos e, além disso, possui limites de quantificação inferiores aos limites máximos permissíveis estabelecidos pela CONAMA n°375/2006.

TABELA 8
Vantagens da técnica de extração otimizada, ESL-PBT, em relação à técnica de extração tradicional, sohxlet

	ESL-PBT	Sohxlet
Clorobenzenos extraídos	9 compostos	4 compostos
LD ¹ ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)	1,24 a 3,75	0,19 a 1,1
Recuperação (%)	63,43% a 98,46%	76% a 84%

Notas: ¹LD- limite de detecção

Fonte: Da autora.

3.4 Aplicação em amostras reais

As 22 amostras de lodo coletadas durante o período de onze meses, duas em cada mês, sendo uma de lodo centrifugado e outra de lodo após secagem térmica, foram submetidas à ESL-PBT. Foram detectados três compostos: 1,4-CB, 1,2,4-CB e 1,2,3-CB (TAB. 9). O clorobenzeno 1,2,4-CB foi detectado em seis amostras de lodo centrifugado e em seis de secagem térmica, e apenas no mês de janeiro foi quantificado em valor próximo ao limite máximo permissível ($\leq 11,0 \mu\text{g Kg}^{-1}$). Já o 1,2,3-CB foi detectado em todas as amostras de lodo centrifugado e nove de secagem térmica das 22 amostras analisadas,

sendo seis amostras quantificadas em concentrações superiores ao limite máximo aceitável ($\leq 10,0 \mu\text{g Kg}^{-1}$).

O composto 1,4-CB foi quantificado todos os meses (TAB. 9), porém todas as concentrações foram inferiores às aceitáveis ($390 \mu\text{g Kg}^{-1}$). Possivelmente, o que explica a presença desse analito nas amostras, seja as diversas aplicações comerciais do 1,4-CB como desinfetante, purificador de ar, repelente, desodorante (KOZANI *et al.*, 2007), sendo liberados para o ambiente nos efluentes industriais e domésticos (ROHAC, 1999).

TABELA 9

Concentrações dos compostos 1,4-CB, 1,2,4-CB e 1,2,3-CB em amostras de lodo coletadas na ETE de Montes Claros

Meses	Clorobenzenos ($\mu\text{g Kg}^{-1} \pm \text{DPR}^{\text{c}}$)					
	1,4-CB		1,2,4-CB		1,2,3-CB	
	LC ^a	LST ^b	LC	LST	LC	LST
dez/11	17,4±10,0	13,9±2,74	6,90±26,8	4,10±8,57	14,4±0,89	10,7±3,91
jan/12	16,7±6,42	14,1±8,80	8,60±10,0	5,34±6,37	13,1±8,67	8,46±6,21
fev/12	15,3±6,38	14,7±6,51	7,09±1,10	3,95±0,78	14,9±1,95	7,18±11,2
mar/12	19,1±0,58	16,2±0,89	8,11±9,28	5,17±5,74	16,5±0,78	11,3±4,51
abr/12	42,6±9,56	16,7±10,8	ND ^d	ND	6,23±3,53	4,48±11,3
mai/12	32,6±7,64	28,7±1,59	ND	2,95±8,05	6,48±10,7	5,47±4,41
jun/12	29,6±6,82	9,86±8,25	4,21±6,43	ND	7,14±2,48	2,22±0,8
jul/12	26,8±0,22	23,2±6,77	3,98±8,37	ND	7,58±6,24	6,55±0,78
ago/12	27,2±2,41	ND ^d	ND	ND	8,30±5,58	ND
set/12	27,0±4,53	28,0±6,26	ND	ND	7,06±5,16	5,38±0,90
out/12	36,7±6,29	8,26±8,91	ND	ND	5,68±4,02	ND

Notas: ^a LC- lodo centrifugado; ^b LST- lodo de secagem térmica; ^c concentrações em $\mu\text{g Kg}^{-1}$ e respectivos valores de desvio padrão relativo; ^d ND- não detectado.

Fonte: Da autora.

