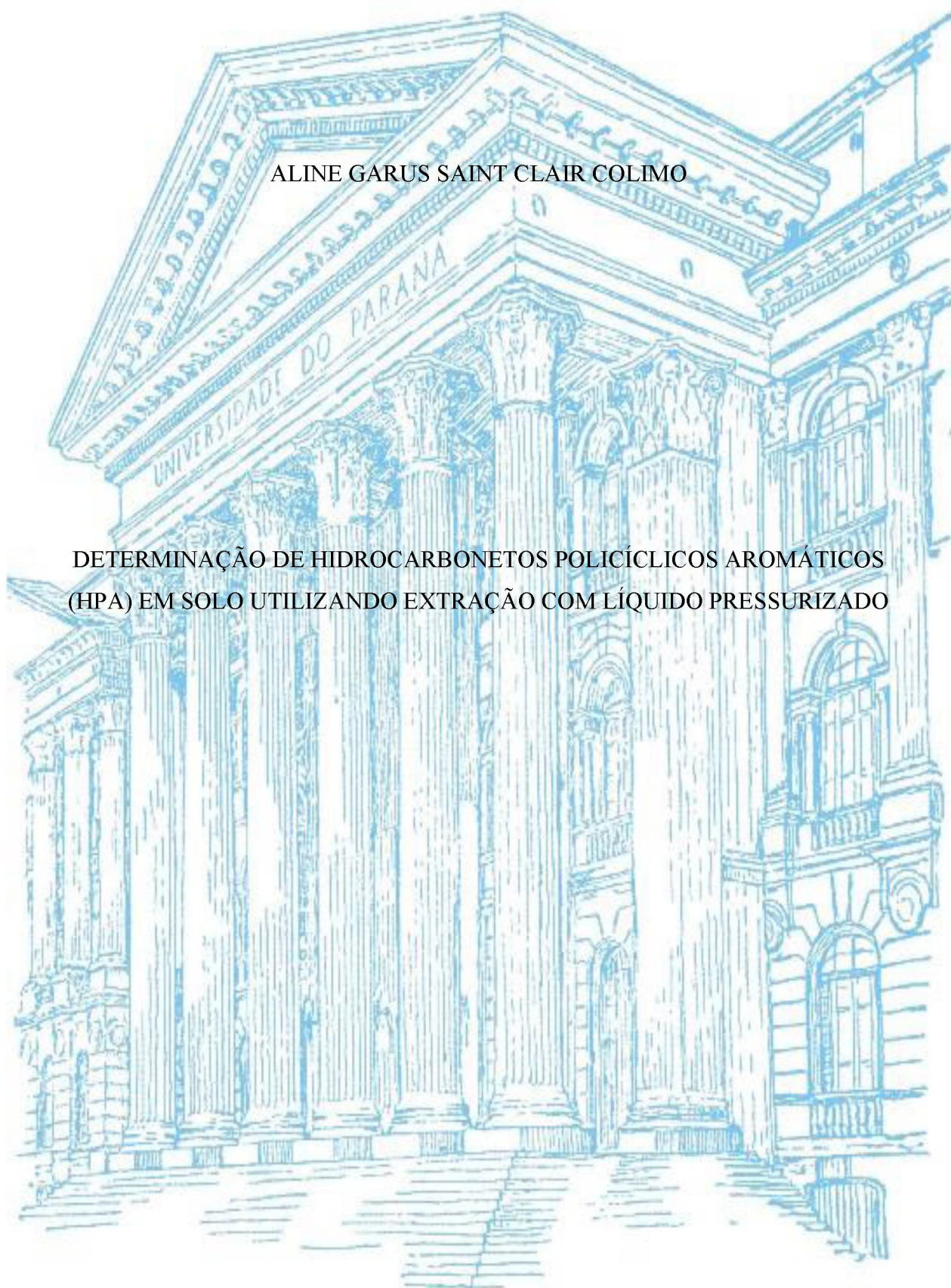


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ALINE GARUS SAINT CLAIR COLIMO

DETERMINAÇÃO DE HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS
(HPA) EM SOLO UTILIZANDO EXTRAÇÃO COM LÍQUIDO PRESSURIZADO



CURITIBA

2017

ALINE GARUS SAINT CLAIR COLIMO

DETERMINAÇÃO DE HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS
(HPA) EM SOLO UTILIZANDO EXTRAÇÃO COM LÍQUIDO PRESSURIZADO

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção
do grau de Doutora em Química, no Programa de Pós
Graduação em Química, Setor de Ciências Exatas, da
Universidade Federal do Paraná

Orientador: Prof. Dr. Marco Tadeu Grassi
Co-orientadora: Prof.^a Dra. Iara Messerschmidt

CURITIBA

2017

Catálogo na Fonte: Sistema de Bibliotecas, UFPR
Biblioteca de Ciência e Tecnologia

C696d Colimo, Aline Garus Saint Clair
Determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) em
solo utilizando extração com líquido pressurizado. [recurso eletrônico] /
Aline Garus Saint Clair Colimo – Curitiba, 2017.

Tese - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Exatas,
Programa de Pós-graduação Química.

Orientador: Marco Tadeu Grassi

Coorientadora: Iara Messerschmidt

1. Cromatografia gasosa. 2. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos
(HPA). 3. Solo. I. Universidade Federal do Paraná. II. Grassi, Marco
Tadeu. III. Messerschmidt, Iara. IV. Título.

CDD: 547.6

Bibliotecária: Roseny Rivellini Morciani CRB-9/1585

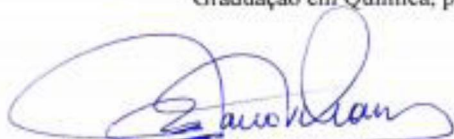
TERMO DE APROVAÇÃO

**DETERMINAÇÃO DE HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS
AROMÁTICOS (HPA) EM SOLO UTILIZANDO EXTRAÇÃO COM
LÍQUIDO PRESSURIZADO**

por

ALINE GARUS SAINT CLAIR COLIMO

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Química, pela Comissão Examinadora composta por:



Prof. Dr. Marco Tadeu Grassi
Orientador
Dep. de Química – UFPR



Prof.ª Dr.ª Ana Flavia Locateli Godoi
Eng. Ambiental – UFPR



Prof. Dr. Vander de Freitas Melo
Dep. de Solos e Eng. Agrícola – UFPR



Prof.ª Dr.ª Andrea Pinto de Oliveira
Dep. de Química – UFPR



Prof. Dr. Gilberto Abate
Dep. de Química – UFPR

Curitiba, 20 de dezembro de 2017.

À todos os pesquisadores que agem como cidadãos para o objetivo do bem comum.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Marco, orientador que esteve presente em todos os momentos, do início ao fim do doutorado, agradeço por todas as orientações e por ter me dado o apoio necessário para a realização da pesquisa.

À Professora Iara por ter aceito o desafio de ser co-orientadora deste trabalho e por todos os momentos em que pude contar com a sua ajuda.

Ao Projeto Xisto, sobretudo a Embrapa, por terem concedido a bolsa que possibilitou a realização desta pesquisa, mas sou grata também pelo acolhimento e por toda a confiança depositada no meu trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Paraná e ao colegiado do curso por serem compreensivos com o processo de pesquisa e por terem concedido as prorrogações necessárias para que a pesquisa pudesse ser concluída.

À minha família por todo o apoio e carinho durante estes quatro anos. Obrigada por entenderem os momentos em que não pude me fazer presente.

Aos amigos e colegas do LABPPAM, LQAA e GQA agradeço pelo caminho percorrido junto, pelo apoio, pela troca de ideias e de favores durante a realização da pesquisa. Sou grata a cada um de vocês por terem cruzado a minha vida e terem feito desse processo de doutoramento um período mais leve.

“Quando Alice, após correr por muito tempo de mãos dadas com a rainha, percebe, espantada, ter ficado no mesmo lugar, aquela lhe diz:

Aqui, sabe, é necessário toda a corrida que você tem para se manter no mesmo lugar. Se você quer ir a um lugar diferente, você deve correr pelo menos duas vezes mais rápido que aquilo!”

(Lewis Carroll; Alice através do Espelho)

RESUMO

O xisto retornado é o subproduto gerado em maior quantidade no beneficiamento do xisto (folhelho pirobetuminoso). Tem em sua composição um considerável teor de matéria orgânica, silício e nutrientes, o que o torna um produto com potencial para o uso na agricultura. No entanto, o processo de retortagem modifica a composição inicial da rocha, o que faz com que esse material possa liberar compostos como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), sendo assim fundamental a investigação sobre a sua viabilidade como insumo agrícola. Nesse trabalho, foi avaliado o teor de HPA em um experimento de campo no qual o solo que recebeu a adição de xisto retornado em doses crescentes num período de cinco anos. Para efetuar a quantificação dessas espécies químicas, duas metodologias de preparo de amostra envolvendo extração com líquido pressurizado foram desenvolvidas, e as análises foram efetuadas por cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas. As concentrações de HPA encontradas foram abaixo do limite máximo estabelecido pela legislação brasileira mais restritiva, que é da Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) e que considera o valor de prevenção de até $0,025 \text{ mg kg}^{-1}$ solo de benzo(a)antraceno. Os resultados indicaram também a falta de correlação entre os tratamentos e a presença de HPA no solo, uma vez que essas são substâncias ubíquas, podendo ser oriundas de outras fontes naturais e ou antropogênicas. Dessa maneira, sugere-se que o uso do xisto retornado como insumo agrícola não proporciona um aumento na concentração de HPA no solos, sendo seguro para o meio ambiente do ponto de vista dessa avaliação.

Palavras-chave: Solo. HPA. Extração com Líquido Pressurizado. Cromatografia Gasosa.

ABSTRACT

The retorted oil shale is the byproduct generated in greater quantity in the oil shale processing (pyrobituminous shale). It has in its composition a considerable content of organic matter, silicon and nutrients, which makes it a product with potential for the use in agriculture. However, the retorting process modifies the initial composition of the rock, which can lead this material to release compounds such as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH). Therefore, the investigation of its viability as an agricultural product is crucial. In this work, the PAH content was evaluated in a field experiment with a soil enriched with retorted oil shale in increasing doses for five years. In order to quantify these chemical species, two sample preparation methodologies were developed, and the analyses were performed by gas chromatography mass spectrometry. PAH concentrations found were all below the maximum limit established by the most restrictive Brazilian legislation, which is the National Environmental Council (CONAMA) who considers the preventive value of up to 0.025 mg kg^{-1} of benzo(a)anthracene. Results also indicated lack of correlation between treatments and the presence of PAH in the soil, since they are ubiquitous substances that can derive from natural and anthropogenic sources. In this way, it can be suggested that the use of the retorted shale as agricultural input does not provide an increase in the concentration of PAH in soils, so it is safe for the environment from the point of view of this evaluation.

Keywords: Soil. PAH. Pressurized Liquid Extraction. Gas Chromatography.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	6
2 REVISÃO	7
2.1 NOÇÕES DE SOLOS E FERTILIDADE	7
2.2 XISTO COMO INSUMO AGRÍCOLA	8
2.2.1 XISTO RETORTADO	10
2.3 HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS (HPA)	11
2.4 DETERMINAÇÃO DE HPA EM AMOSTRAS AMBIENTAIS	15
2.5 PREPARO DE AMOSTRA	16
2.5.1 Extração de HPA de amostras de solo	16
2.5.2 <i>Clean up</i> de extratos de solo contendo HPA	19
3 OBJETIVOS	24
3.1 OBJETIVO GERAL	24
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
4 METODOLOGIA	24
4.1 REAGENTES	24
4.2. DESCONTAMINAÇÃO DE FRASCOS E VIDRARIAS	25
4.3 AMOSTRAS	25
4.4 ESTABELECIMENTO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO	28
4.5 PREPARO DAS SOLUÇÕES-PADRÃO	30
4.6 CURVA ANALÍTICA	30
4.7 FORTIFICAÇÃO DA AMOSTRA DE SOLO (<i>SPIKING</i>)	30
4.8 ESTABELECIMENTO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO COM LÍQUIDO PRESSURIZADO SELETIVA (SPLE)	31
4.9 ANÁLISE DAS AMOSTRAS DE SOLO	32
4.10 DESENVOLVIMENTO DA METODOLOGIA DE EXTRAÇÃO COM LÍQUIDO PRESSURIZADO E MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA (PLE-DLLME)	32
4.10.1 Primeira etapa: otimização da microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME)	32
4.10.2 Segunda etapa: DLLME aplicada a extratos de solo PLE concentrados e ressuspensos em acetona	33

4.10.3 Terceira etapa: DLLME aplicada a extratos de solo PLE (alíquota sem evaporação do solvente)	35
4.11 ENSAIOS DE RECUPERAÇÃO PARA AVALIAR A EXATIDÃO DOS MÉTODOS SPLE E SPE-DLLME	36
4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA	37
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5.1 ESTABELECIMENTO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO	37
5.2 CURVA ANALÍTICA	39
5.3 EXTRAÇÃO E <i>CLEAN UP</i> – ESTRATÉGIAS	43
5.4 FORTIFICAÇÃO DO SOLO	44
5.5 ESTABELECIMENTO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO COM LÍQUIDO PRESSURIZADO SELETIVA (SPLE) E ANÁLISE DAS AMOSTRAS DE SOLO	45
5.6 DESENVOLVIMENTO DA METODOLOGIA DE EXTRAÇÃO COM LÍQUIDO PRESSURIZADO E MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA (PLE-DLLME)	50
5.6.1 Primeira etapa: otimização da microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME)	54
5.6.2 Segunda etapa: DLLME aplicada a extratos de solo PLE concentrados e ressuspensos em acetona	55
5.6.3 Terceira etapa: DLLME aplicada a extratos de solo PLE (alíquota sem evaporação do solvente)	56
6 CONCLUSÕES	68
REFERÊNCIAS	70

1 INTRODUÇÃO

A atividade humana depende do solo, não apenas para a produção de alimentos como também para extrair materiais vitais para a sua sobrevivência, dentre eles os empregados na construção de abrigo e confecção de vestimentas. Assim, é essencial que o solo seja fértil e produtivo para fornecer o que é necessário para o crescimento das plantas que dão origem a esses produtos. Devido a diversos fatores, como intemperismo e práticas agrícolas inadequadas, o solo pode tornar-se improdutivo, requerendo assim a adição de condicionadores de solo e fertilizantes para restaurar o seu equilíbrio. Para este fim e como uma alternativa aos produtos agrícolas sintéticos, destaca-se o pó de rocha, um material de baixo custo que tem se mostrado eficiente e compatível com o perfil da agricultura orgânica e familiar no Brasil. Nesse sentido, os subprodutos da industrialização do xisto (folhelho pirobetuminoso) possuem uma composição orgânica e mineral que permite que eles sejam utilizados para o fornecimento de alguns nutrientes. Entretanto, tais subprodutos são ricos em compostos como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), os quais podem atuar como contaminantes tanto do solo como de águas subterrâneas. Por esse motivo, a realização de estudos sobre a presença dos HPA no solo decorrente do emprego desses materiais como insumos agrícolas, cerne de investigação do presente trabalho, é de grande importância para garantir que seu uso é seguro para o meio ambiente. Além disso, esse estudo contempla o estabelecimento e desenvolvimento de protocolos analíticos voltados para a quantificação dessas espécies químicas. Seguindo a tendência de produtos mais sustentáveis, existe uma demanda por metodologias de análise alinhadas aos princípios da Química Verde, dentre eles, a redução da escala experimental para diminuir o consumo de reagentes. Assim, para a determinação dos HPA em solo, foram propostas duas metodologias, a extração com líquido pressurizado seletiva (SPLE) e a extração com líquido pressurizado (PLE) seguida de microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME). No primeiro caso, a extração com líquido pressurizado é realizada com a adição de uma fase adsorvente na célula de extração. Desse modo, a extração dos analitos é realizada concomitantemente com a limpeza do extrato, unificando assim as duas etapas do preparo da amostra. Já a DLLME é geralmente utilizada para a extração de analitos em amostras aquosas por meio da injeção de uma mistura de um solvente dispersor e um solvente extrator, formando assim uma dispersão. De maneira alternativa, os analitos podem estar contidos no solvente dispersor e serem transferidos por meio dessa técnica para o solvente extrator, não apenas evitando a etapa de evaporação do solvente do extrato como diminuindo a presença de compostos coextraídos que podem atuar como interferentes na análise.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 NOÇÕES DE SOLOS E FERTILIDADE

O solo é um material heterogêneo que possui três fases fundamentais: a sólida, formada pelos minerais e matéria orgânica; a líquida, representada pela solução aquosa do solo e a gasosa, formada pelo ar (AKINRINDE, 2004; BRADY, 1983; LUCHESE, FAVERO e LENZI, 2001; SPOSITO, 2008). Um solo pode ser considerado fértil quando possui um equilíbrio adequado entre essas fases (LUCHESE, FAVERO e LENZI, 2001) e quando fornece quantidade adequada de nutrientes às plantas. Esses nutrientes são classificados como essenciais se a planta não se desenvolve adequadamente ou não completa o seu ciclo de vida sem uma oferta adequada deles. O gerenciamento incorreto do solo pode levar à perda dessas espécies, sendo que a ausência de qualquer uma delas atua como fator limitante e afeta o crescimento normal da planta. Nesse caso, substâncias conhecidas como fertilizantes são adicionadas ao solo, visando suprir essa necessidade além de proporcionar aumento na produção e no crescimento vegetal, mesmo em condições climáticas pouco favoráveis no período da safra (LEPSCH, 2002; AKINRINDE, 2004; BRADY, 1983).

Existem dois tipos principais de fertilizantes, os de origem natural e os artificiais. Tradicionalmente, os fertilizantes artificiais são compostos com teores definidos de sais de nitrato, fosfato e potássio, enquanto os de origem natural se referem a esterco e produtos de compostagem (AKINRINDE, 2004; BRADY, 1983; RAIJ, 1991). Nessa categoria pode-se incluir a rochagem, onde rochas moídas constituídas de diversos minerais são aplicadas no solo visando aumentar a reserva mineral. A sua vantagem é a liberação lenta de nutrientes para as plantas cultivadas durante longos períodos, além do aumento da capacidade de troca de cátions dos solos devido à formação de novos minerais de argila durante o processo de alteração da rocha. Atualmente, as práticas mais utilizadas de rochagem são a calagem e a fosfatagem natural (COLA e SIMÃO, 2012; MELAMED, GASPAR e MIEKELEY, 2007; SANTUCCI, 2012; SILVA et al., 2005).

O Brasil é um dos maiores importadores de fertilizantes e o 4º maior consumidor, embora o consumo de fertilizantes por área agricultável ainda seja muito baixo se comparado ao de países desenvolvidos (MELAMED, GASPAR e MIEKELEY, 2007). Segundo a Associação Nacional para Difusão de Adubos (ANDA), o Brasil importa cerca de 70% dos fertilizantes intermediários que são utilizados nas formulações e distribuídos ao

consumidor final, como é possível constatar pelos indicadores referentes aos três últimos anos (TABELA 1).

TABELA 1 – PRINCIPAIS INDICADORES NO SETOR DE FERTILIZANTES REFERENTE AOS ANOS 2014, 2015 E 2016

PRINCIPAIS INDICADORES NO SETOR DE FERTILIZANTES (TON)	2014	2015	2016
Produção nacional de fertilizantes intermediários*	8.817.680	9.115.260	9.040.747
Importação de fertilizantes intermediários*	24.035.600	21.087.299	24.481.089
Fertilizantes entregues ao consumidor final	32.209.066	30.201.993	34.083.415

*superfosfato simples (SSP), superfosfato triplo (TSP), fosfatos monoamônio (MAP) e diamônio (DAP),
 FONTE: ANDA (2017)

Esses valores são justificados pela dimensão da produção agrícola brasileira, pela característica dos solos brasileiros, pobres em macronutrientes, e pela produção insuficiente de fertilizantes pela indústria nacional. Nesse sentido, a rochagem mostra-se uma alternativa interessante aos fertilizantes comerciais (MELAMED, GASPAR e MIEKELEY, 2007), por ser um produto de custo acessível para a agricultura familiar (SANTUCCI, 2012).

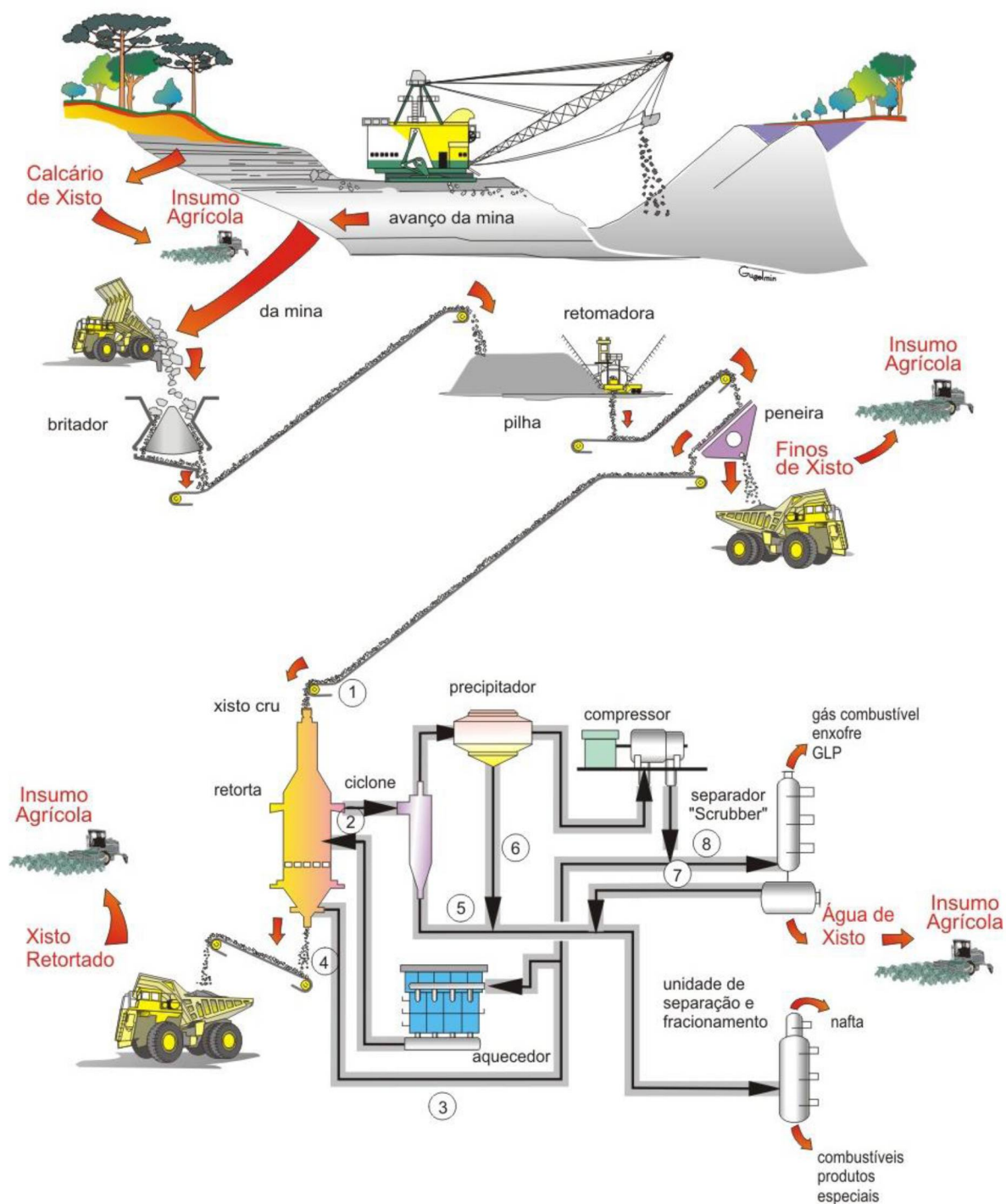
2.2 XISTO COMO INSUMO AGRÍCOLA

O xisto (folhelho pirobetuminoso) é uma rocha sedimentar formada há 250 milhões de anos, da qual se extrai óleos combustíveis, nafta, gás e enxofre em condições de alta temperatura e pressão, processo conhecido como pirólise ou retortagem. A maior reserva mundial encontra-se nos Estados Unidos, seguido pelo Brasil, o qual possui a Formação Irati que abrange os estados de São Paulo, Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Mato Grosso do Sul e Goiás (PETROBRAS, 2011).

A Petrobras, por intermédio de sua Unidade de Negócio da Industrialização do Xisto (SIX) situada em São Mateus do Sul, processa diariamente cerca de 5.500 toneladas de xisto, gerando 325 toneladas de óleo combustível, 55 toneladas de nafta industrial, 70 toneladas de gás de xisto, 35 toneladas de gás liquefeito de petróleo (GLP) e 45 toneladas de enxofre (dados fornecidos pela empresa em 2017). Existem ainda os subprodutos oriundos da rocha que não são processados. Um deles é o calcário de xisto (CX), constituído de rochas carbonáticas consideradas estéreis que não apresentam teor de óleo adequado ao processamento, mas que podem ser utilizadas como corretivos da acidez do solo. Já os finos de xisto (FX) são fragmentos da rocha de xisto que não podem ser aproveitados devido a sua pequena granulometria, a qual não se enquadra nas necessidades do processo de retortagem

(ALBA, 2010; PETROBRAS, 2011). Um esquema exemplificando o processo é apresentado na FIGURA 1.

