

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

*Avaliação da metodologia de detecção de
massas de baixa resolução associado ao modo
MS/MS na determinação de dioxinas e furanos*

RAFAEL MELLO LATTUADA

Dissertação apresentada no Curso de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul para a obtenção do Título de Mestre em Química

Porto Alegre-RS, novembro de 2003

O presente trabalho foi realizado entre março de 2002 e novembro de 2003, no instituto de Química da UFRGS, sob a orientação da professora Doutora Maria do Carmo Ruaro Peralba e co-orientação do professor Doutor João Henrique Zimnoch dos Santos, inteiramente pelo autor.

Rafael Mello Lattuada

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de MESTRE EM QUÍMICA, e aprovada em sua forma final, pela orientadora, pelo co-orientador, pela Comissão Examinadora, no Curso de Pós-Graduação em Química da UFRGS.

Orientadora: Prof.a Dra. Maria do Carmo Ruaro Peralba

Co-Orientador: Prof. Dr. João Henrique Zimnoch dos Santos

Comissão Examinadora: Prof. Dr. Marçal José Rodrigues Pires
Faculdade de Química - PUCRS

Prof.a Dra. Tânia Mara Pizzolato
Departamento de Química Inorgânica – IQ –UFRGS

Prof. Dr. Celso Camilo Moro
Departamento de Química Inorgânica – IQ –UFRGS

Coordenador do Curso: prof. Dr. Adriano Lisboa Monteiro

DEDICATÓRIAS

Aos meus familiares que me ajudaram na conclusão desta etapa, principalmente a minha esposa e nosso filho que iluminou o fim desta jornada com a sua chegada.

AGRADECIMENTOS

A professora Maria do Carmo pela orientação, principalmente durante as dificuldades e ao professor João Henrique pelas correções precisas e pela sua disposição constante. Ao amigo Khalild pelo incentivo. À minha esposa, pelo companheirismo e meus pais e familiares pela compreensão nos tempos difíceis.

RESUMO

Os métodos oficiais da Agência de Proteção Ambiental Norte-americana (EPA) para análise de dioxinas e furanos, utilizam espectrômetros de massas de alta e baixa resolução para identificação e quantificação destes compostos. A extração da amostra é realizada por Soxhlet (SOX) e a etapa de *clean up* por uma seqüência de colunas de sílica, alumina e carbono/celite. O método que usa espectrômetro de massas de alta resolução é o mais preciso e seguro para este tipo de análise, sendo também o de maior custo. Com o intuito de estabelecer uma análise segura e de menor custo, o presente trabalho teve como proposta a avaliação da aplicação da metodologia de identificação e quantificação de dioxinas e furanos, utilizando espectrômetro de massas de baixa resolução, “*ion trap*”, no modo massas/massas (MS/MS) segundo a metodologia proposta pela empresa VARIAN. Foi também estudada a extração da amostra por ultra-som convencional (US) e ultra-som de ponta, conhecido como disruptor celular (DC) em substituição ao método clássico de extração por soxhlet, bem como a utilização de Florisil® no processo de *clean up*. Desta forma, amostras de cinzas de incinerador foram extraídas por soxhlet, US e DC e submetidas a processos de *clean up* segundo os métodos oficiais (seqüência de colunas de sílica, alumina e carbono/celite) ou utilização de Florisil®.

Os dados obtidos neste trabalho mostraram que: **a-** a extração por US não foi adequada, devido à baixa recuperação apresentada; **b-** a extração por DC mostrou potencialidade de extração semelhante à técnica oficial de extração por Soxhlet; **c-** o Florisil® não demonstrou ser eficiente no processo de *clean up*, possibilitando a permanência de vários interferentes os quais dificultaram em muito a análise; **d-** a metodologia proposta pela VARIAN foi eficiente nas amostras em estudo, inclusive na amostra real, em que foi utilizada uma cinza de incinerador hospitalar, cujos extratos obtidos, tanto por Soxhlet quanto por DC apresentaram valores de PCDD/Fs de $533 \pm 56,1$ e $370 \pm 81,6$ ng g⁻¹ de I-TEQ respectivamente, sendo estatisticamente equivalentes pelo teste *t*.

ABSTRACT

The official EPA (American Environmental Protection Agency) methods for analysing dioxins and furans make use of high and low resolution mass spectrometers to identify and quantify these compounds. Sample extraction is carried out in a Soxhlet followed by clean-up by a sequence of silica, alumina and carbon/celite columns. The method using a high resolution spectrometer is the most accurate and confident for this kind of analysis being also the most expensive. In order to establish a cheap and confident analytical method, the present work had the purpose of evaluate the methodology for identification and quantification of dioxins and furans using low resolution ion trap mass spectrometer, in the mass/mass mode (MS/MS). Furthermore, sample extraction by conventional ultra sound (US) and cellular disruptor (CD) was employed instead of the classical Soxhlet extraction, and Florisil[®] was used in the clean-up process. Incinerator ashes were extracted by Soxhlet, US and CD, followed by clean-up according to official methods (sequence of silica, alumina and carbon/celite columns) or using Florisil[®].

The obtained data showed that: a) extraction by US was not adequate due to low recovery; b) extraction by CD showed a extraction capability comparable to the official Soxhlet extraction; c) Florisil[®] showed to be efficient for clean-up, allowing several interferences to be present causing analytical difficulties; d) the methodology proposed by VARIAN proved to be efficient for the studied samples, including a real sample constituted by hospital incinerator ashes, for which extracts by Soxhlet and CD presented I-TEQ values for PCDD/Fs of $533 \pm 56,1 \text{ ng g}^{-1}$ and $370 \pm 81,6 \text{ ng g}^{-1}$ respectively, being statistically equivalents by the t-test.

INDICE GERAL

AGRADECIMENTOS	I
RESUMO	II
ABSTRACT	III
INDICE GERAL	IV
LISTA DE FIGURAS	VI
LISTA DE TABELAS	IX
LISTA DE TABELAS	IX
LISTA DE ABREVIATURAS	XI
1. INTRODUÇÃO	2
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1 INTRODUÇÃO.....	5
2.1.1 <i>Fatores de toxicidade equivalente, toxicidade equivalente e toxicidade</i>	5
2.1.2 <i>Casos de contaminação por dioxinas e furanos e influência dos valores de fundo na saúde</i>	8
2.1.3 <i>Propriedades dos PCDD/Fs</i>	11
2.1.4 <i>Fontes das PCDD/Fs</i>	12
2.1.5 <i>Distribuição no meio ambiente</i>	15
2.2 METODOLOGIA ANALÍTICA DE PCDD/FS.....	18
2.2.1 <i>Formas de extração</i>	18
2.2.2 <i>Clean up</i>	21
2.2.3 <i>Análise de PCDD/Fs</i>	21
2.2.4 <i>Considerações Gerais</i>	23
3. OBJETIVOS	26
4. PARTE EXPERIMENTAL	27
4.1 REAGENTES E MATERIAIS	27
4.2 EQUIPAMENTOS	28
4.3 LAVAGEM DO MATERIAL, CONTROLE DE VIDRARIA E CARTUCHOS	28
4.4 PREPARO DO BRANCO	29
4.5 CURVAS DE CALIBRAÇÃO	30
4.6 PREPARO DA AMOSTRA E PROCEDIMENTOS DE EXTRAÇÃO	32
4.6.1 <i>Preparo da amostra</i>	32
4.6.2 <i>Extração por Soxhlet</i>	33
4.6.3 <i>Extração por ultra-som (US)</i>	33
4.6.4 <i>Disruptor celular (DC)</i>	33

4.6.5 Lavagem ácido-base.....	34
4.7 ELIMINAÇÃO DE INTERFERENTES.....	35
4.7.1 Preparo e especificações dos adsorventes empregados na cromatografia líquida preparativa. (adaptado de EPA 8280 E 8290)	35
4.7.2 Cromatografia preparativa – eliminação de interferentes - eluição.....	36
4.8 ANÁLISE DE DIOXINAS POR CG/MS/MS	38
4.9 ANÁLISE DE PCDD/FS	40
5. ANÁLISE DOS DADOS	42
5.1 MÉTODOS E ALTERNATIVAS AVALIADOS.....	42
5.2 CONTROLE DOS MATERIAIS E REAGENTES	43
5.2.1 Critérios para controle dos materiais e reagentes.....	43
5.3 PREPARO DO BRANCO	49
5.4 EXTRAÇÃO POR SOXHLET	51
5.5 EXTRAÇÃO POR ULTRA-SOM.....	56
5.6 COMPARAÇÃO DA REPRODUTIBILIDADE DE INJEÇÕES DE PEQUENOS VOLUMES	63
5.7 EXTRAÇÃO POR SOXHLET SEM COLUNA DE CARBONO/CELITE	65
5.8 EXTRAÇÃO POR ULTRA-SOM SEM COLUNA DE CARBONO/CELITE	67
5.9 EXTRAÇÃO POR DC SEM COLUNA DE CARBONO/CELITE	70
5.10 CONFRONTO DOS RESULTADOS OBTIDOS POR DC COM SOXHLET	72
5.11 CLEAN UP COM FLORISIL.....	74
5.12 TEMPOS DE CADA ETAPA DA ANÁLISE DE PCDD/FS.....	76
5.13 APLICAÇÃO DA EXTRAÇÃO POR DC EM AMOSTRAS DE INCINERADOR	76
6. CONCLUSÕES.....	82
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fórmula estrutural das dioxinas (PCDD) e dos furanos (PCDF).....	5
Figura 2. (a) Estruturas da TCDD e (b) 2,3,4,7,8-pentaclorodibenzofurano (PeCDF).....	6
Figura 3. Concentração de TCDD (ng kg^{-1} de gordura) no leite de mães no Vietnã do Sul. [38]	9
Figura 4. Esquema de funcionamento do <i>ion trap</i>	23
Figura 5. Sistemática adotada na limpeza de vidraria.....	29
Figura 6. Curva de calibração do TCDD, obtida pela injeção de 1 μL das soluções descritas na tabela VIII como Cal 1, 2, 3 e 4, $R^2_{\text{TCDD}}=0,9966$. A solução Cal 5 foi desconsiderada por sofrer efeito de discriminação.....	31
Figura 7. Esquema das eluições, adsorventes, quantidades e seqüência de empacotamento empregado nos extratos obtido por SOX, DC e US.....	36
Figura 8. Esquema do método 8280a e as alternativas em termos de extração, adsorventes da cromatografia preparativa, volume final e tipo de detector.....	42
Figura 9. Espectrograma da contagem total de íons da solução de PCDD/Fs CAL3; n=nativo, m=marcada.....	44
Figura 10. Espectrograma da contagem total de íons (A) e dos íons $m/z = 243+245$ (B) e $252+254$ (C).....	45
Figura 11. Espectrograma típico do extrato da lavagem de vidraria.....	46
Figura 12. Espectrograma da lavagem de extratores Soxhlet e frascos de US.....	47
Figura 13. Espectrograma do solvente recolhido antes do uso da vidraria utilizada na análise.	48
Figura 14. Contagem total de íons da primeira extração das cinzas para confecção do branco.	50
Figura 15. Espectrograma da segunda extração das cinzas para confecção do branco.....	51
Figura 16. Comparação dos valores de recuperação para extração com Soxhlet com e sem a coluna de carbono/celite no <i>clean up</i> dos furanos.....	53
Figura 17. Comparação dos valores de recuperação para extração com Soxhlet com e sem a coluna de carbono/celite no <i>clean up</i> das dioxinas.....	54

Figura 18. Espectrogramas sobrepostos da análise de extratos oriundos de Soxhlet com e sem o uso da coluna de carbono/celite para remoção de interferentes.....	55
Figura 19. Comparação dos valores de recuperação para extração com US com e sem a coluna de carbono/celite no <i>clean up</i> dos furanos.....	57
Figura 20. Comparação dos valores de recuperação para extração com US com e sem a coluna de carbono/celite no <i>clean up</i> das dioxinas.	58
Figura 21. Comparação dos valores de recuperação para extração com US e Soxhlet dos furanos sem a coluna de carbono/celite no <i>clean up</i>	59
Figura 22. Comparação dos valores de recuperação para extração com US e Soxhlet das dioxinas sem a coluna de carbono/celite no <i>clean up</i>	60
Figura 23. Massas molares (g) das dioxinas comparadas com suas recuperações. SOX=Soxhlet; CC=coluna de carbono/celite; s/CC=coluna de carbono/celite.	60
Figura 24. Curvas ampliadas das recuperações das dioxinas comparadas com suas massas molares (g), SOX=Soxhlet; CC=coluna de carbono/celite; s/CC=coluna de carbono/celite.	61
Figura 25. $\log K_{oc}$ das dioxinas comparados com suas recuperações das. SOX=Soxhlet; CC=coluna de carbono/celite; s/CC=coluna de carbono/celite.....	62
Figura 26. Curvas ampliadas de $\log K_{oc}$ comparadas com recuperações das dioxinas. SOX=Soxhlet; CC=coluna de carbono/celite; s/CC=coluna de carbono/celite.	63
Figura 27. Critérios de aceitabilidade em função do % de recuperação (média recuperação +/- 2s) das PCDD/Fs marcadas com ^{13}C quando todos os congêneros são avaliados, segundo método EPA 1613 [61] e valores de recuperação obtidos com Soxhlet.	66
Figura 28. Critérios de aceitabilidade em função do percentual de recuperação (média recuperação +/- 2s) das PCDD/Fs marcadas com $^{13}\text{C}_{12}$ quando todos os congêneros são avaliados, segundo método EPA 1613, valores de recuperação obtidos com US (1+2 copos na cuba) e recuperação com apenas 1 copo na cuba do US.....	69
Figura 29. Critérios de aceitabilidade em função do % de recuperação (média recuperação +/- 2s) das PCDD/Fs marcadas com ^{13}C quando todos os congêneros são avaliados, segundo método EPA 1613 e valores de recuperação obtidos com DC.	71
Figura 30. Percentuais de recuperação obtidos pela eluição do extrato em coluna de Florisil® frente a eluição de extrato em colunas de sílica e alumina.	74

- Figura 31.** Espectrograma típico do extrato eluído no Florisil®; A=contagem total de íons;
B= íons de $m/z=354+356$ (HpCDFm), $t_r = 25,7$ min. 75
- Figura 32.** Espectrograma de uma amostra de cinzas leves extraída com DC e monitoramento dos íons de $m/z=243+245$, $252+254$ e $259+261$, da TCDFn, TCDFm e TCDDn..... 77

LISTA DE TABELAS

Tabela I. Dose letal das toxinas mais perigosas e do TCDD [3] $\mu\text{g kg}^{-1}$ de peso corpóreo.	6
Tabela II. TEFs dos principais congêneros das PCDD/Fs na sistemática da OMS/1998 [4]. .	7
Tabela III. Propriedades físico-químicas das PCDD/Fs.....	11
Tabela IV. Principais fontes de dioxinas, fatores de emissão e emissões anuais mundial estimadas. [30].....	13
Tabela V. Taxas de deposição de PCDD/Fs, do material em suspensão atmosférica e concentração de PCDD/Fs no material amostrado na Alemanha (Baden-Wurttemberg) [28].	16
Tabela VI. Níveis de dioxinas em diferentes matrizes [8].	17
Tabela VII. Formas de extração, tempo de extração, solvente, volume, detector e referências	18
Tabela VIII. Concentrações das soluções de calibração e R^2 das curvas de calibração.	30
Tabela IX. Concentração dos padrões de PCDD/Fs na solução de reforço adicionada ao branco.	32
Tabela X. Concentrações da solução de PIs das PCDD/Fs	32
Tabela XI. Parâmetros cromatográficos usados na análise de PCDD/Fs por LR MS/MS.	39
Tabela XII – m/z dos íons pais e íons filhos usados no modo MS/MS.....	39
Tabela XIII. Segmentos, tempos de retenção dos congêneros das PCDD/Fs.	45
Tabela XIV. Número de picos nos espectrogramas de lavagem do papel usado na confecção dos cartuchos de extração frente aos tempos de extração, usando DCM como solvente.	49
Tabela XV. Recuperação das PCDD/Fs com extração em Soxhlet e processo de <i>clean up</i> em coluna de carbono/celite. As colunas de 1-4 e RSD expressam a reprodutibilidade da injeção, a média diz respeito a 4 injeções de uma mesma extração.	52
Tabela XVI. Recuperação das PCDD/Fs por extração em Soxhlet e processo de <i>clean up</i> sem coluna de carbono/celite. As colunas de 1-5 e RSD expressam a reprodutibilidade da injeção, a média diz respeito a 5 injeções de uma mesma extração.	53
Tabela XVII. Recuperação das PCDD/Fs com ultra-som e coluna de carbono/celite para <i>clean up</i> . As colunas de 1-5 e RSD expressam a reprodutibilidade da injeção, a média diz respeito a 5 injeções de uma mesma extração.	56

Tabela XVIII. Recuperação das PCDD/Fs com US e sem coluna de carbono/celite no <i>clean up</i> . As colunas de 1-4 e RSD expressam a reprodutibilidade da injeção, a média diz respeito a 4 injeções de uma mesma extração.....	57
Tabela XIX. Reprodutibilidade da injeção do extrato obtido com Soxhlet e <i>clean up</i> sem coluna de carbono/celite, média das injeções, RSDs obtidos e RSDs da literatura [...]	64
Tabela XX. Recuperações obtidas com Soxhlet sem a coluna de carbono/celite no <i>clean up</i> ; n = número de injeções no cromatógrafo à gás.....	65
Tabela XXI. Recuperações obtidas com US sem a coluna de carbono/celite no <i>clean up</i> ; Ext. = extração; n = número de injeções no cromatógrafo; n _{cc} = número de copos na cuba do US.....	67
Tabela XXII. Recuperações obtidas com DC sem a coluna de carbono/celite no <i>clean up</i> ; n = número de injeções no cromatógrafo à gás.....	70
Tabela XXIII. Formas de extração e número de congêneros dentro do intervalo de aceitabilidade do método EPA 1613.....	72
Tabela XXIV. média da recuperações (\bar{x}) e desvio padrão (s) com Soxhlet (x_1, s_1) e DC (x_2, s_2); $t_{calculado}$ e $t_{tabelado}$ para intervalo de confiança de 95% e 4 graus de liberdade [49], equivalência.....	73
Tabela XXV. Etapas da preparação da amostra para análise de PCDD/Fs em cinzas leves e períodos de tempo usualmente consumidos por etapa.....	76
Tabela XXVI. Quantidades encontradas em ng g ⁻¹ de PCDD/Fs nas cinzas obtido com Soxhlet e DC. Am.=Amostra; n=número de injeções; s=desvio padrão.....	78
Tabela XXVII. Quantidades identificadas de PCDD/Fs, desvio padrão (s), fatores de toxicidade equivalente (TEFs) e a toxicidade equivalente (TEQ), $t_{calculado}$, $t_{tabelado}$ e equivalência.....	79

LISTA DE ABREVIATURAS

AED – *Atomic emission detection* - Detetor de emissão atômica

AhR - *aryl hydrocarbon receptor*

CG - cromatografia gasosa

DC – Disruptor celular

DCM – Diclorometano

ECD – *electron capture detection* - Detetor de captura de elétrons

ER - evaporador rotativo

FID – *Flame ionization detection* - Detetor de ionização de chama

HPAs – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos

HRMS – *High resolution mass spectrometer* - Detetor de massas de alta resolução

$\log K_{ow}$ - logaritmo da constante de partição 1-octanol/água

LRMS – *Low resolution mass spectrometer*- Detetor de massas de baixa resolução

MeOH – metanol

MS - *mass spectrometer* - detector de massas

OMS - Organização Mundial da Saúde

PCBs - bifenilas policloradas

PCDD/Fs, dibenzo-p-dioxinas e dibenzofuranos

PCDDs - dibenzo-p-dioxinas

PCDFs – dibenzofuranos

PI - Padrão Interno

P_v - pressão de vapor

S - solubilidade em água

SFE – extração por fluido supercrítico

SIM - *single ion monitoring* – monitoramento de um único íon

TCDD - 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina

TEF - fator de toxicidade equivalente

TEQ - toxicidade equivalente

US – ultra-som

USEPA – *United States Environmental Protective Agency* - Agência de Proteção Ambiental
Americana

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Já faz algumas décadas que o homem, através da ciência, tem voltado sua atenção para as questões ambientais devido aos efeitos sentidos no meio ambiente e na saúde das populações decorrentes da poluição. O avanço das pesquisas auxiliou a identificar vários contaminantes ambientais ligados não somente aos processos industriais, mas também às atividades antrópicas. Entre os compostos conhecidos como poluentes ambientais podem ser citados os metais pesados, gases do efeito estufa, agrotóxicos, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, bifenilas policloradas e as dioxinas e furanos. As dioxinas e furanos são conhecidas pela sua elevada toxicidade, persistência no meio ambiente e danos ao homem e ecossistemas.

Além de agirem nos ecossistemas e indiretamente no homem, muitos poluentes, como as dioxinas e furanos, têm influência direta sobre o ser humano, estando ligados a doenças como câncer, diabetes, problemas neurológicos, má formação de fetos, mutagenicidade e outros.

As dioxinas e furanos podem estar presentes em diversas matrizes, tendo, porém como fonte majoritária sua emissão pelos incineradores, sejam de lixo hospitalar, municipais ou industriais. Assim, os anseios norteadores desta pesquisa partiram da preocupação com a possível presença de dioxinas e furanos (PCDD/Fs) em nosso meio ambiente e da necessidade de se avaliarem fontes potenciais destes composto na nossa região.

Porém, sabendo-se das exigências analíticas necessárias para este tipo de análise, buscou-se, inicialmente, uma revisão das principais metodologias e alternativas potenciais. Os diversos trabalhos existentes apontam como melhores metodologias a extração por Soxhlet ou por fluido supercrítico, técnicas que vão de encontro aos métodos da USEPA. Além disso, alguns trabalhos sugerem o uso de ultra-som (US) como alternativa de extração e o Florisil® como adsorvente para limpeza do extrato. Em termos de detecção, as técnicas de análise de PCDD/Fs empregam em geral detectores de massas (MS) de alta resolução. Neste estudo, foi avaliado conjuntamente às alternativas descritas, o uso de MS de baixa resolução na detecção de PCDD/Fs (em modo MS/MS).

Tais aspectos serão discutidos na revisão bibliográfica fundamentando as escolhas realizadas em termos de técnica de extração, adsorventes para o clean up, volume final e sistema de detecção.

Na metodologia serão descritos os materiais e equipamentos empregados, os adsorventes e seu preparo para a limpeza do extrato, o preparo do branco e demais informações relativas à metodologia. Os dados das recuperações foram avaliados frente à técnica de confronto, Soxhlet, e comparados com critérios de aceitabilidade de metodologias oficiais da USEPA. Ainda, com o intuito de avaliar o método, foi analisada uma amostra de cinzas leves de incinerador por extração com Soxhlet e disruptor celular (DC). Os resultados serão apresentados junto à discussão dos resultados, e finalmente serão apresentadas as conclusões obtidas neste estudo.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 INTRODUÇÃO

A revisão bibliográfica deste trabalho focalizou-se nas questões pertinentes à toxicidade, distribuição no meio ambiente, principais fontes e matrizes analisadas, bem como, nas metodologias de análise comumente empregadas na análise de PCDD/Fs, em particular em amostras de cinzas leves.

2.1.1 Fatores de toxicidade equivalente, toxicidade equivalente e toxicidade

As dioxinas e furanos, nomes genéricos das dibenzo-p-dioxinas (PCDDs) e dibenzofuranos (PCDFs), respectivamente, são compostos de elevada toxicidade e difícil degradação, o que torna esse tema assunto de elevada relevância para as questões ambientais [1]. As PCDDs podem apresentar de 1 a 8 átomos de cloro na molécula, resultando num total de 75 isômeros, enquanto os PCDFs têm um total de 135 isômeros. No entanto, dos 75 isômeros das PCDDs, apenas 8 são tóxicos e dos 135 PCDFs há 10 tóxicos. O grau de toxicidade varia para cada congênero. Na figura 1 são mostradas as estruturas genéricas das PCDDs e PCDFs.

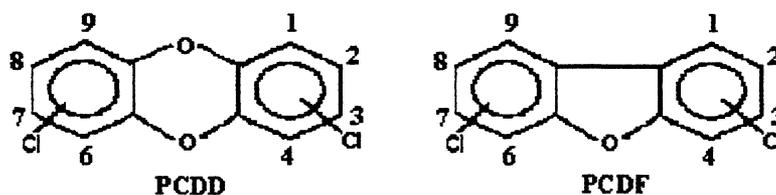


Figura 1. Fórmula estrutural das dioxinas (PCDD) e dos furanos (PCDF).

As dioxinas e furanos (PCDD/Fs) são, segundo alguns autores, os compostos químicos sintetizados pelo homem de maior toxicidade, pois, mesmo em ínfimas concentrações, causam efeitos bastante sérios ao meio ambiente e ao homem, podendo ser letais [2]. A dioxina 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD) está entre as substâncias mais perigosas. Conforme pode ser visto na tabela I, sua toxidez é ultrapassada apenas por toxinas de fontes naturais [3]. Os resultados das pesquisas sobre efeitos de dioxinas na saúde humana, segundo

a Agência de Proteção Ambiental Americana (USEPA), [4] permitem considerá-las de ação carcinogênica.

Tabela I. Dose letal das toxinas mais perigosas e do TCDD [3] $\mu\text{g kg}^{-1}$ de peso corpóreo.

Composto (toxinas)	Dose letal ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Botulinustoxina	0,00003
Tetranustoxina	0,0001
Ricina (mamona)	0,02
Crotoxina	0,2
Difteriotoxina	0,3
2,3,7,8-TCDD	1,0
Tetradoxina	10,0
Aflatoxina B ₁	10,0

Devido à toxicidade variada das dioxinas foi definido, de modo a expressar estas diferentes toxicidades, o fator de toxicidade equivalente (TEF), tendo como referência o valor de 2,3,7,8-tetracloro dibenzo-p-dioxina (TCDD). A TCDD foi escolhida como referência por ser a dioxina de maior toxicidade, à qual é atribuído o valor 1 de TEF. As moléculas com substituintes nas posições 2, 3, 7 e 8 têm o maior grau de toxicidade. Na figura 2 são mostradas as estruturas das dioxinas (PCDDs) e dos furanos (PCDFs) mais tóxicos, ambos com substituintes nas posições 2,3,7,8.

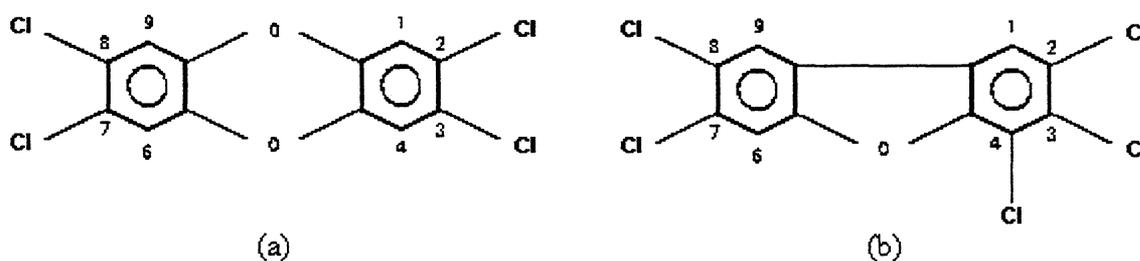


Figura 2. (a) Estruturas da TCDD e (b) 2,3,4,7,8-pentaclorodibenzofurano (PeCDF).

Mesmo entre as PCDD/Fs que apresentam esta toxicidade significativa, há diferentes graus de toxicidade. Por exemplo, a octaclorodibenzo dioxina tem TEF de 0,0001, enquanto a 1,2,3,7,8,9-hexaclorodibenzo dioxina tem o TEF de 0,1. Na tabela II, são descritos os TEFs das PCDD/Fs [4] que apresentam toxicidade importante nos ensaios laboratoriais [5]. Trata-

se dos TEFs adotados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) referentes à revisão feita em 1998.

Tabela II. TEFs dos principais congêneros das PCDD/Fs na sistemática da OMS/1998 [4].

Congêneros das dioxinas	TEF	Congêneros dos furanos	TEF
2,3,7,8-TCDD	1,0	2,3,7,8-TCDF	0,1
1,2,3,7,8-PeCDD	1,0	1,2,3,7,8-PeCDF	0,05
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0,1	2,3,4,7,8-PeCDF	0,5
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0,1	1,2,3,4,7,8-HxCDF	0,1
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0,1	1,2,3,6,7,8-HxCDF	0,1
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0,01	1,2,3,7,8,9-HxCDF	0,1
1,2,3,4,6,7,8,9-OCDD	0,0001	2,3,4,6,7,8-HxCDF	0,1
		1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0,01
		1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0,01
		1,2,3,4,6,7,8,9-OCDF	0,0001

Para misturas onde há vários isômeros das PCDD/Fs, a toxicidade equivalente (TEQ) é calculada através do somatório das concentrações de cada isômero multiplicada pelo seu TEF, conforme equação 1.

$$TEQ^1 = \sum_{i=n} (\text{congênero}_i \times TEF_i) \quad (\text{Eq. 1})$$

O documento da USEPA, *Inventory of Dioxins Sources Draft Review* (1998) [4], informa que organismos como peixes, crustáceos, roedores, anfíbios e outros com metabolismos similares aos mamíferos são afetados pelas PCDD/Fs. Segundo este trabalho, que avaliou os resultados obtidos em experimentos com ratos e de exposições ocupacionais, há indícios do comportamento, frente às dioxinas, bastante similar entre homens e os animais empregados, principalmente quando as concentrações estão na ordem de grandeza dos valores de fundo encontrados no ser humano. A USEPA refere valores de fundo em torno de 5-8 ng/I-TEQ/kg de tecido adiposo para os norte-americanos e o *International Agency for Research on Cancer* (IARC), para níveis globais, de 3-4 ng I-TEQ/kg de tecido adiposo [5].

As dioxinas agem no sistema reprodutivo e em outras funções do organismo, induzindo a má formação dos fetos, problemas ligados ao desenvolvimento das crianças em nível

¹ Também é usada a abreviação I-TEQ (International Toxicity Equivalent) para a TEQ.

comportamental e alterações de funções orgânicas. As dioxinas são associadas a estes efeitos, porque o receptor preferencial das PCDD/Fs, o receptor aril hidrocarboneto (Ah), atua nas mesmas funções do organismo relacionadas com tais problemas. A ação no organismo humano ocorre pela alta afinidade ao Ah [6,7]. O entendimento de que sua forma de ação seja dependente da interação PCDD/Fs–Ah é reforçada por uma certa “imunidade” frente às dioxinas obtidas em ratos geneticamente modificados para não conter Ah [4].