A maior presença destes compostos no lodo centrifugado e as baixas concentrações podem estar relacionadas à pressão de vapor dos analitos (MACKAY *et al.*, 1992). Assim, quando submetidos ao aquecimento no secador térmico, estes compostos podem sofrer perdas por volatilização.

Embora o aquecimento influencie na quantidade dos CBs no lodo, em um trabalho foi detectada a presença de 11 clorobenzenos. As concentrações quantificadas foram de $<0,01-40,2 \text{ mg kg}^{-1}$ (peso seco), sendo que destes, os compostos di-substituídos foram encontrados em maior abundância (ROGERS *et al.*, 1989). Um trabalho recente também analisou esses compostos em amostras de solo (de um local próximo a indústrias) e verificou que as concentrações totais de Σ CBs variaram de $71,06-716,57 \text{ } \mu\text{g Kg}^{-1}$ (concentração média de $434,93 \text{ } \mu\text{g Kg}^{-1}$). Os principais CBs encontrados foram os di, tri e tetraclorobenzenos, enquanto que, para os congêneres individuais, o 1,2,4-TCB teve a maior concentração, que foi de $13,21-210,35 \text{ } \mu\text{g Kg}^{-1}$ (concentração média de $111,89 \text{ } \mu\text{g Kg}^{-1}$) (SONG *et al.*, 2012).

Quanto aos limites máximos aceitáveis, a CONAMA não estabelece valores de clorobenzenos em lodo de esgoto, e as concentrações detectadas do 1,2,3-CB está acima dos limites máximos estabelecidos para clorobenzenos em solo ($<10 \text{ } \mu\text{g Kg}^{-1}$). Entre os males que esses compostos podem causar, ainda não há relatos confirmados de cânceres em humanos, mas há estudos que mostram evidências do potencial tumoral e carcinogênico de alguns compostos, como o 1-4-CB (BUTTERWORTH *et al.*, 2007; RODRIGUEZ *et al.*, 2012).

A abundância de detecções de clorobenzenos em diversas matrizes, como o lodo, reflete o processo de utilização generalizada de produtos tanto de origem industrial quanto doméstica (SONG *et al.*, 2012), e salienta a importância da caracterização do lodo de esgoto antes de destiná-lo à agricultura.

4 CONCLUSÃO

A técnica otimizada, a ESL-PBT, apresentou vantagens em relação ao método de extração tradicionalmente utilizado para clorobenzenos, o soxhlet. As porcentagens de recuperação obtidas na ESL-PBT variaram de 66 a 108% e o desvio padrão relativo foi inferior a 12,97%.

Os limites de quantificação obtidos utilizando o método otimizado foram inferiores a $4,13 \mu\text{g Kg}^{-1}$, sendo adequados para quantificar os nove clorobenzenos de acordo com a CONAMA n° 375/2006. No monitoramento das amostras coletadas no período de 11 meses foram detectados três clorobenzenos e destes apenas o 1,2,3-CB apresentou concentração acima do estabelecido pela CONAMA.

REFERÊNCIAS

ANDREOLI, C. V.; SPERLING, M. V.; FERNADES, F. **Lodo de esgotos: tratamento e disposição final**. Belo Horizonte: UFMG, 2001. 484 p.

APARÍCIO, I. S.; SANTOS, J. L.; ALONSO, E. Limitation of the concentration of organic pollutants in sewage sludge for agricultural purposes: a case of study in south Spain. **Waste Manage**, v. 29, n. 5, p. 1747-1753, May, 2009.

BANJOO, D. R.; NELSON, P. K. Improved ultrasonic extraction procedure for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments. **Journal of Chromatography A**, v. 1066, n. 1-2, p. 1-2, Feb. 2005.

BARRO, R.; ARES, S.; GARCIA-JARES, C.; LLOMPART, M.; CELA, R. Development of a sensitive methodology for the analysis of chlorobenzenes in air by combination of solid-phase extraction and headspace solid-phase microextraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1045, n. 1-2, p. 189-196, Aug. 2004.