FIGURA 1 - REPRESENTAÇÃO DO PROCESSO DE RETORTAGEM E DA OBTENÇÃO DOS PRODUTOS DO XISTO



FONTE: imagem fornecida pela empresa (2007)

Pela sua diversidade e quantidade de elementos químicos presentes em sua composição e por suas características físico-químicas, esses subprodutos constituem-se fonte

de nutrientes e matéria-prima para a formulação de fertilizantes sólidos para uso em sistemas de produção convencional e/ou de base agroecológica. O potencial de uso dos subprodutos do xisto na agricultura tem despertado o interesse de alguns órgãos brasileiros de pesquisa, como a Embrapa Clima Temperado, que desenvolve o Projeto Xisto Agrícola em parceria com a Petrobras e outras instituições de pesquisa. As frentes de pesquisa são divididas em eficiência agrônômica, segurança dos alimentos e segurança ambiental (ALBA, 2010; PEREIRA et al. 2009a). Em conjunto, visam promover o uso dos subprodutos de xisto garantindo a sustentabilidade ambiental, social e econômica, além de representar uma oportunidade para o Brasil reduzir sua dependência de insumos externos, especialmente de fertilizantes (PEREIRA et al., 2009b).

2.2.1 Xisto retornado

O xisto retornado, subproduto gerado em maior quantidade, tem em sua composição um considerável teor de matéria orgânica (15%), elevado teor de silício (52%) além de nutrientes, características que o tornam um produto com potencial para o uso na agricultura, sobretudo na recuperação de áreas degradadas (PEREIRA e VITTI, 2004). No entanto, o processo de retortagem modifica a composição inicial da rocha, o que faz com que esse material possa liberar espécies metálicas bioacumulativas e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (TUVIKENE et al., 1999; MÖLDER, 2004), sendo assim fundamental a investigação sobre a viabilidade do seu uso na agricultura (THEODORO, 2012). No trabalho de Pereira et al. (2009a), a composição desse subproduto foi estudada e foram determinados diversos elementos químicos, alguns na faixa de g kg^{-1} (Al, Ca, Fe, K, Mg, Na, P, S e Ti), outros em mg kg^{-1} (As, B, Ba, Ca, Co, Cr, Cu, Li, Mn, Mo, Ni, Pb, Se, Si, V e Zn) além dos que estão presentes na ordem de $\mu\text{g kg}^{-1}$ ou não são detectados em algumas amostras (Ag, Cd, Hg e Sn). No mesmo estudo, também foram encontrados compostos orgânicos como fenóis, hidrocarbonetos aromáticos e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) em concentrações na ordem de $\mu\text{g kg}^{-1}$ a mg kg^{-1} .

No entanto, além de conhecer a composição química desse material, é necessário determinar quais espécies serão dele dessorvidas e incorporadas ao solo, às águas subterrâneas e vegetais (ALLOWAY, 1993) quando utilizado como insumo agrícola. Os solos funcionam como filtros que diminuem o impacto ambiental de compostos orgânicos introduzidos na atmosfera, pois atuam como a primeira linha de defesa contra a lixiviação desses compostos na água subterrânea e na biosfera. Assim, para prever o comportamento

desses compostos no solo, e avaliar o risco desses compostos atingirem as águas subterrâneas, é necessário o entendimento da natureza e extensão dos processos de sorção (MCBRIDE, 1994).

Diferentes métodos têm sido desenvolvidos com o objetivo de avaliar a liberação de espécies orgânicas e inorgânicas ao ambiente (LAGER et al., 2006), principalmente por meio de experimentos em batelada e em colunas de lixiviação (DELAY et al., 2003; DELAY et al., 2007; PEREIRA et al., 2007a; PEREIRA et al., 2007b). Alguns autores sugerem que testes em batelada fornecem importantes informações sobre a influência de vários parâmetros como pH, razão sólido/líquido, agente eluente e tempo de eluição na mobilidade de contaminantes orgânicos e inorgânicos (DELAY et al., 2003; DELAY et al., 2007; LAGER et al., 2006).

No trabalho de Nicolini et al. (2011) foi estudada a presença de HPA em solos condicionados com XR, FX e/ou CX. Nesse estudo, esses compostos foram encontrados em níveis considerados ambientalmente seguros, tanto nos extratos aquosos como nos lixiviados provenientes de testes em batelada e coluna de lixiviação, respectivamente. Os HPA também foram determinados em solos que receberam diferentes tratamentos com os subprodutos do xisto, porém em um experimento que utilizava tanto xisto retornado quanto calcário de xisto e finos de xisto. Nesse trabalho, o objetivo é avaliar um experimento utilizando apenas xisto retornado, subproduto ainda em fase de estudo pelo Projeto Xisto Agrícola.

2.3 HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS (HPA)

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos são uma classe de compostos orgânicos caracterizados pela presença de dois ou mais anéis benzênicos conjugados por um par de átomos de carbono adjacente. Os HPA são formados principalmente pela combustão incompleta de materiais contendo carbono, durante o processo de queima ou pirólise (BAIRD e CANN, 2011; MANAHAN, 2000). Assim sendo, podem ser liberados em ambientes de descarte de plantas industriais que convertem carvão em combustíveis gasosos e em refinarias de petróleo e xisto (BAIRD e CANN, 2011).

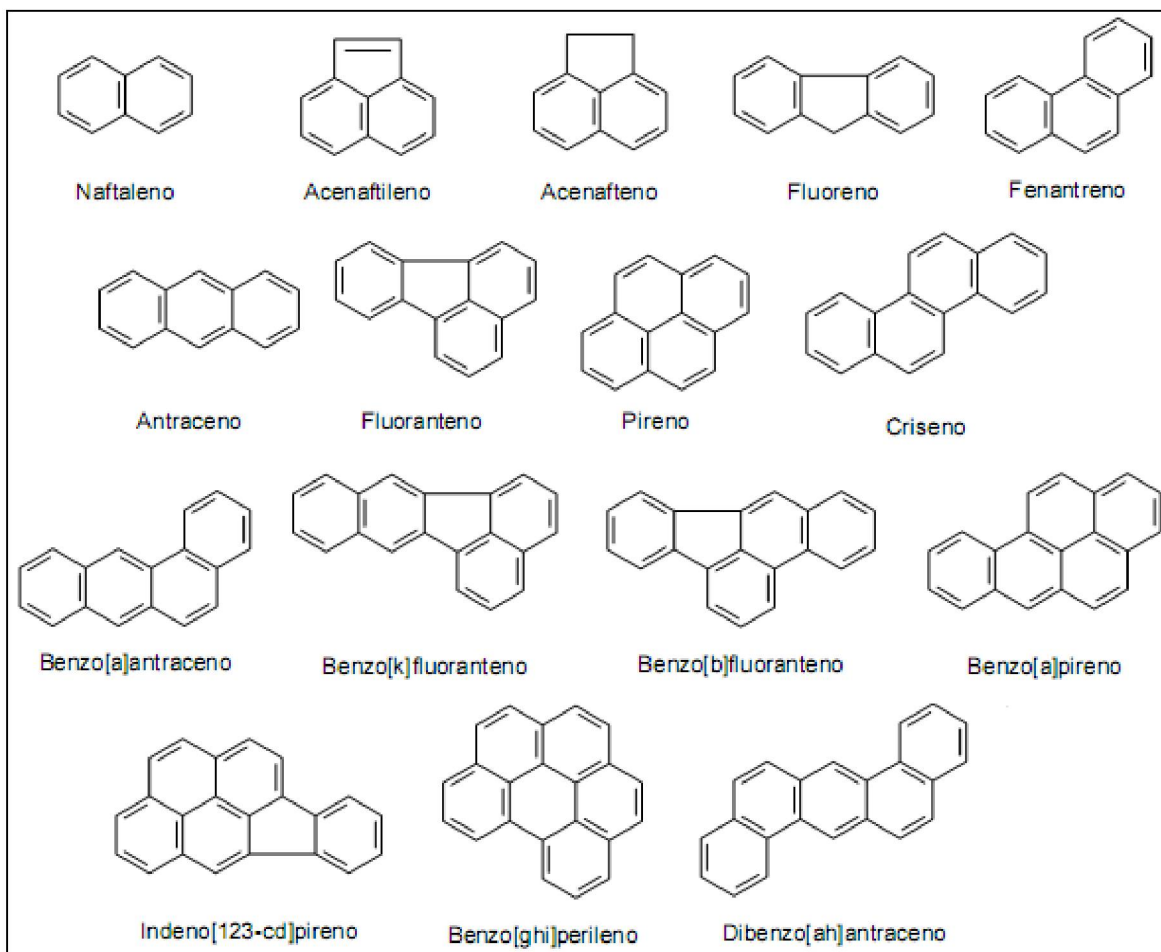
HPA contendo quatro ou menos anéis normalmente permanecem como gases se forem liberados na atmosfera, uma vez que a pressão de vapor de suas formas líquidas é relativamente alta (BAIRD e CANN, 2011). Já os seus análogos com mais de quatro anéis benzênicos não existem na atmosfera como moléculas gasosas, condensando-se e tornando-se adsorvidos na superfície de partículas de fuligem e cinzas, podendo assim deslocar-se em

longas distâncias, o que os torna ubíquos no planeta (MANAHAN, 2000; STIGLIANI e SPIRO, 2009). Quando presentes no solo, os HPA interagem rapidamente com a matéria orgânica devido à sua alta hidrofobicidade (MCBRIDE, 1994; TANG et al., 2005). Quanto maior o número de anéis, maior o efeito de sorção, fenômeno que se torna cada vez mais pronunciado no decorrer do tempo e é conhecido como *aging* (“amadurecimento” ou “envelhecimento”). Isso ocorre tanto devido à difusão das moléculas dos HPA dentro da matéria orgânica como pela formação de ligações químicas e pelo seu aprisionamento dentro dos microporos do solo. Assim, se tornam resistentes à degradação e podem permanecer no solo por centenas de anos, sendo no decorrer do tempo degradados, lixiviados e ou volatizados (HATZINGER e ALEXANDER, 1995; LUNDSTEDT, 2003).

Os HPA trazem preocupação por serem contaminantes ambientais potencialmente cancerígenos quando transformados por reações metabólicas no corpo humano e em animais (BAIRD e CANN, 2011; MANAHAN, 2000). Estudos demonstraram que os HPA são capazes de alterar a estrutura do DNA e com isso causar mutações que podem causar tumores. Contudo, não é a molécula original que provoca a alteração, mas sim a resultante de um processo de ativação metabólica. Isso ocorre quando o organismo tenta converter os HPA em formas mais hidrossolúveis, que são mais facilmente excretáveis. Nesse processo, os HPA podem ser transformados em intermediários reativos que formam adutos com o DNA, impedindo-o de executar suas funções normalmente. Se esse dano não for reparado, torna-se permanente e afeta as funções celulares, o que pode induzir à formação de tumores (IGWE e UKAOGO, 2015).

Além disso, aqueles com maior número de anéis bioacumulam em tecidos gordurosos de alguns organismos marinhos e têm sido relacionados à produção de lesões hepáticas e tumores em alguns peixes (BAIRD E CANN, 2008). Por esse motivo, 16 HPA foram incluídos na lista de poluentes de interesse prioritário, elaborada pela Agência de Proteção Ambiental Norte-Americana (US-EPA, 2008) a partir de critérios de frequência da ocorrência, toxicidade e potencial de exposição humana (US - EPA, 2008). A estrutura desses compostos é mostrada na FIGURA 2.

FIGURA 2 - ESTRUTURA QUÍMICA DOS 16 HPA CONSIDERADOS POLUENTES PRIORITÁRIOS PELA EPA



FONTE: a autora (2017)

O HPA mais conhecido e mais estudado é o benzo[a]pireno, BaP, que contém cinco anéis benzênicos condensados. Além de ter sido descrito como um composto cancerígeno em testes com animais, pode bioacumular na cadeia alimentar (BAIRD e CANN, 2008; SCHWARZENBACH, GSCHWEND e IMBODEN, 2003), sendo por isso considerado um dos 15 compostos orgânicos de maior potencial cancerígeno em água potável (BAIRD e CANN, 2008).

O comportamento dos HPA está relacionado as suas propriedades físico-químicas, contribuindo no que diz respeito ao transporte, distribuição, disponibilidade, bioacumulação e toxicidade dos HPA nos compartimentos ambientais. As propriedades dos 16 HPA listados acima são consideravelmente diferentes conforme aumenta-se o número de anéis. Como é possível ver na TABELA 2, existe um decréscimo significativo na pressão de vapor e solubilidade em água dos compostos de maior massa molar em relação aos de menor massa

molar. Os compostos de baixa massa molar são mais voláteis, menos lipofílicos e, portanto, mais solúveis em água do que aqueles de maior massa molar (LUNDSTEDT, 2003).

TABELA 2 - MASSA MOLAR E PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DOS 16 HPA PRIORITÁRIOS

HPA	Nº anéis	M.M.	S (mg L ⁻¹)	Log K _{ow}	P (Torr a 20 °C)
Naftaleno	2	128	30	3,37	4,9 x 10 ⁻²
Acenaftileno	3	152	3,93	4,07	2,1 x 10 ⁻²
Acenafteno	3	154	3,47	4,33	2,0 x 10 ⁻²
Fluoreno	3	166	1,98	4,18	1,3 x 10 ⁻²
Fenantreno	3	178	1,29	4,46	6,8 x 10 ⁻⁴
Antraceno	3	178	7,0 x 10 ⁻²	4,45	1,9 x 10 ⁻⁴
Fluoranteno	4	202	2,6 x 10 ⁻¹	5,33	6,0 x 10 ⁻⁶
Pireno	4	202	1,4 x 10 ⁻¹	5,32	6,8 x 10 ⁻⁷
Benzo(a)antraceno	4	228	1,4 x 10 ⁻²	5,61	5,0 x 10 ⁻⁷
Criseno	4	228	2,0 x 10 ⁻³	5,61	6,3 x 10 ⁻⁷
Benzo(b)fluoranteno	5	252	1,2 x 10 ⁻³	6,57	5,0 x 10 ⁻⁷
Benzo(k)fluoranteno	5	252	5,5 x 10 ⁻⁴	6,84	5,0 x 10 ⁻⁷
Benzo(a)pireno	5	252	3,8 x 10 ⁻³	6,04	5,0 x 10 ⁻⁷
Indeno(1,2,3-cd)pireno	6	276	6,2 x 10 ⁻²	7,66	1,0 x 10 ⁻¹⁰
Dibenzo(ah)antraceno	5	278	5,0 x 10 ⁻³	5,97	1,0 x 10 ⁻¹⁰
Benzo(g,h,i)perileno	6	276	2,6 x 10 ⁻⁴	7,23	1,0 x 10 ⁻¹⁰

M.M.: massa molar; S: solubilidade em água; K_{ow}: coeficiente de partição octanol-água;

P: pressão de Vapor.

FONTE: Lundstedt (2003, adaptado)

Para evitar maiores exposições e danos antropogênicos, instituições governamentais de diversos países estabeleceram valores orientadores para a concentração de HPA em águas superficiais, subterrâneas, solo e ar. No Brasil, a Decisão de Diretoria 045/2014/E/C/I da CETESB (Companhia Ambiental do Estado de São Paulo) e a resolução 420/2009 do CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente) estabelecem valores orientadores de alguns HPA para solos e águas subterrâneas como referência para prevenção e intervenção (CETESB, 2014). Os valores de prevenção são definidos como a concentração de HPA acima da qual podem ocorrer alterações prejudiciais à qualidade do solo e da água subterrânea. Já os valores de intervenção são a concentração da substância no solo acima da qual existem riscos potenciais, diretos ou indiretos, à saúde humana, considerado um cenário de exposição genérico (CONAMA, 2009). No que diz respeito às legislações internacionais, o CCME (*Canadian Council of Ministers of the Environment*) do Canadá divulgou as concentrações máximas desses contaminantes permitidas em solo (CCME, 2009). Esses dados estão apresentados na TABELA 3.

TABELA 3 - VALORES ORIENTADORES MÁXIMOS DE CONCENTRAÇÃO DE HPA EM SOLO.

HPA	SOLO AGRÍCOLA (mg kg ⁻¹)				
	CONAMA		CETESB		CCME – CANADÁ
	VP	VI	VP	VI	
Naftaleno	0,12	30	0,7	1,1	0,013
Acenaftileno			-	-	-
Acenafteno			-	-	-
Fluoreno			-	-	-
Fenantreno			3,6	15	0,046
Antraceno	0,039	-	0,3	2300	2,5
Fluoranteno	3,3	15	-	-	50
Pireno			-	-	0,1
Benzo(a)antraceno	0,025	9	0,2	1,6	0,1
Criseno	8,1	-	1,6	95	-
Benzo(b)fluoranteno			0,7	2	0,1
Benzo(k)fluoranteno	0,38	-	0,8	27	0,1
Benzo(a)pireno	0,052	0,4	0,1	0,2	20
Dibenzo(a,h)antraceno	0,8	0,15	0,2	0,3	0,1
Benzo(g,h,i)perileno	0,57	-	0,5	-	-
Indeno(1,2,3-d)pireno	0,031	2	0,4	3,4	0,1

VP= Valor de Prevenção; VI= Valor de Intervenção

FONTE: CONAMA (2009), CETESB (2014) e CCME (2009)

Uma vez que os HPA têm caráter ubíquo no planeta e são oriundos de diversas fontes, antropogênicas e naturais (BAIRD e CANN, 2008), é fundamental avaliar até que ponto a adição de xisto retornado no solo contribui para o aumento do teor dessas espécies químicas nesse compartimento ambiental. Os valores orientadores, por sua vez, são essenciais para julgar se esses teores se encontram em níveis em que podem ser prejudiciais para a saúde humana e para o meio ambiente.

2.4 Determinação de HPA em amostras ambientais

Uma das dificuldades associadas à determinação de HPA em amostras ambientais é a complexidade da matriz. Mesmo após um pré-tratamento rigoroso da amostra, a fração a ser determinada ainda pode conter centenas de compostos. Assim, métodos analíticos cromatográficos que combinem boa resolução e sensibilidade são ideais para esse tipo de análise (ATSDR, 2015). Para esse fim, cromatografia a gás, cromatografia a líquido de alta eficiência e cromatografia em camada delgada têm sido utilizadas na determinação de HPA. Dentre essas três, a cromatografia a gás acoplada a detector de espectrometria de massas (GC-MS) provê a melhor separação, seletividade e identificação dos compostos (CROMPTON, 1984; POSTER et al., 2006).

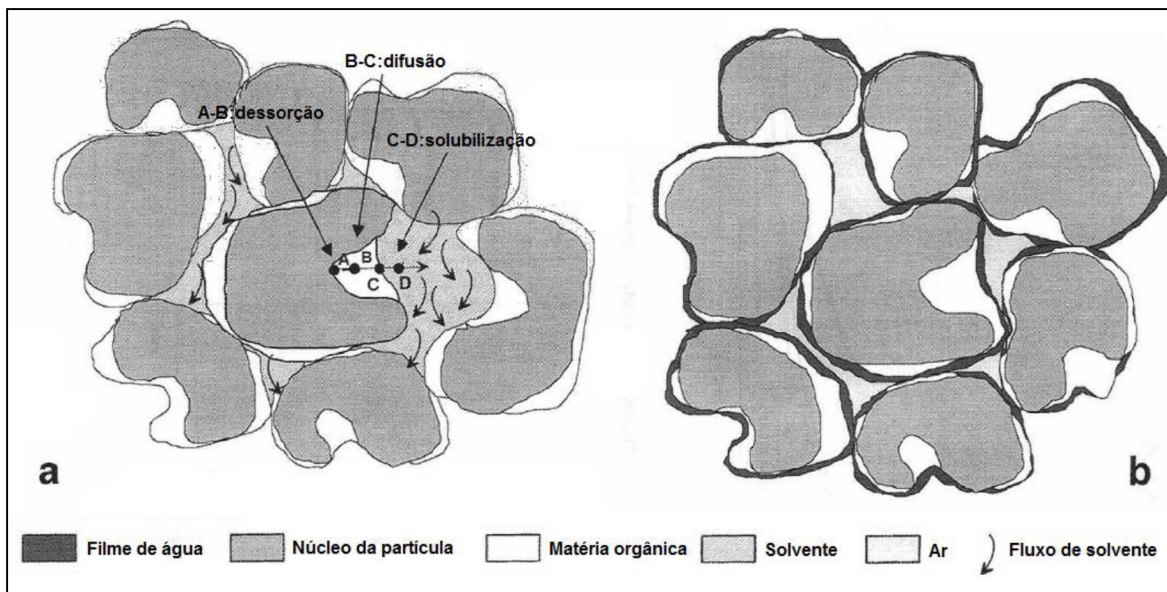
Atualmente, existem técnicas analíticas que promovem a resolução de matrizes complexas permitindo a quantificação de analitos com limites de detecção da ordem de

fentogramas. No entanto, o processo analítico pode ser comprometido por um preparo de amostra inadequado. Neste tópico, o provérbio da computação “*garbage-in garbage-out*” também é válido, pois um preparo de amostra descuidado faz com que mesmo o método de separação mais poderoso produza resultados que não significativos e confiáveis. O preparo de amostra é importante tanto para a etapa analítica como do ponto de vista econômico, dado que sua ineficiência aumenta o número de etapas e o consumo de reagentes (MCDONALD e BOUVIER, 2001; ALPENDURADA, 2000; SMITH, 2003). Ele consiste basicamente em procedimentos que são aplicados à matriz original a fim de convertê-la em uma amostra que seja compatível com a técnica de análise que será empregada. Seus principais objetivos são remover interferentes, aumentando a seletividade do método; concentrar o analito, aumentando a sua detectabilidade; e caso necessário, converter o analito em outra espécie compatível com o método de detecção escolhido. Um dos seus pré-requisitos é que seja robusto e reprodutível, e preferencialmente que use pequena quantidade de amostra, reagentes amigáveis ao meio ambiente e que seja fácil de automatizar (MCDONALD E BOUVIER, 2001; SMITH, 2003).

2.4.1 Extração de HPA de amostras de solo

O processo de dessorção dos analitos do solo no processo de extração envolve três etapas: a sua dessorção da partícula sólida, a difusão pelo solvente que está dentro do poro da partícula e a transferência do analito para o solvente (GIERGIELEWICK-MOZAJSKA et al., 2001), as quais podem ser visualizadas na FIGURA 3:

FIGURA 3 - REPRESENTAÇÃO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DO ANALITO DO SOLO (A) E PERFIL DO SOLO ÚMIDO (B)



FONTE: Giegierlewicz-Mozajska et al. (2001, adaptado)

A extração dos analitos do solo envolve a transferência dos analitos de maneira quantitativa para outro meio, em geral um solvente orgânico, utilizando alguma técnica que promova um contato eficiente entre os dois meios por um determinado período de tempo. Assim, a escolha da técnica de extração mais adequada deve levar em consideração a quantidade de amostra a ser analisada, os solventes que podem ser empregados e a sua afinidade com os analitos, o tempo de análise e como isso influencia na frequência analítica e nos custos de todo o processo. Também deve-se levar em consideração o desempenho que se espera do método quanto a sua precisão, exatidão, limites de quantificação, dentre outros parâmetros (KHAN, TROQUET e VACHELARD, 2005). O solo pode ser analisado tanto na forma úmida, como foi coletado, como após secagem. Ao solo úmido pode ser acrescentado sulfato de sódio anidro para a remoção da água superficial, e dá-se preferência para os solventes miscíveis em água, como acetona, metanol e acetonitrila (KHAN, TROQUET e VACHELARD, 2005). Contudo, a análise de solos secos é preferida por aumentar a área de contato entre o solvente e a matriz, além de permitir uma melhor homogeneização da amostra. Nesse caso, deve-se evitar a secagem em altas temperaturas para prevenir a perda dos analitos mais voláteis, como o naftaleno (LUNDSTEDT, 2003).

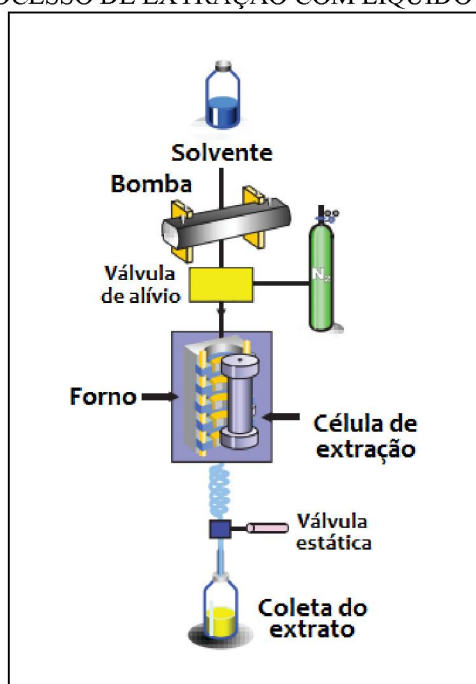
Diversas técnicas podem ser utilizadas para extrair os HPA do solo. Dentre as mais comuns estão agitação mecânica, sonicação ou agitação com ultrassom, extração assistida por micro-ondas e *soxhlet* (LAU, GAN e NG, 2010). Por ser um método recomendado por organizações bem conceituadas, como a US. EPA e a ISO (International Organization for

Standardization), o método de extração por *soxhlet* tem sido utilizado amplamente por muitos autores. Embora seja demorado e utilize grande volume de amostra e solvente, produz resultados satisfatórios de recuperação e limite de detecção (SONG et al., 2002; TANG et al., 2005; GRAHAM et al., 2006; MALISZEWSKA-KORDYBACH, 2008; ORECCHIO, 2010).

No entanto, novas perspectivas têm surgido em busca do aprimoramento de metodologias para torná-las mais simples, de baixo custo e que consumam o menor volume possível de solventes tóxicos ou os substituam (DELGADO-POVEDANO e LUQUE DE CASTRO, 2013). É desejável que essas técnicas reduzam a produção de resíduos, sejam eficientes energeticamente e evitem procedimentos de derivatização dos analitos (GAŁUSZKA, MIGASZEWSKI e NAMIESNIK, 2013). Dentre as técnicas que possuem essa característica, a extração com líquido pressurizado (PLE) também chamada de extração acelerada por solvente (ASE™, conforme registrado pela empresa Dionex™) tem se mostrado promissora.