As PCDD/Fs são indutoras da P-450, que é um grupo de enzimas responsáveis pela metabolização dos xenobióticos no organismo humano [8]. Tal indução pode ser benéfica. Há estudos com ratos expostos dermalmente a hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), que apresentam uma redução na incidência de câncer de pele em função da dosagem de TCDD. O TCDD, agindo como indutor da P-450, pode acelerar a metabolização dos HPAs, reduzindo o risco ocasionado pelo ação dos seus metabólitos no DNA.

O câncer, um dos principais focos das pesquisas em relação as PCDD/Fs, é resultado de exposições prolongadas e não de exposições agudas. Por isso, tais trabalhos procuram identificar o efeito de doses constantes no desenvolvimento e indução de carcinomas, doses estas, existentes em praticamente todo ser humano, e que são conhecidas por *background* ou valores de fundo.

2.1.2 Casos de contaminação por dioxinas e furanos e influência dos valores de fundo na saúde

Apesar dos efeitos cancerígenos, outros efeitos são conhecidos para as PCDD/Fs, pois desde 1957, é conhecido o efeito da TCDD sobre a saúde humana como indutora de cloroacne em indivíduos ocupacionalmente expostos² [9]. No entanto, uma melhor compreensão dos prejuízos que a exposição aos PCDD/Fs pode trazer veio no pós-guerra do Vietnã. O uso dos herbicidas ácido diclorofenoxi (2,4-D) e ácido triclorofenoxi (2,4,5 T), conhecidos por “agente laranja”, como desfoliante, expôs os soldados e a população vietnamita a tais princípios ativos e seus contaminantes. O exército americano despejou, de 1965 a 1970, entre 19 a 40 milhões de litros do agente laranja no território vietnamita. Os

² A cloroacne não deve ser encarada como um simples surgimento de espinhas. Há relatos de trabalhadores seriamente expostos a agentes causadores de cloroacne que chegaram a fazer 48 intervenções cirúrgicas para retirada do “caroços” conhecidos como cloroacne. Estes “caroços”, além de doloridos são mal cheirosos.

herbicidas estavam contaminados com dioxinas e furanos, formados na síntese industrial. Segundo informações da Companhia Dow, líder na fabricação de 2,4,5-T, o herbicida daquela época continha níveis elevados de TCDD (191 mg kg^{-1}) se comparados aos níveis do produto comercializado atualmente ($0,01\text{-}0,02 \text{ mg kg}^{-1}$) [3]. O 2,4-D e o 2,4,5 T lançados nos campos de batalha, misturados com querosene e óleo diesel, expuseram os soldados as PCDD/Fs. Nestes soldados houve aumento da incidência de câncer no pulmão, uma vez que a mistura dos princípios ativos com solventes facilita a absorção pela pele e através da respiração.

Os soldados adversários e os campos de batalha também ficaram fortemente contaminados. Há relatos da persistência de PCDD/Fs naquele país, afetando a saúde de boa parte da população (IARC) [5], acarretando dificuldades durante a gravidez, abortos, má formação congênita e carcinomas, decorrentes da exposição aos PCDD/Fs. Ainda hoje, a população do Vietnã do Sul pode estar sofrendo ação do agente laranja e das dioxinas a ele associadas [3]. Avaliações em hospitais do Vietnã do Sul apontam concentrações, nos anos de 1984 a 1985, de até 103 ng kg^{-1} no tecido adiposo, enquanto em 1991-1992 os valores ficaram em torno de 33 ng kg^{-1} , tendo como referência os valores encontrados no Vietnã do Norte, na faixa de $2,9 \text{ ng kg}^{-1}$. A população norte-americana apresenta em média $5\text{-}8 \text{ ng kg}^{-1}$. Amostras de leite materno vietnamita, de 1970, apresentam valores em torno de 1450 ng kg^{-1} na fração lipídica [3]. Uma estimativa da exposição sofrida durante a guerra e da acumulação das PCDD/Fs na gordura pode ser inferida a partir dos dados coletados por Schecter e Li [38] de leite materno no período seguido ao uso do agente laranja, representados na figura 3.

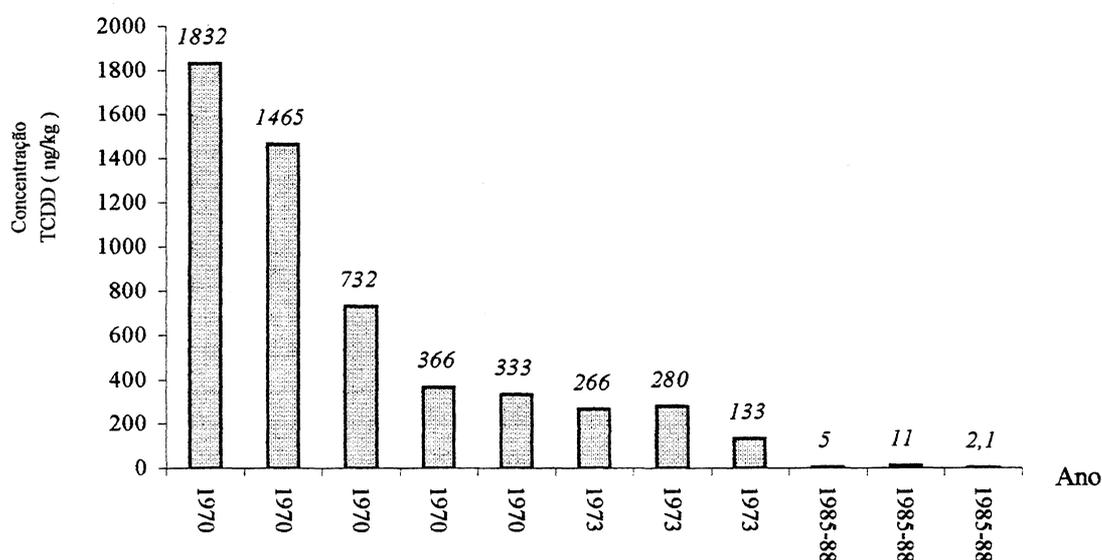


Figura 3. Concentração de TCDD (ng kg^{-1} de gordura) no leite de mães no Vietnã do Sul. [38]

No período de 1985 a 1988 foram realizadas três amostragens encontrando-se os valores de 5, 11 e 2,1 ng kg⁻¹. As concentrações de TCDD na gordura de leite materno sugerem que 18 anos após a suspensão do uso do agente laranja (1970 a 1985) a concentração não tinha alcançado os níveis atuais de valores de fundo para PCDD/Fs que se situam em torno de 3-4 ng I-TEQ kg⁻¹ de tecido adiposo segundo o IARC. Ressalta-se ainda que os níveis de valores de fundo se referem a todos os congêneros, enquanto, que nas medidas de 1970 a 1985 foi analisado apenas ao TCDD, com valores de 2,1 – 11 ng TCDD kg⁻¹ de tecido adiposo no final deste período.

Outro exemplo bem conhecido e estudado de contaminação por PCDD/Fs foi o acidente ocorrido em Seveso, Itália (1976), numa fábrica dos herbicidas 2,4-D e 2,4,5-T. Nesta ocasião, um tanque explodiu liberando uma grande nuvem dos herbicidas com dioxinas expondo grandemente empregados e população. Os efeitos observados foram a alteração da taxa de nascimento de meninos/meninas, incidência de cloroacne e de câncer. No entanto, considerando que a indução, promoção e desenvolvimento de neoplasias são processos crônicos, é possível conjecturar que o acidente em Seveso não é o melhor ambiente para avaliações sobre câncer, porque a exposição foi aguda, entretanto, permite avaliações de respostas como cloroacne e efeitos da exposição a altas doses. Os moradores vizinhos à fábrica apresentaram diversos efeitos colaterais subsequentes à exposição, mas o melhor definido foi a influência da exposição na taxa de natalidade meninos/meninas, aumentando os nascimentos de meninas.

Há, ainda, muitos trabalhos sobre os efeitos das dioxinas na saúde humana e sua potencialização dos riscos de câncer, ensaios de toxicidade e carcinogenicidade para animais, [10] e valores de ingestão diárias [11]. Alguns trabalhos são mais elucidativos sobre seus efeitos na saúde e sua associação com o aumento da incidência de câncer em grupos expostos. Tais trabalhos foram conduzidos alguns anos após os eventos citados anteriormente com grupos de trabalhadores de uma fábrica alemã de herbicidas fenoxiácidos [12 - 15], com trabalhadores da BASF [16 - 19] e soldados americanos encarregados do manejo e acondicionamento do agente laranja, este último conduzido pelo *National Institute for Occupational Safety and Health* norte-americano (NIOSH). Estes trabalhos empregaram indivíduos expostos à altas concentrações de PCDD/Fs e concluíram que houve um aumento na incidência de câncer nestes indivíduos.

No entanto, a população mundial está exposta a baixas concentrações e não a altas dosagens. Esta exposição ocorre através dos valores de fundo encontrados no homem. As pesquisas da USEPA e do IARC, com indivíduos expostos por longos períodos a doses baixas indicam aumentam da incidência de cânceres, má formação de fetos, distúrbios comportamentais, dificuldade de concentração. Segundo estes trabalhos há exposição crônica às dioxinas das populações em geral. O IARC [5] cita em torno de 80 estudos de análise de PCDD/Fs no homem, realizados em diversas regiões da Europa, Ásia, América do Norte e Oceania, que reforçam a idéia de que efetivamente a população mundial está sujeita ao contato de doses baixas e contínuas. Nesta avaliação estão incluídos principalmente os indivíduos não expostos ocupacionalmente. Tal se deve a grande difusão das dioxinas no meio ambiente [4].

2.1.3 Propriedades dos PCDD/Fs

As PCDD/FS apresentam uma estrutura predominantemente apolar, sendo insolúveis em água e bastantes solúveis em solventes orgânicos apolares ou de baixa polaridade, como nonano, benzeno e tolueno. Na tabela III são dados os valores P_v , $\log K_{ow}$, $\log K_{oc}$ ponto de fusão (P.F.), ponto de ebulição (P.E.) e solubilidade em água (S) dos principais congêneros.

Tabela III. Propriedades físico-químicas das PCDD/FS.

Congêneros das PCDD/FS	Pressão de vapor (Pa) ^a	Log K_{ow} ^a	Log K_{oc} ^b	P.F. (°C) ^c	P.E. (°C) ^c	Solubilidade em água (mol L ⁻¹) ^a
2,3,7,8-TCDD	$6,2 \cdot 10^{-7}$	6,8	6,3	305-306	446	$1,5 \cdot 10^{-9}$
1,2,3,7,8-PeCDD	$5,8 \cdot 10^{-8}$	7,4	6,8	240-241		$3,37 \cdot 10^{-10}$
1,2,3,4,7,8-HxCDD	$5,1 \cdot 10^{-9}$	7,8	7,2	273-275		$1,12 \cdot 10^{-11}$
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	$7,5 \cdot 10^{-10}$	8,0	7,4	264-265		$5,64 \cdot 10^{-12}$
OCDD	$1,1 \cdot 10^{-10}$	8,2	7,5	325-326	510	$8,7 \cdot 10^{-10}$
2,3,7,8-TCDF	$2,0 \cdot 10^{-6}$	6,1	5,6	227-228		$1,37 \cdot 10^{-9}$
2,3,4,7,8-PeCDF	$3,5 \cdot 10^{-7}$	6,5	6,0	196-196,5		$6,93 \cdot 10^{-10}$
1,2,3,4,7,8-HxCDF	$3,2 \cdot 10^{-8}$	7,0	6,4	225-226,5		$2,2 \cdot 10^{-11}$
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	$4,7 \cdot 10^{-9}$	7,4	6,8	236-237		$3,3 \cdot 10^{-12}$
OCDF	$5,0 \cdot 10^{-10}$	8,0	7,4	258-260	537	$2,7 \cdot 10^{-12}$

(a) Valores de P_v , $\log K_{ow}$ e S foram transcritos da referência [20].

(b) Valores de $\log K_{oc}$ calculados através de K_{ow} pela equação $\log K_{oc} = 0,0808 + 0,909 \cdot \log K_{ow}$ [21]

(c) Valores de P.F. e P.E. foram transcritos das referências [5] e [3], respectivamente.

Pressão de vapor (P_v), logaritmo dos coeficientes de distribuição 1-octanol/água ($\log K_{ow}$), e de distribuição carbono orgânico ($\log K_{oc}$), pontos de fusão (P.F.) e ebulição (P.E.) e solubilidade em água (S)

De acordo com a tabela III, as PCDD/Fs apresentam o logaritmo da constante de distribuição 1-octanol/água ($\log K_{ow}$) de 6,1 a 8,2, sugerindo uma tendência a se reterem em gordura animal. O $\log K_{oc}$ sugere alta tendência a adsorverem-se na matéria orgânica dos solos. O P.F. varia de 196-326 °C e a pressão de vapor (P_v) é da ordem de 10^{-7} Pa. O P.E. em torno de 500 °C, associado com P.F. e P_v , indica uma baixa volatilidade, razão pela qual são considerados compostos fixos. A solubilidade em água é bastante baixa, variando de $2,7 \cdot 10^{-12}$ a $1,5 \cdot 10^{-9}$ mol L⁻¹, valores que correspondem a 1,2 a 483 ppt, respectivamente.

As dioxinas e furanos, sendo pouco solúveis em água e muito solúveis em gorduras, são lipossolúveis, sendo esta a principal causa da sua biocumulatividade [22,23]. No entanto, a presença dos ácidos húmicos em água pode aumentar em até cinco vezes a solubilidade das PCDD/Fs neste solvente [4]. Dificilmente contaminam águas subterrâneas, a menos que exista comunicação da água superficial com a subterrânea, permitindo assim a percolação de PCDD/Fs até o lençol freático.

Os valores de distribuição de carbono orgânico sugerem alta tendência das dioxinas de permanecerem adsorvidas no solos, lodos e sedimentos [3]. São também bastante estáveis e de difícil biodegradação, propriedades estas que, somadas a sua biocumulatividade, tornam os PCDD/Fs contaminantes ambientais extremamente perigosos para a saúde da população em geral e ao meio ambiente, por apresentarem efeitos deletérios em vários tipos de organismos³.

2.1.4 Fontes das PCDD/Fs

Há muitos trabalhos sobre os mecanismos de formação das PCDD/Fs, sugerindo a queima de diversos compostos, por exemplo, plásticos, pesticidas, solventes e outros que apresentam cloro em sua estrutura, como precursores da formação de PCDD/Fs [24 - 26]. Os precursores mais conhecidos na formação em incineradores são cloro fenóis e os cloro benzenos [27].

Segundo alguns autores, o processo parece ocorrer da seguinte forma: a combustão incompleta dos resíduos na câmara de combustão dos incineradores leva a formação de carbono sólido, fragmentos orgânicos (subprodutos da combustão incompleta), cloro e metais. Os metais e os fragmentos orgânicos são adsorvidos na superfície do carbono.

³ Experimentos demonstram que os efeitos sentidos pela ação das PCDD/Fs sobre espécies como macacos; porcos camundongos; ratos; hamsters. vacas; coelhos; galinhas; peixes; pássaros silvestres; mamíferos marinhos e martas são similares aos sentidos pelo homem [4].

O metal adsorvido na superfície do carbono sólido passa a catalisar a reação do cloro com os fragmentos orgânicos gerados na queima vindo a formar as PCDD/Fs. Assim, a preocupação com o uso de incineradores é relevante devido ao fato de que havendo queima de algum produto clorado, pode ocorrer formação das dioxinas e furanos. Além disso, atualmente há uma profusão de aditivos e produtos químicos utilizados nos diferentes processos industriais [28], o que torna improvável a existência de um rejeito isento de cloro. Estando os compostos halogenados presentes nos resíduos enviados para incineração, estes podem estar gerando precursores de PCDD/Fs.

As PCDD/Fs encontradas nas cinzas de incinerador estão em maior quantidade nas cinzas leves do que nas cinzas de fundo [29], tendo como valores médios concentrações da ordem de 47,2 ng g⁻¹ I-TEQ [29]. Apenas 10 % são retidas nas cinzas de fundo. Isto ocorre pela propriedade das PCDD/Fs de se adsorverem na superfície do carbono sólido. Sendo as cinzas leves compostas por partículas de pequeno diâmetro, tendo uma superfície específica superior a das partículas de fundo, e portando retendo em sua superfície uma maior quantidade do que as cinzas com partículas maiores. Assim, quando o objetivo é avaliar a formação e a emissão de dioxinas originárias de incineradores, são analisadas as frações leves das cinzas (*fly ash*).

O fator de emissão de algumas fontes, expresso em µg kg⁻¹ de PCDD/Fs, pode ser usado para ordenar os contribuintes majoritários de PCDD/Fs. Na tabela IV estão apresentadas estimativas dos fatores de emissão das fontes consideradas majoritárias, bem como sua contribuição global anualmente expressa [30]. As principais fontes são os incineradores, fornos de cimento operando principalmente, mesmo em altas e a baixas temperaturas, com a refundição de peças metálicas que usam sucata.

Tabela IV. Principais fontes de dioxinas, fatores de emissão e emissões anuais mundial estimadas. [30]

FONTE	Fator de emissão (µg kg⁻¹)	Emissão (kg ano⁻¹)
Incineradores municipais	13	1130
Fornos de cimento – queima resíduos	2,6	680
Combustão da biomassa	0,04	350
Produção de metais ferrosos	0,5	350
Fornos de cimento – s/ queima de resíduos	0,2	320
Incineração de lixo hospitalar	22	84
Recuperação de cobre – fundição	39	78

Outras fontes bastantes citadas são processos de branqueamento de papel e celulose com cloro molecular e a simples queima de combustíveis fósseis [4]. A presença das PCDD/Fs no meio ambiente também está ligada ao difícil descarte de produtos clorados como o pentaclorofenol (PCF), pentaclorofenato de sódio, pesticidas organoclorados (família do drins⁴, heptacloro, DDT, HCB, BHC, etc.), ascarel (óleo de refrigeração usado nos transformadores), bifenilas policloradas (PCBs) e outros compostos tóxicos que não podem ser descartados sem critérios de segurança. Assim, seus resíduos e rejeitos como sedimentos, lodos e solos contaminados, apresentam poucas alternativas viáveis de descarte além da incineração. Tal dificuldade, associada às regulamentações e legislações ambientais, relacionadas ao descarte de resíduos perigosos coloca-os na iminência de serem incinerados. Alguns autores consideram este processo como uma etapa do processamento de resíduos bastante interessante, pois permite reduzir em média em até 80% o volume de rejeitos [20].

Por muitos anos, no Brasil e no mundo, foram usados e continuam sendo, compostos químicos tais como 2,4-D e 2,4,5-TP, hexaclorociclohexano entre outros, possivelmente contaminados com dioxinas [31], ou que de alguma maneira possam formar as PCDD/Fs. Isto é bem evidenciado no trabalho desenvolvido por *Braga e Krauss* [32], que identificaram dioxinas e furanos no leite materno de mães da região da “Cidade dos Meninos”, Rio de Janeiro, uma área contaminada com o pesticida hexaclorociclohexano, conhecido como BHC, ou vulgarmente como “pó de gafanhoto”. Esta área, na tentativa de remediação, recebeu cal (CaO) para degradar os rejeitos do BHC. No entanto, além do próprio BHC conter dioxinas e furanos, provenientes da sua síntese, a cal também poderia contê-las fornecendo estes compostos para área. Porém em condições alcalinas pode haver formação de clorofenóis, o que explicaria a presença de PCDD/Fs no leite materno das mães citadas anteriormente segundo os autores.

Outra fonte importante é a produção e uso do PCF (pentaclorofenol), que tem larga aplicação como cupincida e outros usos industriais, pois, a madeira protegida contra cupins, com PCF, ao ser queimada, libera (volatiliza) na fumaça o PCF nela aplicado. No entanto, alguns processos atuais de síntese e purificação dos organoclorados, como 2,4-D, 2,4,5-T, PCF etc., evoluíram de forma a reduzir, não produzir ou não liberar dioxinas, ou ainda sua fabricação foi interrompida. Porém, há muita madeira tratada com PCF contendo PCDD/Fs

⁴ A “família do drins” é expressão usada para os biocidas comumente conhecidos por aldrin, dieldrin e endrin.

que ainda será queimada, volatilizando as dioxinas e o próprio PCF, ou ainda gerar precursores de dioxinas e furanos em processos de queima e incineração. Ressalta-se também, que processos domésticos podem agir como fonte de PCDD/Fs. A USEPA estima que 19% das emissões atmosféricas de PCDD/Fs nos Estados Unidos provenha da queima de lixo doméstico nas residências, uma vez que tais processos são conduzidos a baixa temperatura, tendo materiais ricos em cloro e outros compostos que geram os precursores das dioxinas e furanos presentes.

2.1.5 Distribuição no meio ambiente

A ocorrência natural de PCDD/Fs ainda é discutida. Alguns autores acreditam na existência de fontes naturais sugerindo que incêndios em florestas e atividades vulcânicas possam formá-las. No entanto, estudos relatam restos mortais de 100 a 400 anos, devidamente armazenados, com ausência completa de dioxinas. Considerando o tempo de meia-vida das dioxinas calculado nos sedimentos do Mar Báltico (condições anaeróbicas) [1] de 100 a 200 anos, em condições similares a dos restos mortais avaliados, tem sido reforçada a idéia da inexistência de fontes naturais. Porém, apesar da discussão em torno do tema, em paralelo parece haver consenso de que as fontes principais são processos antrópicos. Tal entendimento é reforçado por dados referentes à redução das dioxinas, em variadas esferas ambientais, após poucos anos de medidas mitigadoras em países do primeiro mundo. A USEPA informa redução nos lançamentos de PCDD/Fs em torno de 76 % num período de 8 anos [4], assim como Reino Unido e Alemanha obtiveram em média 50% de redução em 7 anos de esforços [33]. Os lançamentos nos Estados Unidos foram estimados no ano de 1987 em 3,3 kg de $TEQ_{DF-OMS_{98}}$ e no ano de 1995 em 14 kg $TEQ_{DF-OMS_{98}}$ pela USEPA.

Considerando que as fontes naturais inexistam ou que não sejam importantes em termos de contribuição de PCDD/Fs para o ambiente, pode-se dizer que nenhuma outra toxina está tão difundida nas esferas ambientais como as dioxinas e furanos. Isto provavelmente ocorre devido a sua alta afinidade por partículas de carbono e matéria orgânica e a existência de diversas fontes geradoras. Um estudo conduzido na Alemanha encontrou em áreas remotas, mesmo longe de fontes de dioxinas, concentrações em torno de seis vezes inferiores que em áreas industriais [28].

O estudo relacionou a quantidade depositada de dioxinas e a quantidade de material particulado em suspensão no ar. Ambientes remotos tiveram menores concentrações de dioxinas e partículas em suspensão. Isto é creditado à quantidade de material particulado no ar ($< 10\mu\text{m}$), onde a dioxina fica agregada. Assim, dioxinas adsorvidas a partículas de poeira podem ser transportadas a lugares distantes pela ação dos ventos, ficando menos sujeitas à fotodecomposição [28]. Para ilustrar estes apontamentos, na tabela V, estão alguns dados obtidos por Wallenhorst et al. [28] para distribuição de dioxinas nestas regiões.

Tabela V. Taxas de deposição de PCDD/Fs, do material em suspensão atmosférica e concentração de PCDD/Fs no material amostrado na Alemanha (Baden-Wurttemberg) [28].

Média	Área rural	Área rural com indústrias	Área suburbana	Área urbana	Área Industrial
PCDD/F (pg I-TEQ/m ² .dia)	7	298	42	47	43
Taxa de deposição (mg/m ² .dia)	63	93	110	74	106
PCDD/F no material (ng I-TEQ kg ⁻¹)	111	320	382	635	406

Na tabela V, observa-se que o valor médio de PCDD/Fs nas partículas de poeira é menor nas áreas rurais do que próximo aos centros urbanos. Em tese, nestas regiões, não deveriam ser encontradas, portanto, credita-se a existência destes contaminantes ambientais em regiões longe de fontes de PCDD/F, à sua agregação ao material particulado e ao transporte pelos ventos.

Por características de distribuição como estas, as PCDD/F difundem-se pelo meio ambiente, sendo comum o entendimento de que qualquer matriz terá um valor de fundo, isto é, sempre haverá uma quantidade de dioxinas em qualquer matriz avaliada [34].

As dioxinas e furanos são ainda encontradas em lodos de estações de tratamento de água, originárias possivelmente das águas brutas contaminadas por esgoto doméstico, rico em águas de máquinas de lavar roupa. Este efluente é, segundo alguns autores, rico em dioxinas proveniente das roupas, que podem ter sido tratadas com PCF [35], TCF e outros aditivos organoclorados comuns nas indústrias têxteis.

Assim, lodos originários das estações de tratamento de águas/esgotos usados em adubos ou aditivos de fertilizantes podem contribuir com PCDD/Fs para os solos. Acredita-se que os despejos destes lodos nos rios adicionem PCDD/Fs lentamente aos sedimentos dos rios. Outra possibilidade de contaminação das águas está ligada à característica das PCDD/Fs de ficarem

retidas nos solos, a partir do qual, por lixiviação poderiam chegar aos lençóis freáticos. Esta hipótese é pouco provável de ocorrer por que os elevados valores de $\log K_{oc}$ indicam justamente a grande afinidade por solos das dioxinas e furanos, de onde dificilmente são lixiviadas.

O comportamento de PCDD/Fs na água pode também ser avaliado através do $\log K_{oc}$ e S (solubilidade), pois por apresentarem baixos valores de S e elevado valores de $\log K_{oc}$ (vide Tabela III) tendem a ficarem aderidas aos sólidos suspensos e a depositarem-se nos sedimentos dos corpos hídricos. Nos sedimentos ficam menos suscetíveis às ações da luz solar e do oxigênio podendo ter uma meia vida maior nesta situação. Avaliações em sedimentos do Mar Báltico indicam, para os principais congêneros das PCDD/Fs, tempos de meia vida da ordem de 100 a 200 anos [1].

A principal rota de entrada das dioxinas no homem são os alimentos, essencialmente devido aos de origem animal, ricos em gordura. É estimado que 90 % da exposição dos seres humanos a PCDD/Fs e PCBs com toxicidade similar a das dioxinas e furanos seja proveniente dos produtos de origem animal e peixes [33]. A Tabela VI apresenta os níveis de dioxinas encontrados normalmente em diversas matrizes [8].

Tabela VI. Níveis de dioxinas em diferentes matrizes [8].

Congêneros das dioxinas	ar urbano (ng m ⁻³).10 ⁻⁶	água doce (ng L ⁻¹)	solo (ng kg ⁻¹)	carne (ng kg ⁻¹).10 ⁻³	gordura humana (ng kg ⁻¹)
2,3,7,8-TCDD	6,1	3,1.10 ⁻⁶	1,1.10 ⁻¹	280	6,4
1,2,3,7,8-PeCDD	20	4.10 ⁻⁷	3,0.10 ⁻¹	410	23
1,2,3,4,7,8-HxCDD	18	6.10 ⁻⁷	3,7.10 ⁻¹	550	37
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	31	3,6.10 ⁻⁵	6,3	7700	150
OCDD	1000	1,4.10 ⁻²	24	13000	820
2,3,7,8-TCDF	33	2,6.10 ⁻⁵	9,5.10 ⁻¹	320	9
2,3,4,7,8-PeCDF	22	8,5.10 ⁻⁶	9,3.10 ⁻¹	390	24
1,2,3,4,7,8-HxCDF	7,3	9,5.10 ⁻⁶	1,3	370	26
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	230	9,9.10 ⁻⁵	4,1	500	34
OCDF	240	1.10 ⁻²	4,6	11000	46

Na tabela VI, identifica-se que a concentração de PCDD/Fs nos alimentos supracitados é maior nas carnes que na água doce, ar urbano e solo. Há trabalhos relacionando hábitos alimentares, como o de ingerir peixes com a presença de PCDD/Fs no leite materno e no organismo humano [36].

2.2 METODOLOGIA ANALÍTICA DE PCDD/Fs

Na literatura há várias metodologias de análise das PCDD/Fs [37 - 42] as quais são compostas, em geral, das etapas de: extração, limpeza do extrato (*clean up*) e análise por cromatografia gasosa (CG). Etapas estas que serão, a seguir, discutidas. Os métodos desenvolvidos pela EPA para dioxinas e furanos, métodos conhecidos por EPA 8280 e 8290 [43, 44] observam as mesmas etapas de preparo da amostra, extração dos analitos, *clean up* e análise por CG.

2.2.1 Formas de extração

Entre as diversas matrizes onde normalmente são analisadas dioxinas e furanos, estão as cinzas leves provenientes de incineradores. Os procedimentos de extração das cinzas, como em qualquer análise de traços apresenta etapas que visam retirar o(s) analito(s) da matriz em estudo. Para tanto, existem várias alternativas usando diferentes sistemas extratores e solventes, sendo algumas destas representadas na tabela VII, onde estão especificados as formas de extração, o tempo de extração, o solvente, a massa de amostra, o volume de solvente, os detectores utilizados e as respectivas referências deste trabalhos.

Tabela VII. Formas de extração, tempo de extração, solvente, volume, detector e referências

Sistema de extração	Tempo de extração (h)	Solventes	Massa amostra	Volume de solvente	Detector	ref
Soxhlet	16	Tolueno	10 gramas	200 mL	HRMS	[44]
	16 (Dean Stark)	Tolueno	10 gramas	200 mL	LRMS	[43]
	24	Benzeno	5,0 gramas	350 mL	LRMS	[51]
	48	Tolueno	5,0 gramas	350 mL	LRMS	[51]
	24	Tolueno	2,0 gramas	400 mL	LRMS	[25, 27]
	48	Benzeno	-	-	FID, ECD, LRMS	[62]
	24	Tolueno	1,0 gramas	150 mL	LRMS	[40]
	48	Tolueno	1,5 gramas	150 mL	HRMS	[47]
	24	Tolueno	-	-	HRMS	[32] ^a
	16	Tolueno	13 gramas	-	MS/MS	[45]
	20	Tolueno	1,5 gramas	120 mL	HRMS	[53]
	48	Tolueno	-	-	HRMS	[58]
	Fluido Supercrítico (SFE)	0,667	Tolueno	5 gramas	10-50 mL	HRMS

Ultra-som	1,5	benzeno	1,0 gramas	60 mL	LRMS ECD	[51]
	1,5 - 6	tolueno	1,0 gramas	60 mL	LRMS ECD	[51]
Disruptor celular	0,15	acetonitrila ; hexano; DCM e 2- propanol	30 gramas	300-400 mL	-	[52] ^b

^a solo; ^b recomendado para amostras de lodos, sedimentos e efluentes; HRMS – *High resolution mass spectrometer* - Detector de massas de alta resolução; ECD – *electron capture detection* - Detetor de captura de elétrons; FID – *Flame ionization detection* - Detetor de ionização de chama; LRMS – *Low resolution mass spectrometer*- Detector de massas de baixa resolução

Os procedimentos de extração mais comuns trabalham com extrator do tipo Soxhlet, sendo também o procedimento que numericamente mais aparece na literatura. Os solventes de extração usados são todos grau pesticida como tolueno, hexano, diclorometano e misturas de solventes, tais como diclorometano-acetona (1:1 v/v), 2-propanol- diclorometano (1:1 v/v) e benzeno [40]. O tempo de extração varia de 12 até 72 horas para Soxhlet [46] têm sido considerados lentos. Entretanto, apesar da desvantagem do tempo gasto na extração, esta técnica, Soxhlet, é considerada como a técnica que oferece as melhores recuperações [50]. Há, ainda, a extração por fluido supercrítico (SFE) [47], que utiliza comumente CO₂ líquido, que é mais econômico em relação a outros usados em SFE e além de apresentar bons resultados, não necessita de grandes cuidados com a disposição de rejeitos do solvente. Enquanto gasta-se de 100 a 500 mL com Soxhlet, na SFE são gastos de 10 a 50 mL [48]. Na SFE é usado como modificador o metanol (MeOH), com o objetivo aumentar a solubilidade de analitos polares [49]. O uso de SFE reduz o tempo de extração para algo em torno de 40 minutos nos sistemas automatizados [48]. Assim, a extração por SFE apresenta vantagens em termos de tempo de análise, consumo de reagentes e geração de resíduos. Porém, ao contrário dos extratores tipo Soxhlet, que são relativamente baratos, largamente empregados e disponíveis, o SFE é ainda dispendioso, existindo poucas unidades no Brasil.