BOEIRA, R. C. Lixiviação de nitrogênio em latossolo incubado com lodo de esgoto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 33, n. 4, p. 947-958, jul./ago. 2009.

BRASIL. Conselho Nacional do 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] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF., n. 167, p. 141-146, de 30 ago. 2006.

BRASIL. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial - INMETRO. **Orientação sobre validação de métodos analíticos: DOQ-CGCRE-008**, 2010. 20 p.

BRIGHT, D. A.; HEALEY, N. Contaminant risks from biosolids land application: Contemporary organic contaminant levels in digested sewage sludge from five treatment plants in Greater Vancouver, British Columbia. **Environmental Pollution**, v. 126, n. 1, p. 39-49, 2003.

BUTTERWORTH, B. E.; AYLWARD, L. L.; HAYS, S. M. A mechanism-based cancer risk assessment for 1,4-dichlorobenzene. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 49, n. 2, p. 138-148, Nov. 2007.

CAI, Q. Y.; MO, C. H.; WU, Q. T.; ZENG, Q. Y.; KATSOYIANNIS, A. Quantitative determination of organic priority pollutants in the composts of sewage sludge with rice straw by gas chromatography coupled with mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1143, n. 1-2, p. 207-214, Mar. 2007b.

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, n. 9, p. 1751-1762, Aug. 2007a.

CAMPOS, F. S.; ALVES, M. C. Uso de lodo de esgoto na reestruturação de solo degradado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 32, n. 4, p. 1389-1397, jul./ago. 2008.

CHISVERT, A.; ROMÁN, I. P.; VIDAL, L.; CANALS, A. Simple and commercial readily-available approach for the direct use of ionic liquid-based single-drop microextraction prior to gas chromatography, determination of chlorobenzenes in real water samples as model analytical application. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 9, p. 1290-1295, Feb. 2009.

CLARKE, B. O.; SMITH, S. R. Review of 'emerging' organic contaminants in biosolids and assessment of international research priorities for the agricultural use of biosolids. **Environment International**, v. 37, n. 1, p. 226–247, Aug. 2011.

COSCIONE, A. R.; NOGUEIRA, T. A. R.; PIRES, A. M. M. (Orgs.) **Uso agrícola de lodo de esgoto: avaliação após a resolução n.º 375 do CONAMA**. Botucatu: FEPAF, 2010. 407 p.

DAI, J.; XU, M.; CHEN, J.; YANG, X.; KE, Z. PCDD/F, PAH and heavy metals in the sewage sludge from six wastewater treatment plants in Beijing, China. **Chemosphere**, v. 66, n. 2, p. 353–361, Jan. 2007.

DU, Q. P.; JIA, X. S.; HUANG, C. N. Chlorobenzenes in waterweeds from the Xijiang River (Guangdong section) of the Pearl River. **Journal of Environmental Sciences**, v. 19, n. 10, p. 1171–1177, 2007.

DUARTE, R. F.; SAMPAIO, R. A.; BRANDÃO JUNIOR, D. S.; SILVA, H. P.; PARREIRAS, N. S.; NEVES, J. M. G. Crescimento inicial de mudas de *Acacia mangium* cultivadas em mantas de fibra de coco contendo substrato de lodo de esgoto. **Revista Árvore**, v. 35, N. 1, p. 69-76, jan./fev. 2011.

EUROPEAN COMMISSION. Environment. Diretiva 86/278/CEE. 1986. Disponível em: <<http://ec.europa.eu/environment/waste/sludge/index.htm> >. Acesso em: 1 set. 2012.

FIELD, J. A.; ALVAREZ, R. S. Microbial degradation of chlorinated benzenes. **Biodegradation**, v. 19, n. 4, p. 463–480, Jul. 2008.

FU, T. A gas sensor based on Prussian blue film for the detection of chlorobenzene vapor. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 401, n. 4, p. 1167–1172, Sep. 2011.