A extração acelerada por solvente consiste no bombeamento de um solvente extrator em alta temperatura e pressão para uma célula contendo a amostra. Após o tempo definido para a extração, o extrato é transferido para um frasco, que segue pra a próxima etapa do método (*clean up*, concentração e ou análise) (LAU, GAN e NG, 2010; JINSHUI et al., 2013). Um esquema representando o funcionamento do equipamento é mostrado na FIGURA 4:

FIGURA 4 - PROCESSO DE EXTRAÇÃO COM LÍQUIDO PRESSURIZADO



FONTE: Kettle, (2013)

A ASE utiliza temperaturas na faixa de 40 a 200 °C e pressão entre 1000-2500 psi, de maneira a aumentar a velocidade da eluição e manter os solventes na fase líquida (LI et al., 2003; WANG et al., 2007). Possui como vantagens utilizar quantidade reduzida de solvente além de ser um procedimento automatizado que previne a perda dos analitos por volatilização e diminui focos de contaminação (LAU, GAN e NG, 2010). Essa técnica ganhou aceitabilidade na comunidade científica por prover extrações quantitativas em um curto período de tempo, sendo seu desempenho reportado como superior ao *soxhlet* e à extração assistida por ultrassom (LI et al., 2003; WANG et al., 2007). Por esse motivo, também foi recomendada pela U.S. EPA no método 3545A (US-EPA, 2007).

2.4.2 *Clean up* de extratos de solo contendo HPA

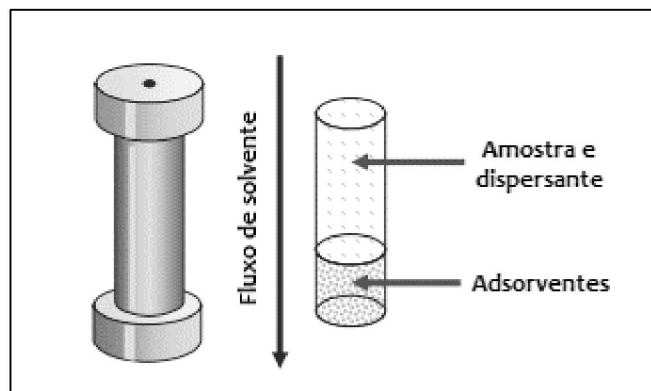
Outro desafio no preparo de amostra é a etapa de limpeza do extrato (*clean up*). É esperado que o extrato final obtido a partir da extração com líquido pressurizado contenha interferentes, o que demanda uma etapa de *clean up* antes que ele seja injetado no cromatógrafo a fim de preservar a integridade do equipamento. Geralmente isso é realizado empregando-se colunas empacotadas com fases adsorventes (extração em fase sólida, SPE) (KETTLE, 2013). A SPE consiste em passar a amostra por um cartucho contendo uma fase sólida chamada fase estacionária ou sorvente, na qual os constituintes da amostra ficarão sorvidos. Em seguida, o solvente da solução é drenado e os compostos retidos na coluna são eluídos utilizando-se pequeno volume de solvente, sendo coletados para posterior análise (POOLE et al., 1990; LANÇAS, 2009). Embora utilize menor volume de solventes orgânicos, a técnica é tediosa e trabalhosa, tanto para a montagem das colunas empacotadas quanto no caso dos cartuchos comerciais, que além de caros devem ser descartados após a utilização (REZAEE et al., 2006).

a) *Extração com líquido pressurizado seletiva (SPLE)*

Como alternativa ao *clean up* tradicional com SPE, uma tendência atual é a integração da etapa de *clean up* à extração. No caso da extração com líquido pressurizado, a técnica passa a se chamar SPLE, onde a letra S é adicionada à sigla significando “seletiva”. Introduzida em 1996 pela própria Dionex™, consiste em integrar as etapas de extração e *clean up* em um único procedimento, pelo empacotamento da fase adsorvente na própria célula de extração (DO et al., 2013). A FIGURA 5 contém o esquema da montagem de uma

célula utilizando-se amostra de solo, sulfato de sódio (Na_2SO_4) e Florisil® como fase adsorvente.

FIGURA 5 - REPRESENTAÇÃO DA CÉLULA DE EXTRAÇÃO NA TÉCNICA SPLE UTILIZANDO ADSORVENTES, AMOSTRA E DISPERSANTE



FONTE: Kettle (2013, adaptado)

Para atingir a seletividade desejada, três parâmetros são otimizados, o solvente extrator, a temperatura de extração e o material da fase estacionária (KETTLE, 2013). O solvente extrator geralmente é o primeiro fator a ser definido, mais comumente de acordo com os solventes já utilizados em outras técnicas de extração para determinado analito ou suas alternativas menos tóxicas (HUSSEN et al., 2007; DO et al., 2013). Alguns estudos mostram que o aumento da temperatura de extração aumenta tanto a quantidade de analitos extraída quanto de interferentes, possibilitando a otimização desse parâmetro com planejamentos de superfície de resposta (CHOI et al., 2014). Por fim, a escolha da fase adsorvente dependerá do conhecimento prévio da composição da matriz e de quais interferentes ela contém. Sílica, Florisil® (silicato de magnésio) e sílica funcionalizada C18 são utilizadas na remoção de lipídios apolares. A alumina possui a mesma função com a vantagem de também remover compostos coloridos, ao passo que resinas de troca iônica adsorvem interferentes iônicos, cobre em pó remove enxofre e carvão ativado auxilia na purificação de certas classes de compostos como dioxinas, furanos e bifenilas policloradas (KETTLE, 2013; CHOI et al., 2014). Feitas essas escolhas, o desenvolvimento do método segue com a otimização da quantidade relativa entre amostra e fase adsorvente e os demais parâmetros da extração líquida pressurizada, o que geralmente é feito utilizando-se planejamento fatorial, que permite avaliar a interação entre as variáveis estudadas (SALGUEIRO-GONZÁLEZ et al., 2014).

Existem algumas metodologias disponíveis na literatura para a determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em solos utilizando SPLE. Zhang e colaboradores (2012) otimizaram a extração de HPA de solos utilizando uma célula com capacidade de 34 mL empacotada com 3 g de alumina, 2 g de sílica gel e 10 g de solo disperso com 1 g de cobre metálico (para remover o enxofre molecular). Utilizando diclorometano:hexano (1:1) como solvente de extração num ciclo de 10 minutos a 70 °C, obtiveram recuperações de 75 a 103% para os HPA em solo na concentração 100 µg kg⁻¹, com desvio padrão de no máximo de 10%. Já Lundstedt, Haglund e Öberg (2006) desenvolveram um método para extração e fracionamento de HPA e oxi-HPA em solos. As células de extração foram empacotadas com sílica gel desativada com água (2%) seguida de 0,5 g a 1,0 g de solo e terra diatomácea para preencher o espaço vazio da célula. A extração se deu em duas etapas; na primeira, os HPA foram extraídos com uma mistura de diclorometano:ciclohexano (9:1) a 120 °C. Posteriormente, utilizando a mesma célula, os oxi-HPA foram extraídos com ciclohexano:diclorometano (1:3) a 150 °C. Os extratos foram evaporados até o volume de 1 mL e puderam ser injetados diretamente no GC-MS, sem a necessidade de etapa de *clean up* adicional. Foram obtidas recuperações de cerca de 70% com desvio padrão de no máximo 11% para concentrações de HPA entre 20 – 1500 ng g⁻¹. Os autores explicam que baixas recuperações foram obtidas para os HPA de baixa massa molar (2 e 3 anéis) por conta da sua alta volatilidade. Nesse sentido, empregar técnicas de extração, concentração e *clean up* que evitem a etapa de evaporação do solvente é uma estratégia interessante para prevenir a perda dos analitos mais voláteis.

b) Microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME)

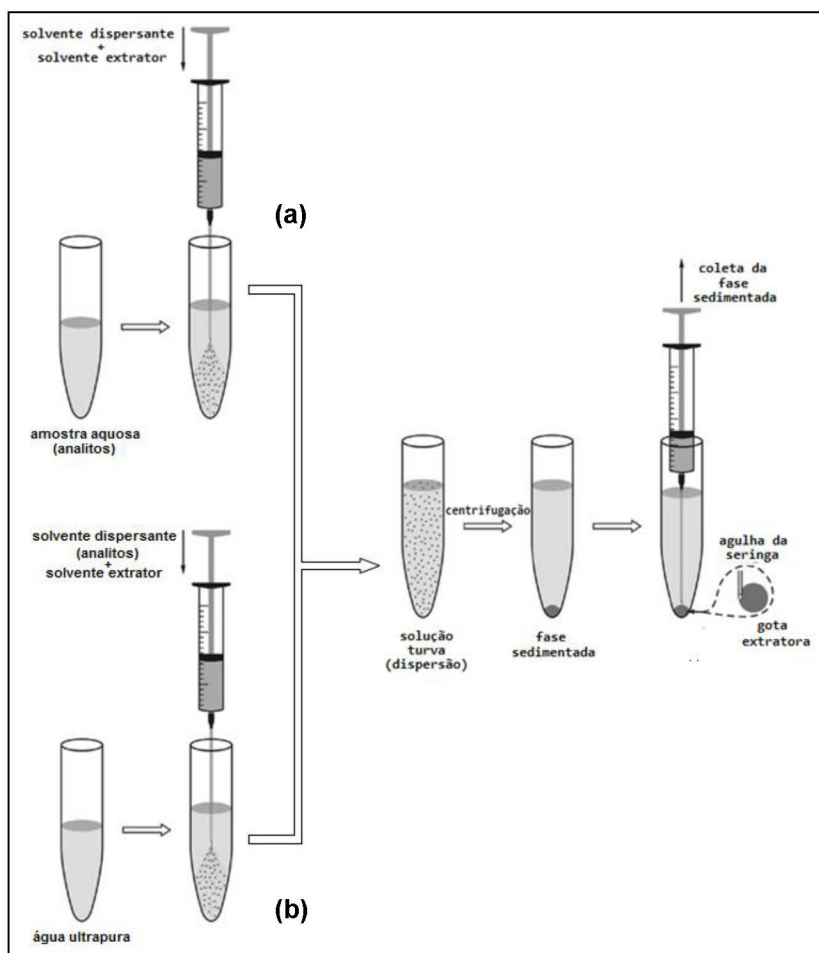
A microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) é uma técnica utilizada para a extração de analitos de matrizes aquosas que atende a alguns dos principais critérios da química verde. Baseada em um sistema ternário de solventes, sendo um solvente extrator, um dispersor e a amostra em fase aquosa, funciona colocando-se a amostra em um tubo de fundo cônico e em seguida injetar rapidamente os solventes extrator e dispersor com o auxílio de uma seringa, gerando uma solução turva devido à formação de microgotículas do solvente extrator na fase aquosa. Em seguida, a mistura é centrifugada para dar origem à fase sedimentada (a qual os autores também se referem como “gota”), que é coletada para em seguida ser injetada no cromatógrafo (RODRIGUEZ-DELGADO et al., 2010; ZGOLA-GRZESKOWIAK E GRZESKOWIAK, 2011; ZANELLA et al., 2012). A técnica é

empregada principalmente na extração de analitos apolares, cuja extração é favorecida na partição entre as fases aquosas e orgânica. Desenvolvida em 2006 por Rezaee e colaboradores (2006), foi utilizada para a extração e concentração de HPA em amostras de água, sendo obtidas recuperações na faixa de 82,0 – 111,0% para uma fortificação de 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, limites de detecção entre 0,007 e 0,030 $\mu\text{g L}^{-1}$ e fatores de enriquecimento (EF) de 603 a 1113, valores considerados satisfatórios pelos autores.

A DLLME é empregada geralmente como preparo de amostra de matrizes aquosas, como águas provenientes de diversos compartimentos ambientais (HERRERA-HERRERA et al., 2010). Além disso, a técnica pode ser aplicada a sólidos caso estes passem previamente por um processo de extração para transferir os analitos para uma fase orgânica ou aquosa. Em análise de alimentos, por exemplo, os extratos são obtidos por *QuEChERS* (acrônimo das palavras em inglês *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe*; em português, rápido, fácil, barato, eficaz, robusto, seguro) utilizando acetonitrila, para em seguida o solvente ser evaporado até *secura* e o extrato ressuspensionado em água, que é utilizada como a amostra na DLLME (ZHAO et al., 2007; VICHAPONG et al., 2016). No caso de analitos extraídos de amostras de solo, pode-se proceder da mesma maneira como executado por Asensio-Ramos e colaboradores (2011). Os autores determinaram pesticidas em solo extraíndo os analitos em ultrassom com metanol, evaporando o extrato até *secura* e ressuspensionando-o em água. Nesse caso, deve-se ressaltar que os analitos tinham caráter hidrofílico e puderam ser extraídos utilizando um líquido iônico como solvente extrator.

De maneira alternativa, a DLLME pode ser empregada para o *clean up* de extratos contendo analitos hidrofóbicos, como é o caso dos HPA. Nesse caso, os compostos de interesse devem ser solúveis no solvente dispersor, para a ele ser acrescentado o solvente extrator e ambos serem injetados em água ultrapura, que torna favorável o sistema ternário de solventes, como exemplificado na FIGURA 6.

FIGURA 6 - REPRESENTAÇÃO DA MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA (A) PARA A EXTRAÇÃO DOS ANALITOS DE AMOSTRA AQUOSA E (B) COMO *CLEAN UP*



FONTE: Zanella et. al. (2012, adaptado)

Uma possibilidade interessante a ser explorada na associação da DLLME com outras técnicas é eliminar a necessidade de evaporação do extrato utilizada para a concentração dos analitos, o que é particularmente importante no caso de compostos mais voláteis, como os HPA de menor massa molar. Essa estratégia já foi adotada por alguns autores para o *clean up* e concentração de extratos de solo dos quais se pretendia avaliar o teor de defensivos agrícolas e contaminantes.

Um exemplo dessa aplicação é o trabalho desenvolvido por Pastor-Belda e colaboradores (2015), que propuseram a determinação de cinco pesticidas em solo extraíndo os analitos em acetonitrila, da qual uma alíquota de 1,5 mL foi utilizada como solvente dispersor juntamente com 125 μ L de tetracloreto de carbono como solvente extrator e 10 mL de água para a formação da dispersão. Similarmente, Cacho et al. (2016) empregaram 1 g de amostra e 3 mL de metanol para a extração de nitrofenóis de solos. Uma alíquota de 2,5 mL desse extrato metanólico foi misturada a 0,3 mL de diclorometano e anidrido acético, para

em seguida ser injetado em 10,0 mL de água e prosseguir para as etapas subsequentes da técnica. No geral, os autores avaliam diferentes tipos e volumes de solvente extrator para a DLLME, o volume de água, adição de sal em diferentes proporções e tempo de extração e centrifugação, que em geral são os mesmos parâmetros estudados quando a DLLME é aplicada à matrizes aquosas. No geral, os métodos desenvolvidos tiveram bom desempenho analítico, com recuperações entre 87 e 114% (Pastor-Belda et al., 2015) e 86 – 111% (Cacho et al., 2016) e desvio padrão relativo (RSD) abaixo de 14% para amostras de solo fortificadas na faixa de ng g^{-1} ($\mu\text{g kg}^{-1}$), indicando assim que a técnica é promissora e tem potencial para ser aplicada nesse trabalho.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver duas metodologias para a determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em solos utilizando extração com líquido pressurizado.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estabelecer o método cromatográfico para a determinação de HPA;
- Estabelecer um protocolo analítico para extração de HPA de amostras de solo utilizando extração com líquido pressurizado seletiva (SPLE);
- Desenvolver e validar uma metodologia para extração de HPA de amostras de solo utilizando extração com líquido pressurizado e microextração líquido-líquido dispersiva (PLE-DLLME);
- Determinar a concentração dos HPA nos solos e correlacionar os resultados obtidos com os tratamentos aplicados ao solo utilizando ferramentas quimiométricas.

4 METODOLOGIA

4.1 REAGENTES

Os padrões dos 16 hidrocarbonetos policíclicos aromáticos [Naftaleno (Naf); Acenaftileno (Aci); Acenafteno (Ace); Fluoreno (Flu); Fenantreno (Fen); Antraceno (Ant);

Fluoranteno (Fla); Pireno (Pir); Benzo (a) antraceno (BaA); Criseno (Cris); Benzo(b)fluoranteno (BbF); Benzo(k)fluoranteno (BkF); Benzo (a) pireno (BaP); Indeno (1,2,3-cd)pireno (IP); Dibenzo (a,h) antraceno (DahA); Benzo (g,h,i) perileno (BghiP)] e seus respectivos padrões internos [Naftaleno-d₈(Naf-d₈); Acenafteno-d₁₀ (Ace-d₁₀); Fenantreno-d₁₀, (Fen-d₁₀); Criseno-d₁₂ (Cris-d₁₂); perileno-d₁₂ (Per-d₁₂)] e sub-rogado [p-terfenil-d₁₄(p-terf-d₁₄)] foram adquiridos da marca AccuStandard Inc (USA). Os solventes utilizados em cromatografia em fase gasosa e para a diluição dos padrões foram de grau HPLC, e os demais reagentes foram de grau analítico ou superior. O óxido de alumínio neutro (grau I) foi adquirido da J.T. Baker (EUA). O detergente neutro Extran®, a sílica gel 60 (0,063 – 0,200 mm) e o sulfato de sódio foram adquiridos da Merck (Brasil). Previamente ao uso, a alumina e o sulfato de sódio foram calcinados a 450 °C por 4 horas e a sílica gel foi ativada a 160°C por 16 h. A água ultrapura foi obtida por sistema de osmose reversa e em seguida pelo sistema de purificação de água (marca Millipore Simplicity UV) acoplado à lâmpada UV. O gás hélio e nitrogênio ambos com grau de pureza 99,9999% foram fornecidos pela White Martins (São Paulo, Brasil).

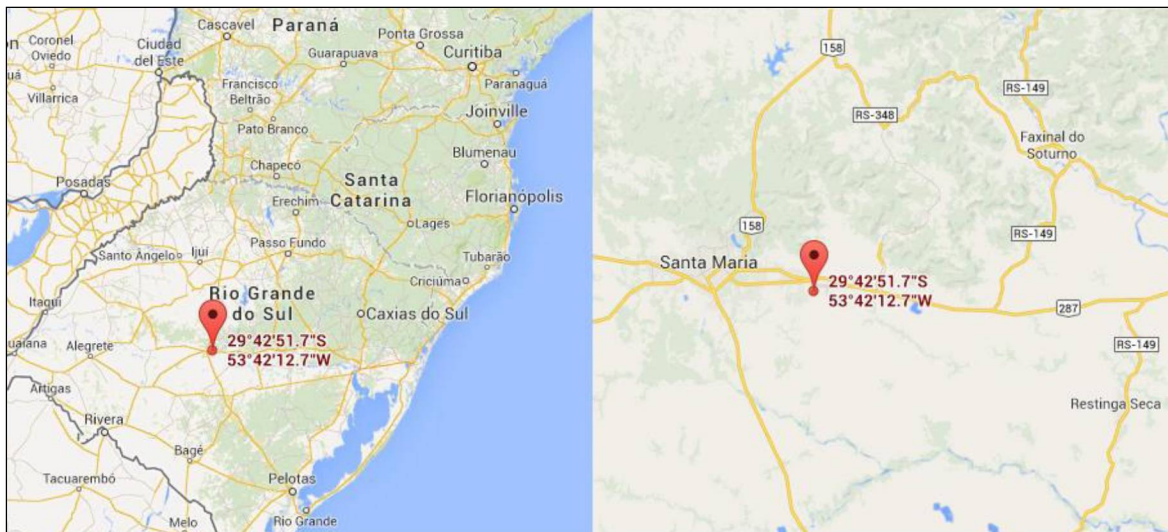
4.2 DESCONTAMINAÇÃO DE FRASCOS E VIDRARIAS

As vidrarias empregadas foram submetidas a um procedimento de descontaminação antes da sua utilização. Primeiramente, elas foram deixadas em banho de detergente neutro (Extran ® 5% v/v) por 24 h, para em seguida serem enxaguadas em água corrente, água destilada, água ultrapura e acetona. Após isso, foram colocadas em forno mufla a 450 °C por um período de 4 horas, sendo devidamente armazenadas ao abrigo de poeira e outros contaminantes em potencial.

4.3 AMOSTRAS

As amostras de solo são provenientes de um experimento de campo executado na área experimental da Universidade Federal de Santa Maria/RS, onde o solo é classificado como argissolo vermelho distrófico arênico, caracterizado pela sua baixa fertilidade, textura arenosa e alta suscetibilidade à erosão. A localização dessa estação pode ser visualizada na FIGURA 7.

FIGURA 7 - MAPA DA LOCALIZAÇÃO DA ÁREA DE COLETA DAS AMOSTRAS EM SANTA MARIA/RS



FONTE: Google maps (2017)

Estes solos receberam anualmente uma adição de xisto retortado além da adubação de base recomendada, e em seguida foram cultivados em sistema de rotação de culturas em plantio direto, utilizando espécies anuais de verão (feijão) e de inverno (trigo) (FIGURA 8).

FIGURA 8 – APLICAÇÃO DE XISTO RETORTADO, SEMEADURA E CULTIVO



FONTE: A autora (2017)

Os tratamentos executados e as doses aplicadas desde o início do experimento estão descritos na TABELA 4. Nesse trabalho, foram analisadas as amostras coletadas em dezembro/2013, junho/2014 e novembro/2014 devido aos cuidados necessários adotados no processo de coleta e armazenamento. Após a terceira coleta, o experimento de campo foi descontinuado.

TABELA 4 - TRATAMENTOS, MESES DAS COLETAS, DOSES DE XR ACUMULADAS E ADUBAÇÃO UTILIZADA NO EXPERIMENTO DO PROJETO XISTO AGRÍCOLA

Tratamento	XR (superfície) (kg ha ⁻¹)								
	Dose ^s	Adubação ^b + dose (dez/2009)	Adubação ^b + dose ^a (dez/2010)	Adubação ^b + dose ^a (dez/2011)	(Jun/2012)	Adubação ^b + dose ^a (Jan/2013)	1 ^a coleta (Dez/2013)	2 ^a coleta Adubação ^b + dose ^a (Jun/2014)	3 ^a coleta (Nov/2014)
T1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T2	750	750	1500	2250	3000	3750	3750	4500	4500
T3	1500	1500	3000	4500	6000	7500	7500	9000	9000
T4	3000	3000	6000	9000	12000	15000	15000	18000	18000
T5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T6	1500	1500	3000	4500	6000	7500	7500	9000	9000

^a doses de XR acumuladas de aplicações anteriores

^b Adubação de base: aplicação de N (100 kg ha⁻¹), P₂O₅ (120 kg ha⁻¹) e K₂O (90 kg ha⁻¹)

FONTE: A autora (2017).

O tratamento T1 corresponde ao solo testemunha de adubação (sem adição de XR e com adubação de NPK) e os tratamentos T2, T3 e T4 se referem a solos com adubação de base e adições crescentes de xisto retornado. O tratamento T5 é o solo testemunha absoluta (sem adição de XR e sem adubação de NPK) e T6 o solo testemunha de XR (com adição de XR e sem adubação de NPK). Os tratamentos com maior dose acumulada de xisto retornado são o T4 e o T6.

As parcelas analisadas (áreas de plantio) possuem 25 m² cada (5 x 5 m), onde cada tratamento foi realizado em quadriplicata, totalizando 24 parcelas, conforme o croqui apresentado abaixo.

QUADRO 1 - CROQUI DO EXPERIMENTO DE SANTA MARIA/RS

BLOCO 1						BLOCO 2						ENTRA
T2	T1	T3	T4	T6	T5	T5	T6	T1	T3	T4	T2	
BLOCO 3						BLOCO 4						

T6	T5	T4	T1	T3	T2	T4	T2	T1	T3	T6	T5	
					AÇUDE							

FONTE: A autora (2017)

Para este trabalho, os solos foram coletados dos blocos 1, 2 e 4 do experimento, após cada colheita, totalizando duas coletas anuais executadas nos períodos de verão e inverno. O procedimento foi realizado seguindo-se as recomendações da publicação IWRG701 da US-EPA (2009), em profundidades de 0 – 5 cm e de 5 – 20 cm. Esse documento fornece diretrizes de amostragem, preservação e armazenamento das amostras a fim de assegurar que estas sejam representativas, que não haja contaminações e que a concentração dos analitos seja minimamente alterada do momento da coleta até a análise.

Para efetuar a secagem dos solos, o material foi transferido para uma bandeja metálica revestida com papel alumínio, sendo em seguida recoberta também com papel alumínio perfurado e deixada à temperatura ambiente por 5 dias. Em seguida o solo foi peneirado em uma peneira metálica de malha 12 *mesh* (1,4 mm) e acondicionado em frasco de vidro previamente higienizado, sendo armazenado sob refrigeração a -20 °C. Para efetuar a análise, amostras compostas foram obtidas misturando-se quantidades iguais das amostras de solo, sendo esses oriundos de parcelas que receberam o mesmo tipo de tratamento, coletadas na mesma época e na mesma profundidade. Por exemplo, para obter a amostra T1 composta na profundidade 0-5 cm da coleta de dezembro de 2013, foram misturadas todas as amostras T1 coletadas em dezembro de 2013 na profundidade 0-5 cm dos blocos 1, 2 e 4. Em seguida essa amostra composta foi quarteada manualmente e uma porção de cerca de 50 g foi separada para análise.

4.4 ESTABELECIMENTO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO

A metodologia para determinação dos HPA por GC-MS foi otimizada a partir da proposta por Ferreira et al. (2012).

Para a otimização da separação cromatográfica, foram injetadas soluções dos analitos em diclorometano na concentração de 200 µg L⁻¹ no modo *full scan*. Em seguida, os íons de maior abundância foram definidos como de identificação e confirmação, e os intervalos de monitoramento seletivo de íons (modo SIM), onde apenas íons selecionados previamente são detectados, foram estabelecidos. Os parâmetros do método definitivo estão detalhados na TABELA 5.