Pelas razões citadas anteriormente existem possibilidades, como sistemas extratores mais rápidos e mais econômicos, sistemas como ultra-som, extração acelerada por solvente, etc. Os equipamentos de ultra-som (US) são bastante utilizados para limpeza de material e vidraria em laboratórios, e vem sendo utilizados para extração de amostras [50] e para reações químicas (sonoquímica). Há relatos de uso do US para extração de PCDD/Fs,

conseguindo-se eficiência de extração da ordem de 70 % da extração por Soxhlet com uso de apenas 1 g de amostra e 60 mL de solvente extrator [51]. O ultra-som consiste de uma cuba onde se adiciona água, que age como meio de propagação das ondas ultra-sônicas, e na cuba coloca-se o recipiente contendo a matriz e o solvente de extração. Resumidamente, o processo consiste em colocar a matriz sólida em contato íntimo com o solvente extrator, expondo o solvente e o sólido à ação de ondas ultras-sônicas. Os ciclos de operação variam de 15 minutos a 3 horas. As ondas ultra-sônicas, em tese, têm energia suficiente para romper as interações estabelecidas entre as moléculas dos analitos e o sólido em questão, sem afetar a estrutura molecular dos analitos. Assim, a energia fornecida pelo ultra-som rompe estas interações sem clivar ligações mais energéticas, como as ligações covalentes. Além disso, a agitação ocasionada pelas ondas do ultra-som permite um maior contato entre o solvente e o líquido, aumentando também a eficiência da extração pelo acréscimo de temperatura associado. Os modelos tradicionais para serem utilizados com este fim devem dispor de potência adequada, (em torno de 300W) para que a energia fornecida possa romper a interação estabelecida entre os analitos e a matriz. Isto é relevante quando os compostos a serem extraídos possuem alta afinidade com a matriz sólida [52].

O disruptor celular (DC) também é um equipamento que fornece ondas ultras-sônicas. No entanto, difere dos ultra-sons tradicionais pelo seu melhor aproveitamento da potência fornecida, devido a sua forma de ação. No DC, as ondas são geradas na ponta de uma sonda imersa no solvente de extração. Agindo desta maneira, a potência é praticamente toda transferida ao sistema matriz sólida e analito, ao contrário do sistema de ultra-som convencional, onde parte da energia é perdida no aquecimento das moléculas da água contidas em sua cuba. Cabe salientar que os DC também perdem energia por aquecimento, no entanto, tal efeito é ocasionado no próprio solvente que está em contato com a amostra, fato este que pode auxiliar aumentando a eficiência de extração [50].

Na tabela VII pode ser observado que a técnica de extração mais utilizada é por Soxhlet, pelos motivos discorridos anteriormente, sendo o tolueno o solvente preferido. Os volumes de solvente destes trabalhos ficam na média de 300 mL para Soxhlet, 60 mL para US e 300 mL para DC. Os tempos de extração são preferencialmente 16, 24 e 48 horas por Soxhlet, com amostras de 1,0 a 13 gramas, e para US e DC os períodos de extração sendo bem menores (9 min com DC e 1,5 – 6 horas US). Há ainda relatos de trabalhos com ultra-som e disruptor celular.

2.2.2 Clean up

Efetuada a extração dos analitos da matriz, passa-se à eliminação de interferentes do extrato, que visa retirar compostos co-extraídos às PCDD/Fs. Isto é fundamental, pois, estes compostos interferem na análise cromatográfica. Compostos como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), bifenilas policloradas (PCBs), dibenzo-p-dioxinas e furanos polibromados são interferentes que dificultam a identificação e quantificação das dioxinas e furanos [53- 55]. O processo de eliminação dos interferentes consiste de uma cromatografia preparativa de coluna, podendo ser usados diversos adsorventes.

A escolha dependerá de fatores como natureza das matrizes, interferentes esperados e analitos em estudo entre outros. Com solos, há trabalhos para análise de PCDD/Fs usando os adsorventes alumina, sílica gel e colunas de carbono com celite [56]. Já para substratos do tipo cinzas leves são empregadas sílicas ácidas e básicas, sulfato de sódio, alumina desativada, cobre ativado e sílica gel, existindo um número expressivo de combinações entre as fases estacionárias [39]. Há pesquisadores que usam colunas de Florisil® um adsorvente, à base de silicato de magnésio, muito empregado na análise de traços. O Florisil® vem sendo empregado para análise de PCDD/Fs visando reduzir o número de colunas, o tempo da cromatografia preparativa, o material e a possibilidade de perda dos analitos [57], já que se emprega apenas uma coluna de *clean up* ao invés das três mais usuais (sílica-gel, alumina e carbono), pois tal fase estacionária apresenta grande afinidade pelos interferentes mais comuns neste tipo de análise. Dessa forma seu uso poderia consumir menor quantidade de reagentes, e a amostra seria menos manipulada pelo analista.

2.2.3 Análise de PCDD/Fs

O passo seguinte, estando o extrato livre de interferentes, é a análise por cromatografia gasosa. Existem basicamente dois aspectos determinantes no sucesso desta análise: a escolha da coluna cromatográfica e do detector empregado. Colunas do tipo capilar são preferidas em função da sua alta capacidade resolutiva, o que é fundamental devido ao número de congêneros a serem resolvidos. As mais empregadas têm fases estacionárias similares a DB-5 (5% metilfenilpolisiloxano).

Freqüentemente são empregados detectores de massas (MS) de alta [58] e baixa resolução [59], detectores do tipo ECD (Detector de captura de elétrons) [39,51,56], FID (Detector de ionização de chama) [39, 60] e AED (Detector de emissão atômica) [39]. Entretanto, o uso destes detectores, com exceção ao MS, apresentam limitações inerentes. Na tabela VII também estão descritos trabalhos com estes detectores. Alguns, como FID, ECD ou AED, só informam tempo de retenção do analito e área do pico, o que é insuficiente quando se deseja determinar, identificar, confirmar e quantificar alguns congêneros específicos numa família de 210 isômeros. Além disso, é difícil ajustar as condições de uma corrida para resolver tantos isômeros, mas, conseguindo-se tal feito, esta corrida seria mesmo assim longa. Há também dificuldades para obter-se uma fase estacionária que possa separar todos os isômeros.

Porém, utilizando-se detector de massas, alguns aspectos analíticos são melhorados, pois este detector fornece informações estruturais sobre cada pico detectado no CG, aliando, em uma única corrida, três informações: tempo de retenção, área do pico e dados estruturais. Por estas razões, o uso de MS é fundamental para análise de PCDD/Fs, sendo, portanto, o detector mais empregado [39].

Os espectrômetros de massas de alta resolução (HRMS) fornecem, além de informações estruturais, a massa molecular exata, auxiliando na identificação e confirmação dos analitos. Já os detectores de baixa resolução (LRMS), mesmo não informando a massa exata, também possibilitam a confirmação da estrutura de um composto que elua da coluna, estando o pico resolvido em termos cromatográficos.

A diferença fundamental que permite aos detectores de baixa resolução, operando em modo MS/MS (LR/MS/MS) identificar os homólogos principais dos PCDD/Fs, é o seu sistema de remoção dos íons não monitorados de dentro do *trap*. Tal mecanismo possibilita isolar no *trap* íons de determinada massa/carga (m/z), formados em uma primeira fragmentação de determinado composto, íons de fragmentação conhecidos como íons pais. Estes íons sofrerão uma segunda fragmentação e formarão os denominados íons filhos. Antes, porém, são excluídos do *trap* os íons com m/z diferentes da m/z definida para o íon pai. Um esquema do processo é mostrado na figura 4.

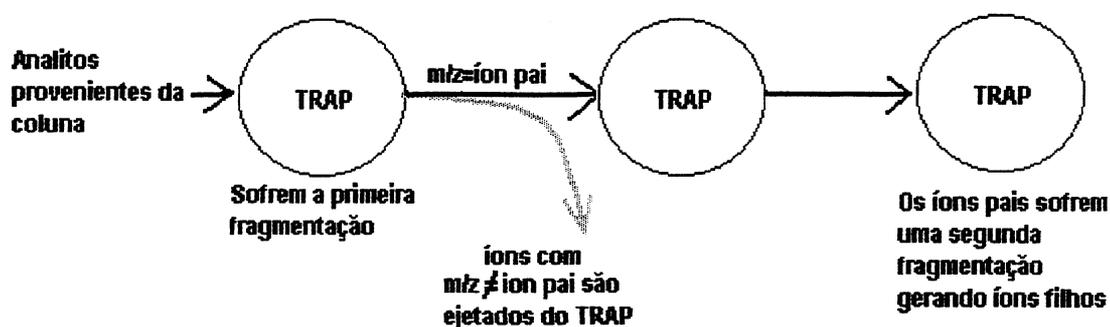


Figura 4. Esquema de funcionamento do *ion trap*.

Para uma determinada estrutura molecular, os íons filhos são mais característicos que os íons pais. Assim, em uma análise em que ocorra a co-eluição de homólogos das PCDD/Fs e interferentes em um mesmo pico cromatográfico, serão mantidos no *trap*, para a segunda fragmentação, somente os íons pais dos congêneros das PCDD/Fs e dos interferentes de mesma razão m/z . Após sua retenção no *trap*, os íons sofrem uma segunda fragmentação, que gera fragmentos característicos. Estes fragmentos são monitorados de uma forma parecida com o SIM (*single ion monitoring*), obtendo-se, em geral, fragmentos com m/z diferentes para os analitos dos fragmentos obtidos para os interferentes. Tal sistema tende a reduzir ainda mais a ação dos interferentes, aumentando a confirmação segura de cada isômero.

A partir do uso deste sistema é possível reduzir a interferência de compostos co-extraídos tornando a detecção muito sensível. Singh e Kulshrestha [39] acreditam que para amostras de sedimentos ou cinzas, que contenham pouca interferência, equipamentos do tipo HRMS e LRMS/MS fornecem dados quantitativos similares. No entanto, para matrizes com altos graus de interferentes, melhores resultados são obtidos com LRMS/MS frente a HRMS.

2.2.4 Considerações Gerais

Atualmente existem muitos trabalhos publicados referentes às dioxinas e furanos, porém a literatura traz escassas referências de avaliações destes compostos no Brasil. Alguns organismos internacionais (OMS) justificam tal fato devido a estas análises demandarem recursos financeiros elevados e necessitarem de analistas bem treinados, os quais segundo a OMS são escassos em países do terceiro mundo.

A legislação brasileira, até o presente momento, regulamenta teores de PCDD/Fs nas matrizes de cal e polpa cítricas utilizadas na produção de ração animal, através das Instruções Normativas 008, 009, 010, de 18 de maio /1999 do Ministério da Agricultura. O Estado do Rio Grande do Sul dispõe através das resoluções 02/2000 e 09/2000 do CONSEMA sobre o co-processamento de resíduos em fornos de *clinker* e sobre a incineração de resíduos hospitalares, respectivamente. Há nestas legislações limites para emissões de PCDD/Fs. Tais fatos denotam a necessidade de intensificar estudos para clarear a situação ambiental com relação às dioxinas e furanos no país.

Além disso, atualmente, as amostras para análises de dioxinas e furanos coletadas no país têm sido, em geral, enviadas para laboratórios no exterior, o que implica em custos elevados, inconveniências no transporte e um prazo maior no retorno dos resultados. Entende-se, portanto, como necessária a criação de recursos humanos e o desenvolvimento de competência nesta área analítica, fundamental para avaliação dos impactos de diversas fontes potenciais de PCDD/Fs.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

Este trabalho busca investigar as possibilidades e limitações do desenvolvimento de um protocolo analítico de extração e análise de PCDD/Fs em nível de traços nas cinzas leves de incineradores. A inexistência de um protocolo específico para extração e análise de dioxinas e furanos operacionalizado junto ao Instituto de Química (UFRGS) exige um estudo exploratório das metodologias empregadas para tais análises, tentando identificar as melhores alternativas que existem para a realidade do contexto brasileiro.

Objetivos específicos

- Revisar as metodologias mais empregadas nas análises de PCDD/Fs, de acordo com a literatura.
- Comparar a eficiência da extração por ultra-som e disruptor celular, tendo a extração com Soxhlet como técnica de confronto (métodos USEPA n°s 8280 e 8290b).
- Avaliar a aplicabilidade do Florisil como adsorvente para cromatografia preparativa em substituição ao *clean up* dos métodos USEPA n°s 8280 e 8290b.
- Avaliar o uso de MS/MS de baixa resolução, em níveis de baixa concentração.

PARTE EXPERIMENTAL

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1 REAGENTES E MATERIAIS

Reagentes para cromatografia preparativa (clean up)

- Alumina neutra 80-200 mesh, Merck. Estocada em dessecador.
- Sílica gel – alta pureza tipo 60, 70-230 mesh, Merck.
- Celite 545, Merck.
- Carbono ativado, Merck.
- Florisil, 60-100 mesh, Merck.
- Sulfato de sódio P.A., Na₂SO₄, Merck. Purificado por aquecimento à 400 ° C por 4 horas.

Gases:

- Hélio alta pureza, White Martins, 99,999%.
- Nitrogênio 4.6, White Martins, 99,99%.

Solventes:

- Todos os solventes utilizados foram grau pesticida ou equivalente.
- Diclorometano (DCM), CH₂Cl₂, Mallinckrodt.
- Hexano, C₆H₁₄, Mallinckrodt.
- Metanol (MeOH), CH₃OH, Fisher.
- Nonano, C₉H₂₀, 99%, Acros.
- Tolueno, C₆H₅CH₃, EM Science.
- Ciclohexano, C₆H₁₂, Merck.
- Acetona, CH₃COCH₃, Mallinckrodt.

Reagentes diversos e soluções de calibração:

- Ácido Sulfúrico P.A., concentrado, d=1,84 g/mL, Merck.

- Hidróxido de potássio, KOH, P.A. 20 % (m/v) em água deionizada, Merck.
- Cloreto de sódio, NaCl, grau analítico, 5 % (m/v) em água deionizada, Merck.
- Soluções de calibração, concentrações descritas na Tabela 1, Cinco soluções em n-nonano contendo 17 PCDD/Fs nativos (não marcados isotopicamente), 7 PCDD/Fs isotopicamente marcados com ^{13}C e 1 PCDD isotopicamente marcada com ^{37}Cl .
- Solução de reforço – Solução contendo 10 PCDD/Fs em nonano, nas concentrações descritas na tabela VIII.
- Solução de padrão interno (PI), soluções em nonano nas concentrações descritas na tabela VIII.

Os padrões para calibração do MS, referidos anteriormente, foram obtidos junto a *Radian Corporation LLC*.

4.2 EQUIPAMENTOS

A seguir são descritos os equipamentos empregados:

- Ultra-som marca UNIQUE, *ultrasonic cleaner*, modelo USC 1450, frequência ultrasônica de 25 kHz, potência ultrasônica 150 Watts.
- Forno elétrico marca Sanchis.
- Disruptor celular UNIQUE, modelo disruptor, frequência 19 kHz, potência 100 watts.
- Evaporador Rotativo marca Ika Labortechnik, aquecimento HB4, evaporador RV 05ST.
- Controlador de vácuo do evaporador rotativo marca Vacubrand, modelo CVC 2II.
- Bomba de vácuo do ER modelo ATB, 0,24 HP, 2,9 A.
- Cromatografo Varian, modelo 3800 CX, acoplado a detector de massas SATURN 2000, do tipo MS/MS.
- Centrifuga marca IEC (International Equipamento Company)/centra MP4R, 16A.

4.3 LAVAGEM DO MATERIAL, CONTROLE DE VIDRARIA E CARTUCHOS

Toda vidraria, como extrator Soxhlet, béqueres, balões, frascos de amostra, copos de US, etc. tiveram um criterioso procedimento de lavagem. O processo de lavagem da vidraria e similares obedeceu à seqüência da figura 5, similar a descrita pelo método EPA 8290a:

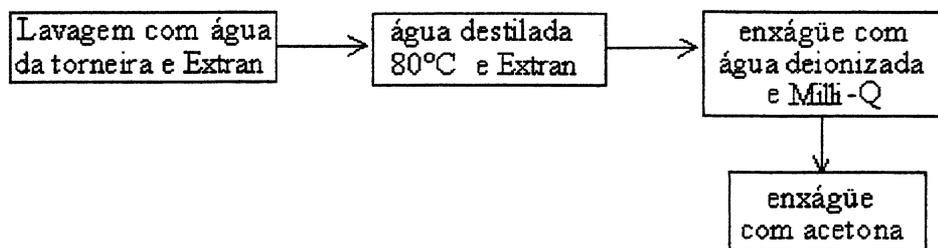


Figura 5. Sistemática adotada na limpeza de vidraria.

O material foi lavado inicialmente com água da torneira e extran neutro, água destilada quente e extran. Após, foi realizado o enxágüe com água deionizada e Milli-Q, esta última obtida em sistema dotado de cartucho para remoção de compostos orgânicos, sendo na seqüência o material enxaguado com acetona grau pesticida.

Após este procedimento, o material foi lavado 3 vezes com pequenas frações de diclorometano, 3 vezes com hexano para análise de resíduos e colocado no forno por 2 a 3 horas na temperatura de 400°C. Após foi resfriado dentro do forno, retirado e coberto imediatamente com papel laminado e guardado ao abrigo de poeiras e fumos. Antes do uso deste material, foram passadas algumas frações de hexano no mesmo. Este solvente foi concentrado e analisado cromatograficamente para garantia da inexistência de contaminantes. No item resultados são apresentados alguns espectrogramas destes ensaios.

Os cartuchos de papel usados para conter as cinzas no extrator Soxhlet e os filtros para lavagem das cinzas foram extraídos previamente com DCM em Soxhlet por 24 horas ou alternativamente em ultra-som com 4 ciclos de 45 minutos com o mesmo solvente.

4.4 PREPARO DO BRANCO

O branco de cinzas utilizado neste trabalho foi preparado pela extração de uma amostra de cinzas originária da incineração de madeira, obtida junto ao incinerador do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. As cinzas leves (*fly ash*) foram extraídas por duas vezes com tolueno em Soxhlet, por 24 horas e analisados.

Após a extração das cinzas, como descrito acima, foram pesados 100 gramas da mesma em um frasco âmbar, adicionado hexano de forma a ultrapassar o nível das cinzas e adicionados 100 µL da solução de reforço (descritas a seguir), na mistura de hexano e cinzas. A mistura foi agitada cuidadosamente para garantir uma correta homogeneização das cinzas,

hexano e PCDD/Fs, e deixada, com papel laminado protegendo o bocal do frasco, na estufa a 40°C por 24 horas para evaporar o hexano e restar as cinzas contaminadas com PCDD/Fs.

4.5 CURVAS DE CALIBRAÇÃO

As concentrações das soluções das PCDD/Fs, descritas na tabela VIII, foram utilizadas para a obtenção das curvas de calibração usadas na quantificação dos analitos (PCDD/Fs). A calibração foi realizada pela injeção de 1 µL de cada solução, usando injeção sanduíche (1 µL ar + 1 µL amostra). No total foram construídas dez curvas relativas aos compostos assinalados em negrito na tabela VIII.

Tabela VIII. Concentrações das soluções de calibração e R² das curvas de calibração.

Nome do composto	concentração (ng µL ⁻¹)					R ²
	CAL 1	CAL 2	CAL 3	CAL 4	CAL 5	
2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD)	0,1	0,25	0,5	1	2	0,9966
1,2,3,7,8-pentaclorodibenzo-p-dioxina (PCDD)	0,1	0,25	0,5	1	2	0,9985
1,2,3,4,7,8-hexaclorodibenzo-p-dioxina	-	-	1,25	-	-	
1,2,3,6,7,8-hexaclorodibenzo-p-dioxina (HxCDD)	0,25	0,625	1,25	2,5	5	0,9992
1,2,3,7,8,9-hexaclorodibenzo-p-dioxina	-	-	1,25	-	-	
1,2,3,4,6,7,8-heptaclorodibenzo-p-dioxina (HpCDD)	0,25	0,625	1,25	2,5	5	0,9985
octaclorodibenzo-p-dioxina (OCDD)	0,5	1,25	2,5	5	10	0,9859
2,3,7,8-tetraclorodibenzofurano (TCDF)	0,1	0,25	0,5	1	2	0,9983
1,2,3,7,8-pentaclorodibenzofurano (PCDF)	0,1	0,25	0,5	1	2	0,9961
2,3,4,7,8-pentaclorodibenzofurano	-	-	0,5	-	-	
1,2,3,6,7,8-hexaclorodibenzofurano (HxCDF)	0,25	0,625	1,25	2,5	5	0,9978
2,3,4,6,7,8-hexaclorodibenzofurano	-	-	1,25	-	-	
1,2,3,4,7,8-hexaclorodibenzofurano	-	-	1,25	-	-	
1,2,3,7,8,9-hexaclorodibenzofurano	-	-	1,25	-	-	
1,2,3,4,6,7,8-heptaclorodibenzofurano (HpCDF)	0,25	0,625	1,25	2,5	5	0,9947
1,2,3,4,7,8,9-heptaclorodibenzofurano	-	-	1,25	-	-	
octaclorodibenzofurano (OCDF)	0,5	1,25	2,5	5	10	0,9762
1,2,3,4-tetraclorodibenzo-p-dioxina- ¹³ C ₁₂ (¹³ C ₁₂ TCDD)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	
2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina- ¹³ C ₁₂	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	
2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina- ³⁷ Cl ₃₄	-	-	0,25	-	-	
1,2,3,7,8,9-hexaclorodibenzo-p-dioxina- ¹³ C ₁₂	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	
1,2,3,6,7,8-hexaclorodibenzo-p-dioxina- ¹³ C ₁₂	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	
octaclorodibenzo-p-dioxina- ¹³ C ₁₂ (¹³ C ₁₂ OCDD)	1	1	1	1	1	
2,3,7,8-tetraclorodibenzofurano- ¹³ C ₁₂ (¹³ C ₁₂ TCDF)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	
1,2,3,4,6,7,8-heptaclorodibenzofurano- ¹³ C ₁₂	1	1	1	1	1	

Solvente = nonano; CAL = solução de calibração

Os compostos não assinalados na tabela VIII foram usados para identificar o segmento (faixa de tempo) em que são eluídos os demais isômeros com substituintes nas posições 2,3,7,8, ou ainda para avaliações da resposta do MS. Na figura 6 é apresentada a curva do TCDD, onde são vistos quatro pontos, pois, o quinto ponto, de maior concentração, foi desconsiderado por sofrer efeito de discriminação no injetor.

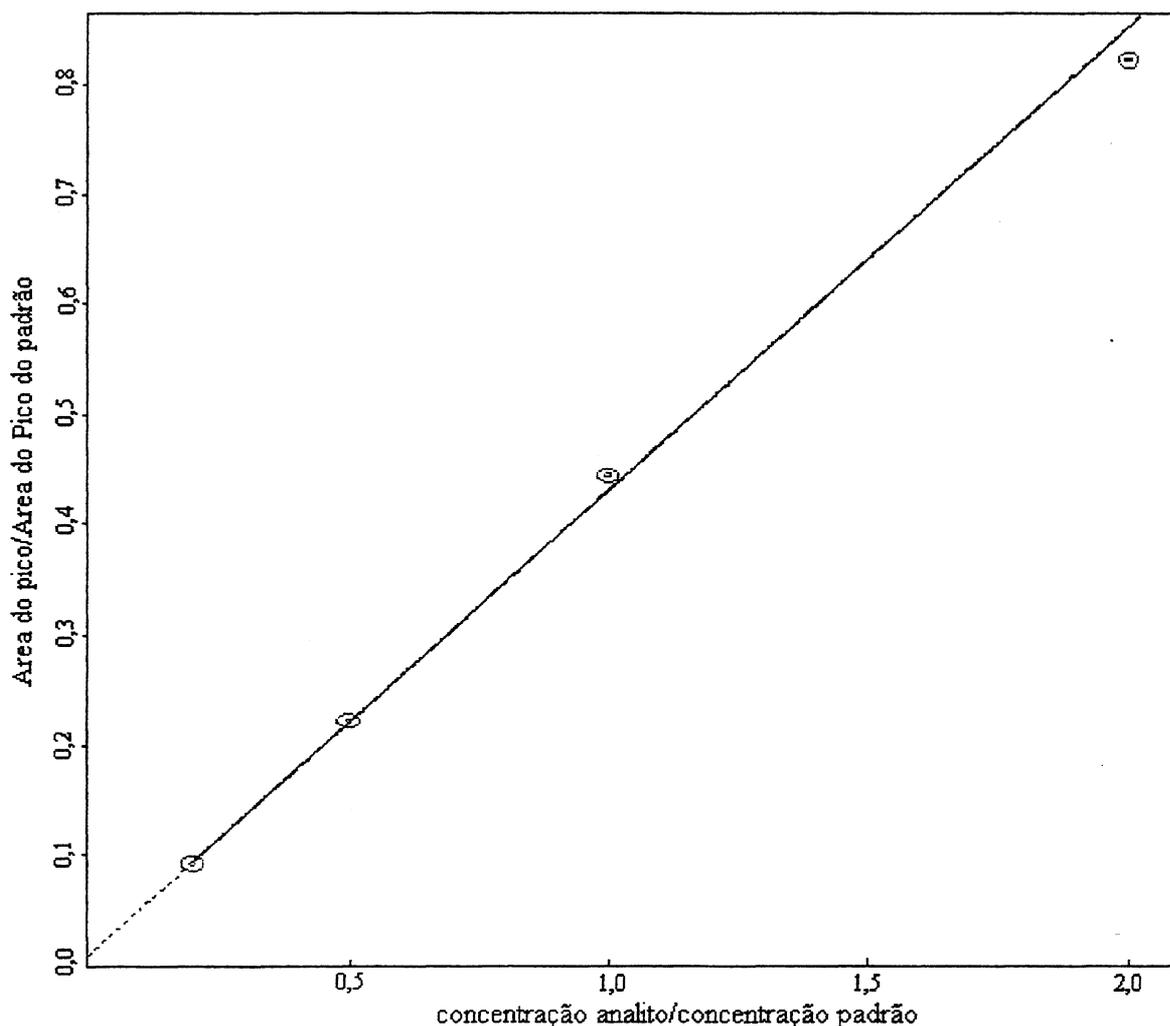


Figura 6. Curva de calibração do TCDD, obtida pela injeção de 1 μL das soluções descritas na tabela VIII como Cal 1, 2, 3 e 4, $R^2_{\text{TCDD}}=0,9966$. A solução Cal 5 foi desconsiderada por sofrer efeito de discriminação.

A solução de reforço (*spike solution*) adicionada ao branco tem as concentrações descritas na tabela IX.

Tabela IX. Concentração dos padrões de PCDD/Fs na solução de reforço adicionada ao branco.

Padrão de reforço	Conc. (ng μL^{-1})
2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD)	0,5
2,3,7,8-tetraclorodibenzofurano (TCDF)	0,5
1,2,3,7,8-pentaclorodibenzofurano (PCDF)	1,25
1,2,3,7,8-pentaclorodibenzo-p-dioxina (PCDD)	1,25
1,2,3,6,7,8-hexaclorodibenzofurano (HxCDF)	1,25
1,2,3,6,7,8-hexaclorodibenzo-p-dioxina (HxCDD)	1,25
1,2,3,4,6,7,8-heptaclorodibenzofurano (HpCDF)	1,25
1,2,3,4,6,7,8-heptaclorodibenzo-p-dioxina (HpCDD)	1,25
octaclorodibenzo-p-dioxina (OCDD)	2,5
octaclorodibenzofurano (OCDF)	2,5

A tabela X descreve as concentrações dos PIs adicionados ao extrato final de 10 μL imediatamente antes da injeção no CG.

Tabela X. Concentrações da solução de PIs das PCDD/Fs

Padrão Interno (PI)	Conc. (ng μL^{-1})
2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina- $^{13}\text{C}_{12}$	0,50
1,2,3,6,7,8-hexaclorodibenzo-p-dioxina- $^{13}\text{C}_{12}$	0,49
octaclorodibenzo-p-dioxina- $^{13}\text{C}_{12}$	0,96
2,3,7,8-tetraclorodibenzofurano- $^{13}\text{C}_{12}$	0,50
1,2,3,4,6,7,8-heptaclorodibenzofurano- $^{13}\text{C}_{12}$	0,98

4.6 PREPARO DA AMOSTRA E PROCEDIMENTOS DE EXTRAÇÃO

4.6.1 Preparo da amostra

A amostra é pesada (10 g de cinzas) em um Erlenmeyer, ao qual é adicionado 150 mL de HCl 1 M, e colocado sob agitação mecânica para uma digestão prévia. A mistura, cinza e HCl 1M, é agitada por três horas, e após é filtrada através de papel filtro ou membrana filtrante de 0,45 μm pré-extraídos⁵. A cinza e o papel são lavados com 500 mL de água deionizada para completa remoção do HCl, e deixados devidamente protegidos para secar em dessecador por uma noite

⁵ Papel pré-extraído: extraído nas condições de análise e testados para garantir a ausência de PCDD/Fs ou interferentes. Extraído por 3 x 50 minutos com DCM em ultra-som ou 16 horas com soxhlet.