GALDOS, M. V.; MARIA, I. C.; CAMARGO, O. A.; DECHEN, S. C. F. Sewage sludge application on cultivated soils: effects on runoff and trace metal load. **Scientia Agricola**, v. 66, n. 3, p. 368-376, May/June. 2009.

GOULART, S. M.; ALVES, R. D.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, J. H.; ASSIS, T. C.; QUEIROZ, M. E. L. R. Optimization and validation of liquid-liquid extraction with low temperature partitioning for determination of carbamates in water. **Analytica Chimica Acta**, v. 671, n. 1-2, p. 41-47, Jun. 2010.

GOULART, S. M.; QUEIROZ, M. E. L. R.; NEVES, A. A. Low-temperature clean-up method for the determination of pyrethroids in milk using gas chromatography with electron capture detection. **Talanta**, v. 75, n. 5, p. 1320–1323, Jun. 2008.

GRANDIN, S. R. **Desidratação de lodos produzidos nas estações de tratamento de água**. 1992. 465 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia) - Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1992.

GUEDES, M. C.; ANDRADE, C. A.; POGGIANI, F.; MATTIAZZO, M. E. Propriedades químicas do solo e nutrição do eucalipto em função da aplicação de lodo de esgoto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 30, n. 2, p. 267-280, mar./abr. 2006.

GUERIN, F. T. Ex-situ bioremediation of chlorobenzenes in soil. **Journal of Hazardous Materials**, v. 154, N. 1-3, p. 9–20, Jun. 2008.

GUSTAFSON, D. L.; COULSON, A. L.; FENG, L.; POTT, W. A.; THOMAS, R. S.; CHUBB, L. S.; SAGHIR, S. A.; BENJAMIN, S. A.; YANG, R. S. Use of a medium-term liver focus bioassay to assess the hepatocarcinogenicity of 1,2,4,5-tetrachlorobenzene and 1,4-dichlorobenzene. *Cancer Letters*, v. 129, n. 1, p. 39-44, Jul. 1998.

HARRISON, E. Z.; OAKES, S. R.; HYSELL, M.; HAY, A. Organic chemicals in sewage sludges. **Science of the Total Environment**, v. 367, p. 481-497, 2006.

KAMAREI, F.; EBRAHIMZADEH, H.; YAMINI, Y. Optimization of temperature-controlled ionic liquid dispersive liquid phase microextraction combined with high performance liquid chromatography for analysis of chlorobenzenes in water samples. **Talanta**, v. 83, n. 1, p. 36-41, Nov. 2010.

KHAN, M. A. Q.; KHAN, S. F.; SHATTARI, F. Halogenated hydrocarbons. In: **ENCYCLOPEDIA Ecology**, Philadelphia: Elsevier, 2008. p. 1831-1843.

KOZANI, R. R.; ASSADI, Y.; SHEMIRANI, F.; HOSSEINI, M. R. M.; JAMALI, M. R. Part-per-trillion determination of chlorobenzenes in water using dispersive liquid-liquid microextraction combined gas chromatography-electron capture detection. **Talanta**, v. 72, n. 2, p. 387-393, Apr. 2007.

LEGA, R.; LADWIG, G.; MERESZ, O.; CLEMENT, R. E.; CRAWFORD, G.; SALEMI, R.; JONES, Y. Quantitative determination of organic priority pollutants in sewage sludge by GC/MS. **Chemosphere**, v. 34, n. 8, p. 1705-1712, Apr. 1997.

MACKAY, D.; MA, K.C.; LEE, S. C.; SHIU, W. Y. **Handbook of physical-chemical properties and environmental fate for organic chemicals**. New York: Taylor e Francis Group, 1992.

MACLEOD, M.; MACKAY, D. An assessment of the environmental fate and exposure of benzene and the chlorobenzenes in Canada. **Chemosphere**, v. 38, n. 8, p. 1777-1796, Apr. 1999.

MAIO, M. M.; SAMPAIO, R. A.; NASCIMENTO, A. L.; PRATES, F. B. S.; RODRIGUES, M. N.; SILVA, H. P.; DIAS, A. N.; FREITAS, C. E. S. Atributos físicos do solo, adubado com lodo de esgoto e silicato de cálcio e magnésio. **Revista Ceres**, v. 58, n. 6, p. 823-830, nov./dez. 2011.