TABELA 5 - PARÂMETROS OPERACIONAIS USADOS PARA A DETERMINAÇÃO DE HPA

Equipamento	GC-MS (Thermo Electron Corporation) modelo Focus-PolarisQ, acoplado ao auto-amostrador AS 3000 (Thermo Electron Corporation) Alternativamente: GC-MS/MS (Shimadzu) modelo GC-2010 Plus, acoplado a detector de massas em tandem do tipo triplo quadrupolo modelo TQ8040 e injetor automático modelo AOC-5000 Plus
Coluna	DB-5ms (Agilent) 30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m
Gases	Arraste: He 1,2 mL min ⁻¹ (vazão constante) - Gas saver: off
Injetor	<i>Splitless</i>
Temperatura	Injetor: 270 °C; Linha de transferência: 280 °C; Fonte de íons: 230 °C Coluna: 40 °C (2 min), 50 °C min ⁻¹ até 80 °C, 10 °C min ⁻¹ até 240 °C (5 min), 4 °C min ⁻¹ até 260 °C (5 min), 20 °C min ⁻¹ até 300 °C (7 min) <i>Solvent delay</i> : 5 min 8 - 13 min: 128, 136, 152, 162, 164 13 - 21 min: 165, 166, 178, 188, 202, 244
m/z	21 - 32 min: 228, 236, 240, 252, 253, 260, 264 32 - 39,8 min: 276, 277, 278, 279

FONTE: A autora (2017)

Na TABELA 6 estão apresentadas as razões massa/carga (m/z) de quantificação de cada analito, bem como o seu tempo de retenção e o padrão interno utilizado na sua quantificação.

TABELA 6 - RAZÕES MASSA/CARGA E TEMPOS DE RETENÇÃO DOS HPA E PADRÕES INTERNOS

Composto	m/z	T _R (min)	Padrão Interno
Naftaleno (Naf)	128	8,37	naftaleno d ₈
Acenaftileno (Aci)	152	11,88	acenafteno d ₁₀
Acenafteno (Ace)	154	12,28	acenafteno d ₁₀
Fluoreno (Flu)	165	13,52	acenafteno d ₁₀
Fenantreno (Fen)	178	15,78	fenantreno d ₁₀
Antraceno (Ant)	178	15,90	fenantreno d ₁₀
Fluoranteno (Fla)	202	18,62	fenantreno d ₁₀
Pireno (Pir)	202	19,16	criseno d ₁₂
Benzo (a) antraceno (BaA)	228	23,37	criseno d ₁₂
Criseno (Cris)	228	23,52	criseno d ₁₂
Benzo(b)fluoranteno (BbF)	252	28,32	perileno d ₁₂
Benzo(k)fluoranteno (BkF)	252	28,48	perileno d ₁₂
Benzo (a) pireno (BaP)	252	30,24	perileno d ₁₂
Indeno (1,2,3-cd)pireno (IP)	276	34,52	perileno d ₁₂
Dibenzo (a,h) antraceno (DahA)	278	34,69	perileno d ₁₂
Benzo (g,h,i) perileno (BghiP)	276	35,35	perileno d ₁₂
Naftaleno d ₈ (Naf-d ₈) ^a	136	8,30	-
Acenafteno d ₁₀ (Ace-d ₁₀) ^a	162	12,19	-
Fenantreno d ₁₀ (Fen-d ₁₀) ^a	188	15,37	-
Criseno d ₁₂ (Cris-d ₁₂) ^a	236	23,41	-
Perileno d ₁₂ (Per-d ₁₂) ^a	260	30,64	-

T_R = Tempo de retenção; ^a = padrão interno

FONTE: A autora (2017).

O padrão interno utilizado para cada analito foi definido com base nas metodologias descritas na metodologia descrita por Ferreira et al. (2012).

4.5 PREPARO DAS SOLUÇÕES-PADRÃO

Para o preparo das soluções-estoque, o conteúdo das ampolas de 1 mL contendo os 16 padrões de HPA (2000 mg L^{-1}) e 5 padrões internos deuterados (4000 mg L^{-1}) foi transferido para balões de 25 mL e diluído em diclorometano ou clorofórmio para dar origem às soluções concentração 80 mg L^{-1} , 160 mg L^{-1} e 80 mg L^{-1} , respectivamente. Em seguida, soluções intermediárias nas concentrações $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ para os HPA e $5,00 \text{ mg L}^{-1}$ para os padrões internos foram preparadas a partir de alíquotas das soluções estoque em balões de 10 mL, também utilizando os solventes diclorometano e clorofórmio.

Observação: Nos ensaios realizados no início do desenvolvimento desse trabalho empregou-se soluções intermediárias nas concentrações $960 \mu\text{g L}^{-1}$ para os HPA e $5,12 \text{ mg L}^{-1}$ para os padrões internos.

4.6 CURVA ANALÍTICA

Para a construção da curva analítica, as soluções intermediárias dos HPA e padrões internos foram diluídas diretamente no *vial*, pipetando-se o volume da solução e em seguida o volume de solvente necessário para completar 1 mL. Os níveis injetados foram de 10, 25, 50, 100, 150, 225, 300, 350, 500, 650 e $980 \mu\text{g L}^{-1}$ de HPA e com a concentração fixa do padrão interno $100 \mu\text{g L}^{-1}$. As soluções de HPA em diclorometano foram injetadas em todos os níveis da curva, enquanto as soluções de HPA em clorofórmio foram injetadas apenas nos sete primeiros níveis, todas preparadas em triplicata e injetadas em sequência no mesmo dia.

A regressão linear das curvas analíticas foi obtida com a plotagem da razão entre a área do pico do composto (A_{analito}) pela área do pico do padrão interno (A_{PI}), em relação à concentração do composto (c_{analito}) para as curvas analíticas utilizadas para as análises para SPLE. No caso das análises para PLE, plotou-se diretamente a área do pico do composto (A_{analito}) em relação à concentração do composto (c_{analito}).

4.7 FORTIFICAÇÃO DA AMOSTRA DE SOLO (*SPIKING*)

Para o estabelecimento e desenvolvimento das metodologias de extração, porções de solo do tratamento T5 (testemunha absoluta) foram fortificadas utilizando solução de HPA em diclorometano para gerar a concentração final de $20 \mu\text{g kg}^{-1}$ de solo, na proporção 1:20 (solvente:amostra). O solvente foi evaporado a temperatura ambiente por cerca de uma hora e em seguida o solo foi reacondicionado em frasco de vidro para passar por um período de

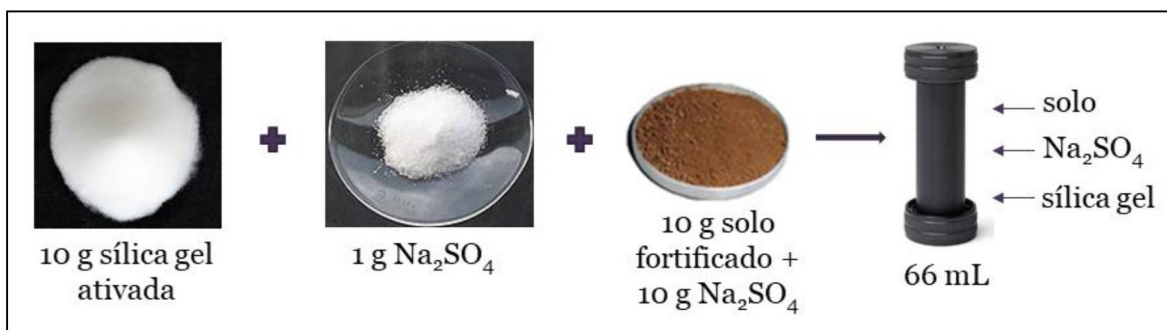
amadurecimento a fim de permitir uma possível interação entre solo e analitos, por um período de 24 h à 21 dias (conforme o ensaio) em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após esse período, o solo foi utilizado para os ensaios de extração com líquido pressurizado.

O mesmo procedimento de fortificação foi empregado para os ensaios de recuperação, porém nas concentrações de HPA de 20, 50 e 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de solo e com período de interação de 24 h.

4.8 ESTABELECIMENTO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO COM LÍQUIDO PRESSURIZADO SELETIVA (SPLE)

Utilizou-se uma célula de extração com capacidade para 66 mL que foi montada adicionando-se, em ordem, um filtro de celulose para prevenir a saída de material particulado, 10,0 g de sílica gel ativada, 1,0 g de Na_2SO_4 e 10,0 g de solo fortificado disperso com 10,0 g de sulfato de sódio e envolto por um papel de filtro, como representado na figura a seguir:

FIGURA 9 - REAGENTES E MONTAGEM DA CÉLULA DE EXTRAÇÃO COM LÍQUIDO PRESSURIZADO



FONTE: A autora

As condições de extração foram baseadas no protocolo analítico publicado pela Dionex™ (JINSHUI et al., 2013), com temperatura de 100 °C, 2 ciclos de extração estática de 5 min, volume de purga 60% e tempo de purga 90 s utilizando gás nitrogênio. O equipamento empregado foi o ASE™ modelo 150 (Dionex™, Thermo Fisher Scientific, EUA), disponibilizado pelo LACAUT (Centro Politécnico UFPR). Os solventes testados foram diclorometano, diclorometano: acetona (1:1), hexano:diclorometano (1:1), hexano: acetona (1:1). Foram testadas combinações de 1 a 3 ciclos de extração com tempo variando entre 3 a 20 minutos de extração estática. Os extratos foram recolhidos, evaporados até secura em concentrador à vácuo a 40 °C (marca Martin Christ, modelo RVC 2-18 CD plus

acoplado a bomba à vácuo de membrana marca Vaccubrand, modelo MZ/2CNT/AK/EK) e ressuspensos em 1,00 mL de diclorometano, sendo em seguida analisados por GC-MS.

4.9 ANÁLISE DAS AMOSTRAS DE SOLO

As amostras de solo citadas no item 4.3 foram analisadas utilizando a extração com líquido pressurizado seletiva e célula de extração de 66 mL. Essa foi montada adicionando-se, em ordem, um filtro de celulose, 10,0 g de sílica gel ativada, 1,0 g de Na₂SO₄ e 10,0 g de solo fortificado envolto por um papel de filtro. Foi empregado como solvente de extração uma mistura de diclorometano:acetona (1:1), temperatura de 100 °C, 2 ciclos de extração estática de 5 min, volume de purga 60% e tempo de purga 90 s. Os extratos foram recolhidos, evaporados até *secura* em concentrador à vácuo a 40 °C e ressuspensos em 1,00 mL de diclorometano, sendo em seguida analisados por GC-MS.

4.10 DESENVOLVIMENTO DA METODOLOGIA DE EXTRAÇÃO COM LÍQUIDO PRESSURIZADO E MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA (PLE-DLLME)

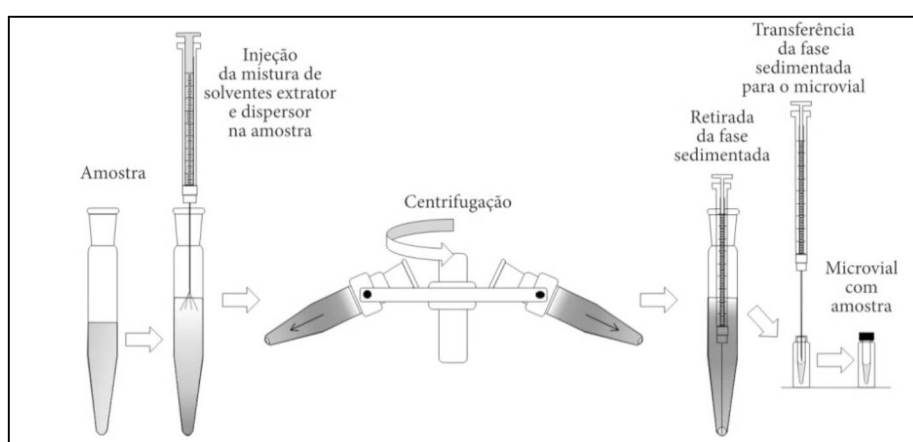
O desenvolvimento da metodologia PLE-DLLME ocorreu em três etapas. Na primeira, a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) foi otimizada utilizando soluções-padrão de HPA em acetona. Posteriormente, essa microextração foi aplicada à extratos de solo obtidos a partir da extração com líquido pressurizado (PLE), concentrados até *secura* e ressuspensos em acetona. Nessa segunda etapa, o desempenho da DLLME como um *clean up* alternativo foi comparado ao do *clean up* convencional utilizando extração em fase sólida (SPE). Na etapa final, as condições experimentais da PLE foram estudadas e a DLLME foi aplicada a uma alíquota do extrato, sem a necessidade de evaporação do solvente.

4.10.1 Primeira etapa: otimização da microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME)

Inicialmente, os experimentos foram executados utilizando uma solução padrão de HPA 20,0 µg L⁻¹ em acetona, da qual 1,00 mL foi utilizado como fase dispersora. Acrescentou-se a essa o solvente extrator e com o auxílio de uma pipeta, a mistura foi injetada rapidamente em um tubo de ensaio contendo água ultrapura. Após homogeneização no vórtex por 1 minuto a 2000 rpm (marca B. Braun Biotech International GmbH, modelo

Certomat MV, potência 42 W, Alemanha) e centrifugação por 10 minutos a 2500 rpm (centrífuga Excelsa Baby II, modelo 206-R, potência 550 W, FANEM®, São Paulo, Brasil), a fase sedimentada resultante foi coletada com o auxílio de uma micropipeta e analisada por GC-MS. Nesse ensaio foram testados solventes extratores (tetracloreto de carbono, clorofórmio e diclorometano), volumes de solvente extrator (50, 100 e 200 μL), volumes de água (5,0, 7,5 e 10,0 mL) e adição de sal (NaCl 10% solubilizado na água ultrapura). A FIGURA 12 ilustra os procedimentos executados nessa etapa:

FIGURA 10 - REPRESENTAÇÃO DA MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA



FONTE: Zanella et. al. (2012)

4.10.2 Segunda etapa: DLLME aplicada a extratos de solo PLE concentrados e ressuspensos em acetona

a) Extração de solo utilizando PLE

Para o desenvolvimento do método de *clean up* por DLLME, foi feita a extração das amostras de solo empregando a célula de 10 mL, na qual foram introduzidos 2,5 g de solo não fortificado acondicionados em um papel de filtro. As condições de extração foram baseadas no protocolo analítico publicado pela Dionex™ (JINSHUI et al., 2013), utilizando como solvente de extração uma mistura DCM: acetona (1:1), com temperatura de 100 °C, tempo de extração estática de 5 min, 2 ciclos estáticos, volume de purga 60% e tempo de purga 90 s. Os extratos foram recolhidos, evaporados até *secura*, reconstituídos em 1,00 mL de acetona contendo HPA 20,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ e submetidos aos ensaios subsequentes.

b) *Clean up* alternativo com microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME)

As variáveis estudadas na otimização do método descrita na seção 4.10.1 que proveram o melhor resultado foram empregadas no ensaio de recuperação com extrato de solo não fortificado (obtido do experimento de PLE descrito anteriormente). Um mililitro do extrato já ressuscitado em acetona contendo HPA $20,0 \mu\text{g L}^{-1}$ foi acrescido de $100 \mu\text{L}$ de clorofórmio e injetado em $10,0 \text{ mL}$ de água ultrapura utilizando uma micropipeta. Após homogeneização no vórtex por 1 min e centrifugação por 10 min , foram coletados $49 \mu\text{L}$ da fase sedimentada, aos quais foi acrescido $1 \mu\text{L}$ padrão interno de $5,12 \text{ mg L}^{-1}$ (concentração final de $102,4 \mu\text{g L}^{-1}$), sendo o conteúdo transferidos para um *insert* para ser então analisado. Testou-se também a ressuspensão dos extratos de solo em outros solventes utilizados como dispersores, sendo eles metanol e acetonitrila. Todos os experimentos foram executados em triplicata.

c) *Clean up* convencional com extração em fase sólida (SPE)

Para a definição do volume de solvente necessário para eluição dos HPA, uma coluna de SPE foi montada introduzindo-se na parte inferior de uma pipeta de vidro um porção de lã de vidro calcinada, e na sequência, transferindo-se $1,00 \text{ g}$ de sílica gel ativada e 500 mg de sulfato de sódio. O empacotamento foi efetuado com o auxílio de gás nitrogênio e hexano, empregado também nesse caso para condicionar a coluna. Em seguida, $1,00 \text{ mL}$ de solução de HPA $960,0 \mu\text{g L}^{-1}$ foi transferido com o auxílio de uma pipeta de pasteur. Após a impregnação dessa na fase adsorvente, foram acrescentados $5,0 \text{ mL}$ de hexano e em seguida $5,0 \text{ mL}$ de uma mistura de hexano:DCM (3:2), sendo coletadas frações de aproximadamente $1,00 \text{ mL}$ do eluato que em seguidas foram levadas para análise em GC-MS. As cinco primeiras frações de limpeza foram numeradas de 1 a 5 e as frações de eluição dos analitos, de 6 a 10. Outros três ensaios foram realizados de maneira análoga, utilizando-se hexano como solvente de limpeza mas variando-se a fase adsorvente e o solvente de eluição. Nesse caso, foram utilizadas $1,00 \text{ g}$ sílica desativada com água ultrapura (2% m/m) com solvente de eluição hexano:DCM (3:2) e (2:3), e 750 mg sílica desativada (2% m/m) com 250 mg de alumina e eluição dos analitos com hexano:DCM (4:1).

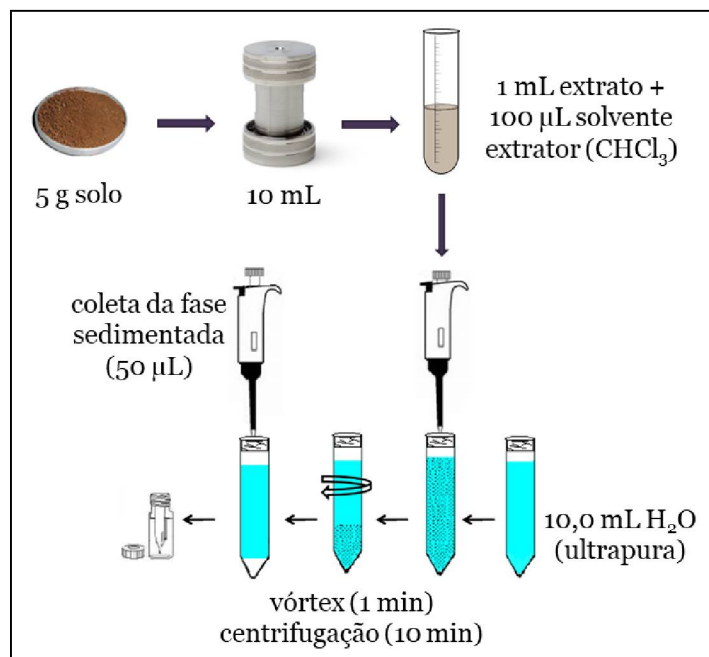
Para avaliar a recuperação dos HPA, o mesmo procedimento foi realizado com uma solução de $50,0 \mu\text{g L}^{-1}$ em hexano. Para examinar a eficiência na remoção de interferentes, o experimento foi executado com extrato de solo não fortificado (obtido do experimento de PLE anteriormente) reconstituído em hexano contendo de $50,0 \mu\text{g L}^{-1}$ HPA. Após a coleta

do eluato, este foi evaporado até a secura e reconstituído em 196 μL de hexano e 4 μL de padrão interno de 5,12 mg L^{-1} (concentração final de 102,4 $\mu\text{g L}^{-1}$), para então serem colocados em um *insert* e serem analisados por GC-MS. Todos os experimentos foram executados em triplicata.

4.10.3 Terceira etapa: DLLME aplicada a extratos de solo PLE (alíquota sem evaporação do solvente)

Nessa etapa, as condições experimentais da PLE foram otimizadas para a injeção de uma alíquota do extrato na DLLME. Para a extração das amostras de solo foi empregada a célula de 10,0 mL, na qual foram introduzidos 5,0 g de solo fortificado (20 $\mu\text{g kg}^{-1}$) acondicionados em um papel de filtro. As condições de extração fixas foram solvente de extração acetona, apenas um ciclo de extração estática, volume de purga 30% e tempo de purga 90 s. Avaliou-se as temperaturas de extração 70, 85 e 100 $^{\circ}\text{C}$, tempo de extração de 5, 10 e 15 min e adição 1,5 g de terra diatomácea na parte superior da célula ou 1,0 g de sílica gel ativada na parte inferior da célula. Em seguida, uma alíquota de 1,00 mL desse extrato foi acrescida de 100 μL de clorofórmio e essa mistura injetada em 10 mL de água ultrapura. Após isso, o tubo foi tampado com papel alumínio calcinado, homogeneizado no vórtex por 1 minuto e centrifugado por 10 min. Após a formação da fase sedimentada, dessa foram coletados 50 μL , os quais foram transferidos para um *insert* para ser então analisados. Esse procedimento está representado na FIGURA 11:

FIGURA 11 - EXTRAÇÃO COM LÍQUIDO PRESSURIZADO SEGUIDA DE MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA



FONTE: adaptado de Zanella et al. (2012)

Para calcular o volume dos extratos, que varia de extração para extração, o frasco coletor foi pesado antes e depois da extração, obtendo-se assim a massa do extrato, que foi convertida para volume utilizando-se o a densidade da acetona (SMALLWOOD, 1996).

4.11 ENSAIOS DE RECUPERAÇÃO PARA AVALIAR A EXATIDÃO DOS MÉTODOS SPLE E SPE-DLLME

Para avaliar a exatidão do método SPLE estabelecido e do método PLE-DLLME desenvolvido, porções de solo foram fortificadas nas concentrações de HPA de 20, 50 e 100 µg kg⁻¹ de solo conforme descrito no item 4.7. Para a SPLE, as amostras de solo fortificadas foram submetidas à extração conforme as condições descritas na seção 4.9, ou seja, a mesma utilizada para a análise das amostras de solo que receberam adição de xisto retornado. No caso da PLE-DLLME, 5 g de solo foram extraídos com acetona, em 1 ciclo de 10 min, a 85 °C, com volume de purga de 30% e tempo de purga de 90 s. Em seguida, uma alíquota de 1,00 mL desse extrato foi acrescida de 100 µL de clorofórmio e essa mistura injetada em 10,0 mL de água ultrapura, como descrito na seção 4.10. Todos os ensaios foram conduzidos em triplicata, nas três concentrações.

4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A precisão foi avaliada em nível de repetibilidade, pela média dos valores de desvio padrão relativo (DPR) os quais foram calculados para amostras analisadas em triplicata:

$$DPR (\%) = \frac{DP \times 100}{CMD}$$

DP = desvio padrão e CMD = concentração média determinada.

A exatidão foi expressa pelo ensaio de Recuperação (R), a qual foi calculada pela fórmula fornecida pela AOAC (2002):

$$R = \frac{(\overline{xd} - \bar{x}) 100}{d}$$

xd= concentração média das amostras fortificadas, x= concentração média das amostras não-fortificadas e d = concentração do analito adicionada.

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) instrumentais foram calculados segundo as recomendações da AOAC (2002):

$$LD = 3 S/R \quad LQ = 10 S/R$$

S/R = relação sinal-ruído

A análise de variância (ANOVA) foi empregada para avaliar as diferenças entre os resultados obtidos nas condições experimentais do item 4.10.3.

As curvas analíticas e os gráficos foram construídos utilizando-se o software Microsoft® Office Excel 2007. As Análises de Componentes Principais (PCA) foram executadas com o software Matlab versão 6.5, utilizando o pacote PLS-toolbox versão 3.0.

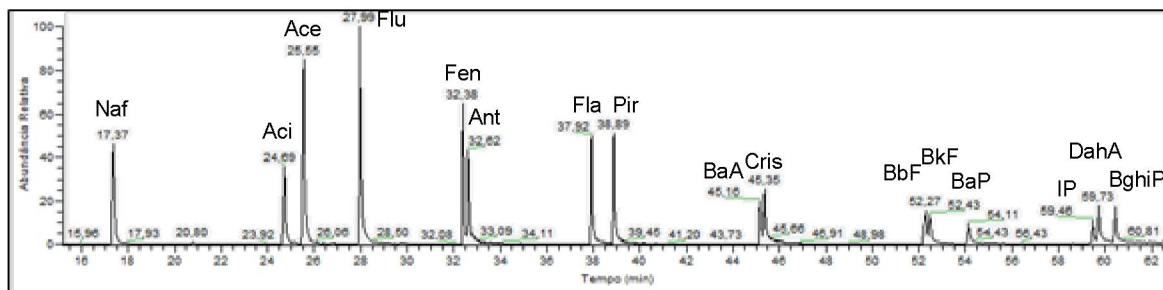
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ESTABELECIMENTO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO

Os parâmetros experimentais descritos por Ferreira et al. (2012) proporcionaram uma corrida cromatográfica de aproximadamente 60 min, com a eluição do primeiro analito, o naftaleno, em 17,37 minutos. Também há coeluição parcial de alguns analitos de mesma razão massa carga (m/z), sendo esses fenantreno (Fen) e antraceno (Ant) em 32,38/32,62 minutos, benzo (a) antraceno (BaA) e criseno (Cris) em 45,10/45,25 minutos e

benzo(b)fluoranteno (BbF) e benzo(k) fluoranteno (BbK) em 52,27/52,43 min, conforme observado na FIGURA 12:

FIGURA 12 – CROMATOGRAMA DAS SOLUÇÕES PADRÃO DE HPA 100,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ UTILIZANDO OS PARÂMETROS INSTRUMENTAIS DESCRITOS POR FERREIRA ET AL. (2006). GÁS DE ARRASTE: HE 1,0 ML MIN^{-1} ; COLUNA: 50 °C (5 MIN), 5 °C MIN^{-1} ATÉ 230 °C, 2 °C MIN^{-1} ATÉ 250 °C, 5 °C MIN^{-1} ATÉ 300 °C (8 MIN)

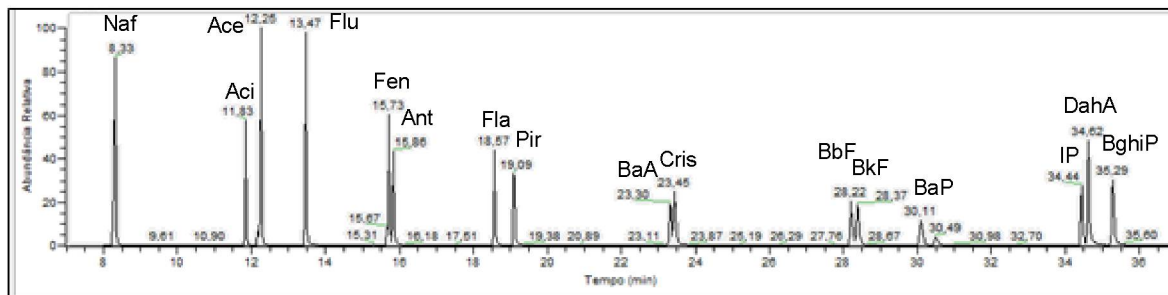


FONTE: A autora (2017)

Esses analitos possuem espectros de massa semelhantes e tempo de retenção muito próximo, uma vez que são isômeros estruturais. Mesmo assim é possível separá-los dado que os diferentes arranjos dos anéis aromáticos conferem aromaticidades diferentes (PORTELLA, POATER e SOLÀ, 2005).