4.6.2 Extração por Soxhlet

A extração empregada por Soxhlet seguiu o procedimento do método EPA 8280a. Cerca de 10 g de cinzas, lavadas conforme descrito anteriormente, foram colocadas em um cartucho de extração e extraídas por 16 horas, em extrator Soxhlet, com 200 mL de tolueno para análise de resíduos, com intensidade de aquecimento ajustada para permitir um ciclo de 15 minutos para cada enchimento do extrator.

4.6.3 Extração por ultra-som (US)

A extração empregando ultra-som foi realizada com o mesmo solvente do método de confronto (tolueno). Para uso do ultra-som foram realizados quatro ciclos de 45 minutos, em cartuchos de papel filtro previamente extraídos. O recipiente utilizado, com capacidade de 200 mL, para conter as cinzas (10 g) juntamente com o solvente de extração e o cartucho com as cinzas, foi confeccionado de Teflon®, para poder ser colocado dentro do ultra-som, sem conter interferentes e permitir a centrifugação das cinzas. As cinzas e o papel filtro usado na lavagem da mesma foi colocado juntamente no recipiente de Teflon®.

O volume de solvente obtido com os quatro ciclos de 45 min perfaz um total de aproximadamente 800-900 mL. Este foi concentrado a 10 μ L, chegando-se a um fator de concentração ao redor de 4 vezes superior àquele obtido ao concentrar os 200 mL da extração por Soxhlet até 10 μ L. Tal diferença pode ressaltar mais a presença de contaminantes oriundos do tolueno na extração ultra-som em relação ao Soxhlet. Na centrifugação das cinzas, empregou-se rotação de 4000 rpm por 30 minutos para sedimentar a cinzas e permitir a retirada do solvente em cada ciclo.

4.6.4 Disruptor celular (DC)

Na extração por disruptor celular foi empregado a mesma massa de cinzas (10 g), com o equipamento operando a 80 % da potência máxima. Foram realizados três ciclos de 4 minutos, mantendo o recipiente com as cinzas, papel filtro e o tolueno refrigerado com gelo. Isso faz-se necessário devido ao aquecimento que ocorre durante a sonicação pelo DC.

Empregou-se 150 mL de tolueno em cada ciclo, perfazendo um total de aproximadamente 450 mL que foi concentrado em evaporador rotativo até 2 mL.

4.6.5 Lavagem ácido-base

A lavagem ácido base visa eliminar interferentes, como pigmentos, lipídeos, proteínas e outros que podem ter sido co-extraídos e conferem cor ao extrato, através da reação com ácido sulfúrico. A partição ácido-base é assim descrita:

O extrato obtido com o uso de Soxhlet, US ou DC é transferido junto com as lavagens do balão que o continha, para um funil de separação de 125 mL ao qual é adicionado 50 mL de solução aquosa 5% de NaCl (m/v), e misturado por dois minutos, tendo muito cuidado para não perder a fase orgânica e ventilando-se sempre o funil, a fase aquosa é descartada. O extrato restante é particionado com ácido sulfúrico concentrado pela adição de 40 mL de H₂SO₄ ao funil de separação, e agitado cuidadosamente por dois minutos e desprezada a fase do ácido. Possivelmente o ácido irá aquecer a mistura tendendo a volatilizar o hexano, para minimizar isto auxilia o uso de ácido sulfúrico refrigerado. Repete-se o procedimento até que nenhuma cor seja visualizada na camada ácida. O extrato oriundo da extração é particionado com 40 mL de solução aquosa 5% de NaCl (m/v) e misturado por dois minutos, tendo muito cuidado para não perder a fase orgânica, e ventilando sempre o funil, a fase aquosa é descartada. Pode ser necessário adicionar hexano para não trabalhar com um volume muito pequeno. Particiona-se o extrato com 40 mL de solução 20 % de KOH (m/v) e se agita por dois minutos, descartando a camada básica. Repete-se o procedimento até que nenhuma cor seja visualizada na camada básica, evitando contatos prolongados com o hidróxido, pois este pode degradar parte das PCDD/Fs. Novamente o extrato é particionado com 40 mL de solução aquosa 5% de NaCl (m/v), misturando bem por dois minutos tendo muito cuidado para não perder a fase orgânica, ventilando sempre o funil, e finalmente desprezando-se a fase aquosa. Passa-se este extrato por um funil contendo sulfato de sódio e lã de vidro, lavando-o com duas porções de 15 ml de hexano, bem como as lavagens do frasco que continha o extrato da última partição também devem ser passados através do sulfato. O extrato seco pelo sulfato é concentrado até próximo da secura no evaporador rotativo a 35°C. Transfere-se o extrato, e as lavagens do recipiente que o continha, para um frasco de vidro âmbar de 5 mL e

tampa rosqueável com batoque de Teflon®. Este concentrado, após a partição, será denominado EP (extrato particionado).

4.7 ELIMINAÇÃO DE INTERFERENTES

A eliminação de interferentes foi realizada através de cromatografia líquida em coluna, empregando sílica gel, alumina, sulfato de sódio e carbono ativado/celite. Os adsorventes foram preparados como descrito a seguir.

4.7.1 Preparo e especificações dos adsorventes empregados na cromatografia líquida preparativa. (*adaptado de EPA 8280 E 8290*)

Sílica gel ativada: A sílica foi ativada antes do uso por 24 horas a 190°C, em estufa, e acondicionada em frasco com batoque de Teflon® na tampa. Sílica gel alto grau de pureza, tipo 60, com granulometria de 70-230 mesh. Pré-extraída em Soxhlet, com DCM grau pesticida por 24 horas. Os brancos foram testados e quando apareceram interferentes as sílicas foram reextraídas.

Sílica-gel impregnada com NaOH: 1 parte de NaOH 1M para 2 partes de sílica gel ativada (m/m). A sílica e o hidróxido foram misturados até não haver grumos, e acondicionados em frasco com tampa rosqueável e batoque de Teflon®.

Sílica-gel impregnada com 40 % de ácido sulfúrico: 2 partes de H₂SO₄ concentrado para 3 partes de sílica gel ativada (m/m). A sílica e o ácido foram misturados até não haver grumos, e acondicionados em frasco com tampa rosqueável e batoque de Teflon®.

Alumina neutra: Alumina, neutra com granulometria de 80-200 mesh, estocada em frasco selado ou em dessecador a temperatura ambiente.

Carbono ativado: O carbono foi lavado com metanol, seco a vácuo (110°C) e acondicionado em frasco com batoque de Teflon® na tampa.

Celite: a Celite 545® não necessitou de nenhum procedimento especial.

Coluna de carbono: O adsorvente desta coluna foi preparado pela mistura de 9 g de carbono ativado, como descrito acima, e 41 g de celite 545, para produzir 18% de carbono em celite (p/p). A mistura foi ativada a 130°C por 6 horas e acondicionada em frasco com tampa rosqueável e batoque de Teflon®, e armazenada em dessecador. A coluna foi empacotada com 1 grama da mistura acima, com chumaços de lã de vidro pré-extraída nas extremidades.

Coluna de florisil: 6 g de Florisil de 150 a 250 µm ativado por 24 horas a 450°C.

4.7.2 Cromatografia preparativa – eliminação de interferentes - eluição

A seguir estão descritos os procedimentos empregados na cromatografia líquida (CL) preparativa para o processo de limpeza da amostra (eliminação de interferentes). É descrita a preparação das colunas e o protocolo da CL empregada nos métodos EPA referidos. As colunas usadas foram de vidro com 30 cm × 1,3 cm de diâmetro, empacotadas como descrito na figura 7. A coluna de Florisil® empregada teve as mesmas dimensões anteriores e a de carbono foi confeccionada pelo corte das extremidades de uma pipeta graduada de 10 mL. Na figura 7 são mostradas as colunas empregadas no *clean up* sugeridas no método EPA8280.

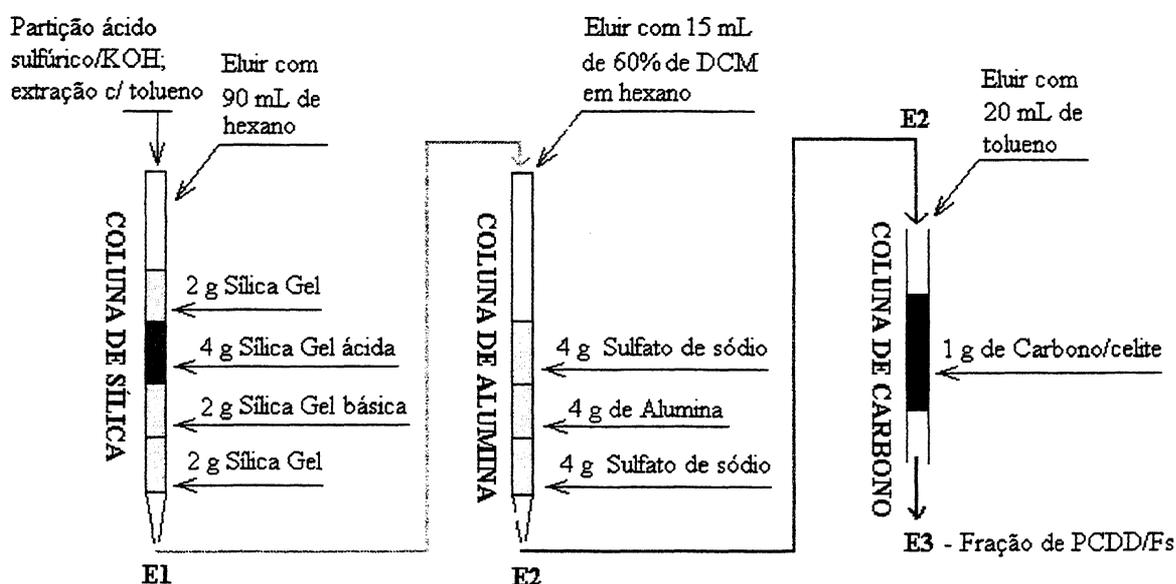


Figura 7. Esquema das eluições, adsorventes, quantidades e seqüência de empacotamento empregado nos extratos obtido por SOX, DC e US.

Coluna de sílica

A coluna foi, imediatamente antes do uso, eluída com 10 mL de hexano, que foi descartado. Com auxílio de pipeta Pasteur transferiu-se o volume total de EP, e lavagens, para o topo da coluna de sílica, lavando-se de 2 a 3 vezes as paredes do recipiente com tolueno (ou hexano). Adicionados o extrato e as lavagens, iniciou-se a eluição com 90 mL de hexano (grau pesticida) que foram recolhidos em um balão apropriado para ER de 125-250 mL, esta fração foi denominada eluído 1 (E1). O E1 então foi concentrado no ER até 2 a 3 mL e transferido para um recipiente de vidro com 5 a 10 mL de capacidade, e concentrado em corrente de nitrogênio até 2 mL. Este concentrado, denominado E1, foi eluído na coluna de alumina, como segue.

Coluna de alumina

Imediatamente antes do uso, a coluna de alumina foi eluída com 10 mL de hexano que foi desprezado. O E1, concentrado foi adicionado ao topo da coluna de alumina, junto com as lavagens do frasco que o continha, e eluído com 20 mL de hexano, sendo coletado e armazenado em um recipiente separado para monitorar uma eventual perda de analitos e/ou recuperações inadequadas. Foi então eluído o extrato E1 com 15 mL de 60 % de DCM em hexano (v/v), na coluna de alumina e coletado em frasco de vidro com tampa rosqueável e batoque de Teflon®. Esta última fração foi concentrada cuidadosamente no ER e, finalmente, em corrente de nitrogênio até o volume de 2 mL. O extrato eluído desta coluna foi denominado de E2.

Coluna de carbono

O eluído identificado como E2 passou através da coluna de carbono/celite, primeiramente, porém, esta foi lavada com a seguinte seqüência de solventes, imediatamente antes da eluição de E2: 4 mL de tolueno; 2 mL de DCM/MeOH/tolueno (75:20:5 v/v); 4 mL de ciclohexano/DCM (50:50 v/v), tendo-se o cuidado para que o fluxo não ultrapassasse 0,5 mL/min. Estas frações foram descartadas. Enquanto a coluna ainda estava umedecida, E2 foi transferido para a coluna de carbono e eluído com os seguintes solventes: 10 mL de ciclohexano/DCM (50:50 v/v); 5 mL de DCM/MeOH/tolueno (75:20:5 v/v). Armazenou-se

este eluato para avaliar a eficiência da coluna em uma eventual baixa recuperação dos analitos. A última etapa é a eluição das dioxinas, o que foi feito virando-se a coluna e fracionando-a com 20 mL de tolueno. Nesta fração são eluídas as dioxinas e furanos, pois devido ao alto valor de $\log K_{oc}$ aderem-se fortemente ao topo da coluna, sendo necessário inverter a coluna para conseguir eluí-las. Quando o eluato apresentou partículas finas de carbono, o mesmo foi filtrado em filtro de 0,7 μm pré-extraído. O eluato foi denominado de E3 e concentrado em ER até 1-2 mL, sendo transferido para um frasco de 1 mL de fundo cônico e concentrado até 100 μL .

Coluna de Florisil

Em substituição às colunas de sílica de alumina e de carbono pode ser empregado, como adsorvente, o Florisil®, tendo possivelmente a mesma função que tais colunas. No trabalho de Ramos *et. al* [57] ressalva-se que o uso destes adsorventes pode não ser adequado para todas as cinzas leves em função da variabilidade de compostos presentes nos rejeitos incineráveis, o que varia o tipo de interferente presente nestas cinzas. Em outras palavras, o Florisil® deve ser testado para a matriz em questão. Ao topo da coluna é adicionado EP em conjunto com as lavagens do frasco que o continha, eluindo-se, então, com 150 mL de n-hexano e 250 mL de DCM. Os extratos são unificados, e concentrados à 10 μL e analisados por CG/MS/MS.

Os extratos oriundos do processo de *clean up* foram concentrados até 1 ou 2 mL em corrente de nitrogênio e transferidos para um mini frasco de fundo cônico. Este foi então concentrado até a secura e retomado ao volume de 10 μL com a mistura de PI, tendo o cuidado de lavar as paredes do frasco com a solução de PIs para remover analitos que possam ter ficado aderidos na paredes do vidro.

4.8 ANÁLISE DE DIOXINAS POR CG/MS/MS

A análise cromatográfica seguiu a técnica de LRMS/MS proposta por Almasi - VARIAN *Chromatography Systems*, conforme descrito a seguir. Algumas condições cromatográficas empregadas para análise de PCDD/Fs por LRMS/MS estão descritas na tabela XI.

Tabela XI. Parâmetros cromatográficos usados na análise de PCDD/Fs por LR MS/MS.

Coluna	CPSIL - 8 MS (30m × 0,25mm × 0,25 μm)
Gás carregador	Hélio
Pressão na cabeça da coluna	18psi
Injetor	290°C (modo <i>splitless</i>)
Quantidade injetada	1,0 μL
Programação de temperatura do forno	60°C (3min) 25°C/min até 235°C (10min) 10°C/min até 275°C (3min) 10°C/min até 310°C (1min)
Temperatura do <i>trap</i>	220°C
Temperatura do <i>manifold</i>	40°C
Temperatura da linha de transferência	270°C

Os íons pai e os íons filhos utilizados no modo MS/MS, para identificação e quantificação, estão descritos na tabela XII.

Tabela XII– m/z dos íons pai e íons filhos usados no modo MS/MS

Composto	Íon Pai	Íons Filho
TCDF	307,90 (M+4)	243/245
${}^6\text{C}^{13}$ -TCDF	317,94 (M+2)	252/254
${}^6\text{C}^{13}$ -TCDD	333,93 (M+2)	268/270
TCDD	323,89 (M+4)	259/261
PCDF	341,86 (M+4)	277/279
PCDD	357,85 (M+4)	293/295
HxCDF	375,82 (M+4)	311/313
HxCDD	391,81 (M+4)	327/329
${}^6\text{C}^{13}$ -HxCDD	401,86 (M+2)	336/338
HpCDF	409,78 (M+4)	345/347
HpCDD	425,77 (M+4)	361/363
${}^6\text{C}^{13}$ -HpCDF	419,82 (M+2)	354/356
OcDD	459,73 (M+4)	395/397
OcDF	455,74 (M+6)	381/383
${}^6\text{C}^{13}$ -OcDD	471,78 (M+4)	406/408

4.9 ANÁLISE DE PCDD/FS

Os extratos foram analisados nas condições cromatográficas descritas anteriormente pela injeção de 1 μL do mesmo, empregando a técnica de injeção “sanduíche”. Esta técnica consiste em succionar ar com a seringa, succionar o volume do líquido em questão, e novamente ar. Este procedimento permite uma maior exatidão na leitura do volume injetado, além de consumir menor quantidade de líquido, sendo esta última característica fundamental para a escolha da adoção desta técnica, uma vez que ao final da análise o volume de extrato disponível é de 10 μL .

ANÁLISE DOS DADOS

5. ANÁLISE DOS DADOS

5.1 MÉTODOS E ALTERNATIVAS AVALIADOS

A análise de PCDD/Fs oferece algumas alternativas em termos de *clean up*, de extração e detectores usados na identificação e quantificação. Assim, a partir das alternativas encontradas na literatura [6,24,25,30,35,36,37-42,50-52,60], e dos equipamentos disponíveis optou-se por avaliar as potencialidades e limitações de alguns destes procedimentos. Considerando que os métodos mais citados e estudados são os da USEPA e o fato da referida agência ser considerada como referência em métodos analíticos, o método de confronto escolhido foi o método EPA 8280a. Esta técnica usa detector do tipo LRMS, *clean up* em colunas de sílica, alumina e carbono/celite, sendo, ao término da preparação da amostra, o extrato concentrado à 100 μL . Na figura 8, é mostrado o referido método de forma esquemática, e as alternativas existentes na literatura escolhidas para avaliação neste trabalho.

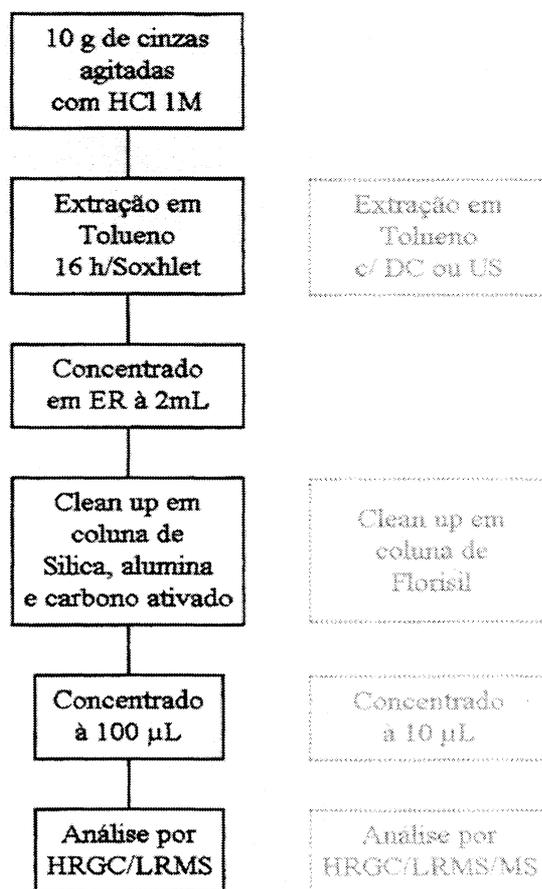


Figura 8. Esquema do método 8280a e as alternativas em termos de extração, adsorventes da cromatografia preparativa, volume final e tipo de detector.

As alternativas em questão são referentes ao tipo de extração, ao tipo de adsorventes usados na cromatografia preparativa, ao volume final e ao tipo de detector. Para extração foi testado o uso de ultra-som (sonicação), através de US do tipo usado para limpeza de material e US de sonda, o disruptor celular (DC). Já, com respeito aos sorbentes, foi considerado o uso de Florisil®. O volume final, de 100 µL, teve como alternativa um volume menor, de 10 µL. O detector usado foi de baixa resolução, como no método 8280a, mas, no modo MS/MS.

As alternativas referentes a forma de extração e uso do Florisil® permitem a comparação entre os dados obtidos neste estudo, já a concentração a um volume final de 10 µL e LRMS/MS versus LRMS só puderam ser comparadas aos dados da literatura, pois não foi avaliado o uso de LRMS convencional (tipo quadrupolo) para análise de PCDD/Fs.

5.2 CONTROLE DOS MATERIAIS E REAGENTES

O procedimento de análise inclui a concentração de 200 a 800 mL do solvente extrator a um volume final de 0,010 mL (10 µL), fornecendo reduções de volume de 20.000 a 80.000 vezes. Assim, um aspecto importante da análise é a limpeza do material e a isenção de interferentes nos solventes utilizados. Por esta razão, o critério adotado para determinar a melhor condição de preparo dos brancos de cinzas, de forma a não conter interferentes, foi definido como a inexistência de picos durante a corrida cromatográfica, na faixa de tempo de retenção das PCDD/Fs. O mesmo foi adotado para avaliar a limpeza de alguns materiais.

5.2.1 Critérios para controle dos materiais e reagentes

Todos os solventes empregados foram de grau pesticida. No entanto, para maior garantia da isenção de interferentes, alíquotas destes solventes foram retiradas e concentradas duzentas vezes em evaporador rotativo (ER), e posteriormente em corrente de nitrogênio a um volume de 10 µL. Os solventes concentrados foram avaliados nas condições de análise, descritas anteriormente, não apresentando interferentes nos tempos de retenção das PCDD/Fs.

Para a identificação dos tempos de retenção das PCDD/Fs foi injetado 1µL da solução descrita na tabela VIII denominada de CAL3 e avaliados os tempos de retenção onde são eluídos os congêneros de interesse com mesmo número de cloros como substituintes. Na figura 9 é apresentado o espectrograma desta solução, onde são identificados os tempos de

retenção dos diferentes congêneros, e dos seus PIs. O índice “n” simboliza nativo⁶ e o índice “m” isotopicamente marcada. Os tempos de retenção foram empregados para determinar os segmentos de 1 a 10 das PCDD/Fs. Os segmentos são faixas de tempo onde determinados congêneros, com o mesmo índice de cloração, eluem juntamente com seus PIs.

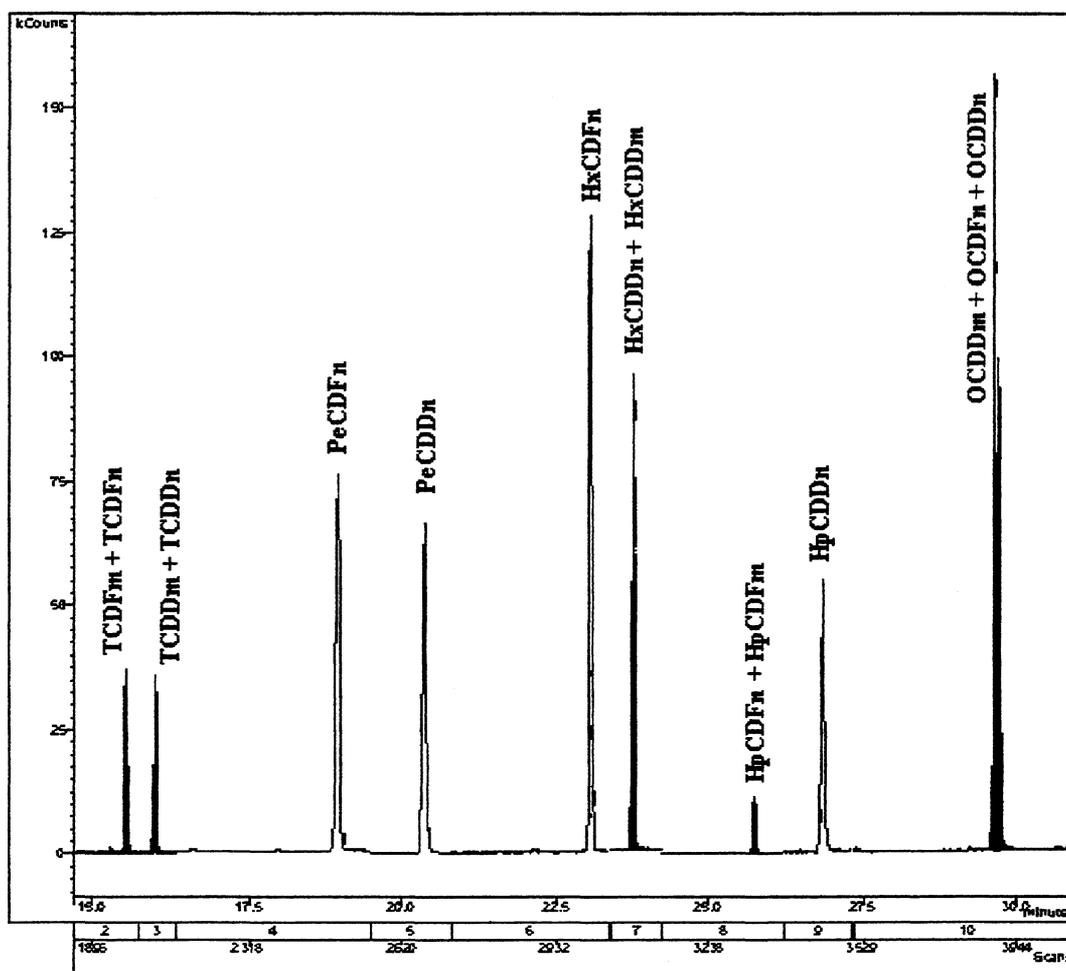


Figura 9. Espectrograma da contagem total de íons da solução de PCDD/Fs CAL3; n=nativo, m=marcada.

No espectrograma da figura 9 observa-se a co-eluição dos analitos com seus PIs. No entanto, selecionando-se, por intermédio do software do SATURN 2000, os íons filhos descritos na tabela XII é possível eliminar a influência de íons co-eluídos nas áreas integradas de cada PCDD/Fs, o que é melhor demonstrado na figura 10, onde o espectrograma da figura 9 é avaliado para os íons filhos da TCDFn e da ¹²C₁₃-TCDFm, com $m/z=243+245$ e $m/z=252+254$, respectivamente. O segmento 1, ocultado em alguns espectrogramas, é do solvente. Na tabela XIII são mostrados os segmentos e os tempos de retenção.

⁶ Nativas são as PCDD/Fs geradas pelas fontes poluidoras, como descrito em EPA 1613.

Tabela XIII. Segmentos, tempos de retenção dos congêneros das PCDD/Fs.

Congêneros	Faixa de tempo de Retenção	Segmento
Solvente	0,00 – 7,20	1
TCDFs	7,20 – 15,75	2
TCDDs	15,75 – 16,35	3
PeCDFs	16,35 – 19,50	4
PeCDDs	19,50 – 20,80	5
HxCDFs	20,80 – 23,40	6
HxCDDs	23,40 – 24,25	7
HpCDFs	24,25 – 26,25	8
HpCDDs	26,25 – 27,35	9
OCDD/Fs	27,35 – 31,00	10

Assim, todos os congêneros de interesse das PCDD/Fs com igual índice de substituição eluem em um mesmo segmento. Por exemplo, no segmento 6 eluem os congêneros 1,2,3,6,7,8-HxCDF, 2,3,4,6,7,8- HxCDF, 1,2,3,4,7,8- HxCDF e 1,2,3,7,8,9-HxCDF. Já no segmento 10 eluem a OCDD₆C¹³ e os congêneros nativos OCDD e OCDF.

Têm-se, na figura 10 a avaliação, através do software do equipamento, apenas os íons de $m/z = 243+245$ e $252+254$, característicos da TCDFn e da TCDFm respectivamente, da mesma solução de padrões demonstrada na figura 9.