MARTHE, D. B.; BITTENCOURT, L. M.; QUEIROZ, L. R.; NEVES, A. A. Desenvolvimento de metodologia para determinação de piretróides em manteiga. **Química Nova**, v. 33, n. 6, p. 1389-1393, 2010.

MIN-JIAN, W.; JONES, K. C. Analysis of chlorobenzenes in sewage sludge by capillary gas chromatography. **Chemosphere**, v. 23, n. 5, p. 677-691, 1991.

MIN-JIAN, W.; JONES, K. C. The chlorobenzene content of contemporary U.K. Sewage sludges. **Chemosphere**, v. 28, n. 6, p. 1201-1210, 1994.

MO, C. H.; CAI, Q. Y.; LI, Y. H.; ZENG, Q. Y. Occurrence of priority organic pollutants in the fertilizers, China. **Journal of Hazardous Materials**, v. 152, n. 3, p. 1208-1213, Apr. 2008.

MORITA, M.; MIMURA, S.; OHI, G.; YAGYU, H.; NISHIZAWA, T. A systematic determination of chlorinated benzenes in human adipose tissue. **Environment Pollution**, v. 9, n. 3, p. 175-179, Nov. 1975.

OLIVER, B. G.; NICOL, K. D. Chlorobenzenes in sediments, water, and selected fish from Lakes Superior, Huron, Erie, and Ontario. **Environmental Science & Technology**, v. 16, n. 8, p. 532-536, Aug. 1982.

PEDROZA, M. M.; VIEIRA, G. E. G.; SOUSA, J. F.; PICKLER, A. C.; LEAL, E. R. M.; MILHOMEN, C. C. Produção e tratamento de lodo de esgoto: uma revisão. **Revista Liberato**, v. 11, n. 16, p. 89-188, jul./dez. 2010.

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, n. 4, p. 425-435, Jan. 2010.

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, n. 2, p. 155-165, Sep. 2008.

PINHO, G. P.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, M. E. L. R.; SILVÉRIO, F. O. Pesticide determination in tomatoes by solid-liquid extraction with purification at low temperature and gas chromatography. **Food Chemistry**, v. 121, n. 1, p. 251-256, Jul. 2010a.

PINHO, G. P.; NEVES, A. A.; 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, n. 10, p. 1307-1311, Oct. 2010c.

PINHO, G. P.; 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, n. 4, p. 909-913, 2010b.

POPP, P.; BRUEGGEMANN, L.; KEIL, P.; THUS, U.; WEIS, H. Chlorobenzenes and hexachlorocyclo-hexanes (HCHs) in the atmosphere of Bitterfeld and Leipzig (Germany). **Chemosphere**, v. 41, n. 6, p. 849-855, Sep. 2000.

QUEIROZ, S. C. N.; FERRACINI, V. C.; SOUZA, D. R. C. BRASIL. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA. **Métodos de extração de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em amostra de solo, sedimento e lodo**. São Paulo: Embrapa, 2009. 15 p.

RAHTORE, H. S. New chlorobezene pesticides, their impacts on environment and food quality. **International Journal of Engineering Research and Science & Technology**, 2012. (No prelo).

RIBANI, M. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, out. 2004.

RODRIGUES, T. A. N.; SAMPAIO, R. A.; SOARES, C. F.; MACHADO, I. F.; FERNANDES, L. A. Produtividade de milho e feijão consorciados: adubados com diferentes formas de lodo de esgoto. **Revista de la Ciencia del Suelo y Nutrición Vegetal**, v. 6, n. 1, p. 52-63, jan./dez. 2006.

RODRIGUEZ, C.; LINGE, K.; BLAIR, P.; BUSETTI, F.; DEVINE, B.; VAN BUYNDER, P.; WEINSTEIN, P.; COOK, A. Recycled water: Potential health risks from volatile organic compounds and use of 1,4-dichlorobenzene as treatment performance indicator. **Water Research**, v. 46, n.1, p. 93-106, Jan. 2012.