A fim de reduzir o tempo de corrida e aumentar a resolução entre os analitos, foram feitas alterações nas temperaturas da rampa de aquecimento e na vazão do gás de arraste. Essa otimização foi feita no modo *full scan*, no qual todos os fragmentos de íons são observados, dado que os analitos têm seu tempo de retenção alterado conforme se muda a rampa de aquecimento e podem se situar em uma faixa de tempo onde seus íons não são detectados no modo SIM. Após a identificação dos picos dos analitos utilizando a biblioteca NIST, os intervalos de monitoramento seletivo de íons foram definidos dando origem ao cromatograma definitivo mostrado na FIGURA 13.

FIGURA 13 – CROMATOGRAMA DAS SOLUÇÕES PADRÃO DE HPA 100,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ UTILIZANDO OS PARÂMETROS OTIMIZADOS NESSE TRABALHO. GÁS DE ARRASTE: HE 1,2 ML MIN^{-1} ; COLUNA: 40 °C (2 MIN), 50 °C MIN^{-1} ATÉ 80 °C, 10 °C MIN^{-1} ATÉ 240 °C (5 MIN), 4 °C MIN^{-1} ATÉ 260 °C (5 MIN), 20 °C MIN^{-1} ATÉ 300 °C (7 MIN)



FONTE: A autora (2017)

O tempo de corrida foi reduzido em quase 50%, propiciando o aumento da frequência analítica. Os analitos cujos picos se sobrepõem parcialmente não puderam ser melhor resolvidos, embora tenha havido uma ligeira redução da formação de cauda. No entanto, analisando métodos de outros autores, é possível perceber que essa coeluição parcial é recorrente. Além disso, para a determinação dos 16 HPA, os tempos de corrida relatados estão na faixa de 40 minutos, o que significa que o método aqui obtido está dentro do tempo médio descrito pela literatura (GRAHAM et al., 2006; QUINTO et al., 2014; WANG et al., 2015) e pela U.S. EPA segundo o método 610 (U.S.EPA, 2015).

5.2 CURVA ANALÍTICA

As curvas analíticas foram construídas de maneira diferente para cada uma das metodologias de preparo de amostra empregadas, nas quais adicionou-se ou não o padrão interno à amostra. Para análises de HPA por GC-MS, cinco HPA deuterados (naftaleno-d8, acenafteno-d10, fenantreno d-10, criseno-d12 e perileno d-12) representando os diferentes números de anéis são utilizados como padrão interno a fim de corrigir flutuações inerentes ao equipamento (KHAN, TROQUET e VACHELARD, 2005). Contudo, ao omitir o seu uso na curva não foram observados prejuízos na linearidade nem desvios relacionados ao volume de injeção que os tornassem imprescindíveis.

No caso da SPLE, os extratos foram evaporados e reconstituídos em solvente (diclorometano) já contendo o padrão interno na mesma concentração empregada na curva analítica. Para avaliar a recuperação das amostras nas três faixas de concentração, foi necessário quantificar os HPA utilizando uma curva analítica mais ampla compreendendo o intervalo de 10 a 980 $\mu\text{g L}^{-1}$. Contudo, para quantificar os analitos nas amostras, foi utilizada uma curva de faixa mais estreita (10 a 150 $\mu\text{g L}^{-1}$) por ser mais adequada às concentrações encontradas nas amostras.

Quando foi empregado o preparo de amostra por PLE-DLLME, os ensaios iniciais contavam com a adição de padrão interno após a coleta da fase sedimentada. Entretanto, a quantidade diminuta de padrão interno adicionada (1 μL) levava a altos desvios devido à variação da área do padrão interno. Por outro lado, a adição de um volume maior de padrão interno foi evitada a fim de não diluir a amostra, diminuindo o fator de pré-concentração. Por esse motivo, na terceira etapa do desenvolvimento do método (utilizando alíquotas do extrato), optou-se por utilizar a curva de calibração externa, sem prejuízos à precisão analítica. Como o solvente empregado na fase extratora foi o clorofórmio, esse foi utilizado na diluição da solução estoque.

A segregação do solvente foi feita dado que na literatura há relatos de variações de detectabilidade e sensibilidade quando diferentes solventes são utilizados na etapa de análise instrumental. No trabalho desenvolvido por Emmrich, Lahrz e Spyra (2001), foi avaliada a influência da injeção de trinitrotoluenos e compostos aromáticos diluídos em quatro solventes diferentes e analisados por cromatografia a gás e detector por captura de elétrons (GC-ECD). Os autores descrevem uma variação de cerca de 50% na altura do pico entre os solventes metanol, acetonitrila, tolueno e éter metil terc-butilico. Berrada, Font e Moltó (2001) observaram um fenômeno similar ao determinar herbicidas por LC-MS devido a formação de derivados diferentes ao ser utilizado etanol, metanol, diclorometano ao acetonitrila como solvente de injeção.

Nesse trabalho, para duas curvas analíticas foram construídas com diclorometano e clorofórmio em faixas analíticas de mesma magnitude. Para a curva em clorofórmio, foi possível integrar com precisão os picos referentes à concentração $10,0 \mu\text{g L}^{-1}$, ao passo que na curva feita com as soluções em diclorometano o primeiro ponto foi de $25,0 \mu\text{g L}^{-1}$ para alguns analitos, sendo ambas até a concentração máxima de $300 \mu\text{g L}^{-1}$. Esses resultados estão expressos nas TABELAS 7 e 8:

TABELA 7 - PARÂMETROS DE MÉRITO DA CURVA ANALÍTICA EM CLOROFÓRMIO PARA OS 16 HPA

HPA	R ²	equação da reta	LD	LQ
-----	----------------	-----------------	----	----

			($\mu\text{g L}^{-1}$)	($\mu\text{g L}^{-1}$)
Naftaleno	0,9917	$y = 3847,2x + 12127$	0,2	0,6
Acenaftileno	0,9989	$y = 3710,3x + 1750,3$	0,2	0,6
Acenafteno	0,9987	$y = 3036,7x + 3457,8$	0,3	0,9
Fluoreno	0,9987	$y = 3285,4x - 2184,1$	0,3	1,0
Fenantreno	0,9981	$y = 4713,6x - 4104,6$	0,5	1,5
Antraceno	0,9988	$y = 4323,7x + 6623,8$	0,5	1,7
Fluoranteno	0,9973	$y = 4683,7x - 17104$	1,1	3,5
Pireno	0,9985	$y = 5202,6x - 9124,8$	4,8	16,2
Benzo(a)antraceno	0,9926	$y = 2829,9x - 32473$	0,3	1,1
Criseno	0,9959	$y = 3444,6x - 24556$	0,4	1,3
Benzo(b)fluoranteno	0,9899	$y = 2190,8x - 34432$	0,4	1,4
Benzo(k)fluoranteno	0,9947	$y = 2555,9x - 38648$	1,3	4,3
Benzo(a)pireno	0,9904	$y = 1449,2x - 21907$	1,2	4,1
Indeno(1,2,3-cd)pireno	0,9847	$y = 699,12x - 13677$	1,0	3,3
Dibenzo(ah)antraceno	0,9862	$y = 747,98x - 13933$	0,9	3,0
Benzo(g,h,i)perileno	0,9934	$y = 974,54x - 15588$	4,4	14,6

R^2 = coeficiente de determinação, LD= limite de detecção, LQ: limite de quantificação
 FONTE: A autora (2017).

TABELA 8 - PARÂMETROS DE MÉRITO DA CURVA ANALÍTICA EM DCM PARA OS 16 HPA

HPA	R^2	equação da reta	LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Naftaleno	0,9992	$y = 0,0118x - 0,0324$	0,3	0,9
Acenaftileno	0,9994	$y = 0,0159x - 0,0717$	0,5	1,8
Acenafteno	0,9837	$y = 0,0024x + 0,0250$	0,2	0,8
Fluoreno	0,9832	$y = 0,0022x + 0,0003$	0,2	0,7
Fenantreno	0,9988	$y = 0,0138x - 0,0686$	0,2	0,6
Antraceno	0,9983	$y = 0,0104x - 0,0940$	1,2	3,9
Fluoranteno	0,9919	$y = 0,0142x - 0,1122$	3,2	10,7
Pireno	0,9994	$y = 0,0535x + 0,3236$	9,3	31,1
Benzo(a)antraceno	0,9980	$y = 0,0390x - 0,3356$	0,4	1,2
Criseno	0,9977	$y = 0,0443x + 0,0632$	1,1	3,8
Benzo(b)fluoranteno	0,9979	$y = 0,0413x - 0,4513$	0,4	1,3
Benzo(k)fluoranteno	0,9992	$y = 0,0502x + 0,2978$	0,7	2,2
Benzo(a)pireno	0,9987	$y = 0,0311x - 0,3136$	2,0	6,5
Conclusão				
Indeno(1,2,3-cd)pireno	0,9942	$y = 0,0257x - 0,4194$	0,9	2,9
Dibenzo(ah)antraceno	0,9681	$y = 0,0283x - 0,639$	1,5	5,0

Benzo(g,h,i)perileno	0,9966	$y = 0,0451x - 0,3503$	8,7	28,9
----------------------	--------	------------------------	-----	-------------

R²= coeficiente de determinação, LD= limite de detecção, LQ: limite de quantificação

Para a quantificação dos HPA nas amostras fortificadas, a concentração esperada de HPA no extrato reconstituído era de 200,0 e 500,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ (para solos fortificados com 20 e 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de HPA ressuspensos em 1,00 mL de DCM e 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de HPA ressuspensos em 2,00 mL de DCM). Por esse motivo, as amostras do ensaio de recuperação foram quantificadas utilizando uma curva com faixa analítica de 50,0 a 980,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ (TABELA 9). Da mesma maneira, para os ensaios de recuperação da metodologia PLE-DLLME, uma faixa analítica mais ampla foi empregada (10 a 650 $\mu\text{g L}^{-1}$), cujos parâmetros de mérito estão apresentados na TABELA 10:

TABELA 9 - PARÂMETROS DE MÉRITO DA CURVA ANALÍTICA EM DICLOROMETANO PARA OS 16 HPA

HPA	R ²	equação da reta
Naftaleno	0,9876	$y = 0,0135x + 0,1241$
Acenaftileno	0,9903	$y = 0,0200x - 0,1626$
Acenafteno	0,9907	$y = 0,0164x - 0,0369$
Fluoreno	0,9891	$y = 0,0171x - 0,2173$
Fenantreno	0,9907	$y = 0,0152x - 0,2124$
Antraceno	0,9975	$y = 0,014x + 0,0953$
Fluoranteno	0,9929	$y = 0,0153x - 0,0252$
Pireno	0,9918	$y = 0,0165x + 0,4829$
Benzo(a)antraceno	0,9910	$y = 0,0128x - 0,2690$
Criseno	0,9892	$y = 0,0148x + 0,3503$
Benzo(b)fluoranteno	0,9919	$y = 0,0403x - 0,6160$
Benzo(k)fluoranteno	0,9910	$y = 0,0519x + 0,9033$
Benzo(a)pireno	0,9878	$y = 0,0370x - 1,0022$
Indeno(1,2,3-cd)pireno	0,9851	$y = 0,0322x - 1,1187$
Dibenzo(ah)antraceno	0,9784	$y = 0,0293x - 0,9155$
Benzo(g,h,i)perileno	0,9889	$y = 0,0447x + 0,3715$

R²= coeficiente de determinação

FONTE: A autora (2017).

TABELA 10 - PARÂMETROS DE MÉRITO DA CURVA ANALÍTICA DE 10 A 650 $\mu\text{g L}^{-1}$ EM CLOROFÓRMIO PARA OS 16 HPA

HPA	R ²	equação da reta
Naftaleno	0,9961	$y = 4111,4x + 36229$
Acenaftileno	0,9970	$y = 3937,2x + 42041$
Acenafteno	0,9963	$y = 2776,1x + 35850$
Fluoreno	0,9972	$y = 2998x + 24257$
Fenantreno	0,9981	$y = 3985,6x - 1493,7$
Antraceno	0,9952	$y = 4089,9x + 40676$
Fluoranteno	0,9980	$y = 4101,8x + 34263$
Pireno	0,9975	$y = 4284,4x + 39437$
Benzo(a)antraceno	0,9981	$y = 3635,9x - 31676$
Criseno	0,9958	$y = 4695,9x + 33860$
Benzo(b)fluoranteno	0,9984	$y = 4280,6x - 40984$
Benzo(k)fluoranteno	0,9977	$y = 5118,5x + 6578,7$
Benzo(a)pireno	0,9991	$y = 3879,4x - 39204$
Indeno(1,2,3-cd)pireno	0,9978	$y = 3906,1x - 45577$
Dibenzo(ah)antraceno	0,9977	$y = 5199,2x - 36336$
Benzo(g,h,i)perileno	0,9981	$y = 4893,8x - 1886,6$

R²= coeficiente de determinação

FONTE: A autora (2017).

As curvas analíticas obtidas apresentaram coeficientes de determinação iguais ou bastante próximos a 0,99, atendendo assim os critérios de linearidade da AOAC (2002). Assim, uma vez estabelecidos os parâmetros instrumentais e de quantificação dos analitos, prosseguiu-se para o estabelecimento e desenvolvimento dos métodos de preparo de amostra.

5.3 EXTRAÇÃO E *CLEAN UP* - ESTRATÉGIAS

Inicialmente, o objetivo do trabalho era o desenvolvimento de um protocolo analítico para a extração dos HPA das amostras de solo utilizando extração com líquido pressurizado. Contudo, com o avanço da parte experimental, notou-se que uma metodologia de limpeza do extrato do solo deveria estar bem estabelecida previamente.

Para realizar a extração, as condições originais de extração do protocolo analítico proposto pela Dionex™ indicavam o uso de uma célula extratora de volume de 34 mL. No entanto, só havia disponibilidade das células de 10 mL e 66 mL. Por esse motivo, ambas foram testadas para verificar se a quantidade de amostra e solvente utilizados era mais adequada e vantajosa. Apesar de o protocolo sugerir o uso de 10 g de solo, foi possível acomodar na célula de 10 mL no máximo 7 g de amostra. Por outro lado, na célula de 66 mL

houve espaço suficiente para a quantidade sugerida pelo protocolo, apresentando como desvantagem o grande volume remanescente, o qual define a quantidade de extrato produzido.

Assim, duas estratégias foram propostas. Na primeira, a célula de 66 mL foi empregada para realizar a extração juntamente com o *clean up* (SPLE), por haver espaço suficiente também para acomodar a fase adsorvente, o que contribui para a redução do volume do extrato. Já a segunda estratégia envolveu a utilização da célula de 10 mL com menor quantidade de amostra, da qual o extrato de solo obtido foi empregado como um solvente dispersor para a DLLME visando tanto a limpeza como a concentração dos analitos.

5.4 FORTIFICAÇÃO DA AMOSTRA DE SOLO

Para o desenvolvimento da metodologia de extração, poderia ser utilizada uma amostra de solo artificial, geralmente composta de areia, caulinita e musgo. Embora eles sejam comparáveis ao solo real em propriedades físico-químicas e extraibilidade, preferiu-se utilizar uma amostra de solo fortificada com os analitos, por reproduzir com maior confiabilidade a sorção dos HPA à matriz estudada (BIELSKÁ et al., 2012).

Poucos artigos da literatura sobre técnicas de extração descrevem com detalhes o processo de fortificação (*spiking*) do solo para a etapa de desenvolvimento e avaliação da exatidão do método. Entretanto, em artigos que abordam como executar a fortificação de amostras, é relatado que pode haver diferenças entre os valores de recuperação conforme o método de *spiking* que foi aplicado. Por exemplo, ao fortificar-se o solo instantes antes da sua extração, a recuperação costuma ser superior à encontrada na análise de amostras reais. Isso porque, inicialmente, quando o analito entra em contato com o solo, ele fica adsorvido na porção mais superficial da partícula. Porém, no decorrer do tempo ele se torna mais fortemente aderido à matéria orgânica, o que dificulta a sua extração (WELLS e HESS, 2000; LUNDSTEDT, 2003). Alguns autores indicam também que resultados mais próximos da realidade são obtidos quando se utilizam volumes menores de solvente, posto que eles não são evaporados integralmente e podem interferir na análise por atuarem como cosolventes alterando a sua solubilidade e partição no solvente de extração (NORTHCOTT e JONES, 2000a). Por esse motivo, o protocolo de fortificação escolhido foi o de melhor resultado obtido por Reid et al. (1998) e que está de acordo com outros autores (NORTHCOTT e JONES, 2000b; BRINCH et al., 2002). O solo utilizado faz parte do conjunto de amostras a ser analisado nesse projeto, e se refere ao tratamento sem adição de xisto retornado ou de outros insumos agrícolas. Uma vez que os HPA são compostos ubíquos, a matriz não estará

livre dos compostos de interesse, mas uma vez presentes, pode-se afirmar que não são oriundos do xisto retornado. A massa de amostra utilizada variou conforme a demanda para os experimentos, porém sendo mantida a proporção 1:20 (solvente:amostra) (NORTHCOTT e JONES, 2000b) e utilizando-se soluções padrão diluídas em diclorometano pela sua maior volatilidade. A concentração foi definida considerando-se a concentração máxima permitida pela Resolução nº 420/2009 do CONAMA (2009), que é de $0,025 \text{ mg kg}^{-1}$ ($25 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$) de solo.

5.5 ESTABELECIMENTO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO COM LÍQUIDO PRESSURIZADO SELETIVA (SPLE) E ANÁLISE DAS AMOSTRAS DE SOLO

Inicialmente, os ensaios foram realizados utilizando a mesma massa e solo, porém acrescentando-se 10 g de sílica gel ativada como adsorvente. O uso desse material para *clean up* por extração em fase sólida por coluna na determinação de HPA por GC-MS é bastante popular (WELLS e HESS, 2000; NOLLET, 2005; PATNAIK, 2010). Após alguns ensaios preliminares cujos resultados foram avaliados qualitativamente, optou-se por seguir as condições recomendadas pelo protocolo do fabricante (Dionex®).

O tempo de extração e número de ciclos foi mantido para não estender o tempo de análise. Algumas misturas de solvente foram selecionadas para avaliar a seletividade quanto à extração de interferentes da matriz. De uma maneira geral, os analitos extraídos por todos os solventes apresentaram áreas de pico similares, corroborando com a afirmação de que o tipo de solvente utilizado em PLE não é tão relevante para a extração desde que haja uma afinidade mínima (polaridade) dele com os analitos (SAIM et al., 1998). Isso é explicado pelo fato da alta temperatura e pressão exercerem o papel primário na extração, uma vez que diminuem a viscosidade do solvente e a sua tensão superficial, melhorando a sua penetração nos poros da partícula e aumentando a transferência de massa. Além disso, o aumento da temperatura também aumenta a solubilidade do analito e a sua taxa de difusão no solvente além de romper interações fortes entre estes e os componentes da matriz dado que diminuem a energia de ativação do processo de dessorção. A pressão nesse caso contribui para que o solvente continue na forma líquida mesmo em temperatura superior ao seu ponto de ebulição além de pressioná-lo contra os poros da matriz promovendo o contato com o analito (GIERGIELEWICK-MOZAJSKA et al., 2001). Assim, foi mantida a mistura de diclorometano e acetona na proporção 1:1, o que permite obter um cromatograma com menor quantidade de compostos coextraídos e extratos que evaporam em menor tempo se

comparados com outros solventes de maior ponto de ebulição. Além disso, o uso dessa mistura de solventes para a extração de HPA de amostras de solo é descrito frequentemente na literatura (DEAN, 1996; KENNY et al., 1998; SAIM et al., 1998).

Para avaliar o desempenho de método, foram executados ensaios de recuperação em triplicata e três concentrações, 20, 50 e 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de HPA, compreendendo as faixas de concentração máxima de HPA em solo estabelecidas pelo CONAMA (TABELA 3 da revisão bibliográfica). O teor encontrado na amostra sem fortificação (“branco”) foi descontado do teor encontrado nas amostras fortificadas. Os resultados desses ensaios estão expressos na TABELA 11, a seguir:

TABELA 11 – ENSAIO DE RECUPERAÇÃO UTILIZANDO SOLO FORTIFICADO COM HPA E EXTRAÇÃO COM SPLE.

	20,0 $\mu\text{g L}^{-1}$		50,0 $\mu\text{g L}^{-1}$		100,0 $\mu\text{g L}^{-1}$	
	R (%)	DPR (%)	R (%)	DPR (%)	R (%)	DPR (%)
Naftaleno	20,7	31,6	11,2	10,4	9,0	12,1
Acenaftileno	24,7	25,4	18,2	23,9	18,8	8,3
Acenafteno	20,3	28,0	15,2	25,4	17,0	8,5
Fluoreno	41,9	27,4	27,1	25,1	28,7	6,7
Fenantreno	103,1	27,9	60,4	28,8	61,3	2,0
Antraceno	52,0	26,7	41,4	35,4	48,3	5,8
Fluoranteno	89,8	22,4	70,1	36,5	78,4	8,1
Pireno	88,7	21,1	68,3	37,3	76,8	8,4
Benzo(a)antraceno	111,3	17,8	89,5	35,7	98,8	9,0
Criseno	93,7	19,0	77,8	35,6	81,9	6,5
Benzo(b)fluoranteno	107,4	16,8	83,1	35,2	92,1	9,7
Benzo(k)fluoranteno	87,9	17,4	69,8	36,5	78,6	9,1
Benzo(a)pireno	104,6	16,0	81,9	33,9	91,8	9,9
Indeno(1,2,3-cd)pireno	107,5	16,5	87,8	35,8	98,8	9,3
Dibenzo(ah)antraceno	122,3	17,4	108,6	36,9	110,9	9,7
Benzo(g,h,i)perileno	81,4	15,3	62,2	33,8	70,9	8,6

R = recuperação; DPR = desvio padrão relativo

FONTE: A autora (2017)

A AOAC (2002) recomenda a faixa de recuperação de 70 a 125% para analitos com desvio padrão relativo máximo de 15% para analitos na faixa de $\mu\text{g kg}^{-1}$. Assim, é possível observar que esses critérios são parcialmente satisfeitos com essa metodologia. Os HPA com menor massa molar (2 ou 3 anéis aromáticos) apresentaram baixas recuperações provavelmente por terem se volatilizado durante a etapa de evaporação do extrato até a secura (OLUSEYI et al., 2011). Contudo, uma vez que o maior interesse desse trabalho são os analitos menos voláteis, por conta do seu potencial de ficarem sorvidos à matéria orgânica do solo, os analitos naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno e fenantreno não foram quantificados nas amostras.

Os teores de HPA encontrados nos solos que receberam adição de xisto retornado estão expressos nas TABELAS 12, 13 e 14, separados conforme a safra de coleta (dezembro/2013, junho/2014 e novembro/2014) e coletados na profundidade de 0 a 5 cm. Na TABELA, 15, são apresentados os resultados para as mesmas três safras na profundidade de coleta de 5 a 20 cm. O limite de quantificação do método, considerando o primeiro ponto da curva analítica como $10 \mu\text{g L}^{-1}$ para o fluoranteno e $25,0 \mu\text{g L}^{-1}$ para os demais HPA, foi de $1,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ e $2,5 \mu\text{g kg}^{-1}$ de solo, respectivamente.

TABELA 12 - CONCENTRAÇÃO DOS HPA DOS SOLOS COLETADOS EM DEZEMBRO/2013 NA PROFUNDIDADE 0 – 5 CM, EM $\mu\text{G KG}^{-1}$

	Dezembro/2013 (0 – 5 cm)					
	T1	T2	T3	T4	T5	T6
Fluoranteno	< 1,0	2,7	3,0	2,5	1,5	2,7
Pireno	n.d.					
Benzo(a)antraceno						
Criseno	< 2,5					
Benzo(b)fluoranteno						
Benzo(k)fluoranteno	n.d.					
Benzo(a)pireno	< 2,5					
Indeno(1,2,3-cd)pireno						
Dibenzo(ah)antraceno	< 2,5	< 2,5	2,7	2,7	2,7	2,9
Benzo(g,h,i)perileno	< 2,5					

Doses de XR (kg ha^{-1}): T1 = 0; T2= 750; T3 = 1500; T4 = 3000; T5 = 0; T6 = 1500; n.d. = não detectado

FONTE: A autora (2017).