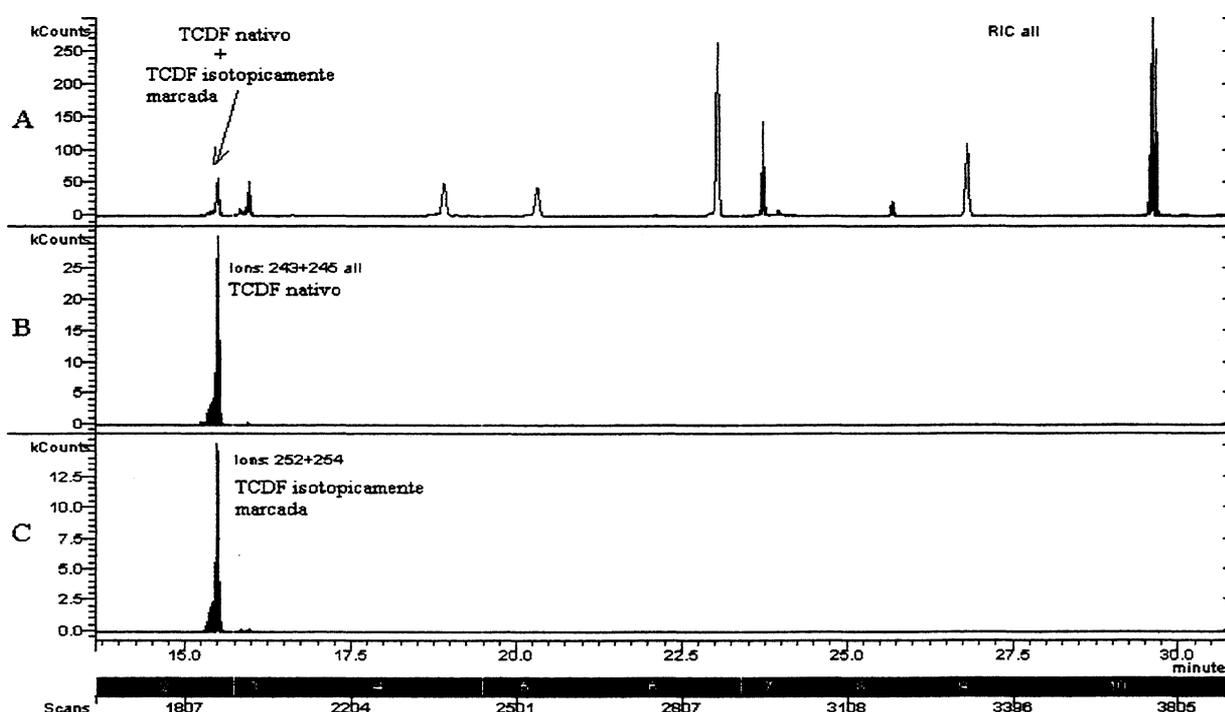
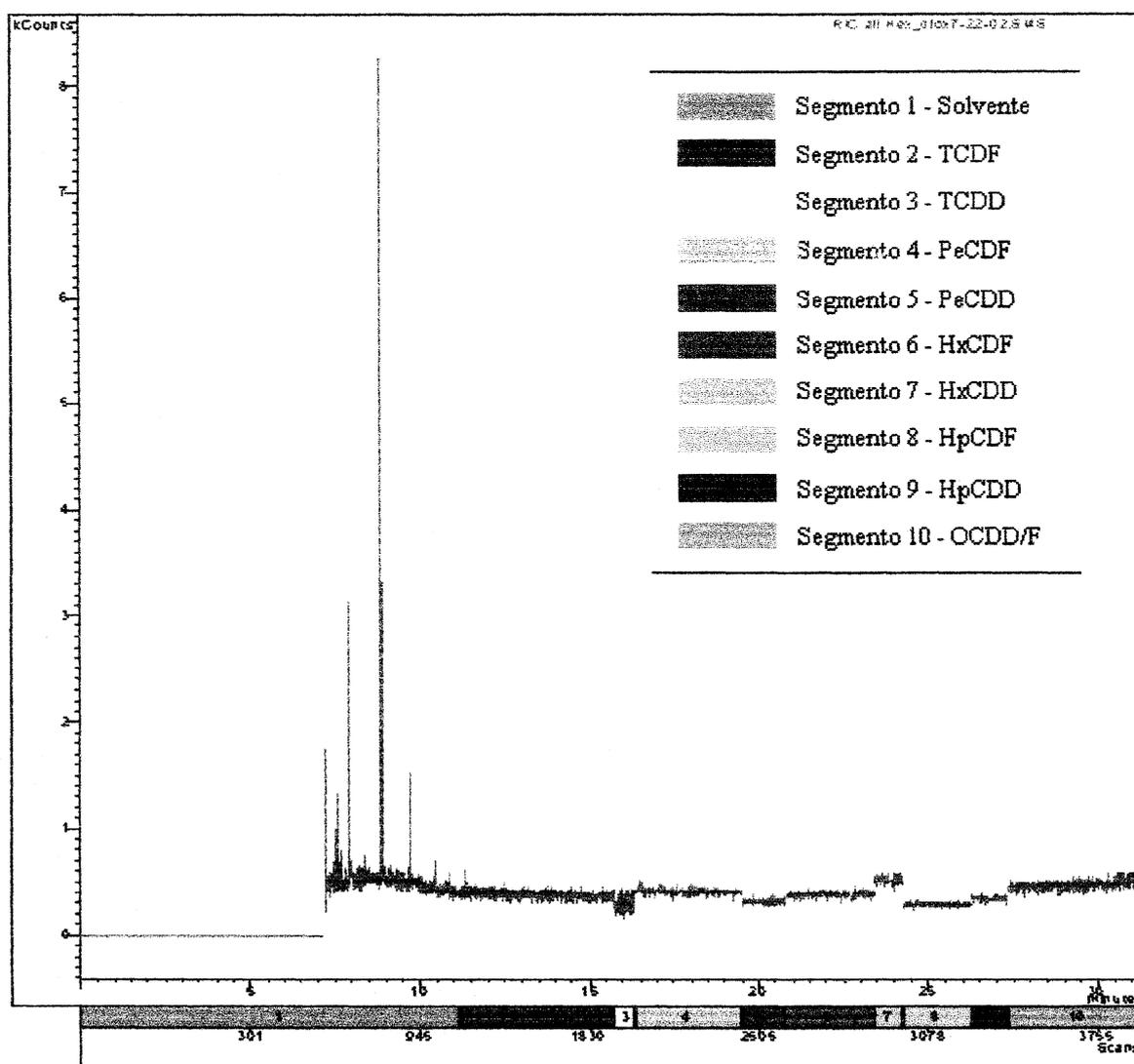


Figura 10. Espectrograma da contagem total de íons (A) e dos íons $m/z = 243+245$ (B) e $252+254$ (C).

Na figura 10 observa-se que os picos assinalados no espectrograma A, como TCDF nativo + TCDF isotopicamente marcado, podem ter tais analitos separados através do monitoramento de íons filhos característicos. Tal procedimento fornece picos com áreas de integração independentes, e que são mostrados nos espectrogramas B e C ($m/z = 243+245$) e ($252+254$), respectivamente.

Adotando este sistema, os extratos da lavagem de vidraria e da concentração de solventes foram testados cromatograficamente, para identificar a presença de algum composto nos segmentos dos analitos, sendo considerado como pico a razão sinal/ruído de 3.

Assim, toda vidraria, extrator Soxhlet, béqueres, balões, frascos de amostra, copos de ultra-som, etc. foram lavados com solvente antes das análises e avaliados cromatograficamente. A figura 11 é de um espectrograma típico de extrato de lavagem da vidraria.



No espectrograma da figura 11 são assinaladas as faixas de tempo de retenção referentes aos congêneros de interesse, denominados de segmentos e definidos na tabela XII. De acordo com este espectrograma há picos somente até 10 min da corrida, isto é, antes do tempo de retenção das PCDD/Fs, indicando pouca interferência para a análise. O espectrograma está em ampliação máxima com o intuito de facilitar a visualização de picos de menor intensidade, e por esta razão a linha base pode aparentar uma possível presença de um grande ruído, sendo, porém apenas o efeito de ampliação do espectrograma.

Após a lavagem, obedecendo à seqüência descrita em 4.3, os solventes foram concentrados 20.000 vezes e coletados em um único extrato. Na figura 12 é mostrado o espectrograma do extrato da lavagem de sistemas Soxhlet e de frascos de US.

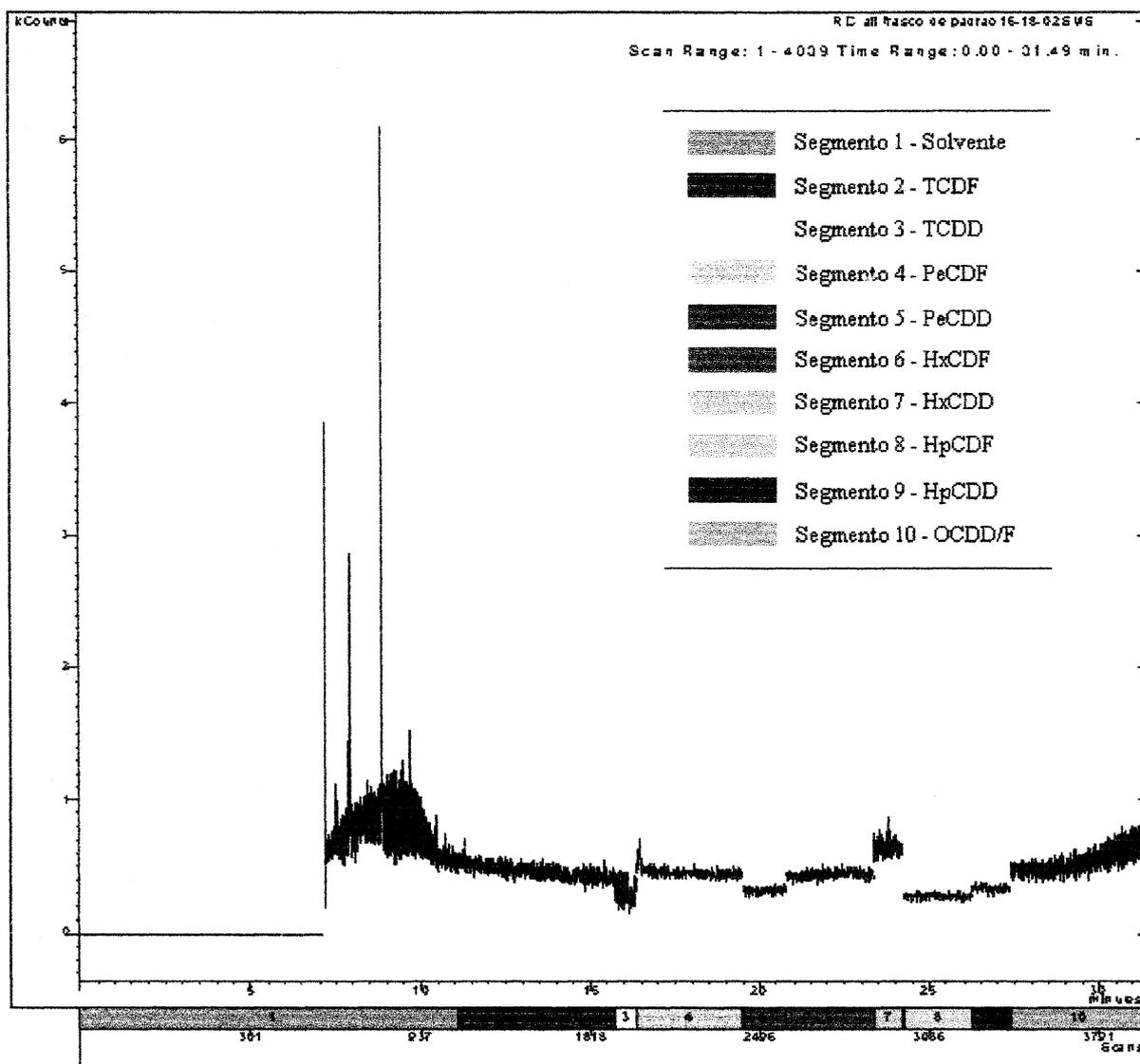


Figura 12. Espectrograma da lavagem de extratores Soxhlet e frascos de US.

Na figura 12 são observados alguns picos até 10 a 12 minutos do espectrograma. No entanto, para os segmentos onde são eluídos as PCDD/Fs não há relação sinal ruído que indique a presença de interferentes, na forma de picos cromatográficos.

Na figura 13 é apresentado um espectrograma obtido do extrato do solvente de lavagem da vidraria momentos antes do uso da mesma.

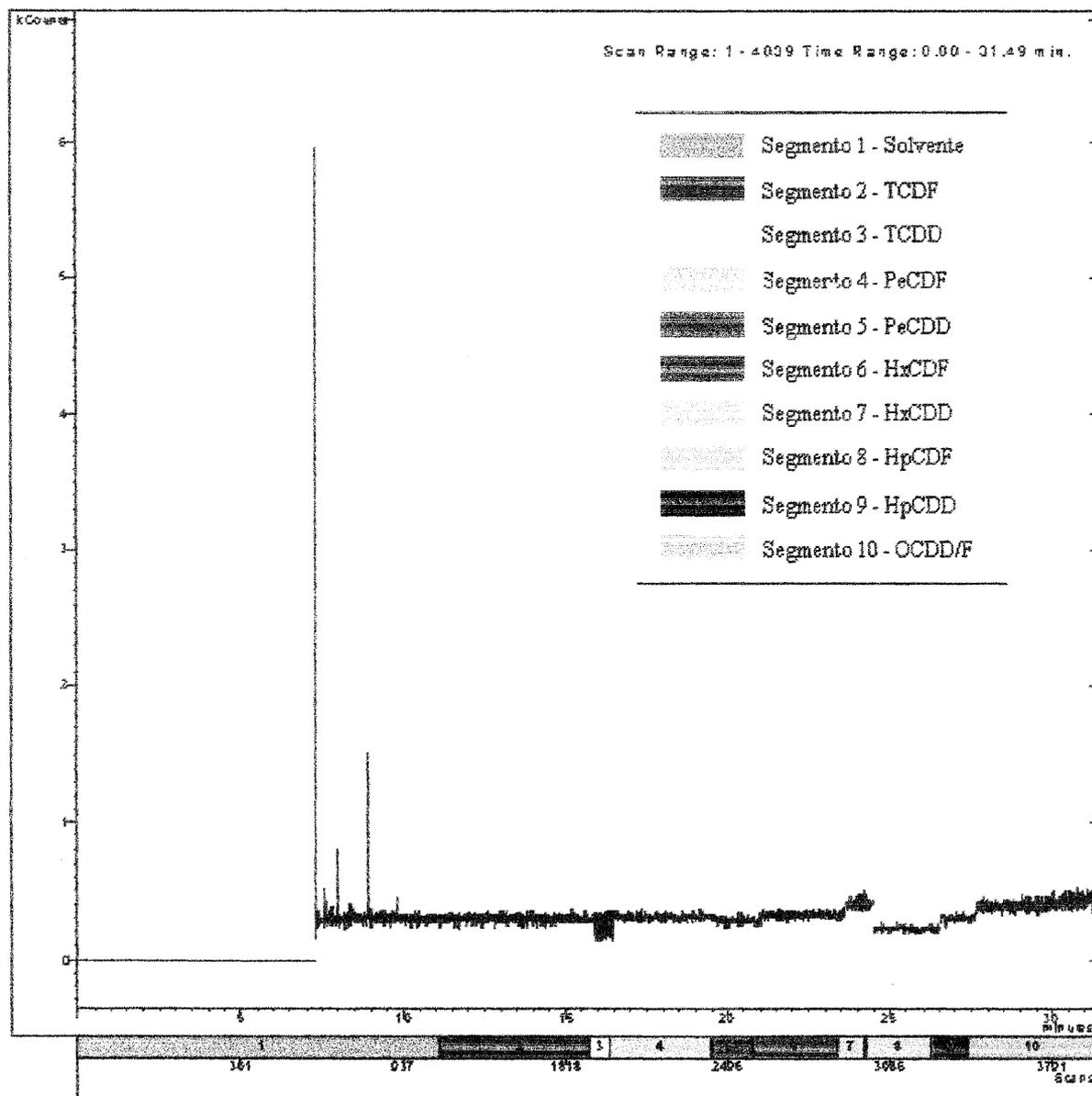


Figura 13. Espectrograma do solvente recolhido antes do uso da vidraria utilizada na análise.

Neste espectrograma pode ser observado comportamento similar ao descrito para os extratos de lavagem dos extratores e frascos de US anteriormente.

Os cartuchos de papel usados para conter as cinzas no Soxhlet, assim como os filtros para lavagem das cinzas foram extraídos previamente com DCM em Soxhlet ou, alternativamente, em ultra-som. Porém, foi necessário identificar a condição para a limpeza com US que equivalesse ao Soxhlet. Assim, foram realizados testes, em diferentes condições, para limpeza do papel filtro. Na tabela XIV, são apresentados os números de picos encontrados, nos segmentos com tempos de 10 a 32 min, dos espectrogramas de extratos da lavagem do material citado. Também são informados os tempos de extração utilizados e o processo de extração. Esta avaliação foi conduzida tendo o DCM como solvente extrator.

Tabela XIV. Número de picos nos espectrogramas de lavagem do papel usado na confecção dos cartuchos de extração frente aos tempos de extração, usando DCM como solvente.

Processo de lavagem / tempo (ciclos)	Número de picos
Soxhlet – 16 horas	8
Soxhlet – 24 horas	1
Ultra-som – 3 Ciclos de 45 minutos	7
Ultra-som – 4 Ciclos de 45 minutos	1

Os melhores resultados foram obtidos com DCM em Soxhlet (24 horas) ou US (4 ciclos de 45 minutos). Tempos menores, no Soxhlet ou US, foram insuficientes para retirar os interferentes do papel utilizado.

5.3 PREPARO DO BRANCO

O branco das cinzas utilizado neste trabalho foi preparado pela lavagem de uma amostra de cinzas originária da incineração de madeira junto ao incinerador do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

O preparo do branco foi conduzido de forma similar ao preparo adotado por *Naikwadi e Karasek* [27], onde as cinzas foram previamente extraídas para a retirada de possíveis PCDD/Fs e posteriormente contaminadas com os analitos de interesse. As cinzas leves (*fly ash*) foram extraídas duas vezes com tolueno em Soxhlet, por um período de 24 horas. O extrato resultante foi analisado cromatograficamente nas condições descritas nos itens 4.8 e 4.9.

Os espectrogramas obtidos para a primeira e segunda extração são apresentados nas figuras 14 e 15 respectivamente. O pico do segmento 4 da figura 14, assinalado com um círculo vermelho, apresentou relação sinal/ruído menor que 3. Por esta razão não foi considerado como um pico quantificável.

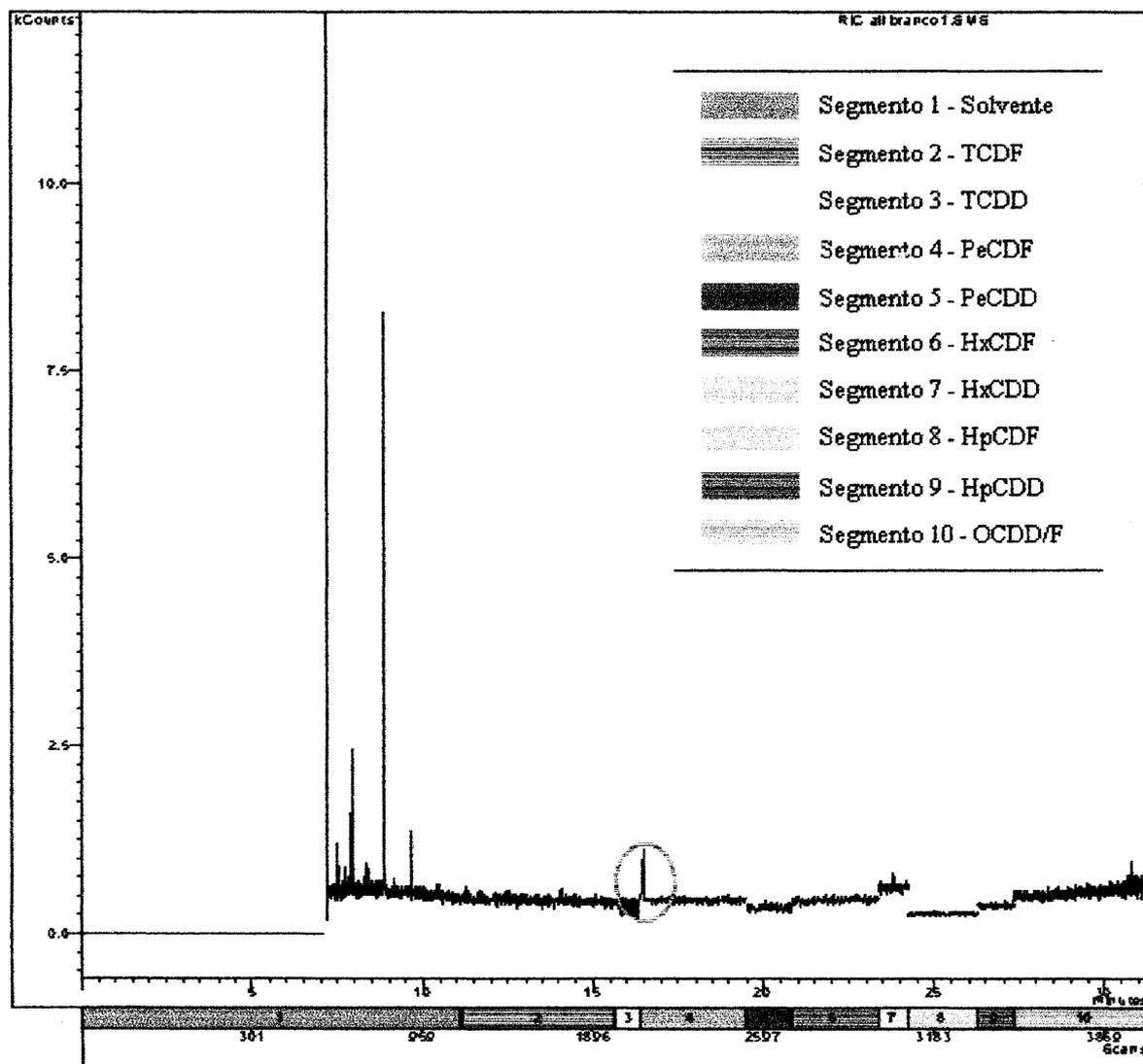


Figura 14. Contagem total de íons da primeira extração das cinzas para confecção do branco.

Além disso, mesmo estando dentro do segmento dos pentacloro dibenzofuranos (PeCDFs), o pico assinalado não coincidiu com o tempo de retenção de nenhum destes congêneros (PeCDFs). Pode ser inferido destes espectrogramas que a primeira extração já teria sido suficiente para extrair possíveis interferentes. No entanto, uma segunda extração foi realizada para garantia da remoção dos analitos da cinza (figura 15) uma vez que nesta cinza seriam adicionados os padrões de PCDD/Fs para posteriormente serem recuperados.

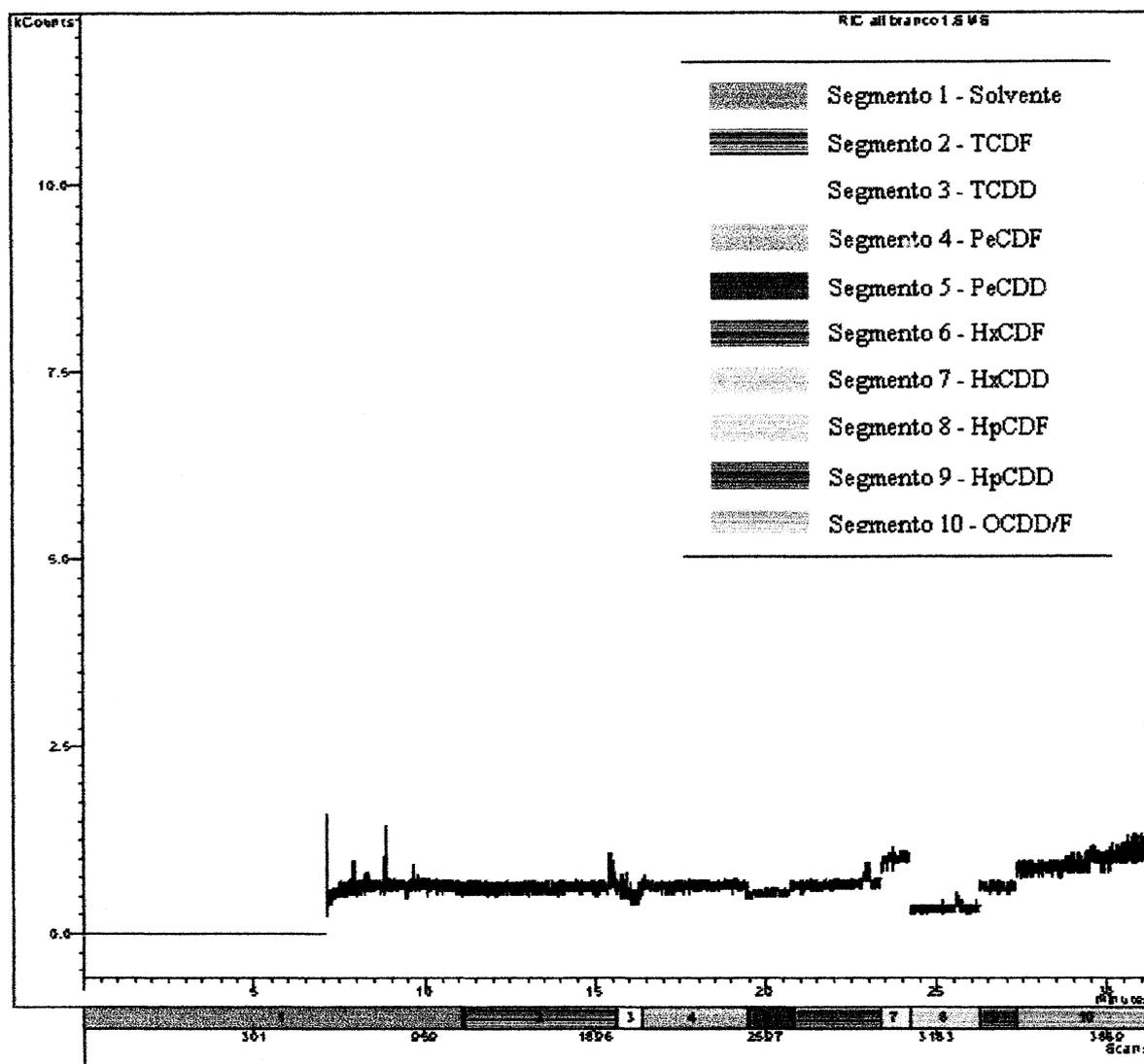


Figura 15. Espectrograma da segunda extração das cinzas para confecção do branco.

Assim como ocorreu na primeira extração, o extrato da segunda extração, das cinzas que foram usadas para preparo do branco, não apresentou picos cromatográficos nos segmentos das PCDD/Fs.

5.4 EXTRAÇÃO POR SOXHLET

A extração por Soxhlet foi conduzida conforme descrito no item 4.6.2. O extrato gerado por este procedimento seguiu o *clean up* descrito no item 4.7.2. A análise seguiu as condições cromatográficas dos itens 4.8 e 4.9. Assim, com esta seqüência de procedimentos, isto é, pela adoção do procedimento de extração e de eliminação de interferentes descrita no

método 8280a, foram obtidos os resultados apresentados nas tabela XV (médias e desvios padrões relativos).

Tabela XV. Recuperação das PCDD/Fs com extração em Soxhlet e processo de *clean up* em coluna de carbono/celite. As colunas de 1-4 e RSD expressam a reprodutibilidade da injeção, a média diz respeito a 4 injeções de uma mesma extração.

Analitos	1	2	3	4	Média das injeções (%)	RSD (%)
TCDF	8,2	8,0	8,6	7,1	8,0	7,62
TCDD	7,6	9,7	16	13	12	31,9
PCDF	7,7	6,4	7,0	8,2	7,3	10,9
PCDD	5,3	6,3	12	8,8	8,0	35,3
HxCDF	3,6	3,3	3,4	3,4	3,4	3,92
HxCDD	5,1	4,6	4,3	4,1	4,6	9,47
HpCDF	8,6	8,3	9,2	7,8	8,5	7,22
HpCDD	2,9	2,8	3,3	2,8	2,9	7,75
OcDF	1,6	1,5	1,2	1,6	1,5	13,7
OcDD	1,9	0,61	0,56	1,2	1,1	57,9

Os valores descritos na tabela XV referem-se a uma extração e 4 injeções do extrato no cromatógrafo. Foram realizadas 4 injeções para avaliar a reprodutibilidade em função do volume final de 10 μ L ser muito baixo. Como pode ser observado o valor das recuperações variaram de 1,1 até 12 %. Ainda, com respeito aos dados da tabela XV, pode ser observado que os desvios padrões relativos (RSDs) oscilaram bastante (7,62 a 57,9 %) e foram altos para alguns analitos. Este efeito foi creditado, em parte, aos pequenos valores de recuperação, ou seja, áreas pequenas dos picos cromatográficos. As áreas sendo pequenas deixam a integração do pico mais suscetível às oscilações da linha base. Os índices de recuperação encontrados são relativamente baixos, mesmo seguindo a metodologia preconizada na literatura. No entanto, a EPA informa que valores baixos de recuperação podem ser devidos a uma alta retenção na coluna de carbono [61]. Tal comportamento pode ser ocasionado pela variabilidade na capacidade adsortiva dos carvões ativados comerciais, os quais apresentam alta área superficial.

Assim, para avaliar a possibilidade da coluna de carbono estar sendo responsável pela retenção dos analitos foi realizada uma nova extração, onde não se utilizou a coluna de carbono/celite. Os valores de recuperação obtidos para extração (1 extração e 5 injeções no cromatógrafo) com Soxhlet e sem a coluna de carbono/celite no *clean up* são apresentados na tabela XVI.

Tabela XVI. Recuperação das PCDD/Fs por extração em Soxhlet e processo de *clean up* sem coluna de carbono/celite. As colunas de 1-5 e RSD expressam a reprodutibilidade da injeção, a média diz respeito a 5 injeções de uma mesma extração.

Analitos	1	2	3	4	5	Média das injeções (%)	RSD (%)
TCDF	55	50	58	40	50	51	13,3
TCDD	92	158	97	133	95	115	25,3
PCDF	76	64	67	63	-	68	8,8
PCDD	97	134 ^d	80	99	82	89	11,2
HxCDF	133	120	126	136	142	131	6,5
HxCDD	41	36	41	43	41	40	6,5
HpCDF	79	76	68	71	54	70	13,8
HpCDD	21	19	20	22	22	21	6,3
OcDF	28 ^d	16	16	17	15	16	4,7
OcDD	36 ^d	19	24	21	19	21	11,6

d = valores descartados pelo teste Q; n = valores não descartados pelo teste Q;

De acordo com a tabela XVI as recuperações cresceram em relação aos resultados obtidos com a coluna de carbono/celite. Além disso, os RSDs alcançaram valores com menor oscilação, em torno de 4,6 a 25,3 %, contra valores de 7,62 a 57,9 %, também para Soxhlet, mas sem a coluna de carbono. Acredita-se que pelo fato das recuperações terem sido maiores, e conseqüentemente os picos cromatográficos terem sido mais intensos em relação aos da extração com *clean up*/coluna de carbono/celite, a área dos primeiros ficou menos suscetível a variações na linha base. Nas figuras 16 e 17 são agrupados os resultados da extração de PCDFs e PCDDs, com e sem coluna de carbono/celite, respectivamente.

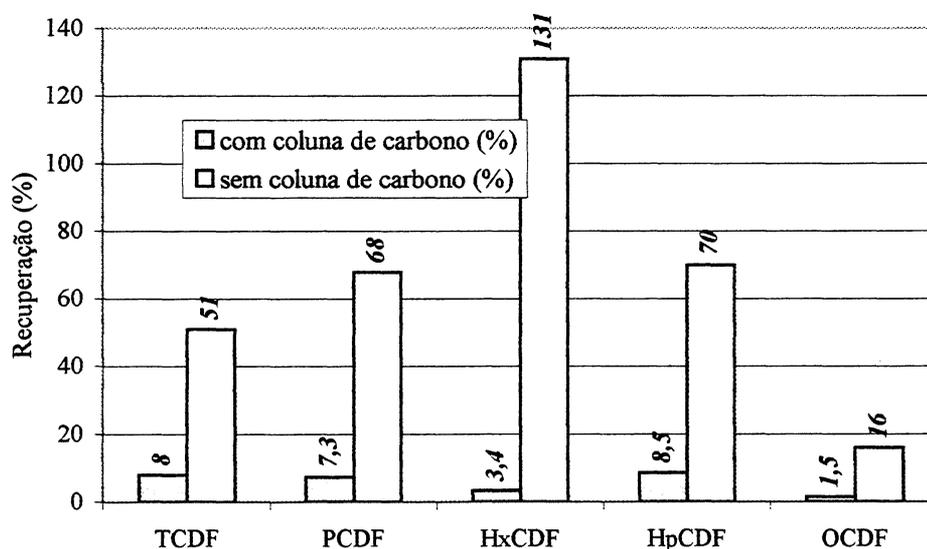


Figura 16. Comparação dos valores de recuperação para extração com Soxhlet com e sem a coluna de carbono/celite no *clean up* dos furanos.

Pode ser observado na figura 16 que todos os percentuais da recuperação com Soxhlet (16 horas de extração) e coluna de carbono mostraram-se bastante baixos para os furanos, enquanto que, os dados de recuperação obtidos sem a coluna de carbono ficaram em níveis bem mais aceitáveis, com exceção da OCDF. Alguns pesquisadores têm relatado que seriam necessários tempos de extração de até 60 ou 72 horas, no Soxhlet, para extrair totalmente as dioxinas e furanos [39,46]. Na figura 17 é comparada a extração por Soxhlet para dioxinas com e sem o uso da coluna de carbono/celite.