ROGERS, H. R. Source, behavior and fate of organic contaminants during sewage treatment and in sewage sludges. **Science of the Total Environment**, v. 185, 1-3, p. 3-26, Jun. 1996.

ROGERS, H. R.; CAMPBELL, J. A.; CRATHORNE, B.; DOBBS, A. J. The occurrence of chlorobenzenes and permethrins in twelve U.K. sewage sludges. **Water Research**. v. 23, n. 7, p. 913–921, Jul. 1989.

ROHAC, V.; RUZICKA, V.; RUZICKA, K.; POLEDNICEK, M.; AIM, K.; JOSE, J. Recommended vapour and sublimation pressures and related thermal data for chlorobenzenes. **Fluid Phase Equilibria**, v. 157, n. 1, p. 121-142, Mar. 1999.

SAITO, M. L. **O uso do lodo de esgoto na agricultura: precauções com os contaminantes orgânicos**. São Paulo: Embrapa Meio Ambiente, 2007. 34 p. (Embrapa Documento, 64).

SANTOS NETO, A. J. S.; SIQUEIRA, M. E. P. B. Análise de praguicidas organofosforados em água por extração em fase sólida (SPE) utilizando discos c18 e cromatografia em fase gasosa: avaliação da contaminação do reservatório de furnas (MG-brasil). **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 747-750, 2005.

SANTOS, F. J.; SARRIN, M. N.; GALCERAN, M. T. Analysis of chlorobenzenes in soils by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-ion trap mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 771, n. 1-2, p. 181-189, May, 1997.

SARRION, M. N.; SANTOS, F. J.; GALCERAN, M. T. Strategies for the analysis of chlorobenzenes in soils using solidphase microextraction coupled with gas chromatography–ion trap mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 819, n. 1-2, p. 197–209, Sep. 1998.

SHEN, G.; LEE, H. K. Headspace Liquid-Phase Microextraction of Chlorobenzenes in Soil with Gas Chromatography-Electron Capture Detection. **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 1, p. 98-103, Nov. 2003.

SHRESTHA, R. A.; PHAM, T. D.; SILLANPAA, M. Effect of ultrasound on removal of persistent organic pollutants (POPs) from different types of soils. **Journal of Hazardous Materials**, v. 170, n. 2-3, p. 871–875, Oct. 2009.

SILVA, M. G. **Avaliação de compostos orgânicos voláteis em lodo de esgoto para fins agrícolas**. 2009. 65f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) -Universidade de São Paulo, Instituto de Química, São Paulo.

SILVÉRIO, F. O.; SILVA, J. G. S.; AGUIAR, M. C. S.; CACIQUE, A. P.; PINHO, G. P. Análise de agrotóxicos em água usando extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura por cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, v. 35, n. 10, p. 1-5, ago. 2012.

SMITH, S. R. Are controls on organic contaminants necessary to protect the environment when sewage sludge is used in agriculture? **Progress in Environmental Science**, v. 2, n. 2, p. 129–146, 2000.

SONG, L.; CHO, D. S.; BHANDARI, D.; GIBSON, S. C.; NALLY, M. E. M.; HOFFMAN, R. M.; COOK, K. D. Liquid chromatography/dopant-assisted atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry for the analysis of non-polar compounds. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 303, n. 2-3, p. 173-180, Jun. 2011.

SONG, Y.; WANG, F.; BIAN, Y.; ZHANG, Y.; JIANG, X. Chlorobenzenes and organochlorinated pesticides in vegetable soils from an industrial site, China. **Journal of Environmental Sciences-China**, v. 24, n. 3, p. 362–368, 2012.

TSUTIYA, M. T.; COMPARINI, J. B.; ALEM SOBRINHO, P.; HESPAHOL, A.; CAMPOS, P.; CARVALHO, T.; MELFI, A. J.; MELO, W. J.; MARQUES, O. M. **Biossólidos na Agricultura**, São Paulo: SABESP, 2001. 468 p.