TABELA 13 - CONCENTRAÇÃO DOS HPA DOS SOLOS COLETADOS EM JUNHO/2014 NA PROFUNDIDADE 0 – 5 CM, EM $\mu\text{G KG}^{-1}$

	Junho/2014 (0 – 5 cm)					
	T1	T2	T3	T4	T5	T6
Fluoranteno	4,2	1,5	3,0	2,0	1,3	2,6
Pireno	n.d.					
Benzo(a)antraceno						
Criseno	< 2,5					
Benzo(b)fluoranteno						
Benzo(k)fluoranteno	n.d.					
Benzo(a)pireno	< 2,5					
Indeno(1,2,3-cd)pireno	< 2,5	< 2,5	2,5	2,6	< 2,5	3,2
Dibenzo(ah)antraceno	< 2,5	2,6	2,8	2,7	2,6	3,3
Benzo(g,h,i)perileno	< 2,5					

Doses de XR (kg ha^{-1}): T1 = 0; T2= 750; T3 = 1500; T4 = 3000; T5 = 0; T6 = 1500; n.d. = não detectado

FONTE: A autora (2017).

TABELA 14 - CONCENTRAÇÃO DOS HPA DOS SOLOS COLETADOS EM NOVEMBRO/2014 NA PROFUNDIDADE 0 – 5 CM, EM $\mu\text{G KG}^{-1}$

	Novembro/2014 (0 – 5 cm)					
	T1	T2	T3	T4	T5	T6

Fluoranteno	2,4	1,4	3,2	2,9	3,1	3,0
Pireno	n.d.					
Benzo(a)antraceno						
Criseno	< 2,5					
Benzo(b)fluoranteno						
Benzo(k)fluoranteno	n.d.					
Benzo(a)pireno						
Indeno(1,2,3-cd)pireno	< 2,5					
Dibenzo(ah)antraceno						
Benzo(g,h,i)perileno						

Doses de XR (kg ha^{-1}): T1 = 0; T2= 750; T3 = 1500; T4 = 3000; T5 = 0; T6 = 1500; n.d. = não detectado

FONTE: A autora (2017).

TABELA 15 - CONCENTRAÇÃO DOS HPA DOS SOLOS COLETADOS EM JUNHO/2014 NA PROFUNDIDADE 5 - 20 CM, EM $\mu\text{G KG}^{-1}$

	5 - 20 cm					
	T4			T6		
	Dez/2013	Jun/2014	Nov/2014	Dez/2013	Jun/2014	Nov/2014
Fluoranteno	2,9	2,6	1,2	1,0	3,0	1,6
Pireno	n.d.					
Benzo(a)antraceno						
Criseno	< 2,5					
Benzo(b)fluoranteno						
Benzo(k)fluoranteno	n.d.					
Benzo(a)pireno						< 2,5
Indeno(1,2,3-cd)pireno	< 2,5					3,2
Dibenzo(ah)antraceno						3,9
Benzo(g,h,i)perileno						< 2,5

Doses de XR (kg ha^{-1}): T1 = 0; T2= 750; T3 = 1500; T4 = 3000; T5 = 0; T6 = 1500; n.d. = não detectado

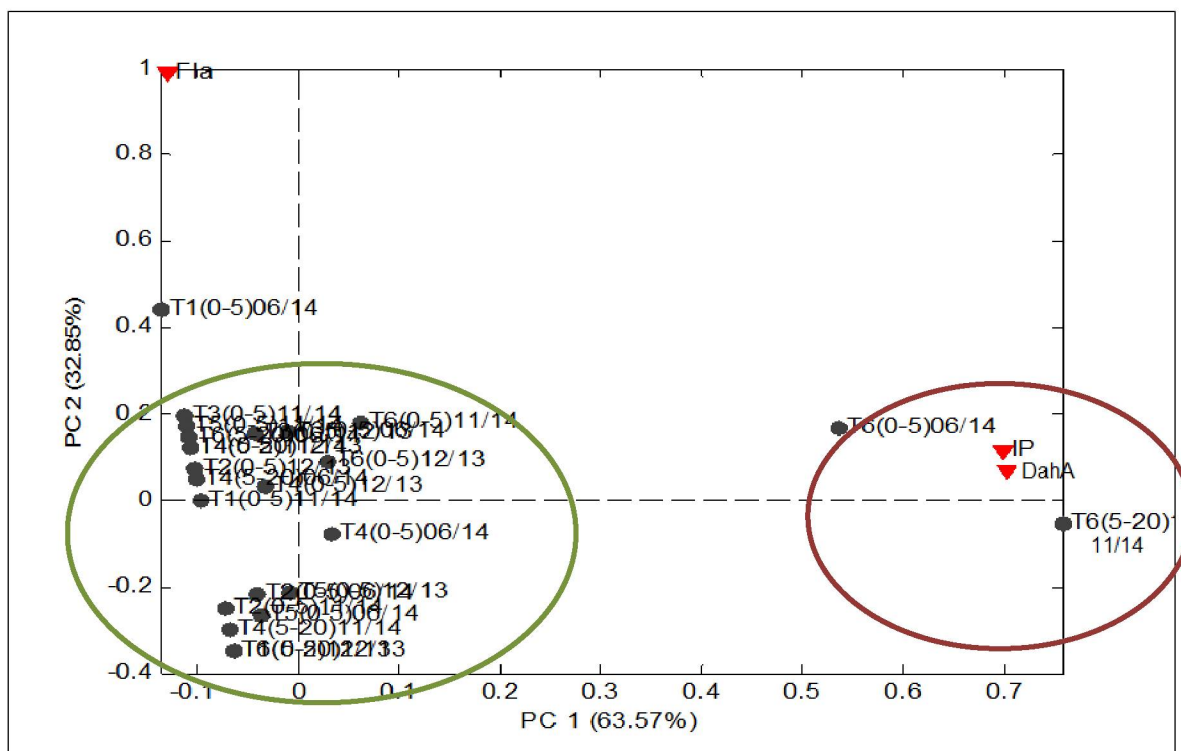
FONTE: A autora (2017).

Foi possível observar que a concentração mais alta de HPA encontrada nos solos foi de $4,2 \mu\text{g kg}^{-1}$ de solo na amostra T1 de dezembro/2013, que é abaixo da concentração mais restritiva para o benzo(a)pireno segundo o CONAMA (2009) de $25 \mu\text{g kg}^{-1}$. Cabe ressaltar que as parcelas T1 são testemunha de adubação de base, ou seja, recebem apenas estes insumos sem adição de xisto retortado. Além disso, os resultados indicam que não há acúmulo desses compostos nas parcelas T4 e T6, que receberam a maior dose acumulada de xisto retortado ao longo das coletas e tampouco lixiviação expressiva para as camadas de solo mais profundas (5 – 20 cm, TABELA 15). Assim, por mais que o xisto retortado contenha HPA, é possível que estes se decomponham pela ação da radiação ultravioleta, uma vez que são aplicados à lanço e ficam sujeitos à exposição solar, conforme a suposição de Nicolini et al. (2011).

Tal hipótese é evidenciada na análise de componentes principais (PCA) apresentada na FIGURA 16. A análise foi realizada para todas as amostras (*scores*) utilizando apenas

três HPA como variáveis (*loadings*) já que os demais que foram quantificados estão presentes na mesma concentração para todos os tratamentos e por isso não são um critério para a diferenciação das amostras. A componente 1 (PC 1) explica 60,44% da variância, separando as amostras T6 (0 – 5 cm) da safra de junho/2014 e T6 (5 – 20 cm) coletada em novembro/2014, no quadrante positivo da PC1 e agrupando os tratamentos T1, T2, T3, T4, T5 e as demais T6 no quadrante negativo da mesma componente principal. Essa diferenciação é feita porque as duas amostras T6 apresentaram maior concentração dos HPA indeno(1,2,3-cd)pireno e dibenzo(ah)antraceno. Já a segunda componente principal separa as amostras pela sua concentração de fluoranteno, que é ligeiramente superior na amostra T1 (0-5)06/14.

FIGURA 14 – GRÁFICO *BIPLLOT* DE *LOADINGS* E SCORES DA PC1 PELA PC2 PARA OS TEORES DE HPA EM SOLOS QUE RECEBERAM ADIÇÃO DE XR



FONTE: A autora (2017)

A parcela T6 (0 - 5 cm) possui a mesma dose de xisto retortado acumulada tanto na coleta de junho/2014 como na de novembro/2014 (9000 kg ha⁻¹). Contudo, a amostra T6 (0 – 5 cm) de novembro/2014 está mais próxima ao outro quadrante, indicando que houve uma redução da concentração desses HPA ao longo do tempo, o que é confirmado ao observar as TABELAS 13 e 14. Observou-se também uma maior concentração de HPA na amostra T6 (5 – 20 cm) de novembro/2014, o que não é observado para as amostras T4, cujo tratamento

possui a maior dose de XR acumulada (18000 kg ha⁻¹). Com isso, sugere-se que a menor concentração de HPA nas amostras T4 esteja associada à adição de adubação de base juntamente com o XR.

As concentrações de HPA encontradas tanto nas amostras que receberam adição de XR como nas amostras testemunha estão abaixo do que é reportado na literatura para solos sem evidências de contaminação (RICHTER et al., 2006; PENA et al., 2007; PLACHÁ et al., 2009), possivelmente pela estação experimental estar localizada distante de centros urbanos e industriais. Além disso, os HPA podem ser transportados pelo ar por longas distâncias por meio do material particulado e serem depositados na camada superficial do solo (ABDEL-SHAFY e MANSOUR, 2016). Assim, não é possível afirmar que os valores encontrados nas amostras estejam diretamente relacionados à adição de xisto retornado ao solo.

Em relação à metodologia analítica, modificações foram propostas a fim de reduzir a quantidade de amostra e solventes empregados, aumentar a frequência analítica e solucionar a impossibilidade de se determinar os HPA mais voláteis.

5.6 DESENVOLVIMENTO DA METODOLOGIA DE EXTRAÇÃO COM LÍQUIDO PRESSURIZADO E MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA (PLE-DLLME)

Além do método de integração do *clean up* ao processo de extração (SPLE), inicialmente propôs-se uma modificação na qual foi feita a extração do solo utilizando PLE para em seguida ser feita a limpeza do extrato com a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME). Nessa modalidade da técnica, os analitos estão presentes no solvente dispersor, e não na amostra aquosa. Por essa razão, é utilizada água ultrapura apenas para formar o sistema que promove a dispersão e permitir que os analitos sejam transferidos de um solvente para o outro.

Num primeiro momento, os parâmetros da DLLME foram otimizados utilizando padrões dos HPA, a fim de definir as condições experimentais que propiciassem recuperações próximas de 100% e baixos valores de desvio-padrão. Em seguida, essas condições foram aplicadas ao extrato de solo obtido a partir da PLE. Esse extrato foi concentrado até a secura e depois ressuspensionado com acetona, que é um dos possíveis solventes para a fase dispersora. Com isso, não esperava-se um ganho de enriquecimento uma vez que o extrato pode ser ressuspensionado no volume de solvente que se desejar. Contudo, a técnica funcionaria como um *clean up* alternativo por separar analitos de demais compostos

pela sua afinidade com o solvente extrator, e o seu desempenho foi comparado com o do *clean up* convencional (SPE). Por fim, o método foi ajustado de forma a dispensar a etapa de evaporação e utilizar como fase dispersora o próprio extrato de solo. A evolução do desenvolvimento do método foi discriminada em três tópicos que serão abordados a seguir.

5.6.1 Primeira etapa: otimização da microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME)

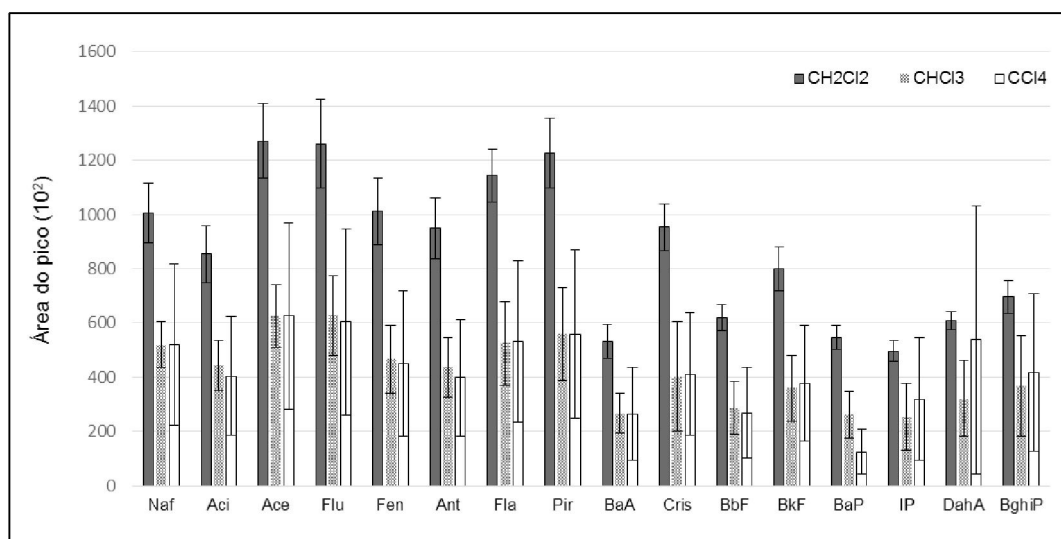
Iniciou-se um estudo preliminar univariado para verificar a viabilidade do uso da DLLME para a limpeza de extratos de solo contendo HPA. Dentre os principais parâmetros que influenciam na eficiência da extração em DLLME estão o volume e o tipo do solvente dispersor, o qual tem como objetivo promover a dispersão do solvente extrator na amostra, necessitando por isso ser miscível tanto na fase orgânica como aquosa (RODRIGUEZ-DELGADO et al., 2010; ZGOLA-GRZESKOWIAK E GRZESKOWIAK, 2011). Uma vez que a obtenção desses extratos consome um volume considerável de gás nitrogênio para a pressurização das células de extração na PLE, esses ensaios foram realizados com 1,00 mL uma solução padrão de HPA em acetona $20 \mu\text{g L}^{-1}$. Esse solvente foi escolhido por ser adequado como solvente dispersor para DLLME e no volume geralmente empregado na literatura (ZANELLA et. al., 2012). Além disso, por ser parte da mistura utilizada no processo de extração, espera-se que ele solubilizará melhor o extrato após ressuspensão. A concentração também está de acordo com o que se espera obter a partir da extração de 2,5 g de solo na concentração $20 \mu\text{g L}^{-1}$ de HPA, que em ensaios anteriores se mostrou adequada para o uso em PLE de dimensões reduzidas. Além disso, a concentração final da fase sedimentada que será analisada por GC-MS não deve ultrapassar o limite superior da faixa de concentração de $500 \mu\text{g L}^{-1}$.

Inicialmente, avaliou-se o solvente extrator, que além de ter afinidade com os analitos para promover uma extração eficiente, deve ser mais denso do que a água para que forme a fase sedimentada. Ele também deve ser compatível com a técnica empregada para análise, como é o caso da cromatografia em fase líquida ou gasosa. Além disso, é desejável que ele tenha baixa solubilidade em água e baixa pressão de vapor, a fim de evitar perdas por solubilização na amostra ou por volatilização (FARAJZADEH et al., 2009; LEONG et al., 2010, KOCÚROVÁ et al, 2010; GUO e LEE, 2011). Isso limitou as opções aos solventes clorados mais comuns, como diclorometano, clorofórmio e tetracloreto de carbono. Outros solventes clorados e o sulfeto de carbono (CS_2) utilizado pelo autor que desenvolveu a

técnica (Rezaee et al., 2006) não foram testados nesse trabalho por não serem de pureza compatível com o uso em GC-MS.

Assim, para os ensaios empregando-se 5,0 mL de água para a formação da dispersão e 200 μ L de solvente extrator, as áreas de pico e seus respectivos desvios padrão (n=3) estão apresentados na FIGURA 15.

FIGURA 15 - COMPARAÇÃO DAS ÁREAS DE PICO DOS HPA APÓS *CLEAN UP* DE 1,0 ML SOLUÇÃO DE ACETONA 20 μ G L⁻¹ HPA COM DLLME EM 5,0 ML DE ÁGUA UTILIZANDO 200 μ L DE DICLOROMETANO, CLOROFÓRMIO OU TETRA-CLORETO DE CARBONO

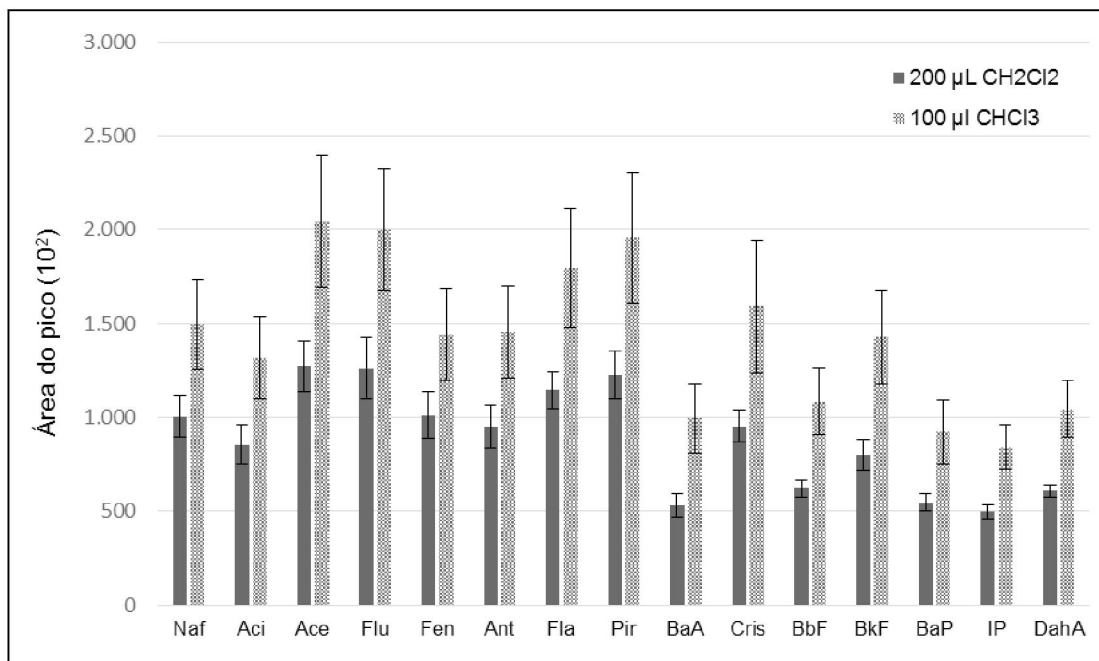


FONTE: A autora (2017)

Nos experimentos utilizando diclorometano as áreas de pico foram superiores aos dos demais solventes utilizados. O desvio padrão relativo variou de 5 a 12% para o diclorometano, de 18 a 50% para o clorofórmio e de 53 a 90% para o tetracloreto de carbono. Apesar do alto valor para esses dois últimos solventes, foi observado que apenas uma réplica da triplicata podia ser considerada anômala. Além disso, a técnica é sensível à habilidade manual do analista, tanto para a injeção da mistura de solventes como para a coleta da fase sedimentada.

Escolhendo-se o diclorometano como melhor solvente extrator pela maior área dos picos dos HPA, seguiu-se para o teste seguinte onde o seu volume foi variado entre 50, 100 e 200 μ L. Tanto os tubos contendo 50 como 100 μ L não formaram fase sedimentada, fato também relatado por Pastor-Belda et. al. (2015) ao utilizar volumes baixos de diclorometano. Por esse motivo, repetiu-se o mesmo teste, porém utilizando 100 μ L de clorofórmio como solvente extrator. Os resultados dos dois testes estão apresentados na FIGURA 16.

FIGURA 16 - COMPARAÇÃO DAS ÁREAS DE PICO DOS HPA APÓS *CLEAN UP* DE 1 ML SOLUÇÃO DE ACETONA $20 \mu\text{g L}^{-1}$ COM DLLME EM 5,0 ML DE ÁGUA UTILIZANDO 200 μL DE DICLOROMETANO E 100 μL DE CLOROFÓRMIO

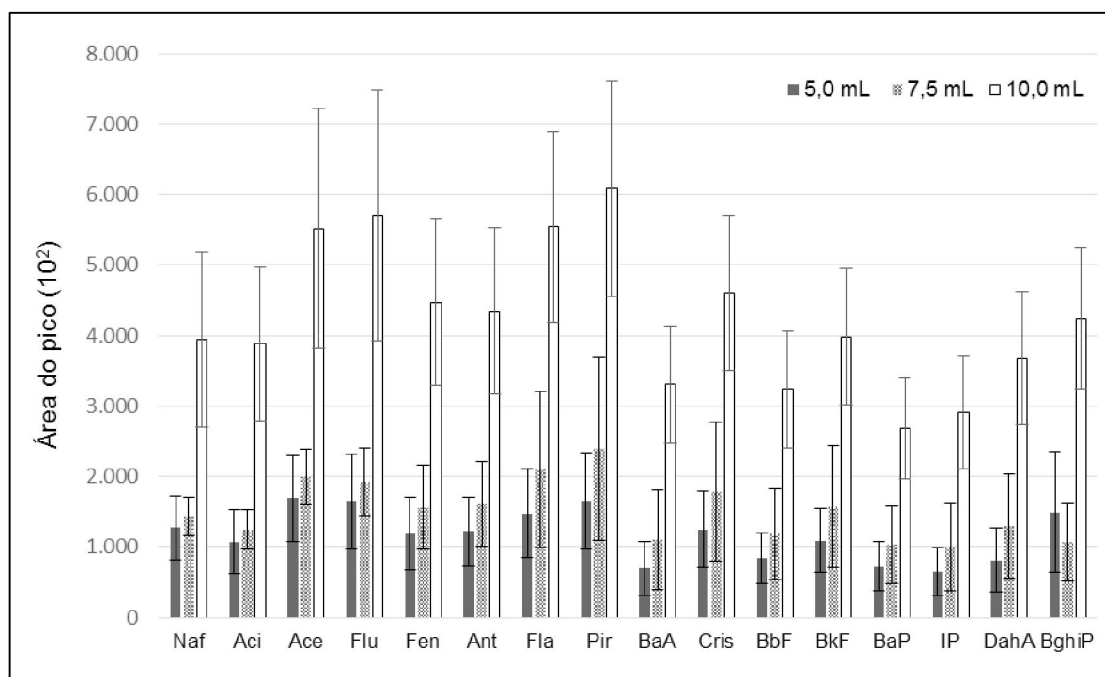


FONTE: A autora (2017)

É possível observar que a redução do volume do solvente extrator não necessariamente duplica a área, como esperado. Contudo, apenas o clorofórmio permite o uso desse volume de solvente, o que é explicada pelas suas diferentes solubilidades em água (8 g L^{-1} para o clorofórmio e 20 g L^{-1} para o DCM, a $20 \text{ }^\circ\text{C}$), que podem ser aumentadas pela presença da acetona agindo como cosolvente o que diminui o volume da fase sedimentada (ZANELLA et al., 2012).

Assim, preferiu-se utilizar 100 μL de clorofórmio dado que volumes inferiores de solvente extrator dificultam a formação da fase sedimentada, dificultando a sua coleta. Prosseguiu-se para a avaliação do volume de água utilizado para formar a dispersão. Ao utilizar-se 5,0, 7,5 e 10,0 mL de H_2O , a área dos picos aumentou significativamente, como observado na FIGURA 17.

FIGURA 17 – COMPARAÇÃO DAS ÁREAS DE PICO DOS HPA APÓS *CLEAN UP* DE UMA SOLUÇÃO DE ACETONA $20 \mu\text{g L}^{-1}$ COM DLLME UTILIZANDO 5,0, 7,5 E 10,0 ML DE ÁGUA E 100 μL DE CLOROFÓRMIO



FONTE: A autora (2017)

Uma possível explicação para esse fenômeno é que o volume de água propicia uma melhor dispersão do solvente dispersor e extrator (WANG et al., 2014), aumentando com isso a área de contato entre analito e solvente extrator. O mesmo teste foi realizado com 200 μ L de diclorometano posto que os resultados utilizando esse solvente apresentam desvio padrão mais baixo e que o enriquecimento dos analitos não é o principal objetivo. Contudo, o aumento do volume de água também atingiu o limite da solubilidade desse solvente não formando fase sedimentada. Assim, para a avaliação do desempenho da técnica com extratos de solo foram utilizados 10,0 mL de água e 100 μ L de clorofórmio.

Também foi testada a influência do efeito *salting out* pelo acréscimo de sal à água da dispersão (NaCl 10% m/v) com resultados pouco promissores por dificultarem a formação da gota, como também relatado por Saleh et al. (2009). Pastor-Belda et al. (2015) obtiveram um resultado semelhante e afirmam que a dificuldade na formação da gota com a adição de sal provavelmente se dá pelo aumento da viscosidade do meio, o que dificultaria a sua sedimentação. Por isso, o seu uso foi descartado em ensaios futuros.

Assim, as condições 1,0 mL de solvente dispersor misturado a 100 μ L de clorofórmio e injetados em 10,0 mL de água foram aplicados ao extrato de solo para avaliar a sua viabilidade nessa matriz.