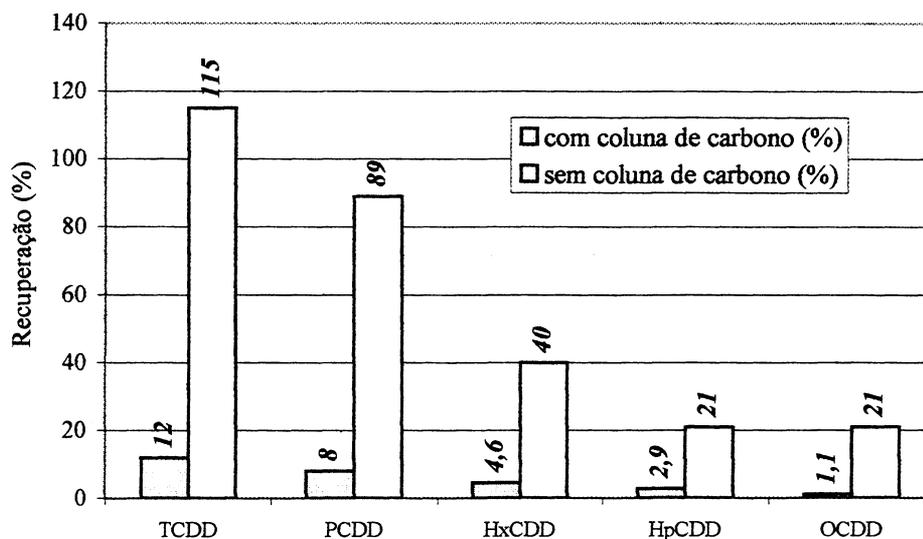


Figura 17. Comparação dos valores de recuperação para extração com Soxhlet com e sem a coluna de carbono/celite no *clean up* das dioxinas.

Os índices de recuperações, comparados na figura 17, para as dioxinas mostram valores variando de 21 a 115%, sendo as menores recuperações dos compostos HpCDD e OCDD. Este comportamento pode ser creditado, segundo *Kemmochi e Tusumi* [41], à tendência das dioxinas e furanos, com maior massa molar ou maior número de cloros na molécula, de ficarem retidas nas cinzas, o que pode estar relacionado aos teores de carbono das mesmas. Estes pesquisadores obtiveram recuperações de PCDD/Fs para cinzas, com 6% de teor de carbono, de 0% para OCDD e 25% para HpCDD, enquanto para as demais PCDDs os valores oscilaram de 63 a 98%. O mesmo comportamento foi observado para os furanos, com recuperações do HpCDF 15 a 29% e para o OCDF de 0%. Isto pode indicar uma certa dificuldade na extração dos congêneros com maior número de cloros.

Tal relação, da eficiência extrativa com o número de cloros ou massa molar e teores de carbono das cinzas, é reforçada pelo aumento nas recuperações com e sem a coluna de carbono para *clean up*. Acredita-se que a coluna de carbono/celite possa ter retido uma fração significativa das PCDD/Fs dos extratos em análise. Em tese, os lotes de carbono/celite empregados poderiam ser descartados e testados novos lotes, porém, como um dos objetivos principais deste trabalho é a avaliação das possibilidades em termos de processos de extração, optou-se por não usar a coluna de carbono/celite. Esta adaptação foi realizada considerando-se que a matriz em estudo teve seus principais interferentes removidos pelo tratamento prévio das cinzas no preparo do branco. Além disso, observou-se que a linha base não teve um acréscimo de ruído significativo, o que poderia ocorrer pela eliminação de uma etapa do *clean up* da técnica de confronto.

A comparação entre as respostas sentidas na linha base dos espectrogramas, pela possibilidade de alguns interferentes estarem ficando no extrato pelo não uso da coluna de carbono/celite é demonstrada nos espectrogramas da figura 18. Na figura citada estão espectrogramas típicos, com contagem total de íons, de extratos originários da extração por Soxhlet, com a diferença de que o espectrograma em verde foi obtido sem o uso da referida coluna e o em vermelho teve seu *clean up* com a coluna de carbono/celite.

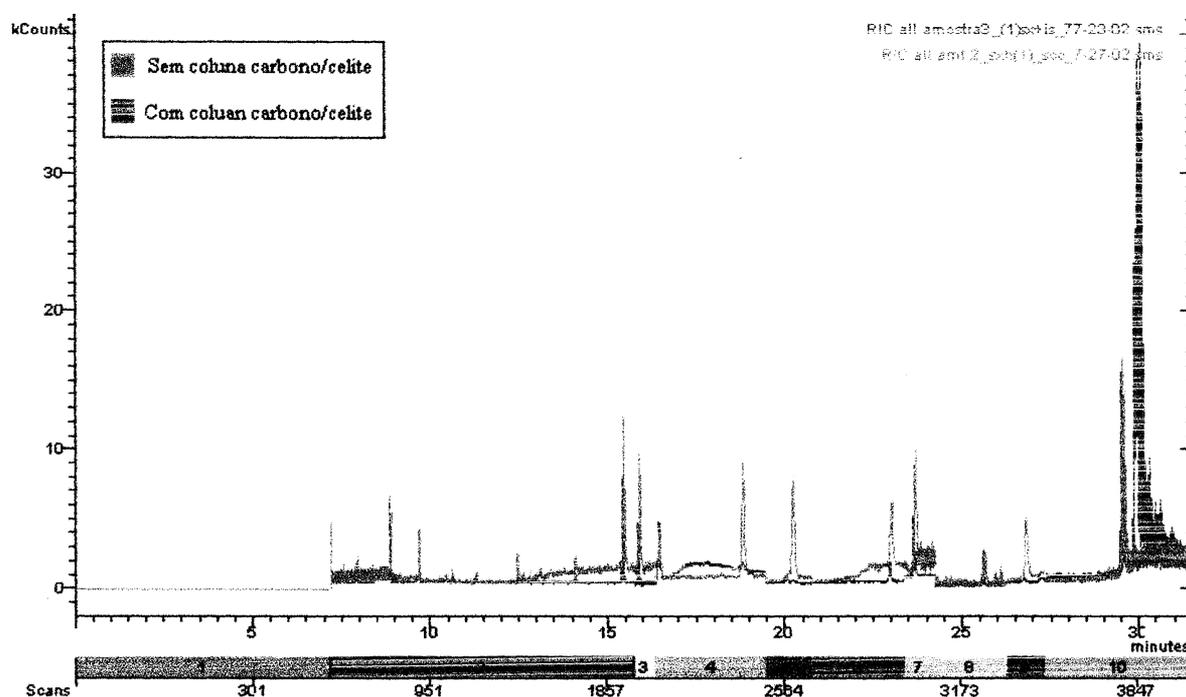


Figura 18. Espectrogramas sobrepostos da análise de extratos oriundos de Soxhlet com e sem o uso da coluna de carbono/celite para remoção de interferentes.

A sobreposição dos espectrogramas mostra um leve aumento no ruído da linha base no início dos segmentos 2, 3 e 7. Já no segmento 10 há redução no ruído, com a eliminação da coluna de carbono/celite. Este comportamento se repetiu nos demais ensaios, sugerindo que a supressão da coluna não traz prejuízos significativos aos objetivos deste trabalho.

5.5 EXTRAÇÃO POR ULTRA-SOM

A extração por US foi conduzida conforme descrito no item 4.6.3. O extrato gerado por este procedimento seguiu o *clean up* descrito no item 4.7.2. A análise seguiu as condições cromatográficas dos itens 4.8 e 4.9. Assim, com esta seqüência de procedimentos, isto é, pelo uso de extração através de US ao invés de Soxhlet e a adoção do *clean up* do método 8280a, foram obtidos os resultados apresentados na tabela XVII, onde são informados, as recuperações, as médias e os desvios padrões relativos obtidos. Similarmente ao *clean up* da extração por Soxhlet, a extração com US usou a coluna de carbono/celite.

Tabela XVII. Recuperação das PCDD/Fs com ultra-som e coluna de carbono/celite para *clean up*. As colunas de 1-5 e RSD expressam a reprodutibilidade da injeção, a média diz respeito a 5 injeções de uma mesma extração.

Analitos	1	2	3	4	5	Media das injeções (%)	RSD (%)
TCDF	4,6	3,8	3,5	7,0 ⁿ	2,8	3,6	20,4
TCDD	4,8	4,8	3,1	2,8	2,3	3,6	33,1
PCDF	1,5	3,6 ^d	1,4	1,4	1,5	1,5	1,4
PCDD	2,9	2,6	2,5	3,0	1,8	2,6	18,6
HxCDF	1,6	0,92	1,2	1,2	0,55	1,0	34,9
HxCDD	5,2 ⁿ	3,3	1,7	2,3	1,9	2,3	31,2
HpCDF	8,8 ^d	5,3	3,7	4,0	3,8	4,2	17,8
HpCDD	2,7	2,0	1,2	1,5	1,4	1,8	33,8
OcDF	1,5	1,1	2,5 ⁿ	1,7	1,2	1,4	20,4
OcDD	0,80	0,55	0,73	0,52	0,17	0,55	44,2

d = valores descartados pelo teste Q; n = valores não descartados pelo teste Q;

Os valores descritos referem-se a uma extração e 5 injeções do extrato no cromatógrafo. As recuperações variaram de 0,55 a 3,6%, enquanto que os desvios padrões relativos oscilaram de 1,4 a 44,2%. A baixa recuperação poderia ter sido também ocasionada pela retenção na coluna de carbono/celite. Então, o segundo extrato obtido por US teve

eliminado do seu de *clean up*, assim como para Soxhlet, a coluna de carbono/celite. As recuperações obtidas, as médias e desvios padrões relativos são mostrados na tabela XVIII.

Tabela XVIII. Recuperação das PCDD/Fs com US e sem coluna de carbono/celite no *clean up*. As colunas de 1-4 e RSD expressam a reprodutibilidade da injeção, a média diz respeito a 4 injeções de uma mesma extração.

Analitos	1	2	3	4	Media das injeções(%)	RSD(%)
TCDF	7,8	7,1	8,8	9,3	8,3	11,8
TCDD	8,4	7,3	12	9,7	9,3	20,9
PCDF	5,3	5,1	5,1	4,0	4,9	12,3
PCDD	7,4	5,2	6,4	7,8	6,7	17,1
HxCDF	5,2	5,2	5,6	5,0	5,2	4,5
HxCDD	5,8	6,5	6,9	6,4	6,4	7,1
HpCDF	11	11	11	9,3	10	6,6
HpCDD	5,1	4,9	4,6	4,0	4,6	10,4
OcDF	1,9	1,5	1,8	2,1	1,8	12,0
OcDD	0,33	0,61	0,33	0,48	0,44	30,9

As médias de recuperação ficaram entre 0,44 e 9,3% sem a coluna de carbono/celite, enquanto com a coluna foram de 0,55 a 3,6%. O aumento da recuperação influenciou os RSDs, que de 1,4 a 44,2% foram para 4,5 a 30,9 sem a coluna. As menores recuperações com US foram creditadas as características da técnica extratora, a potência do equipamento usado e a possível divisão da potência nos dois recipientes com cinzas na cuba do US, ou ainda a retenção na coluna de carbono. As figuras 19 e 20 agrupam dados de US das tabela XVII e XVIII, para furanos e dioxinas, respectivamente, com e em a coluna de carbono/celite.

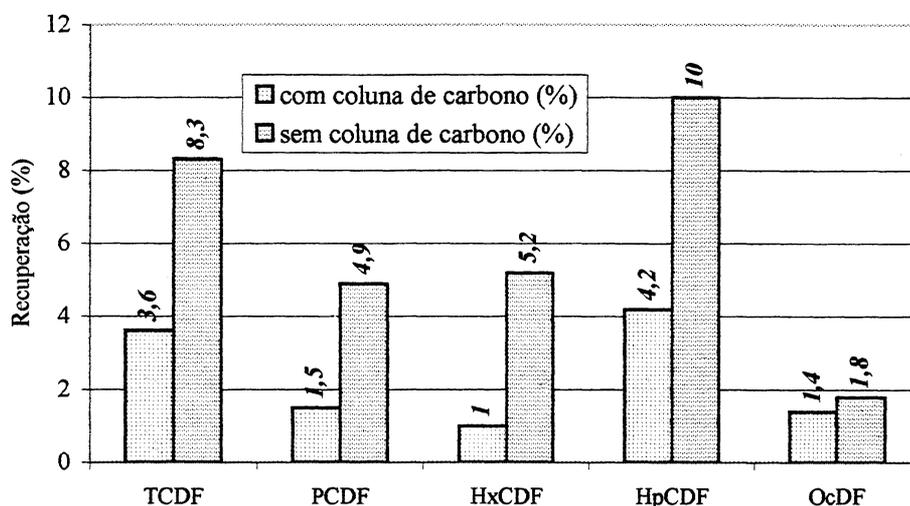


Figura 19. Comparação dos valores de recuperação para extração com US com e sem a coluna de carbono/celite no *clean up* dos furanos.

Comparando o gráfico da figura 15, que relaciona extração por Soxhlet, para furanos, com e sem a coluna de carbono, com o da figura 19 identifica-se que a influência da eliminação da coluna de carbono/celite não foi muito significativa para a extração por US. Portanto, é possível sugerir como responsável pela baixa eficiência na primeira extração com Soxhlet o uso da coluna de carbono/celite. Enquanto, com US, se sugere que a baixa recuperação para os furanos, não pode ser creditada apenas a retenção na coluna, mas, parece que a eficiência da extração por US está também relacionada a outros fatores, que serão discutidos na seqüência. A seguir é apresentada a figura 20, onde são graficados os percentuais de recuperação com e sem coluna de carbono, por US das dioxinas.

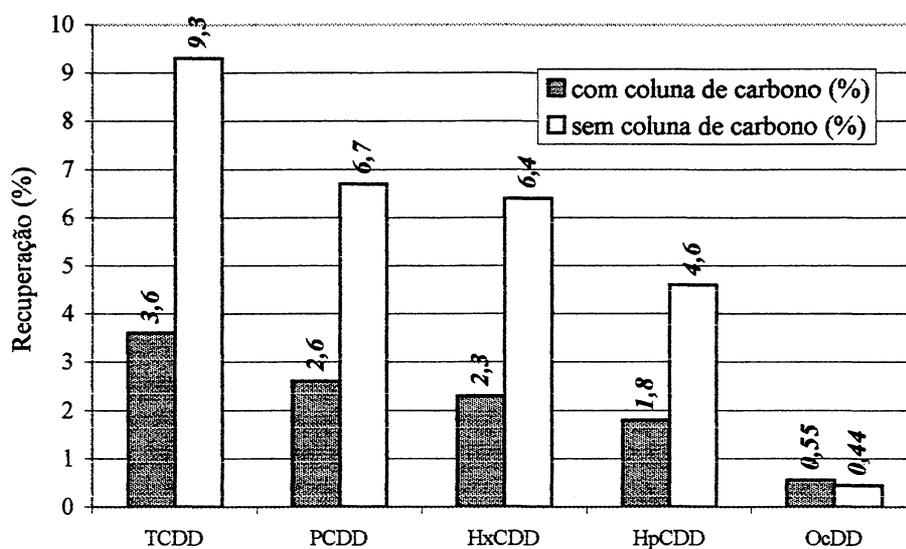


Figura 20. Comparação dos valores de recuperação para extração com US com e sem a coluna de carbono/celite no *clean up* das dioxinas.

Assim como proposto para os furanos, a comparação frente ao comportamento da extração por Soxhlet e por US das dioxinas é possível. Tal avaliação, similarmente ao observado para os furanos e US, indica um efeito devido a eliminação da coluna de carbono/celite menos pronunciado no US do que por Soxhlet, sugerindo que a extração por US das dioxinas possa ter os baixos valores associados a outros fatores que não só a retenção na referida coluna.

Nas figuras 21 e 22 são agrupados os dados das recuperações com US e Soxhlet sem a coluna de carbono, para furanos e dioxinas respectivamente. Isto possibilita comparar a

eficiência das extrações, por estas duas técnicas extratoras, sem o uso da coluna de carbono/celite no processo de eliminação dos interferentes.

A avaliação dos valores agrupados nas figuras referidas indica claramente uma maior eficiência do processo com Soxhlet. O que pode ser ressaltado comparando a recuperação do TCDD por US e Soxhlet, 9,3 e 115%, respectivamente. Alguns pesquisadores têm referido valores de recuperação para PCDD/Fs totais em torno de 70 % dos valores obtidos com Soxhlet [60]. Na figura 20 são agrupados os dados obtidos para US *versus* Soxhlet dos furanos.

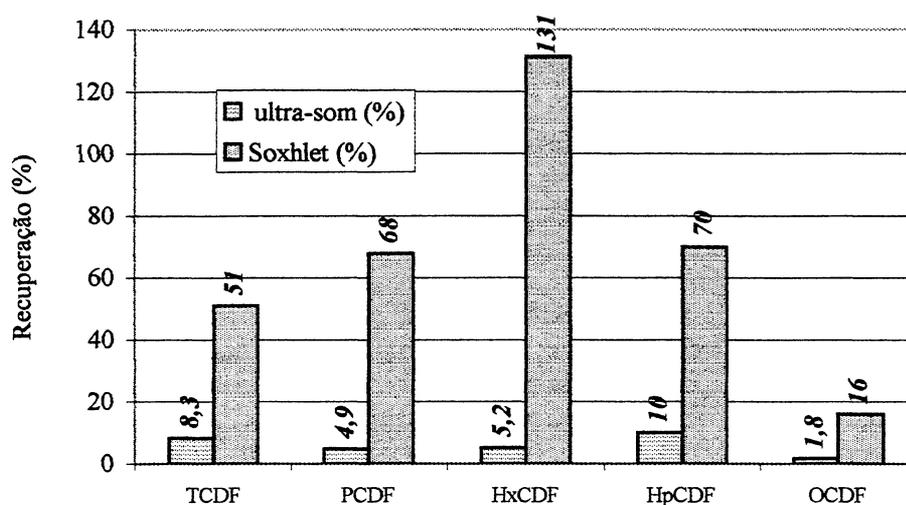


Figura 21. Comparação dos valores de recuperação para extração com US e Soxhlet dos furanos sem a coluna de carbono/celite no *clean up*.

Para o Soxhlet a recuperação dos furanos foi mais eficiente do que por US. No entanto, os valores para OCDF (16%) e HxCDF (131%) deve ser tomados com as seguintes considerações: para as HpCDD/Fs e OCDD/Fs têm sido encontrados valores próximos de zero, e para a HxCDF crê-se que possa ter havido contribuição de alguma interferência aumentando a sua recuperação real. Porém, tem sido reportado limites de aceitabilidade para as HxCDFs variando de 26 a 152 % (Método EPA 1613 [61]). Na figura 22 são agrupados os índices de recuperação das dioxinas com US e Soxhlet sem a coluna de carbono no *clean up*.

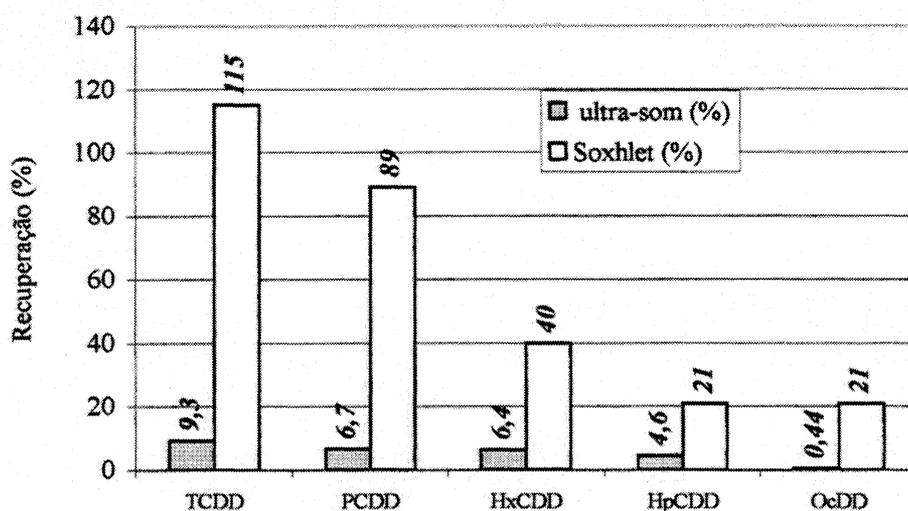


Figura 22. Comparação dos valores de recuperação para extração com US e Soxhlet das dioxinas sem a coluna de carbono/celite no *clean up*.

As dioxinas apresentaram maiores recuperações com Soxhlet do que por US, possivelmente pelos mesmos fatores citados anteriormente. Porém, um aspecto do comportamento da recuperação das dioxinas observado é um decréscimo deste, o qual parece estar ligado ao aumento da massa molar. Para avaliar esta correlação, foram plotadas as recuperações das dioxinas agrupadas como nas figuras 17 e 20. As curvas obtidas são mostradas na figura 23, onde se têm as recuperações de dioxinas versus massa molar.

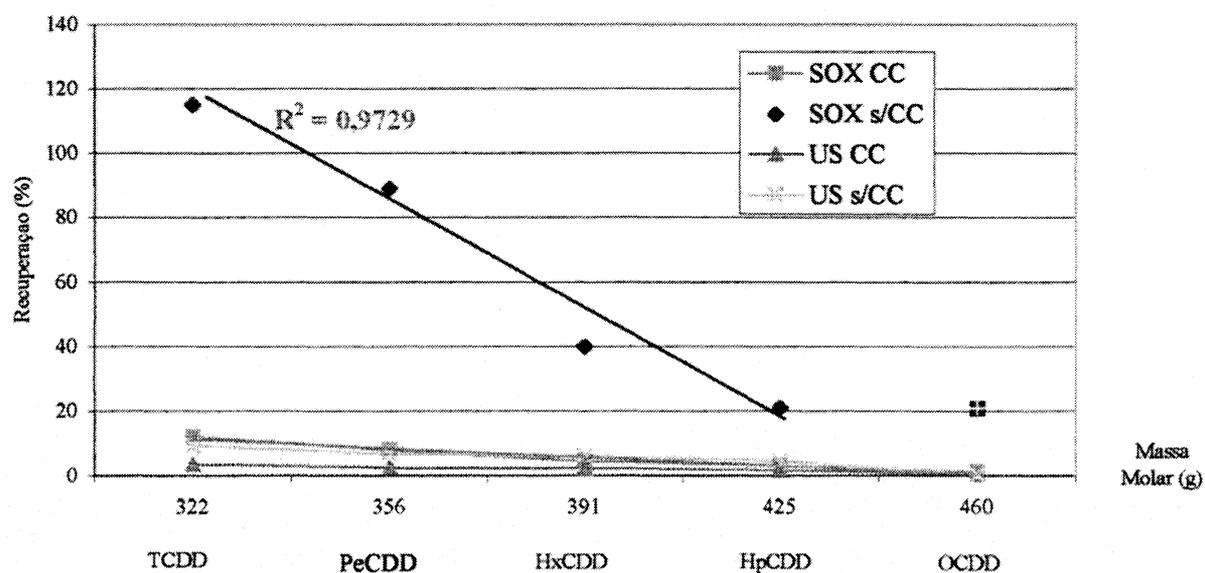


Figura 23. Massas molares (g) das dioxinas comparadas com suas recuperações. SOX=Soxhlet; CC=coluna de carbono/celite; s/CC=coluna de carbono/celite.

Os resultados das extrações por Soxhlet das dioxinas foram então agrupados com e sem coluna de carbono celite, e para US também com e sem a coluna de carbono. Com estas curvas foi possível indentificar uma certa correlação entre a massa molar e a eficiência da extração. A recuperação da OCDD com Soxhlet e sem coluna de carbono foi desconsiderada por ter havido um aumento do ruído na linha base neste último segmento. Este aumento foi observado em muitos espectrogramas, mesmo naqueles de extratos que usaram a coluna de carbono no clean up. Assim, acredita-se que este ruído, no segmento 10, possa estar ligado a um acréscimo na sangria da coluna, no final da programação de temperatura, pois ao fim da corrida cromatográfica a temperatura do forno está em torno de 310°C. Acredita-se, portanto, que mesmo uma coluna específica para uso com detector de massas, em uma temperatura próxima da temperatura máxima de trabalho (325°C), ofereça um pouco de sangramento da fase estacionária. Para as demais curvas também foram observados reduções da eficiência na extração com o aumento da massa molar. A figura 24 traz o gráfico da figura 23 ampliado de forma que possa ser mais bem visualizado o comportamento da curvas com menor inclinação.

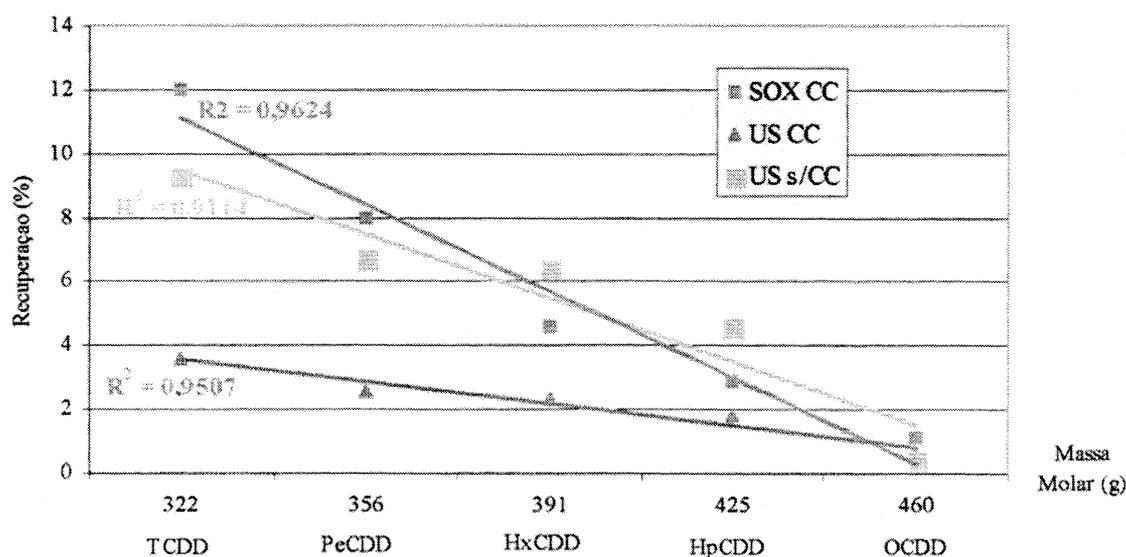


Figura 24. Curvas ampliadas das recuperações das dioxinas comparadas com suas massas molares (g), SOX=Soxhlet; CC=coluna de carbono/celite; s/CC=coluna de carbono/celite.

As curvas da figura 24 podem indicar uma relação linear entre a massa molar das dioxinas e a eficiência da extração, o que sugere uma redução na eficiência da recuperação com o aumento da massa molar, o que poderia ser entendido pelo aumento da interação de forças intermoleculares de Van der Waals, já que estas aumentam com a massa molar. Assim,

este tipo de interação poderia ser responsável pela adsorção das PCDDs na superfície do carbono ativado, usado na coluna de clean up, e, também responsável pela retenção das dioxinas com maior massa molar nas cinzas.

Lembrando que alguns trabalhos têm sugerido uma relação entre o teor de carbono e a retenção das PCDDs nas cinzas [41] e que os valores de R^2 variaram de 0,9114 a 0,9729 na figura 24 para a correlação da recuperação *versus* massa molar, foi então buscada uma variável que pudesse representar a possível interação das PCDDs com residuais de carbono nas cinzas. Para este fim foi escolhido o logaritmo de distribuição carbono orgânico $\log K_{oc}$ [21]. Dessa forma os dados das figuras 23 e 24 foram graficados contra $\log K_{oc}$. As curvas obtidas com este parâmetro são mostradas nas figuras 25 e 26. A figura 26 é uma ampliação da figura 25 para permitir uma melhor visualização do comportamento das curvas com baixa recuperação.

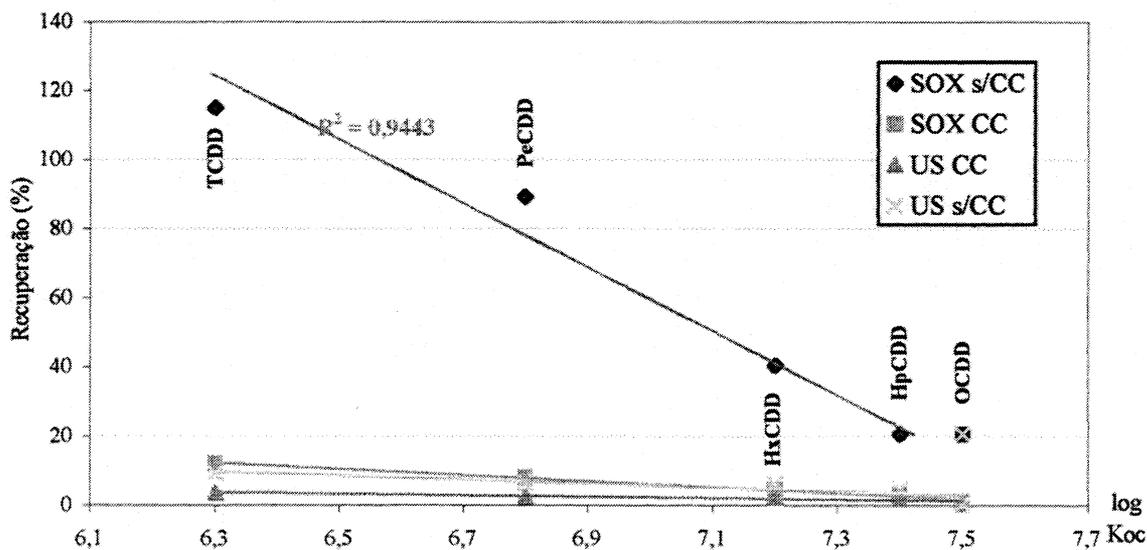


Figura 25. $\log K_{oc}$ das dioxinas comparados com suas recuperações das. SOX=Soxhlet; CC=coluna de carbono/celite; s/CC=coluna de carbono/celite.

O valor de R^2 para a correlação entre $\log K_{oc}$ e o percentual de recuperação das PCDDs de 0,9443 comparado com valor do R^2 de 0,9729 (figura 23) para a correlação de massa molar e o percentual de recuperação indica uma melhor relação entre a eficiência da extração e a massa molar, frente aos dados obtidos com Soxhlet sem coluna de carbono.

Na figura 26 são apresentadas as correlações entre $\log K_{oc}$ e o % de recuperação das PCDDs para extração por US com coluna de carbono/celite, US e Soxhlet sem tal coluna.