UNITED STATES PROTECTION AGENCY – US EPA. **40: Protection of Environment: part 503**: standards for the use or disposal of sewage sludge. USA: EPA, 1993. Code of Federal Regulations. Disponível em: <[http://yosemite.epa.gov/r10/water.nsf/NPDES%2BPermits/Sewage%2BS825/\\$FILE/503-0320 07.pdf](http://yosemite.epa.gov/r10/water.nsf/NPDES%2BPermits/Sewage%2BS825/$FILE/503-0320%2007.pdf)>. Acesso em: 1 maio, 2011.

UNITED STATES PROTECTION AGENCY – US EPA. **Chlorinated benzenes**: final test rule: 40 CFR Part 799. : Fed. Reg. 51.. USA: EPA, 1986. Federal Register 24657.

VALKUSZ, Z.; NAGYÉRI, G.; RADÁCS, M.; OCSKÓ, T.; HAUSINGER, P.; LÁSZLÓ, M.; LÁSZLÓ, F. A.; JUHÁSZ, A.; JULESZ, J.; PÁLFÖLDI, R.; GÁLFI, M. Further analysis of behavioral and endocrine consequences of chronic exposure of male Wistar rats to subtoxic doses of endocrine disruptor chlorobenzenes. **Physiology & Behavior**, v. 103, n. 5, p. 421–430, Jul. 2011.

VENINGEROVÁ, M.; PRACHAR, V.; KOVACICOVÁ, J.; UHNÁK, J. Analytical methods for the determination of organochlorine compounds: application to environmental samples in the Slovak Republic. **Journal of Chromatography A**, v. 774, 1-2, p. 333-347, Jul.1997.

VIDAL, L.; DOMINI, C. E.; GRANÉ, N.; PSILLAKIS, E.; CANALS, A. Headspace single-drop microextraction for the analysis of chlorobenzenes in water samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 1089, n. 1-2, p. 25-30, Sep. 2005.

VIEIRA, H. P.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, M. E. L. R. Otimização e validação da técnica de extração líquido-líquido com partição em baixa Temperatura (ELLPBT) para piretróides em água e análise por CG. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 535–540, maio/jun. 2007.

VORKAMP, K.; RIGET, F.; GLASIUS, M.; PÉCSELI, M.; LEBEUF, M.; MUIR, D. Chlorobenzenes, chlorinated pesticides, coplanar chlorobiphenyls and other organochlorine compounds in Greenland biota. **Science of the Total Environment**, v. 331, n. 1-3, p. 157–175, Sep. 2004.

WANG, F.; GRUNDMANN, S.; SCHMIND, M.; DORFLER, U.; ROHERER, S.; MUNCH, J. C.; HARTMANN, A.; JIANG, X.; SCHROLL, R. Isolation and characterization of 1,2,4-trichlorobenzene mineralizing *Bordetella* sp. and its bioremediation potential in soil. **Chemosphere**, v. 67, n. 5, p. 896–902, Mar. 2007.

ZHENG, X. J.; BLAIS, J. F.; MERCIER, G.; BERGERON, M.; DROGUI, P. PAH removal from spiked municipal wastewater sewage sludge using biological, chemical and electrochemical treatments. **Chemosphere**, v. 68, p. 1143-1152, 2007.

ZHOU, Q.; BAI, H.; XIE, G.; XIAO, J. Trace determination of organophosphorus pesticides in environmental samples by temperature-controlled ionic liquid dispersive liquid-phase microextraction. **Journal Chromatography A**, v. 1188, n. 2, p. 148-153, Apr. 2008.

ZOTA, A. R.; ASCHENGRAU, A.; RUDEL, R.; BRODY, J. G. Self-reported chemicals exposure, beliefs about disease causation, and risk of breast cancer in the Cape Cod Breast Cancer and Environment Study: a case-control study. **Environmental Health**, p. 9-40, Jul. 2010.

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, Jul. 2012.