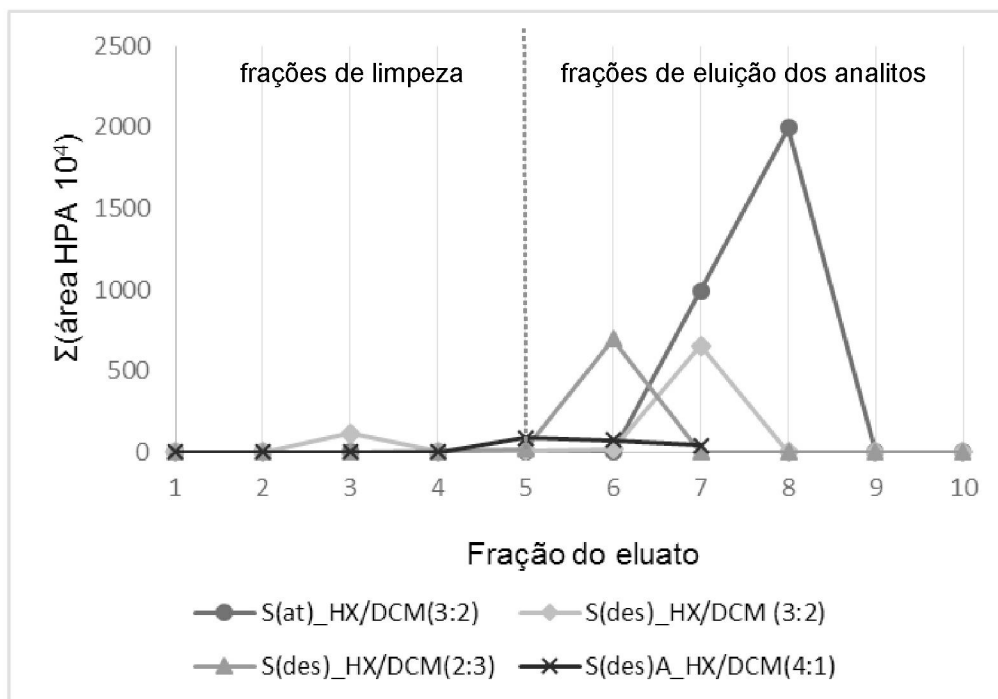
5.6.2 Segunda etapa: DLLME aplicada a extratos de solo PLE concentrados e ressuspendidos em acetona

Para comparar o método de *clean up* alternativo com o convencional, quatro colunas de SPE foram montadas baseando-se nas colunas descritas por Leite (2009), Taverna (2011) e seguindo as recomendações gerais do método 3630C da U.S. EPA (1996). Nessas colunas foram utilizadas a mesma massa de adsorvente, porém variando-se o grau de ativação (sílica ativada ou desativada com 2% água), a composição (sílica ou alumina) ou o solvente de eluição dos analitos (hexano:diclorometano nas proporções 3:2, 2:3 e 4:1). Para verificar se os HPA eluiriam apenas nas frações desejadas, após a saída de possíveis interferentes, foram coletadas frações de 1 mL, das quais após determinação por GC-MS foram obtidos cromatogramas nos quais as áreas dos picos dos HPA foram integradas e somadas.

Na FIGURA 18 estão apresentadas as quantidade de HPA (em área) encontradas em cada fração de solvente eluído pela coluna de SPE, sendo as cinco primeiras frações de limpeza de interferentes, nas quais não é desejável a eluição dos HPA, os quais devem estar presentes apenas nas cinco últimas. Foi observado que apenas na coluna S(at)_HX/DCM (3:2) utilizando sílica ativada e hexano:diclorometano (3:2) nenhuma quantidade apreciável dos HPA eluiu nas frações de limpeza, estando presentes apenas nas frações de número 7, 8 e 9 que corresponde às frações de eluição dos analitos.

FIGURA 18 - PERFIL DE FRACIONAMENTO DE SOLUÇÃO PADRÃO DE HPA
960 μ G L⁻¹
S(AT)_HX/DCM (3:2): 1 G SÍLICA ATIVADA, HEXANO/DICLOROMETANO (3:2)

S(DES)_HX/DCM(3:2):1 G SÍLICA DESATIVADA (2%),
 HEXANO/DICLOROMETANO (3:2)
 S(DES)_HX/DCM (3:2): 1 G SÍLICA DESATIVADA (2%),
 HEXANO/DICLOROMETANO (2:3)
 S(DES)AL_HX/DCM(3:2):750 MG SÍLICA DESATIVADA (2%),250 MG ALUMINA,
 HEXANO/DICLOROMETANO (4:1)



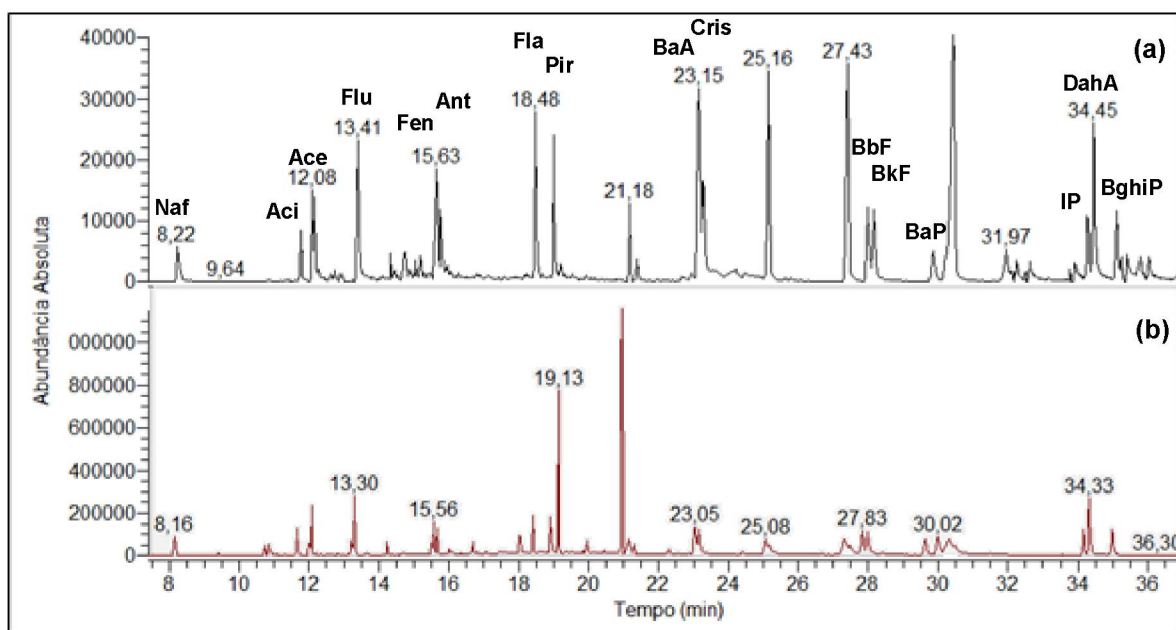
FONTE: A autora (2017)

Tal comportamento não se repete nas colunas S(des)_HX/DCM(3:2) S(des)_HX/DCM (2:3) utilizando sílica desativada e hexano:diclorometano (3:2) ou (2:3), nos quais há sinal dos analitos tanto nas frações de limpeza como de eluição. Ao acrescentar-se água à sílica tornando-a desativada, os seus sítios ativos de silanol são “mascarados”, resultando na diminuição da sua capacidade de adsorção (BRAITHWAITE e SMITH, 2012). Khan, Troquet e Vachelard (2005) também relatam que a desativação da sílica aumenta a reprodutibilidade do método, motivo pelo qual é realizada por muitos autores. Na coluna S(des)A_HX/DCM(4:1) utilizando sílica e alumina os analitos saíram apenas nas frações de interesse, porém com área total dos HPA menor a dos demais ensaios, possivelmente por estes não terem eluído completamente da coluna. Assim, optou-se pela coluna S(at)_HX/DCM (3:2) para a realização dos ensaios de comparação com os de DLLME utilizada como *clean up*.

A comparação com a metodologia convencional (SPE) foi feita de maneira quantitativa apenas para os ensaios de DLLME, uma vez que partiu-se do mesmo extrato de solo fortificado, a fim de evitar variações intrínsecas ao processo de extração. Para garantir que os analitos estavam presentes no extrato de solo e em concentração conhecida, foi feita

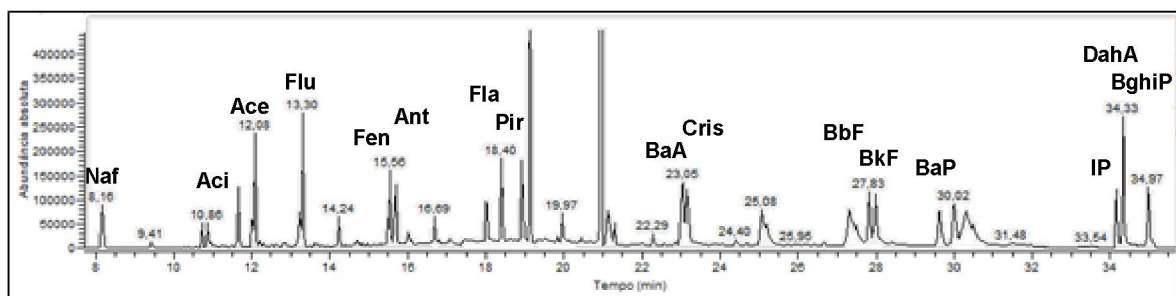
a sua ressuspensão com acetona contendo os HPA na concentração $20 \mu\text{g L}^{-1}$, a mesma dos ensaios anteriores. Assim, foi possível observar se o método desenvolvido é eficiente para a remoção de outros compostos bem como avaliar a eficiência apenas do *clean up*, desconsiderando os fatores que influenciam na extração. Nas FIGURAS 19 e 20 são mostrados os cromatogramas do extrato fortificado após *clean up* com SPE (como descrito no início dessa seção) e com o a DLLME.

FIGURA 19 - CROMATOGRAMAS DOS EXTRATOS UTILIZANDO 2,5 G DE SOLO OBTIDOS POR PLE E FORTIFICADOS COM $20 \mu\text{G L}^{-1}$ HPA APÓS *CLEAN UP* UTILIZANDO SPE (A) E DLLME (B)



FONTE: A autora (2017)

FIGURA 20 - CROMATOGRAMA DOS EXTRATOS UTILIZANDO 2,5 G DE SOLO OBTIDOS POR PLE E FORTIFICADOS COM $20 \mu\text{G L}^{-1}$ HPA APÓS *CLEAN UP* UTILIZANDO DLLME (AMPLIAÇÃO)

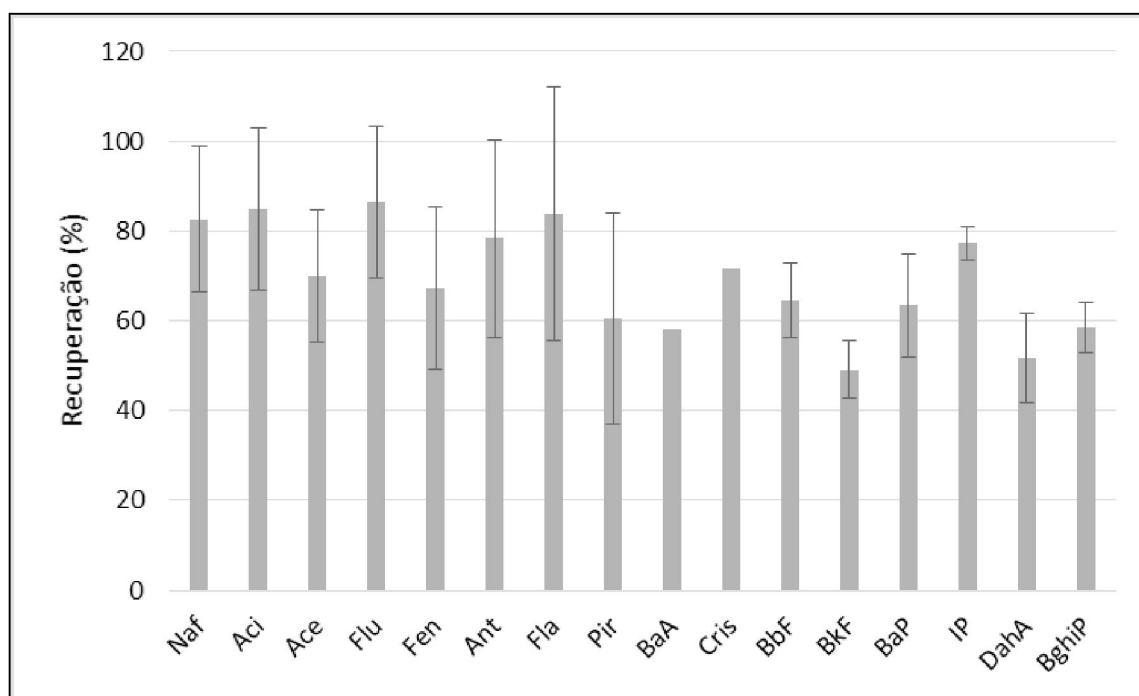


FONTE: A autora (2017)

Comparando-se os cromatogramas acima, observa-se que o extrato oriundo da limpeza com DLLME apresenta menos picos de interferentes no cromatograma que o da SPE, o que é observado pela linha de base menos ruidosa e pela menor quantidade de picos

adjacentes aos dos analitos. Para obter-se um resultado quantitativo, o *clean up* com DLLME foi feito também em extratos sem fortificação, e pela diferença entre as concentrações de HPA obtidas foi calculada a recuperação dos analitos, como apresentado na FIGURA 21.

FIGURA 21 - RECUPERAÇÃO MÉDIA E DESVIO PADRÃO DOS HPA EM EXTRATOS UTILIZANDO 2,5 G DE SOLO OBTIDOS POR PLE E FORTIFICADOS COM 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ HPA APÓS *CLEAN UP* UTILIZANDO DLLME



FONTE: A autora (2017)

Nota-se no gráfico acima que a recuperação dos HPA variou de 51 a 86%, com desvio padrão relativo de 4,8 a 38,9%. No caso do benzo(a)antraceno e do criseno, duas réplicas do extrato de solo sem *spike* foram consideradas anômalas por resultarem em valores de recuperação negativos, motivo pelo qual o desvio padrão foi omitido. Esses valores estão ligeiramente fora do que é recomendado pela AOAC (2000) em critérios de precisão (desvio padrão relativo máximo de 30%) e exatidão (recuperação entre 60-115%) para analitos na faixa de concentração de 10 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Algumas considerações devem ser feitas acerca do uso da DLLME como estratégia para a limpeza de extratos de solo. A técnica oferece como vantagem a simplicidade e rapidez na sua execução, sendo possível processar várias amostras ao mesmo tempo. Os reagentes não precisam ser preparados de antemão, como no caso da sílica e da alumina, que requerem ativação, e o uso de solventes é reduzido em relação a SPE, que os consomem tanto para a etapa de eluição quanto de empacotamento. Contudo, também há desvantagens, como a habilidade manual do analista para executar a técnica, como no caso da coleta da

fase sedimentada que por vezes é de pequena dimensão e mistura-se com água ao ser succionada. Esse também é o desafio para a adição do padrão interno, pois mesmo a fase sendo coletada em volume conhecido, a sucção de bolhas e água faz com que parte dela tenha que ser descartada, fazendo o seu volume ser variado entre réplicas. Além disso, para não alterar significativamente o volume da fase sedimentada recolhida e com isso prejudicar o enriquecimento dos analitos, adiciona-se apenas 1 μL da solução de padrão interno, o qual está mais sujeito a erros de pipetagem. Uma proposta seria a adição do padrão interno em volume maior, no momento da ressuspensão do extrato. Com isso, ele não corrigiria apenas a flutuação instrumental como o propósito que teve até o momento, mas é possível que haja um ganho em precisão do método. É válido ressaltar que outros autores que desenvolveram métodos de DLLME para HPA não utilizaram padrão interno (LEONG et al., 2010; REZAEI et al., 2006; XU et al., 2009). Guo e Lee (2011), por exemplo, determinaram os 16 HPA prioritários em amostras de água por DLLME utilizando GC-MS e calibração externa.

Também é necessário considerar que para extratos fortificados com solução de HPA 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ ou superior, os picos podem ser distinguidos de outros compostos. No extrato sem *spike*, os picos se confundem aos do ruído pois estão em concentração abaixo de 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ na fase sedimentada que é o primeiro ponto da curva para alguns analitos. Isso indica que os analitos estavam numa concentração de aproximadamente 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ no extrato original, e que por isso o solo sem fortificação utilizado na extração possui concentração inferior a 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Nesse sentido, o uso de maior massa de amostra para aumentar a concentração e com isso a área dos analitos permite uma quantificação mais precisa.

Avaliou-se também a ressuspensão do extrato em outros solventes dispersores como a acetonitrila e o metanol. No primeiro caso, o extrato não foi totalmente solubilizado no solvente, restando uma película no fundo do tubo de ensaio utilizado para evaporá-lo até a secura. Já com o metanol os primeiros analitos não foram observados no cromatograma, sendo por isso preferível continuar com a acetona, cujo volume a ser utilizado na ressuspensão pode vir a ser realizado em etapas futuras do trabalho.

Para fins de comparação de técnicas de *clean up*, o uso de extratos oriundos da PLE cumpriu o seu propósito. Entretanto, seria mais interessante se outra forma de extração fosse utilizada, se possível sem a etapa de concentração do extrato como executado por alguns autores (PASTOR BELDA et al., 2015; CACHO et al., 2016).

5.6.3 Terceira etapa: DLLME aplicada a extratos de solo PLE (alíquota sem evaporação do solvente)

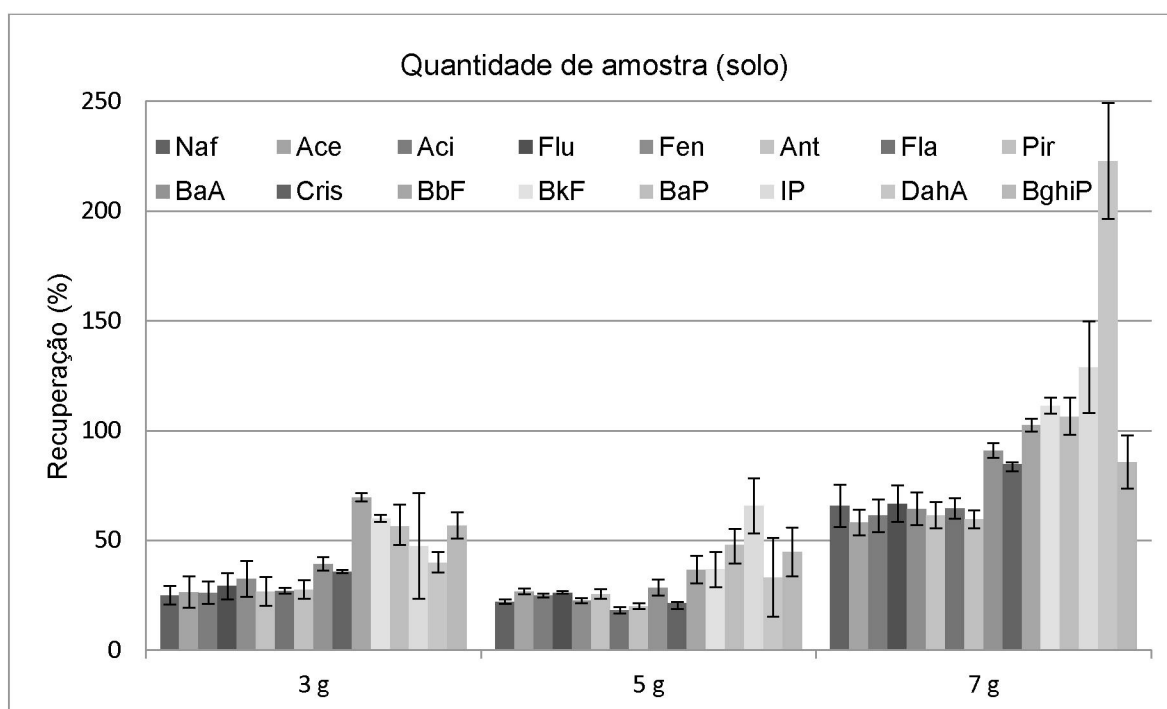
Nessa etapa, as condições experimentais da DLLME foram mantidas para que as de extração fossem estudadas a fim de viabilizar a eliminação da etapa de evaporação do solvente. Dois desafios deveriam ser superados. O primeiro foi a escolha do solvente extrator, pois a mistura acetona:DCM (1:1) empregada na PLE convencional não é adequada para ser empregada como solvente dispersor na DLLME. Isso porque nessa técnica a acetona é um solvente dispersor e o DCM um solvente extrator, porém em proporções que não permitem a formação da fase sedimentada. Assim, estabeleceu-se que o solvente extrator da PLE seria o mesmo do solvente dispersor da DLLME. Escolheu-se utilizar a acetona, e uma vez que a natureza química do solvente é um fator secundário para a extração em PLE, poderia ser eficiente para a extração dos analitos da matriz de solo. Outro desafio foi a quantidade de massa de solo a ser empregada. Isso porque a alíquota de extrato possui os analitos em concentração diluída, definida pelo volume do extrato obtido, o qual também varia de extração para extração. Em uma célula de 10 mL contendo de 3 a 7 g de solo, o volume do extrato obtido é praticamente o mesmo, pois a alta pressão compacta a amostra e o volume remanescente da célula é preenchido com o solvente. Contudo, entre as extrações observa-se uma grande variação de volume (10 a 20 mL), pois quando a pressão da célula atinge o valor limite, libera uma parte do solvente de extração para o frasco coletor e acrescenta mais solvente de forma a repressurizá-la até o valor ideal, o que aumenta o volume do extrato.

O desenvolvimento de uma metodologia PLE envolve geralmente a escolha do solvente de extração, tempo de extração, número de ciclos, volume de purga e temperatura, parâmetros que devem ser estudados visando atingir valores ideais de recuperação dos analitos (SUBEDI et al., 2015). Contudo, algumas dessas condições foram pré-estabelecidas visando adequar o método a etapa seguinte de DLLME. Além do solvente de extração ser obrigatoriamente a acetona, optou-se por efetuar a extração em apenas um ciclo, pois a cada ciclo adicional dobra-se o volume de extrato, promovendo a diluição dos analitos. O volume de purga, definido como pela percentagem de volume da célula que é enxaguada com o próprio solvente para a transferência total dos analitos para o frasco coletor foi reduzido de 60% para 30%. A influência desse parâmetro não foi estudada, pois afetaria apenas na transferência quantitativa dos analitos da célula para o extrato. Assim, além de avaliar a quantidade máxima de amostra que poderia ser acomodada dentro da célula de 10 mL, foram

estudadas as variáveis remanescentes tempo de extração e temperatura, além do acréscimo de sílica e terra diatomácea visando aumentar respectivamente a seletividade a detectabilidade dos analitos.

Previamente, avaliou-se a quantidade de massa passível de ser acomodada na célula de extração, ocasião na qual definiu-se que seriam utilizadas as massas 3, 5 e 7 g de solo. Partindo-se do solo fortificado com $20 \mu\text{g kg}^{-1}$ de HPA, espera-se que a concentração dos analitos no extrato varie de $3 \mu\text{g L}^{-1}$ (3 g de solo em 20 mL de extrato) até no máximo $14 \mu\text{g L}^{-1}$ (7 g de solo em 10 mL de extrato). Uma vez que a proporção de clorofórmio e acetona é 1:10, os analitos podem ser concentrados em até 10 vezes, ou seja, de 30 a $140 \mu\text{g L}^{-1}$, desconsiderando os HPA já presentes na matriz. As recuperações encontradas para as extrações utilizando 3 g, 5 g e 7 g de solo são apresentadas no gráfico da FIGURA 22:

FIGURA 22 - RECUPERAÇÃO MÉDIA E DESVIO PADRÃO DOS HPA EM EXTRATOS OBTIDOS POR PLE-DLLME UTILIZANDO 3, 5 OU 7 G FORTIFICADOS COM $20,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ HPA CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS: 1 CICLO DE 5 MIN, 100°C



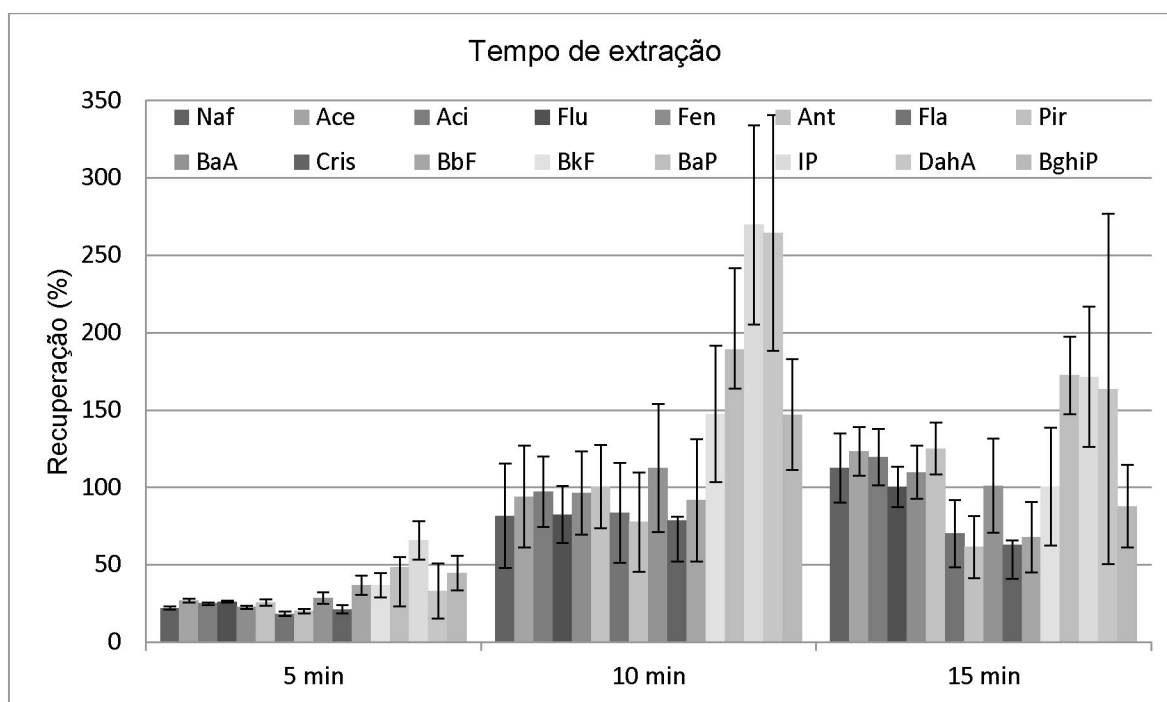
FONTE: A autora (2017)

Para definir as melhores condições experimentais do método, foi empregada a análise de variância (ANOVA) para avaliar se existem diferenças entre as médias dos tratamentos considerando o desvio padrão da técnica. Nesse primeiro teste, concluiu-se com um nível de significância de 5% que as extrações utilizando 3 e 5 g diferem estatisticamente para 10 dos 16 HPA, e 7 g difere das duas anteriores para todos os HPA. Isso é corroborado observando-

se os valores de recuperação notadamente mais altos quando 7 g de solo são utilizados. No entanto, tal quantidade de amostra é de difícil acomodação dentro da célula de extração, não sendo possível envolvê-la adequadamente no papel de filtro. Sem ele, as vedações ficam sujeitas à entrada da amostra, levando a possíveis entupimentos do sistema, além de aumentar a frequência de manutenção das células. Por esse motivo, optou-se por utilizar 5 g de solo nas etapas seguintes e tentar aumentar os valores de recuperação dos analitos otimizando-se os outros parâmetros.