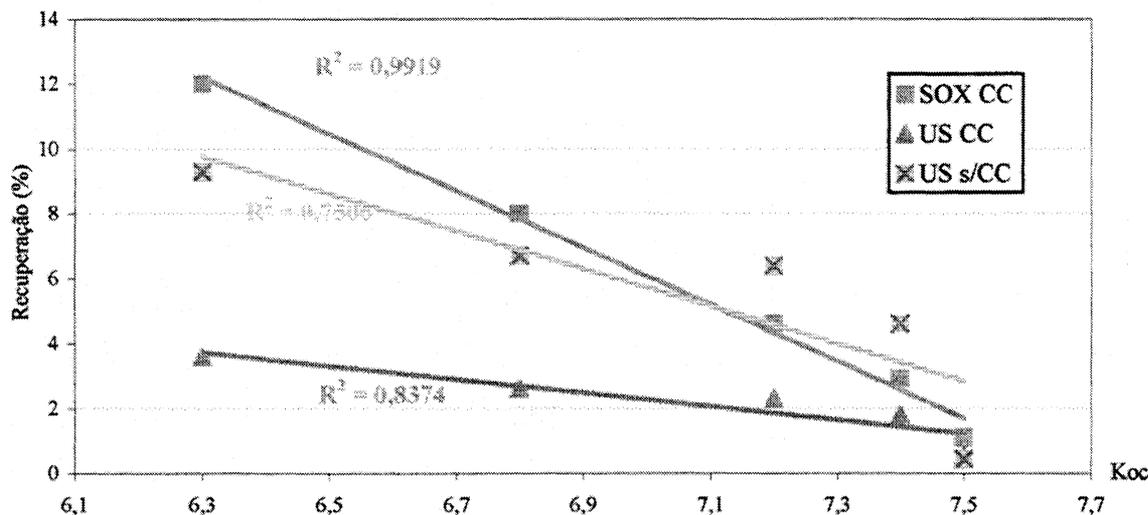


Figura 26. Curvas ampliadas de $\log K_{oc}$ comparadas com recuperações das dioxinas. SOX=Soxhlet; CC=coluna de carbono/celite; s/CC=coluna de carbono/celite.

As curvas representadas na figuras 26 forneceram R^2 de 0,8374 para US com coluna de carbono e 0,7506 sem coluna, para $\log K_{oc} \times \%$ recuperação, frente a R^2 de 0,9507 e 0,9114 para massa molar $\times \%$ recuperação (figura 24). Isto poderia indicar uma melhor correlação entre a recuperação e a massa molar do congênero do que obtida frente a $\log K_{oc}$, como já havia sido observado, nas figuras 23 e 24, para Soxhlet sem coluna de carbono.

No entanto, para a extração por Soxhlet com coluna de carbono foi obtido R^2 para relação com massa molar de 0,9624, enquanto a relação frente a $\log K_{oc}$ fornece R^2 de 0,9919. Porém, apesar desta última correlação afastar-se do comportamento das demais extrações, todas as correlações indicam menores recuperações dos congêneros das dioxinas com massa molar e $\log K_{oc}$ mais altos.

5.6 COMPARAÇÃO DA REPRODUTIBILIDADE DE INJEÇÕES DE PEQUENOS VOLUMES.

Um outro aspecto de interesse neste trabalho foi de avaliar a influência de concentrar o extrato final a um volume bastante pequeno, 10 μL , uma vez que os trabalhos com dioxinas têm sugerido o uso de volumes de extrato finais em torno de 50 a 100 μL ([59, 62], EPA 8280a). A redução em torno de 20000 a 50000 vezes, nas condições empregadas não trouxe

aumento significativo do ruído na linha base como demonstrado nas figuras 10, 11 e 12. Nestas figuras foram mostrados os espectrogramas típicos da lavagem da vidraria onde os volumes dos extratos também foram reduzidos em ordem de grandezas similares às citadas, e por isso podem permitir avaliar a presença de interferentes não só na vidraria, como nos solventes usados. No entanto, a concentração à 10 μL poderia deixar depositados nas paredes do mini-frasco de fundo cônico resíduos dos analitos, uma vez que a amostra é levada a secar e posteriormente retomada ao volume de 10 μL com a solução de PI. Isto, associado a necessidade de se retirar alíquotas para injeção tipo sanduíche, economizando extrato, porque são apenas 10 μL , poderia afetar a reprodutibilidade nas resposta destas injeções.

Para avaliar a reprodutibilidade da resposta de tais injeções foram considerados os desvios padrões relativos da amostra com maior recuperação. Tal consideração foi tomada porque se acredita que as recuperações de baixa eficiência têm picos cromatográficos com áreas muito pequenas, que por isso sofrem uma influência mais significativa de variações na linha base do que os de melhor eficiência na recuperação. Assim, na tabela XVIII são rerepresentados os dados da tabela XVI, da recuperação com Soxhlet sem o uso da coluna de carbono e alguns valores encontrados de RSDs para injeções de extratos com 70 μL . Tais valores foram obtidos com detectores ECD, FID e LRMS [62].

Tabela XVIII. Reprodutibilidade da injeção do extrato obtido com Soxhlet e *clean up* sem coluna de carbono/celite, média das injeções, RSDs obtidos e RSDs da literatura [62].

Analitos	1	2	3	4	5	Media das injeções (%)	RSD (%)	RSD Lit. (%)
TCDF	55	50	58	40	50	51	13,3	4,1 a 13,3
TCDD	92	158	97	133	95	115	25,3	2,5 a 11,9
PCDF	76	64	67	63	-	68	8,8	9,4 a 13,8
PCDD	97	134 ^d	80	99	82	89	11,2	0,9 a 8,5
HxCDF	133	120	126	136	142	131	6,5	3,0 a 7,3
HxCDD	41	36	41	43	41	40	6,5	4,4 a 8,9
HpCDF	79	76	68	71	54	70	13,8	1,3 a 10,6
HpCDD	21	19	20	22	22	21	6,3	0,7 a 4,5
OcDF	28 ^d	16	16	17	15	16	4,7	0,6 a 9,0
OcDD	36 ^d	19	24	21	19	21	11,6	1,1 a 1,7

d = valores descartados pelo teste Q; n = valores não descartados pelo teste Q;

Os RSDs encontrados na literatura são mostrados na última coluna da tabela XVIII, onde os RSDs assinalados em negrito são aqueles que encontram-se dentro da faixa de

valores assinalada. Dentro os 10 congêneros de interesse 5 obtiveram RSDs compatíveis com os de outros trabalhos. No entanto, deve ser considerado que o volume final do trabalho de referência foi de 70 µL, frente aos 10 µL deste ensaio. Acredita-se que uma concentração menor, talvez 20 ou 30 µL, possa diminuir esta diferença.

Assim, considerando os aspectos discutidos referentes à eliminação da coluna de carbono e o uso do volume final de 10 µL foram realizadas novas extrações com Soxhlet, ultra-som e DC. Os resultados são apresentados a seguir.

5.7 EXTRAÇÃO POR SOXHLET SEM COLUNA DE CARBONO/CELITE

O segundo grupo de extrações por Soxhlet foi conduzido conforme descrito no item 4.6.2. O extrato gerado por este procedimento seguiu o *clean up* descrito no item 4.7.2, com a eliminação da coluna de carbono/celite pelos motivos expostos nos itens 5.4 e 5.5. A análise seguiu as condições cromatográficas dos itens 4.8 e 4.9. Assim, com esta seqüência de procedimentos, isto é, pela adoção do procedimento de extração e de eliminação de interferentes referida, foram obtidos os resultados apresentados nas tabela XX.

Tabela XX. Recuperações obtidas com Soxhlet sem a coluna de carbono/celite no *clean up*; n = numero de injeções no cromatógrafo à gás.

Analito	Extração 1; n= 4	Extração 2; n=3	Extração 3; n=3	Média	Desvio Padrão
TCDF	51%	61%	60%	57%	5,4%
TCDD	115%	87%	87%	96%	16,3%
PeCDF	68%	55%	54%	59%	7,8%
PeCDD	89%	112%	112%	104%	13,4%
HxCDF	131%	24%	23%	59%	62,0%
HxCDD	40%	78%	81%	66%	22,8%
HpCDF	70%	63%	65%	66%	3,7%
HpCDD	21%	76%	73%	57%	31,2%
OCDF	16%	24%	20%	20%	4,2%
OCDD	21%	15%	20%	19%	3,3%

Os dados mostrados na tabela XX foram obtidos pela análise de duas amostras com o procedimento de extração por Soxhlet já descrito, agrupados aos valores da primeira extração (coluna 1 da tabela XX), valores estes previamente apresentados na tabela XVI. Os resultados apontam recuperações para os furanos de 20 a 66 %, sendo a recuperação de 20 % referente à recuperação do OCDF, que pelas razões discutidas anteriormente tende a apresentar uma baixa

recuperação. Entretanto, os demais furanos apresentaram recuperações de 57 a 66%. As dioxinas, assim como os furanos de alto log K_{oc} ou massa molar, tiveram menores recuperações, sendo o percentual da OCDD de 19%. As demais PCDD tiveram valores oscilando de 57 a 104%. Os desvios padrões obtidos variaram de 3,32 até 62 %.

A técnica tomada por metodologia oficial (EPA 8280a) não informa critérios de aceitabilidade para os índices de recuperação, portanto, optou-se por usar um dos critérios sugeridos em outro método da mesma instituição. Foram, então considerados, os parâmetros do método EPA 1613, com a ressalva de que este emprega massas de alta resolução e o extrato final é concentrado até um mínimo de 20 μL . Os referidos parâmetros dizem respeito à recuperação de dioxinas isotopicamente marcadas com ^{13}C . Assim, os critérios de aceitabilidade considerados são demonstrados na figura 27, juntamente com os dados de recuperação obtidos com Soxhlet. Os critérios de aceitabilidade também são para extração com Soxhlet, e não informa valores para OCDF, por isso foi usado o critério da OCDD.

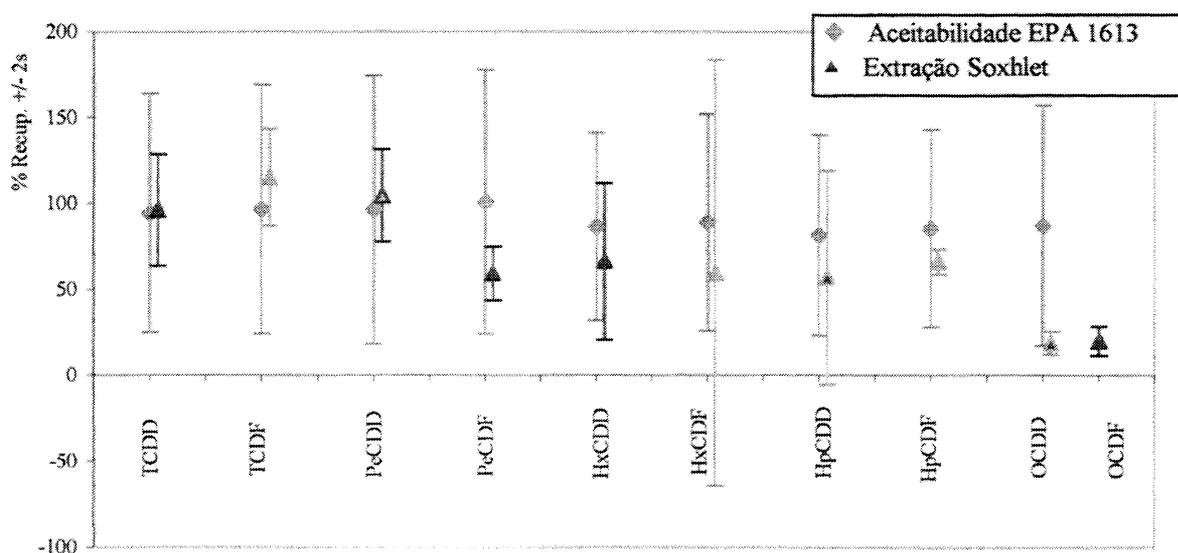


Figura 27. Critérios de aceitabilidade em função do % de recuperação (média recuperação +/- 2s) das PCDD/Fs marcadas com ^{13}C quando todos os congêneros são avaliados, segundo método EPA 1613 [61] e valores de recuperação obtidos com Soxhlet.

Os valores assinalados em vermelho representam a faixa de aceitabilidade adotada no método EPA 1613 [61], enquanto que os valores em azul são os dados obtidos por Soxhlet mostrados na tabela XXIII. Assim, pode ser notado que a TCDD, TCDF, PeCDD, PeCDF e HpCDF apresentam médias de recuperação que ficam dentro da faixa de aceitabilidade. Além

disso, possuem intervalos que se sobrepõem, indicando o fornecimento de resultados similares. A HxCDD, HpCDD, OCDD e OCDF apresentaram médias de recuperações que ficam dentro da faixa de aceitabilidade, em quase toda sua totalidade, dentro do intervalo dos referidos critérios. Já o HxCDF têm média que cai dentro do intervalo de aceitabilidade, mas devido ao desvio padrão elevado (s) de 62 %, pode apresentar resultados um tanto quanto fora dos critério de aceitabilidade. Apesar de alguns intervalos não coincidirem com os critérios de aceitabilidade, gerando resultados que podem diferir, todos os congêneros de interesse (10) obtiveram média de recuperação dentro dos intervalos relativos ao critério utilizado.

5.8 EXTRAÇÃO POR ULTRA-SOM SEM COLUNA DE CARBONO/CELITE

O segundo grupo de extrações por US foi conduzido conforme descrito no item 4.6.3. O extrato gerado por este procedimento seguiu o *clean up* descrito no item 4.7.2, com a eliminação da coluna de carbono/celite pelos motivos expostos nos item 5.4 e 5.5. A análise seguiu as condições cromatográficas dos itens 4.8 e 4.9. Assim, com esta seqüência de procedimentos, isto é, pela adoção do procedimento de extração e de eliminação de interferentes referida, foram obtidos os resultados apresentados nas tabela XXI. Foram agrupados os dados da tabela XVIII, da recuperação de PCDD/Fs com US, onde foram usados dois copos na cuba.

Tabela XXI. Recuperações obtidas com US sem a coluna de carbono/celite no *clean up*; Ext. = extração; n = numero de injeções no cromatógrafo; n_{cc} = número de copos na cuba do US.

Analito	Ext.1;n= 4; $n_{cc} = 2$	Ext.2; n=3; $n_{cc} = 1$	Ext.3 n=3; $n_{cc} = 1$	Média Ext. 1,2 e 3	s (Ext.1,2 e 3)	Média Ext. 2 e 3	s (Ext. 2 e 3)
TCDF	8,3%	13%	13%	11%	2,5%	13%	0,2%
TCDD	9,3%	47%	47%	35%	21,9%	47%	0,4%
PeCDF	4,9%	4,9%	5,8%	5,2%	0,50%	5,4%	0,60%
PeCDD	6,7%	85%	89%	60%	46,5%	87%	2,6%
HxCDF	5,2%	2,4%	2,6%	3,4%	1,56%	2,5%	0,16%
HxCDD	6,4%	24%	24%	18%	10,2%	24%	0,1%
HpCDF	10 %	2,8%	1,4%	4,7%	4,61%	2,1%	0,97%
HpCDD	4,6%	28%	32%	22%	14,8%	30%	2,7%
OCDF	1,8%	14%	11%	9,1%	6,47%	13%	2,2%
OCDD	0,44%	14%	12%	8,7%	7,26%	13%	1,7%

A tabela XXI apresenta três médias de recuperação, extrações 1,2 e 3. A extração 1 foi obtida utilizando dois copos de Teflon® dentro do banho ultra-sônico, sendo estes os valores da tabela XVII. Já as extrações 2 e 3 representam as recuperações com apenas 1 copo de Teflon® na cuba, o que pode aumentar a eficiência da extração por diminuir a divisão da potência que efetivamente esta disponível para romper a interação analito/cinzas. Assim, era esperado que o uso de apenas um copo na cuba aumentasse a eficiência da recuperação, e isto parece ter sido observado, principalmente para as dioxinas. Os valores de recuperação com apenas um copo cresceram para as dioxinas passando de 0,44 a 9,3% para valores da ordem de 14 a 85%. Porém, os furanos apresentaram comportamento diverso, com as recuperações de alguns analitos aumentando, tomando como exemplo a extração 2. O OCDF passou de 1,8 para 14% e o TCDF de 8,3 para 13%, enquanto outras reduziram como o HpCDF passando de 10 para 2,8%, o HxCDF de 5,2 para 2,4% e o PeCDF manteve sua recuperação constante (4,9%). O comportamento assinalado sugere que o uso de apenas um copo na cuba do US, permite melhor aproveitamento da potência fornecida, talvez por não dividir a potência com dois copos de mesma massa. Este efeito parece ser mais acentuado para as dioxinas do que para os furanos, possivelmente porque o tipo de interação entre os analitos e a matriz apresente algum aspecto diferenciado entre as dioxinas e os furanos.

Assim, em função desta diferença associada à potência, os dados foram agrupados em médias da extração 1, 2 e 3, média 2 e 3, bem como para o cálculo do desvio padrão. Dessa forma, observa-se que os desvios padrões são reduzidos agrupando as extrações 2 e 3 que usaram apenas um copo na cuba, em relação ao s para as extrações 1,2 e 3. Então, para uma melhor visualização, foram colocadas na figura 28 as recuperações frente aos critérios de aceitabilidade do método EPA 1613 como promovido com os dados da extração por Soxhlet.

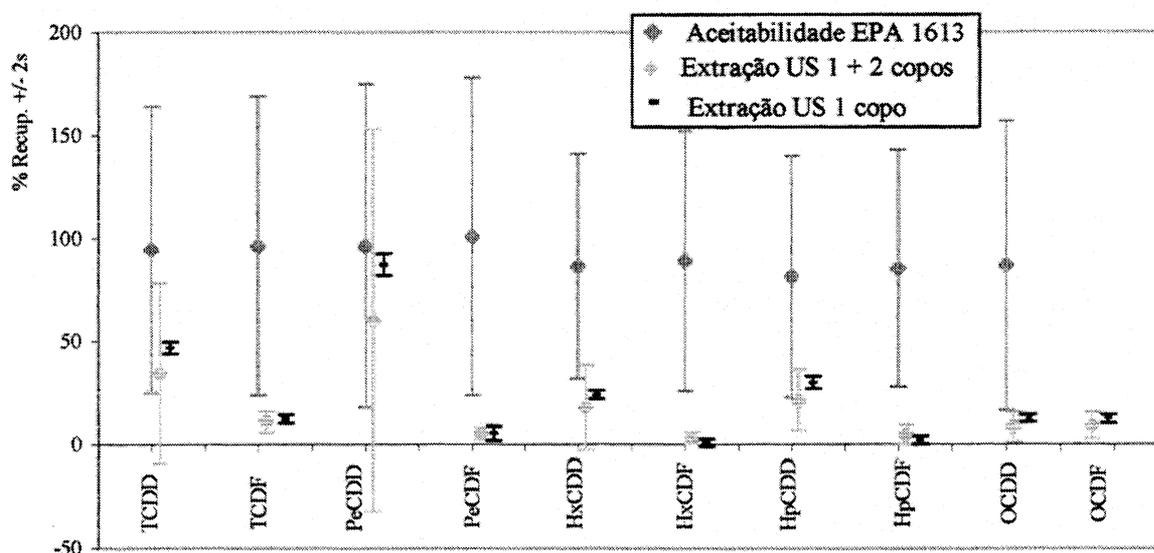


Figura 28. Critérios de aceitabilidade em função do percentual de recuperação (média recuperação $\pm 2s$) das PCDD/Fs marcadas com $^{13}\text{C}_{12}$ quando todos os congêneros são avaliados, segundo método EPA 1613, valores de recuperação obtidos com US (1+2 copos na cuba) e recuperação com apenas 1 copo na cuba do US.

A análise do comportamento das extrações com US, frente aos critérios de aceitabilidade adotados, ressaltam três aspectos principais. O primeiro é referente a um aumento pouco significativo da eficiência na extração das dioxinas quando se utiliza apenas um copo na cuba. O segundo aspecto diz respeito a uma redução observada no desvio padrão das medidas quando se emprega apenas um copo na cuba ao invés de dois. Acredita-se que tal efeito ocorra por não haver distribuição da potência entre dois copos, o que poderia se dar aleatoriamente, implicando em variações mais acentuadas nas recuperações. Do contrário, com apenas um recipiente na cuba, a potência é dirigida apenas para este com menor variabilidade no processo.

O terceiro aspecto refere-se à eficiência da extração, pois, exceto o TCDD e o PeCDD, que têm médias dentro do intervalo de aceitabilidade, e do HxCDD e HpCDD que ficam no limite inferior, todos os demais analitos tiveram recuperações não aceitáveis pelo critério que vem sendo empregado, sendo que apenas dois congêneros ficam dentro destes intervalos de aceitabilidade.

No entanto, como existem trabalhos que referem o uso da extração por US como sendo eficiente para remoção de PCDD/Fs de cinzas [51] propõem-se que os resultados aqui obtidos tenham sido baixos em função da potência do equipamento utilizado. Enquanto usam-

se equipamentos com potências de no mínimo 300 W [52], o US utilizado dispunha de 150 W de potência, podendo esta diferença ser responsável pelos índices de recuperação obtidos.

5.9 EXTRAÇÃO POR DC SEM COLUNA DE CARBONO/CELITE

As extrações por DC foram conduzidas como descrito anteriormente sem o uso da coluna de carbono. Assim, foram obtidos os resultados apresentados nas tabela XXII.

Tabela XXII. Recuperações obtidas com DC sem a coluna de carbono/celite no *clean up*; n = numero de injeções no cromatógrafo à gás.

Analito	Ext. 1; n= 3	Ext. 2; n=3	Ext. 3; n=3	Média	Desvio Padrão (s)
TCDF	22%	22%	41%	28%	11,1%
TCDD	111%	119%	94%	108%	12,6%
PCDF	23%	23%	44%	30%	12,1%
PCDD	99%	124%	123%	115%	14,1%
HxCDF	54%	25%	35%	38%	14,7%
HxCDD	85%	45%	60%	64%	20,0%
HpCDF	114%	36%	48%	66%	41,7%
HpCDD	61%	41%	52%	51%	9,7%
OcDF	31%	20%	30%	27%	6,3%
OcDD	18%	27%	20%	22%	4,5%

Os valores da tabela XXII indicam recuperações para dioxinas variando de 51 a 115 %, com exceção da OCDD que apresentou recuperação de 22%, possivelmente pela sua alta massa molar e alto log K_{oc} . O mesmo comportamento repetiu-se para os furanos com recuperações de 27 a 66 %, com o valor menor sendo obtido para o congênero de maior massa molar, o OCDF. Os desvios padrões das dioxinas variaram de 4,4 a 20 %, enquanto que dos furanos ficaram na faixa de 6,3 a 14,7 %, tendo, porém o HpCDF um desvio bastante acentuado, de 41,7 %. O desvio padrão acentuado do HpCDF talvez seja proveniente da presença no extrato analisado de algum interferente, o qual poderia ter contribuído para aumentar a recuperação da HpCDF na extração 1. O valor suspeito está assinalado em negrito e não pôde ser avaliado pelo teste Q, porque este teste exige, para avaliar um resultado suspeito, pelo menos quatro medidas, enquanto que aqui foram realizadas três.

Porém, as recuperações para dioxinas e furanos com o uso do DC sugerem uma melhor recuperação quando comparadas ao US convencional. Enquanto, o US apresentou recuperações para dioxinas de 14 a 85 %, vide tabela XXI, o DC oferece recuperações de 51 a

115%. Os furanos também apresentaram um aumento nas recuperações com DC frente ao US, passando de 2,1 a 12 % para 27 a 66 %. Manteve-se, neste conjunto de dados, a característica das recuperações dos furanos serem sempre menores que das dioxinas.

No entanto, para avaliar as recuperações por DC adotando os mesmos critérios empregados para Soxhlet e US, traçou-se o gráfico representado na figura 29, onde são assinaladas as recuperações com DC e os intervalos de aceitabilidade do método EPA 1613.

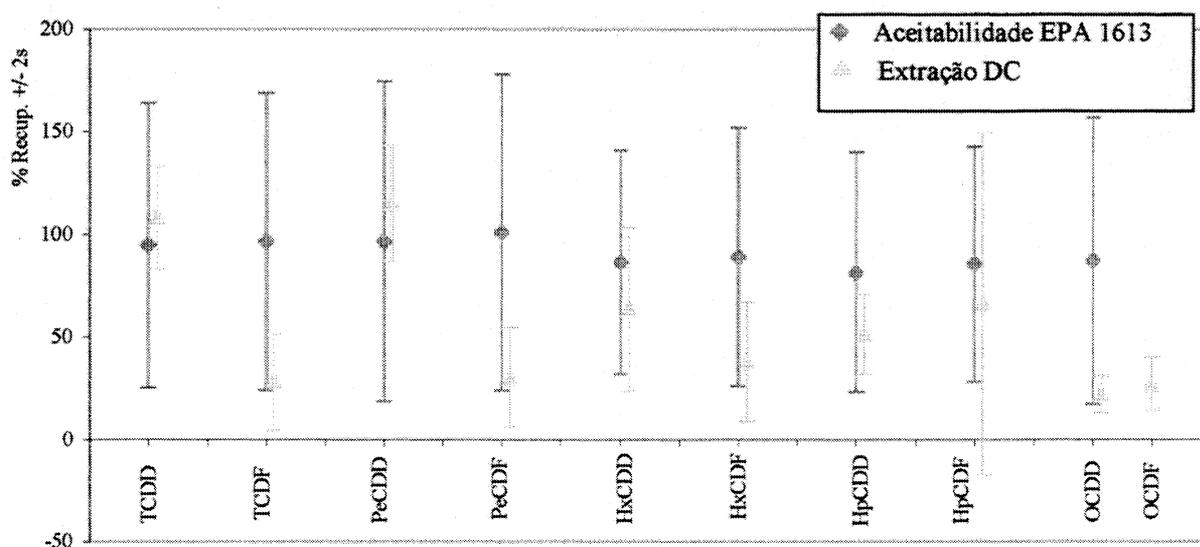


Figura 29. Critérios de aceitabilidade em função do % de recuperação (média recuperação $\pm 2s$) das PCDD/Fs marcadas com $^{13}\text{C}_6$ quando todos os congêneros são avaliados, segundo método EPA 1613 e valores de recuperação obtidos com DC.

Os intervalos de aceitabilidade em vermelho no gráfico da figura 29, quando confrontados aos resultados obtidos para DC, demonstram que todos os congêneros obtiveram médias de recuperação aceitáveis, existindo, porém, alguns congêneros com média muito próximas aos limites do intervalo de aceitabilidade. Tal comportamento ocorre em maior intensidade com os furanos, os quais mantêm recuperações inferiores às dioxinas como nas demais formas de extração (Soxhlet e US). Porém, todos os congêneros (10) ficam dentro dos critérios de aceitabilidade quando extraídos por DC.

Apesar da extração por DC empregar ondas ultra-sônicas, como o US, para promover a extração das PCDD/Fs das cinzas, os resultados diferiram bastante. A principal diferença, em termos de eficiência, deu-se em uma melhor adequação da extração por DC do que por US, em relação aos critérios adotados.

Na tabela XXIII são mostrados as formas de extração avaliadas e o número de congêneros que ficaram dentro dos critérios de aceitabilidade.

Tabela XXIII. Formas de extração e número de congêneros dentro do intervalo de aceitabilidade do método EPA 1613.

Forma de extração	Número de congêneros com média no intervalo de aceitabilidade
Soxhlet	10
Ultra-som	2
Disruptor celular	10

Então, pela análise dos dados da tabela XXIII, há indícios de que o disruptor celular apresenta resultados próximos aos obtidos com Soxhlet, pois as recuperações efetuadas neste trabalho obtiveram tanto para extração com Soxhlet como por DC o mesmo número de congêneros (10) dentro dos critérios referidos. Já o US apresentou apenas 2 congêneros dentro dos critérios, e por esta razão não foram realizados ensaios adicionais com US.

5.10 CONFRONTO DOS RESULTADOS OBTIDOS POR DC COM SOXHLET

Considerando que a extração por Soxhlet foi tomada como técnica de confronto partiu-se então para avaliação estatística da equivalência destas formas extratoras. Isto é, buscou-se uma avaliação estatística que pudesse identificar a equivalência ou não dos resultados alcançados com DC frente a técnica de confronto (Soxhlet). O teste escolhido foi o teste *t* de *student*. O teste é baseado na determinação do *t* de *student* ($t_{calculado}$) e comparação com valor tabelado de *t* ($t_{tabelado}$). Este teste é utilizado para identificar a equivalência do resultado de um grupo de medidas 1, com n_1 medidas e desvio padrão s_1 em relação a um grupo de medidas 2, com n_2 medidas e desvio padrão s_2 . Caso o valor de $t_{calculado}$ seja maior que o $t_{tabelado}$, para um intervalo de confiança de 95% e $n_1 + n_2 - 2$ graus de liberdade, o resultado é considerado diferente [49,63]. O valor de $t_{calculado}$ é determinado pelas equações 2 e 3, descritas a seguir:

$$t_{calculado} = \frac{x_1 - x_2}{s_{agrupado}} \sqrt{\frac{n_1 \cdot n_2}{n_1 + n_2}}; \text{ onde } x_1 \text{ e } x_2 \text{ são as médias 1 e 2.} \quad \text{Eq. 2.}$$

$$S_{\text{agrupado}} = \sqrt{s_1^2(n_1 - 1) + s_2^2(n_2 - 1) / (n_1 + n_2 - 2)} \quad \text{Eq. 3}$$

Assim, o cálculo dos valores de $t_{\text{calculado}}$ partiu dos dados da tabela XX e XXII, os quais foram agrupados na tabela XXIV, onde é mostrado também o resultado do $t_{\text{calculado}}$ e t_{tabelado} . Quando o valor de $t_{\text{calculado}}$ ultrapassou o valor de t_{tabelado} os resultados foram considerados diferentes (**D**), ou não equivalentes. Já quando o valor do $t_{\text{calculado}}$ foi menor que o valor de t_{tabelado} os resultados foram considerados equivalentes (**E**).

Tabela XXIV. média da recuperações (x) e desvio padrão (s) com Soxhlet (x_1, s_1) e DC (x_2, s_2); $t_{\text{calculado}}$ e t_{tabelado} para intervalo de confiança de 95% e 4 graus de liberdade [49], equivalência.

Analito	Soxhlet		DC		$t_{\text{calculado}}$	t_{tabelado}	equivalência
	x_1	s_1	x_2	s_2			
TCDF	57%	5,39%	28%	11,1%	4,11	2,776	D
TCDD	96%	16,3%	108%	12,6%	0,984	2,776	E
PeCDF	59%	7,77%	30%	12,1%	3,48	2,776	D
PeCDD	104%	13,4%	115%	14,1%	0,983	2,776	E
HxCDF	59%	62,0%	38%	14,7%	0,587	2,776	E
HxCDD	66%	22,8%	64%	20,0%	0,159	2,776	E
HpCDF	66%	3,67%	66%	41,7%	0,0124	2,776	E
HpCDD	57%	31,2%	51%	9,68%	0,296	2,776	E
OCDF	20%	4,19%	27%	6,34%	1,59	2,776	E
OCDD	19%	3,32%	22%	4,49%	0,958	2,776	E

D = Resultados diferentes; **E** = Resultados equivalentes

O teste t de *student* indica que a extração por DC, nas condições estudadas, apresenta resultados equivalentes à extração por Soxhlet para as dioxinas e furanos, exceto para TCDF ($t_{\text{calculado}} = 4,11$) e PeCDF ($t_{\text{calculado}} = 3,48$) que tiveram valores acima do tabelado. Estes resultados acima do tabelado indicam resultados diferentes entre DC e Soxhlet. Já os demais congêneros apresentaram $t_{\text{calculado}}$ variando de 0,0124 a 1,59 e menores que t_{tabelado} de 2,776. Assim, estes últimos são considerados equivalentes, e, portanto a técnica de extração gera resultados equivalentes para 8 de 10 congêneros em relação a técnica clássica de extração (técnica de confronto – Soxhlet).

5.11 CLEAN UP COM FLORISIL

O Florisil® para *clean up*, um silicato de magnésio que há muito tempo vem sendo usado como sorbente para cromatografia preparativa, na análise de resíduos de pesticidas [64], tem segundo alguns autores aplicação na análise de dioxinas e furanos em amostras de cinzas [57]. Segundo Ramos *et al* o uso de Florisil® deve ser avaliado para cada tipo de cinzas, pois há o entendimento de que pode haver muita variação no tipo de interferentes e compostos gerados na incineração. Então, para testar a sua aplicabilidade, duas amostras em que foram adicionadas PCDD/Fs, como feito para recuperação por DC, US e Soxhlet, foram extraídas por Soxhlet e tiveram seus extratos eluídos na coluna de Florisil®, como descrito em 4.7.2.. Os resultados são mostrados na figura 30, tendo a média das duas recuperações com *clean up* pelo Florisil® comparadas à média de três extratos limpos em colunas de sílica gel e alumina.

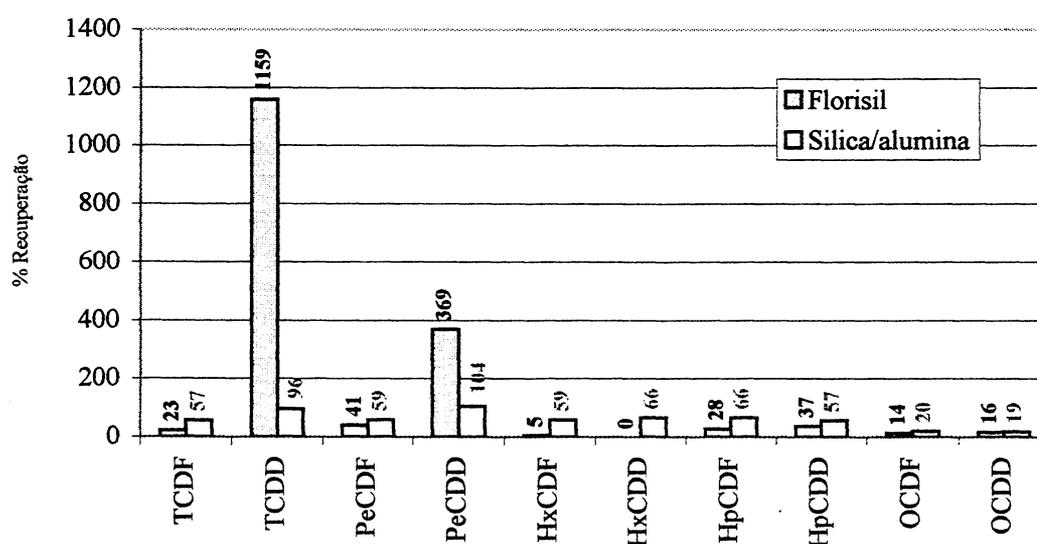


Figura 30. Percentuais de recuperação obtidos pela eluição do extrato em coluna de Florisil® frente a eluição de extrato em colunas de sílica e alumina.

Os dados apresentados na figura 30 indicam para o TCDD e PeCDD recuperações muito elevadas possivelmente pela ineficiente remoção dos interferentes, pois a presença de interferentes no extrato influencia na intensidade dos íons filhos utilizados na quantificação dos analitos. Além disso, a recuperação dos demais analitos foi abaixo das recuperações com sílica gel e alumina, indicando uma certa retenção dos PCDD/Fs, fornecendo inclusive uma

retenção muito acentuada para a HxCDF e HxCDD, 5 e 0 % de recuperações respectivamente.

A ineficiência na remoção dos interferentes foi bastante sentida nos próprios espectrogramas de análises destes extratos, apresentando uma influência importante no ruído da linha base. Na figura 31 é mostrado um espectrograma típico destes extratos.

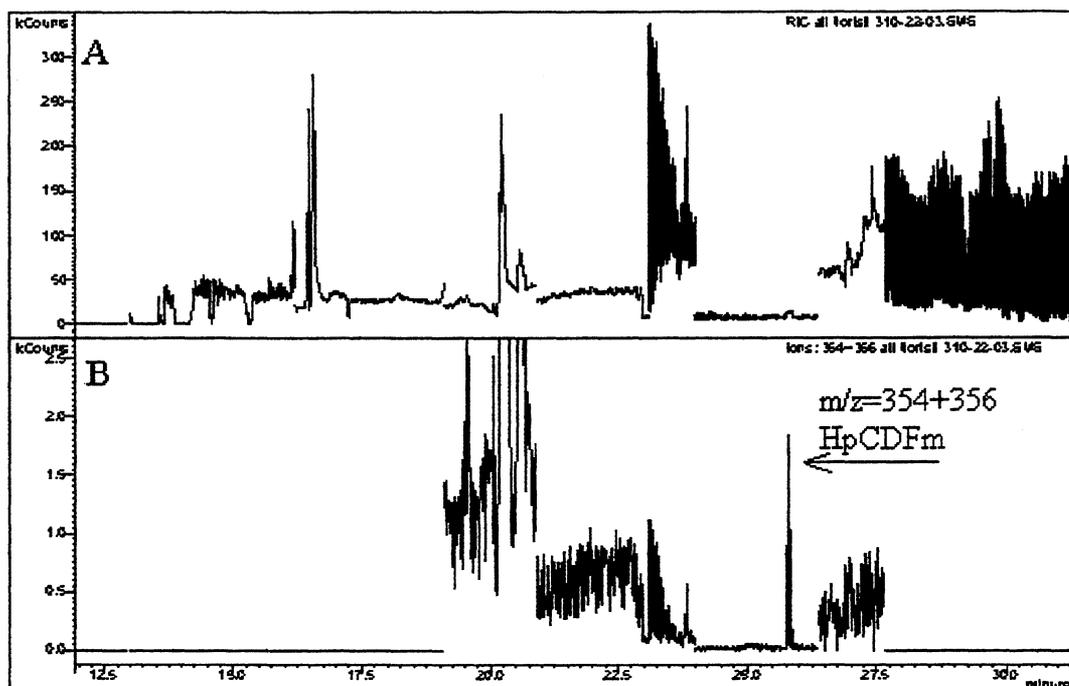


Figura 31. Espectrograma típico do extrato eluído no Florisil®; A=contagem total de íons; B= íons de $m/z=354+356$ (HpCDFm), $t_r = 25,7$ min.

A figura 31 indica no espectrograma A, contagem total de íons, a presença de um grande número de compostos, influenciando inclusive a linha base. No entanto, pelo uso do monitoramento dos íons filhos, como exemplificado no espectrograma B, pode-se reduzir a influência destes interferentes, porém, acredita-se ser muito provável que tais compostos aumentem a intensidade dos íons monitorados. Esta influência ocorrendo nos fragmentos de quantificação dos PIs afeta a sua área e, portanto toda a quantificação.

Dessa forma tanto pela influência observada nos percentuais de recuperação descritos na figura 30, como pela presença de interferentes sugerida nos espectrogramas da figura 31, e considerando que a amostra empregada teve a maior parte dos interferentes removida quando do preparo do branco, tem-se que o Florisil® não se mostrou adequado aos fins propostos.

5.12 TEMPOS DE CADA ETAPA DA ANÁLISE DE PCDD/FS

A análise de PCDD/Fs caracteriza-se por apresentar etapas de preparação da amostra que consomem períodos de tempo prolongados. Assim, com o objetivo de informar os períodos necessários gastos usualmente em cada uma das etapas descritas anteriormente são mostrados na tabela XXV estes períodos.

Tabela XXV. Etapas da preparação da amostra para análise de PCDD/Fs em cinzas leves e períodos de tempo usualmente consumidos por etapa.

Etapa	Tempo necessário (h)
Lavagem com HCl	4
Filtração cinzas	4
Secagem cinzas (dessecador)	24
Extração Soxhlet	16
Extração US	4
Extração DC	2
Partição ácido/base	8
Concentração 300 mL de tolueno à 2 mL	2
Colunas de sílica, alumina e carbono/celite	4
Concentração à secura do extrato	2 a 3
Análise no CG-MS, 3-4 injeções	3
Tempo total	SOX 68 h; DC 54h; US 56h

Os períodos de tempo demonstrados na tabela XXV, fornecem para extração com Soxhlet uma demanda de 68 horas. Período este que, considerando 8 horas diárias, transforma-se em duas semanas para análise, enquanto com DC ou US reduz-se aproximadamente 2 dias do tempo total de análise.

5.13 APLICAÇÃO DA EXTRAÇÃO POR DC EM AMOSTRAS DE INCINERADOR

Na tentativa de avaliar a aplicabilidade da extração com DC em amostras de cinzas para identificação e quantificação de PCDD/Fs foram realizados alguns ensaios com amostras de um incinerador de lixo hospitalar. As amostras foram extraídas por Soxhlet e DC, sendo a primeira tomada como a técnica de confronto. Para ambas as amostras de cinzas pesaram-se

10 gramas de amostra e realizou-se a análise em duplicata, com a a modificação de se concentrar à 100 μL o extrato final por ser uma amostra real e poder conter muitos interferentes e concentrações altas de PCDD/Fs.

As extrações por Soxhlet foram conduzidas conforme descrito no item 4.6.2. O extrato gerado seguiu o *clean up* descrito no item 4.7.2, com a eliminação da coluna de carbono/celite pelos motivos expostos nos itens 5.4 e 5.5 e as condições cromatográficas dos itens 4.8 e 4.9.

Já as extrações por DC foram conduzidas conforme descrito no item 4.6.4. O extrato gerado por este procedimento seguiu o *clean up* descrito no item 4.7.2, com a eliminação da coluna de carbono/celite pelos mesmos motivos da extração com Soxhlet. A análise seguiu as condições cromatográficas dos itens 4.8 e 4.9.

Na figura 32 é apresentado um espectrograma de uma das extrações por DC, monitorado para os íons de $m/z=243+245$, $252+254$ e $259+261$, característicos da TCDFn, TCDFm e TCDDn respectivamente.

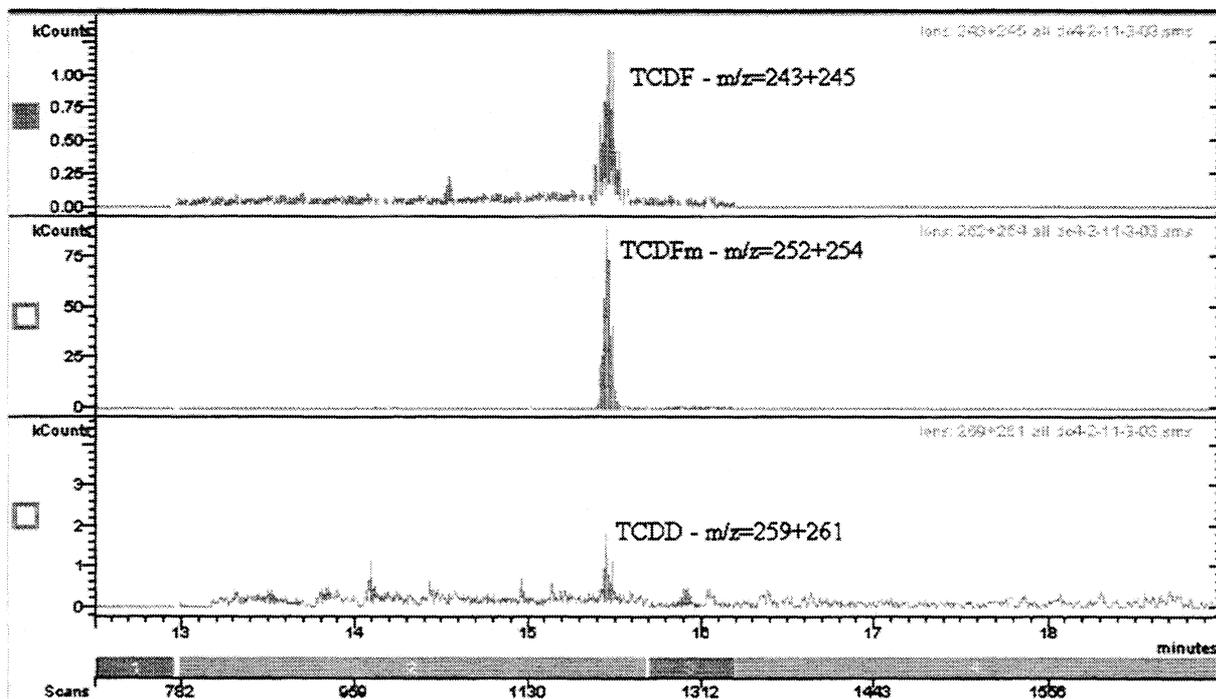


Figura 32. Espectrograma de uma amostra de cinzas leves extraída com DC e monitoramento dos íons de $m/z=243+245$, $252+254$ e $259+261$, da TCDFn, TCDFm e TCDDn.

Pode ser observado que mesmo com um pouco de interferência na linha base do TCDF e TCDD é possível a quantificação do pico gerado. Os valores encontrados para cada

amostra extraída com Soxhlet e DC são mostrados na tabela XXVI, bem como o desvio padrão (s) e o número de injeções (n). As amostras foram denominadas de Am. 1 e Am. 2.

Tabela XXVI. Quantidades encontradas em ng g^{-1} de PCDD/Fs nas cinzas obtido com Soxhlet e DC. Am.=Amostra; n=número de injeções; s=desvio padrão.

Analito	Soxhlet (ng g^{-1})			Disruptor Celular (ng g^{-1})		
	Am. 1; n=3	Am. 2; n=3	Média \pm s	Am. 1; n=3	Am. 2; n=3	Média \pm s
TCDF	30,97	33,26	32 \pm 1,6	33,67	33,26	33 \pm 0,29
TCDD	539,55	460,19	500 \pm 56,1	284,57	400,00	340 \pm 81,6
PeCDF	16,40	16,18	16 \pm 0,15	nd	nd	nd
PeCDD	nd	nd	nd	nd	nd	nd
HxCDF	15,77	8,33	12 \pm 5,3	1,82	7,00	4,4 \pm 3,67
HxCDD	163,44	185,74	175 \pm 15,8	191,99	185,74	190 \pm 4,4
HpCDF	41,75	48,09	45 \pm 4,5	48,67	45,00	47 \pm 2,6
HpCDD	246,93	254,80	250 \pm 5,6	248,29	254,80	250 \pm 4,6
OCDF	286,72	322,02	305 \pm 25	296,71	322,02	310 \pm 7,5
OCDD	350,15	352,18	350 \pm 1,4	362,75	352,18	360 \pm 7,5

nd = não detectado; não foi estabelecido neste estudo o limite de detecção do método.

Os valores encontrados de PCDD/Fs nos referidos extratos tiveram as concentrações expressas em ng g^{-1} descritas na tabela XXVI. As quantidades de PCDD/Fs encontradas variaram de 12 a 500 ng g^{-1} para extração com Soxhlet, com desvios padrões oscilando entre 0,15 e 56,1. Enquanto que, para DC as quantidades variaram de 4,4 a 340 ng g^{-1} , com desvios padrões oscilando de 0,29 a 81,6. A PeCDD não foi identificada por nenhuma das duas técnicas de extração. No entanto o congênero pentaclorado do furano (PeCDF) foi detectado por Soxhlet e não por DC.

Estes dados indicam um comportamento, já observado junto às recuperações dos padrões de PCDD/Fs, de uma menor recuperação dos analitos com DC. No entanto, para avaliar com maior clareza a equivalência destes resultados o teste t, descrito anteriormente, foi empregado. Antes, porém, estabeleceu-se o cálculo da toxicidade equivalente (TEQ), considerando os fatores de toxicidade equivalente (TEF), para permitir a comparação da equivalência, pelo teste t, tanto da quantidade de cada analito analisado por Soxhlet e DC, como do TEQ.

Os resultados obtidos são apresentados na tabela XXVII, onde se têm as médias das quantidades identificadas para as duplicatas do Soxhlet e DC, com os desvios respectivos, os fatores de toxicidade equivalente (TEFs) de cada congênero, a toxicidade equivalente (TEQ),

o resultado do $t_{\text{calculado}}$ para cada congênero, o TEQ e a equivalência obtida comparando o $t_{\text{calculado}}$ com o t_{tabelado} .

Tabela XXVII. Quantidades identificadas de PCDD/Fs, desvio padrão (s), fatores de toxicidade equivalente (TEFs) e a toxicidade equivalente (TEQ), $t_{\text{calculado}}$, t_{tabelado} e equivalência.

Analito	Média ± s Soxhlet (ng g ⁻¹)	Média ± s DC (ng g ⁻¹)	TEF	$t_{\text{calculado}}$	t_{tabelado}^a	Equivalência
TCDF	32 ± 1,6	34 ± 0,29	0,1	1,161	4,303	E
TCDD	500 ± 56,1	340 ± 81,6	1	2,250	4,303	E
PeCDF	16 ± 0,15	nd	0,5	-	-	D
PeCDD	nd	nd	1	-	-	E ^b
HxCDF	12 ± 5,3	4,4 ± 3,67	0,1	1,687	4,303	E
HxCDD	175 ± 15,8	190 ± 4,4	0,1	1,233	4,303	E
HpCDF	45 ± 4,5	47 ± 2,6	0,01	1,240	4,303	E
HpCDD	250 ± 5,6	250 ± 4,6	0,01	0,133	4,303	E
OCDF	305 ± 25,0	310 ± 17,9	0,0001	0,230	4,303	E
OCDD	350 ± 1,4	360 ± 7,5	0,0001	1,171	4,303	E
I-TEQ^c	533 ± 56,1^c	370 ± 81,6^c		2,365	4,303	E

nd = não detectado; ^a Para 2 graus de liberdade e 95 % de confiança; ^b Os resultados foram considerados equivalentes por não terem sido identificados nenhum dos congêneros das PeCDDs nas duas técnicas consideradas; ^c O cálculo da TEQ foi realizado pela equação 1, $TEQ = \sum_{i=1}^n (\text{congênero}_i \times TEF_i)$, fornecendo o valor conhecido por *International Toxicity Equivalent (I-TEQ)*.

Os dados mostrados na tabela XXVII indicam que todos os $t_{\text{calculado}}$ foram menores que o t_{tabelado} de 4,303, exceção feita aos resultados da PeCDF e PeCDD, sugerindo equivalência entre a extração por DC frente a por Soxhlet para os demais analitos. Como a PeCDD não foi identificada, considerou-se o resultado discordante para este congênero. Acredita-se que isto tenha ocorrido devido aos seguintes aspectos: a quantidade de PeCDF presente na amostra era pequena (16 ng g⁻¹ por Soxhlet); a extração por DC tende a extrair com menor eficiência que Soxhlet e por isso a quantidade possivelmente extraída com DC acabou sendo muito pequena para ser detectada pelo MS/MS. Já o PeCDD não foi identificado em nenhuma das extrações possivelmente devido a sua ausência nas cinzas em questão, resultado que foi concordante nas duas técnicas. Além disso, o resultado final de TEQ para a amostra de cinzas, com valores de 533 ± 56,1 ng g⁻¹ (Soxhlet) e 370 ± 81,6 ng g⁻¹ (DC) é considerado equivalente pela avaliação do teste t.

Assim, os resultados apresentados, com as devidas ressalvas feitas anteriormente, suportam que haja equivalência entre a extração por DC frente ao Soxhlet, o qual foi tomado como técnica de confronto. Comparando-se os dados obtidos com os da literatura, verifica-se

uma concordância, uma vez que os da literatura são: 834 ng g⁻¹ I-TEQ [62] e 63, 1599, 494 e 525 ng g⁻¹ I-TEQ [47] para amostras de cinzas leves de incineradores.

A principal vantagem do uso do DC se dá com respeito ao tempo gasto na extração, pois, com o DC, considerando a extração no equipamento (3 ciclos de 4 minutos) mais a etapa de centrifugação das cinzas gasta-se em torno de duas horas, enquanto com Soxhlet este período é de 16 horas.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

Os dados obtidos neste trabalho permitem delinear as seguintes conclusões:

1- a técnica de extração por ultra-som convencional apresentou pouca eficiência para a extração de dioxinas e furanos, uma vez que os valores de recuperação obtidos para a TCDD foram da ordem de 10% dos valores obtidos na extração por Soxhlet, ficando fora dos critérios de aceitabilidade adotados (EPA). Acredita-se que esta ineficiência esteja associada a elevada afinidade dos analitos pela matriz e a baixa potência do equipamento utilizado.

2- a técnica de extração por disruptor celular (DC) se mostrou adequada para a extração de dioxinas e furanos, devido às recuperações com DC terem ficado dentro dos critérios de aceitabilidade do método EPA 1613. Além disso, os resultados puderam ser considerados estatisticamente equivalentes aos que foram obtidos com a técnica de confronto (Soxhlet), indicando uma potencialidade do uso de DC com respeito à extração de PCDD/Fs.

3- o Florisil®, testado para limpeza do extrato, não apresentou bons resultados em relação ao *clean up* realizado com a seqüência de colunas de sílica e alumina.

4- o uso do detector de massas de baixa resolução, modelo "ion trap" no modo MS/MS, se apresentou eficiente para a análise de PCDD/Fs mesmo em baixas concentrações, permitindo a detecção de quantidades na ordem de 4 ng de HxCDF em uma amostra real.

5- o sistema MS/MS, é eficaz na remoção dos interferentes do *trap*, porém por si só não consegue eliminar todos os interferentes, sendo a etapa de *clean up* essencial para que a técnica apresente os resultados esperados.

6- entre as técnicas de extração utilizadas neste estudo, a extração por DC pode ser indicada como uma alternativa ao Soxhlet, na análise de PCDD/Fs.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Wittich M. R., *Biodegradation of Dioxins and Furans*. GBF-National Research Center for Biotechnology Braunschweig, Germany. Springer. 1997.
- (2) Roeder R.A., *J. Anim. Sci.*, 1998, 76, 142.
- (3) Lino M. C., Pena A. S., Baeta M. L., Silveira M. I. N., *Revista Portuguesa de Farmácia*, 2000, 57.
- (4) Environmental Protection Agency US, *Inventory of Dioxins Sources Draft Review*. Não publicado, 1998
- (5) IARC Monographs, *Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans: Polychlorinated Dibenzo-para-dioxins and Dibenzofurans*, WHO. 1997, V.69.
- (6) Doi H., Baba T., Tohyama C., Nohara K., *Chemosphere*, 2003, 52, 655.
- (7) Hu K., Bunce N., Chittim B., Tashiro C., Yeo B., Sharrat B., Campbell F., Potter D., *Environ. Sci. Technol.*; 1995, 29, 2603.
- (8) Zakrzewski S. F., *Principles of Environmental Toxicology*, ACS Monography 190. 2ª Ed., 1997.
- (9) Disponível em (www.geocities.com/RainForest/Wetlands/8552/Dossier1.htm), acessado em 10/03/03
- (10) Huff J.E.; Salmon A.G.; Hooper N.K.; *Cell Biol Toxicol*, 1991, 7, 67.
- (11) Van Leeuwen F.X. R., Feeley M., Schrenk D., Larsen J.C., Farland W., Younes M., *Chemosphere*, 2000, 40, 1095.
- (12) Becher, H; Flesch-Janys, D; Kauppinen, T; et al. *Cancer Causes Control* 1996, 7, 312.
- (13) Becher H.; Steindorf K.; Flesch-Janys D., *Environ Health Perspect*, 1998, 106, 663.
- (14) Flesch-Janys, D; Becher, J; Berger, J; et al., 1999, 44, 379.
- (15) Flesch-Janys D.; Berger J.; Gurn P., *Am J Epidemiol*, 1995, 142, 1165.
- (16) Ott, MG; Zober, A., *Occup Environ Med*, 1996, 53, 844.
- (17) Ott, MG; Zober, A. *Occup Environ Med*, 1996, 53, 606.
- (18) Ott, MG; Messerer, P; Zober, A., *Int Arch Occup Environ Health*, 1993, 65, 1.
- (19) Ott, MG; Zober, A; Germann, C., *Chemosphere*, 1994, 29, 2423.
- (20) Hester, R. E., Harrison, H.M., *Chlorinated Organic Micropollutants*. The Royal Society of Chemistry, V. 6, 1996.
- (21) Schwarzenbach R. P., Gschwend P. M., Imboden D. M., *Environmental Organic Chemistry*, 1 th ed. John Wiley & Sons, Inc., New York, 1992.
- (22) Chen H., Lee C., Liao P., Guo Y., Chen C., Su H., *Environ. Research*, 2003, 91, 172.
- (23) Fries G.F., *J. Anim. Sci.*; 1995, 73, 1639.
- (24) Taylor P. H., Lenoir D., *The Science of the Total Environment*, 2001, 269, 1.
- (25) Addink R., Bakker W., Olie K., *Environ. Sci. Technol.*; 1995, 29, 2055.
- (26) Addink R., Atonioli M., Govers H., Olie K., *Environ. Sci. Technol.*; 1996, 30, 833.
- (27) Naikwadi K. P., Karasek F. W., *Chemosphere*, 1989, 19, 299.

-
- (28) Wallenhorst Th. Kraub P., Hagenmaier H., *Organohalogen Compounds*; **1995**, 24, 157.
- (29) Jiang K., Lingium L., Chen Y., Jin J., *Chemosphere*; **1997**, 941.
- (30) Brzuzly L. P., Hites A., *Envirom. Sci. Technol.*, **1996**, 30, 6, 1797.
- (31) Pignatello J. J., Huang L. Q., *Water Res.* Vol. 27, **1993**, 12, 1731.
- (32) Braga A., Krauss C., *Organohalogen Compounds*, **2000**, 46, 354.
- (33) Liem A. K. D., Furst P., Rappes C., *Food Additivies and Contaminants*, **2000**, 17, 241.
- (34) Svensson B-G., Nilsson A., Jonsson E., Schütz A., Åkesson B., Hagmar L., *Scand J. Work Environ Health*, **1995**, 21, 96.
- (35) Horstmann M., McLACHLAN M. S., *Chemosphere*, **1995**, 31, 2887.
- (36) Nakagawa R., Hirakawa H., Iida T., Matsueda T., *J. AOAC International*, **1999**, 82, 716.
- (37) Horstmann M., Mclachlan M. S., *Chemosphere*, **1995**, 31, 2887.
- (38) Schecter A., LI L., *Chemosphere*, **1997**, 35, 5-7, 1449.
- (39) Singh B. S., Kulshrestha G., *J. Chromatog. A*, **1997**, 774, 97.
- (40) Bautz H., Polzer J. Stieglitz L., *J. Chromatog. A*. **1998**, 815, 231.
- (41) Kemmochi Y., Tsutsumi K. *Chemosphere*, **2001**, 43, 433.
- (42) Focant J-F., Eppe G., Pauw D., *Chemosphere*, **2001**, 43, 417.
- (43) Método EPA 8280a, disponível em <http://www.epa.gov/epaoswer/hazwaste/test/pdfs/8280a.pdf>, acessado em 11/07/03.
- (44) Método EPA 8290, disponível em <http://www.epa.gov/epaoswer/hazwaste/test/pdfs/8290.pdf>, acessado em 11/07/03.
- (45) Charles M. J., Green W. C., Marbury G. D., *Environ, Sci. Technol.*, 1995, 29, 1741.
- (46) Wu W., Schramm K., Henkelmann B., Xu Y., Zhang Y., Kettrup A., *Chemosphere*, **1996**, 33, 11, 2229.
- (47) Windal I., Eppe G., Gridelet A.C., Pauw E.D.; *J. Chromatog. A*, **1998**, 819, 187.
- (48) Bautz H., Polzer J., Stieglitz L., *J. Chromatog. A.*, **1998**, 815, 231.
- (49) Harris D.C., *Quantitative Chemical Analysis*, 5th ed. W.H. Freeman and Company, New York, **1998**.
- (50) Frank. A. Settle, Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry, **1997**.
- (51) Karasek W., Krishnat N., Beard A., *J. Chromatog.*, **1992**, 589, 265.
- (52) Método EPA 3550, disponível em <http://www.epa.gov/epaoswer/hazwaste/test/pdfs/3550b.pdf>, acessado em 11/07/03.
- (53) Mohr K., Ludwig T., Brockmann Ch., Grund H., Ortner H., Hoffmann P., Jager J., *Chemosphere*, **1999**, 39, 1937.
- (54) Ebert J., Lorenz W., Bahadir M., *Chemosphere*, **1999**, 6, 997.
- (55) Linding C., *Chemosphere*, **1998**, 37, 405.
- (56) Adriaens P., Fu Q., Grbic-Galic D., *Envirom. Sci. Technol.*; **1995**, 29, 2252.
- (57) Ramos L., Hernandez L. M., Gonzalez M.J., *J. Chromatog. A*, **1997**, 759, 127.
- (58) Focant J., Eppe G. Pauw D., *Chemosphere*; **2001**, 43, 417.
- (59) Kemmochi Y., Tsutsumi K. *Chemosphere*; **2001**, 43, 433.

-
- (60) Karasek F. W., Clement R. E., *J. Chromatog*, **1982**, 234, 395.
- (61) Método EPA 1613, disponível em <http://www.epa.gov/epaoswer/hazwaste/test/pdfs/1613.pdf> acessado em 11/07/03.
- (62) Karasek F. W., Tong H. Y., *Chemosphere*, **1986**, 1141, 15.
- (63) Anderson RI, *Practical Statistics for Analytical Chemistry*, Nostrand, New York, **1987**. ch. 4.
- (64) Mills P. A., *J. A.O.A.C.*, **1968**, 51, 29.