O segundo parâmetro a ser avaliado foi o tempo de extração estática, ou seja, o período que a amostra e o solvente ficam em repouso dentro da célula sob alta temperatura e pressão. Os tempos de extração mais utilizados na literatura são um ou dois ciclos de 5 ou 10 minutos (RICHTER et al., 1996; HEEMKEN et al., 1997; SAIM et al., 1998, ZHANG et al., 2012). Contudo, visando reduzir o consumo de solvente e conseqüentemente o volume do extrato, foram estudados ciclos únicos de 5, 10 e 15 minutos. Vale ressaltar que existem outras etapas de aquecimento e estabilização do equipamento que prolongam a duração dessa etapa em cerca de 50%, motivo pelo qual não foram testados ciclos maiores. Além disso, foi observado que um maior tempo de extração deixa a célula passível de mais ajustes de pressão, que dispendem solvente e aumentam o volume final do extrato. Os resultados desses ensaios estão apresentados na FIGURA 23:

FIGURA 23 - RECUPERAÇÃO MÉDIA E DESVIO PADRÃO DOS HPA EM EXTRATOS OBTIDOS POR PLE-DLLME UTILIZANDO 5 G DE SOLO CONTENDO $20,0 \mu\text{G kg}^{-1}$ DE HPA E UM CICLO DE EXTRAÇÃO DE 5, 10 OU 15 MINUTOS
CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS: 100 °C

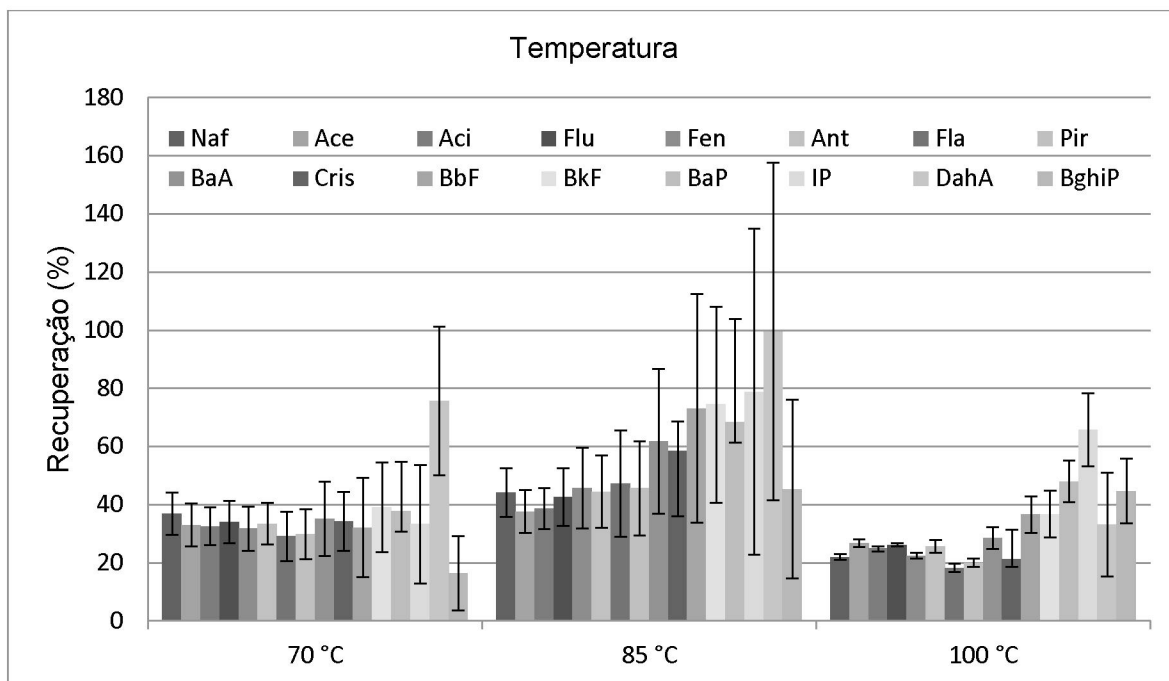


FONTE: A autora (2017)

Utilizando-se a análise de variância como descrito anteriormente, concluiu-se que não há diferença significativa entre as recuperações dos HPA obtidas com 10 e 15 minutos, sendo ambas superiores à extração utilizando 5 minutos. Por esse motivo, escolheu-se prosseguir com 1 ciclo de 10 minutos a fim de reduzir o tempo de análise e os alívios de pressão da célula que acabam por gerar extratos mais diluídos.

Em seguida, foram avaliadas três diferentes temperaturas de acordo com as que geralmente são relatadas na literatura (RAMOS, VREULS e BRINKMAN, 2000; RICHTER et al., 2006; ZHANG et al., 2012). Como observado na FIGURA 26 e corroborado pela análise de variância, não existem diferenças significativas entre as extrações utilizando 70, 85 e 100 °C. Por isso, optou-se por utilizar a temperatura média de 85 °C, posto que temperaturas mais amenas levam a baixos valores de recuperação, bem como temperaturas mais elevadas por perdas dos analitos por volatilização (ZHANG et al., 2012).

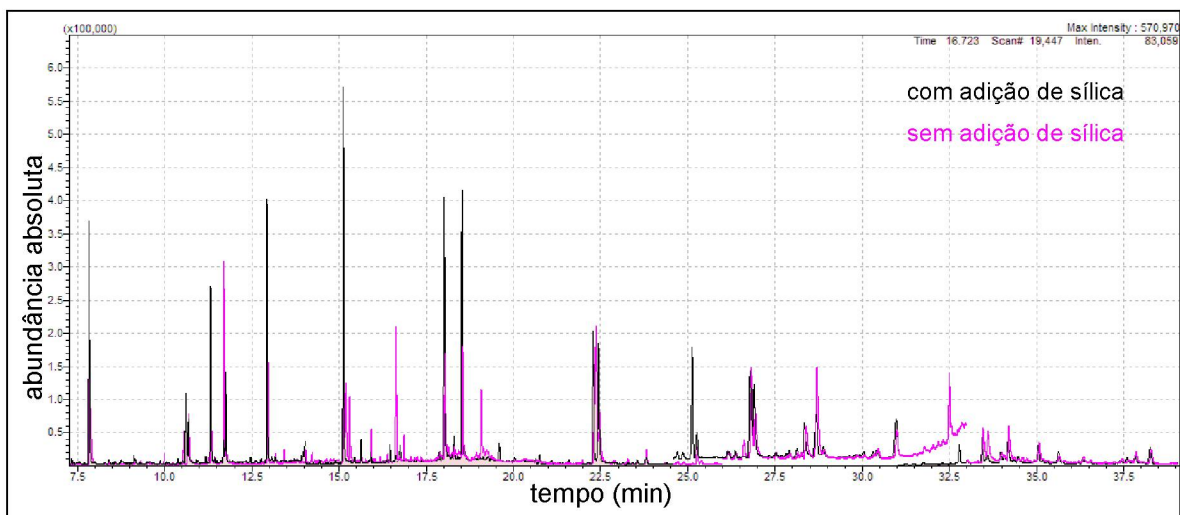
FIGURA 24 - RECUPERAÇÃO MÉDIA E DESVIO PADRÃO DOS HPA EM EXTRATOS OBTIDOS POR PLE-DLLME UTILIZANDO 5 G DE SOLO CONTENDO 20,0 $\mu\text{G kg}^{-1}$ DE HPA E TEMPERATURA DE EXTRAÇÃO DE 70, 85 OU 100 °C. CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS: 1 CICLO DE 5 MIN



FONTE: A autora (2017)

Por fim, avaliou-se a possibilidade de adicionar sílica ou terra diatomácea (TD) às células, com propósitos diferentes. No primeiro caso, a sílica cumpre a função de adsorver compostos interferentes e com isso melhorar a seletividade do método como na SPLE (NOLLET, 2005). Assim, nesse ensaio foram avaliados os cromatogramas das duas amostras preparadas e extraídas da mesma maneira, com e sem adição de sílica na parte inferior da célula. Como visualizado na FIGURA 25, o cromatograma em preto (com adição de sílica) apresenta menos ruído na linha de base que o cromatograma em rosa (sem adição de sílica).

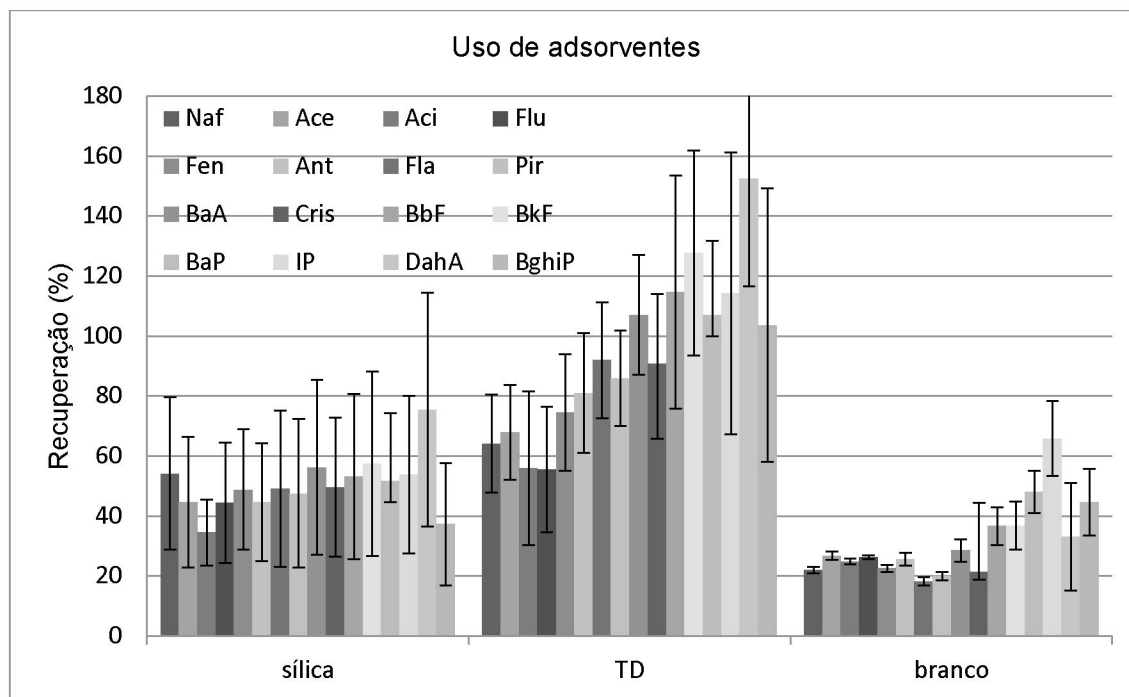
FIGURA 25 - CROMATOGRAMAS DOS EXTRATOS OBTIDOS POR PLE-DLLME UTILIZANDO 5 G DE SOLO CONTENDO $20,0 \mu\text{G KG}^{-1}$ DE HPA COM E SEM ADIÇÃO DE SÍLICA CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS: 1 CICLO DE 5 MIN, $100 \text{ }^\circ\text{C}$



FONTE: A autora (2017)

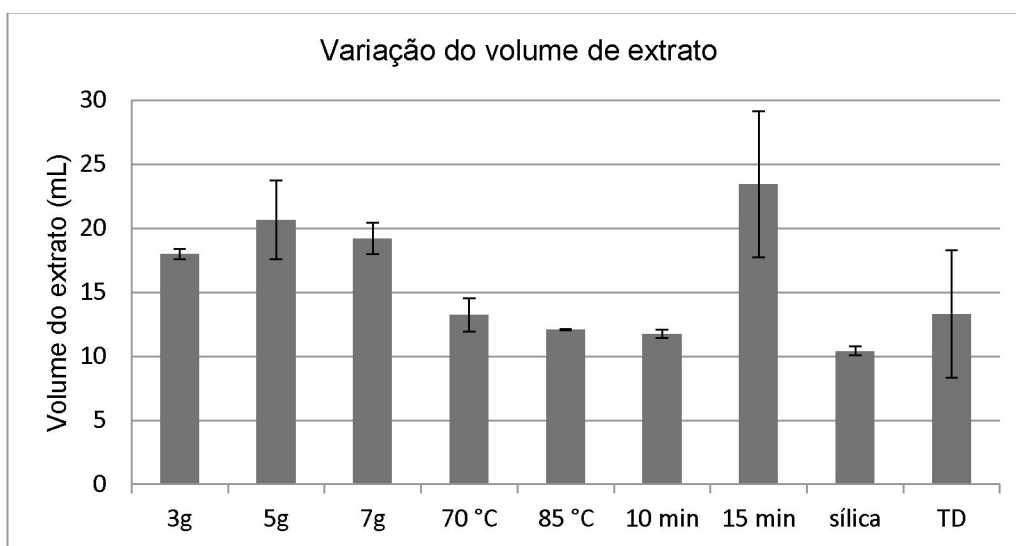
Contudo, tal diferença não repercute nos valores de recuperação e desvios padrão relativos encontrados (FIGURA 26), onde a análise de variância afirma que não há diferença significativa entre esses dois ensaios. Já a terra diatomácea foi adicionada com a finalidade de preencher o volume morto da célula e com isso reduzir a quantidade de extrato produzido. Apesar das recuperações significativamente mais altas, como mostrado na FIGURA 26, observou-se que não houve redução no volume do extrato quando comparada com os outros ensaios realizados anteriormente, como mostrado na FIGURA 27.

FIGURA 26 - RECUPERAÇÃO MÉDIA E DESVIO PADRÃO DOS HPA EM EXTRATOS OBTIDOS POR PLE-DLLME UTILIZANDO 5 G DE SOLO CONTENDO $20,0 \mu\text{G KG}^{-1}$ DE HPA E ADIÇÃO DE SÍLICA OU TERRA DIATOMÁCEA (TD). CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS: 1 CICLO DE 5 MIN, 100°C



FONTE: A autora (2017)

FIGURA 27 – COMPARAÇÃO ENTRE O VOLUME DOS EXTRATOS OBTIDOS POR PLE-DLLME UTILIZANDO DIFERENTES CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS



FONTE: A autora (2017)

Como a sílica e a terra diatomácea não surtiram efeitos significativos na extração optou-se por não acrescentar nenhum material à célula, a fim de reduzir o consumo de reagentes e o tempo de montagem da célula. Assim, foram definidas como as melhores condições de extração: 5 g de solo, 1 ciclo de 10 min e temperatura de 85 °C. Esses parâmetros foram utilizados em solos fortificados em três concentrações distintas (20, 50 e

100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de HPA), como realizado com a metodologia da SPLE. Os resultados desses ensaios estão expressos na TABELA 16:

TABELA 16 – ENSAIO DE RECUPERAÇÃO UTILIZANDO SOLO FORTIFICADO COM HPA E EXTRAÇÃO COM PLE-DLLME

	20,0 $\mu\text{g L}^{-1}$		50,0 $\mu\text{g L}^{-1}$		100,0 $\mu\text{g L}^{-1}$	
	R (%)	DPR (%)	R (%)	DPR (%)	R (%)	DPR (%)
Naftaleno	104,4	0,8	115,8	3,3	112,7	16,4
Acenaftileno	91,7	5,3	120,1	5,4	117,3	15,2
Acenafteno	110,4	0,8	133,6	4,1	131,8	15,4
Fluoreno	94,8	9,7	94,2	4,7	96,0	11,0
Fenantreno	146,4	13,5	124,8	6,4	120,8	14,2
Antraceno	120,3	9,3	133,9	5,5	127,1	12,5
Fluoranteno	138,8	21,4	137,0	8,4	132,1	13,9
Pireno	136,6	22,1	136,2	11,3	129,4	14,9
Benzo(a)antraceno	144,0	27,1	141,5	18,2	132,0	16,3
Criseno	118,0	35,1	111,9	16,3	105,6	18,1
Benzo(b)fluoranteno	147,8	37,2	118,4	14,3	112,6	22,1
Benzo(k)fluoranteno	138,5	36,2	115,3	19,9	112,2	16,8
Benzo(a)pireno	106,2	28,2	100,5	15,1	99,9	20,3
Indeno(1,2,3-cd)pireno	94,1	39,8	78,0	20,8	77,2	22,2
Dibenzo(ah)antraceno	98,3	44,1	87,5	20,0	87,7	18,8
Benzo(g,h,i)perileno	71,3	51,1	55,5	21,3	53,6	21,0

R = recuperação; DPR = desvio padrão relativo

FONTE: A autora (2017).

Os resultados de recuperação e desvio padrão relativo para os HPA foram considerados satisfatórios para a maioria dos HPA, sobretudo nas concentrações intermediária, considerando as recomendações da AOAC (2002) (R = 70 - 125% e DPR < 15%). Também foi possível obter valores de recuperação mais altos para os HPA mais voláteis, o que não havia sido possível na metodologia SPLE. Uma vez que em ambas a amostra de solo está sujeita a altas temperaturas de extração, é possível que estes analitos tenham se perdido na etapa de evaporação do extrato. A metodologia oferece como maior vantagem o consumo reduzido de solventes orgânicos e um menor tempo de análise se comparada com métodos descritos na literatura que empregam técnicas convencionais, como apresentado na TABELA 17:

TABELA 17 – CONDIÇÕES UTILIZADAS EM DIFERENTES METODOLOGIAS DE EXTRAÇÃO DE HPA DE SOLOS

Metodologia	Sohxlet	Sonicação	PLE	PLE-DLLME
Referência	EPA 3540C	EPA 3550C	EPA 3545	(este trabalho)
Solvente	150 mL hexano/acetona	40 mL DCM/metanol	30 mL DCM	10 - 20 mL acetona 100 µL clorofórmio
Tempo de extração	8 h	15 min	15 min ^a	10 min extração ^b 1 min agitação 10 min centrifugação

^a = não foi considerado o tempo empregado na concentração do extrato e *clean up*

^b = o tempo de extração costuma ser ligeiramente superior por conta da estabilização do equipamento

FONTE: A autora (2017).

Além disso, o método desenvolvido utiliza uma quantidade ínfima de solvente clorado, o qual é evitado no desenvolvimento de métodos ambientalmente amigáveis por sua alta toxicidade (GALUSZKA, MIGASZEWSKI e NAMIESNIK, 2013). Além disso, de acordo com os princípios citados pelos mesmos autores, o método está alinhado à Química Analítica Verde por minimizar o tamanho da amostra e reduzir o consumo de energia dado que o tempo dispendido nas etapas de homogeneização por vórtex e centrifugação são inferiores ao da evaporação do extrato até a *secura*.

Outra vantagem do método é não haver a necessidade de um aparato como o concentrador de amostras, fluxo de nitrogênio ou rotaevaporador para concentrar os extratos como no caso da metodologia SPLE. Contudo, alguns desafios poderiam ser encontrados na sua implementação em análises de rotina. Além da etapa de pesagem dos extratos para sua conversão para volume que não pode ser relevada, a etapa da DLLME é sensível à habilidade manual do analista. Foi observado empiricamente que resultados anômalos foram encontrados quando a homogeneização não foi efetuada de maneira eficiente por conta das diferenças entre tubos de ensaio. Além disso, a coleta da fase sedimentada requer cuidado para que a água não seja aspirada juntamente, trazendo prejuízos para o sistema instrumental. Contudo, a metodologia oferece vantagens que podem superar os desafios e contribui para o desenvolvimento de outras aplicações da DLLME em matrizes sólidas.

6 CONCLUSÕES

O método para a determinação de HPA por GC-MS foi estabelecido satisfatoriamente. Foi possível definir as condições de separação dos analitos por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas. Com o método obtido, foi possível separar os 16 HPA em 38 minutos, com um ganho de tempo de quase 50% em relação ao método utilizado como referência. A curva analítica construída a partir das

soluções-padrão dos analitos apresentou parâmetros de mérito de acordo com o que é recomendado por protocolos de validação analítica.

A extração com líquido pressurizado se mostrou uma técnica promissora para a extração de HPA de amostras de solo. As modalidades SPLE e PLE-DLLME tiveram as principais condições experimentais avaliadas e apresentaram desempenhos satisfatórios para maioria dos HPA. Entretanto, apenas a PLE-DLLME foi capaz de quantificar os HPA mais voláteis com precisão e exatidão aceitáveis. Essa metodologia que foi desenvolvida tem como principal vantagem a redução do volume de solvente utilizado e do tempo de análise, além de eliminar a etapa de concentração do extrato uma vez que a DLLME já cumpre esse papel.

Dentre as amostras de solo que receberam adição de xisto retornado, nenhuma apresentou teores de HPA acima de $25 \mu\text{g kg}^{-1}$ de solo, que é o limite máximo mais restritivo segundo as orientações do CONAMA. A maioria dos HPA não foi detectada ou apresentou sinal abaixo do limite de quantificação, e dentre os compostos cuja concentração foi determinada, as diferenças são sutis e não podem ser atribuídas aos tratamentos de adição de xisto retornado no solo. Assim, sugere-se que o uso do xisto retornado como insumo agrícola não proporciona um aumento na concentração de HPA no solos, sendo seguro para o meio ambiente do ponto de vista dessa avaliação.

REFERÊNCIAS

ABDEL-SHAFY H.I.; MANSOUR, M.S.M. A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation. **Egyptian Journal of Petroleum**, 25, 1, 107-123, 2016.

ALBA, J. M. F. **Recuperação de áreas mineradas**. 2ª ed. Brasília: EMBRAPA, 2010.

ALLOWAY, B. J. **Heavy Metals in Soils**. London: Blackie A & P, 1993.

ALPENDURADA, M. F. Solid-phase microextraction: a promising technique for sample preparation in environmental analysis. **Journal of Chromatography A**, 889, 3–14, 2000.

AKINRINDE, E.A. **Soils: Nature, Fertility Conservation and Management**. AMS Publishing, Inc, 2004.

ANDA (AGÊNCIA NACIONAL PARA DIFUSÃO DE ADUBOS). **Principais indicadores do setor de fertilizantes**. Disponível em: <http://www.anda.org.br/>. Acesso em: novembro de 2017..

AOAC INTERNATIONAL. “AOAC Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals,” **Association of Official Analytical Chemists**, Arlington, 2002.

ASENSIO-RAMOS, M.; HERNÁNDEZ-BORGES, J.; BORGES-MIQUEL, T. M.; RODRÍGUEZ-DELGADO, M. A.. Ionic liquid-dispersive liquid–liquid microextraction for the simultaneous determination of pesticides and metabolites in soils using high-performance liquid chromatography and fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, 1218, 30, 4808–4816, 2011.

ATSDR (AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY). **Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) What are the Standards and Regulations for PAHs Exposure?** Disponível em: <http://www.atsdr.cdc.gov>. Acesso em: junho de 2015.

BAIRD, C. e CANN, M. **Química Ambiental**. 4ª ed. Porto Alegre: Bookman, 2011.

BERRADA, H.; FONT, G.; MOLTÓ, J. C. Influence of the Solvent on the Gas Chromatographic Behaviour of Urea Herbicides. **Chromatographia**, 54, 3/4, 253-262, 2001.

BIELSKÁ, L.; HOVORKOVÁ, I.; KOMPRDOVÁ, K.; HOFMAN, J. Variability of standard artificial soils: Physico-chemical properties and phenanthrene desorption measured by means of supercritical fluid extraction. **Environmental Pollution**, 163, 1-7, 2012.

BRADY, N. C. **Natureza e Propriedades dos Solos**. 6ª ed. Rio de Janeiro: Editora Freitas Bastos, 1983.

BRAITHWAITE, A. e SMITH, J.F. **Chromatographic Methods**. Springer Science & Business Media, 2012.

BRINCH, U.C.; EKELUND, F.; JACOBSEN, C.S. Method for spiking soil samples with organic compounds. **Applied Environmental Microbiology**, 68, 4, 1808-1816, 2002.

CACHO, J. I.; CAMPILLO, N.; VIÑAS, P.; HERNANDEZ-CÓRDOBA, M. Dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of nitrophenols in soils by microvial insert large volume injection-gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, 1456, 27-33, 2016.

CCME (CANADIAN COUNCIL OF MINISTERS OF THE ENVIRONMENT). **Canadian Water Quality Guidelines for the Protection of Aquatic Life**. Disponível em: <http://ceqg-rcqe.ccme.ca>. Acesso em: junho de 2015.

CETESB (COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO). **Diretoria nº 045/2014/E/C/I**. Dispõe sobre a aprovação dos Valores Orientadores para Solos e Águas Subterrâneas no Estado de São Paulo – 2014, em substituição aos Valores Orientadores de 2005 e dá outras providências. Diário Oficial do Estado de São Paulo, 124 (36), 53, 2014.

CHOI, M.; KIM, Y. LEE, I., CHOI, H. Development of a one-step integrated pressurized liquid extraction and cleanup method for determining polycyclic aromatic hydrocarbons in marine sediments. **Journal of Chromatography A**, 1340, 8–14, 2014.

COLA, G. P. A. E SIMÃO, J. B. P. Rochagem como forma alternativa de suplementação de potássio na agricultura agroecológica. **Revista Verde**, 7, 1, 1-8, 2012.

CONAMA (CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE). **Critérios e valores orientadores de qualidade do solo e gerenciamento de áreas contaminadas**. Diário Oficial da União, 249, 81-84, 2009.

CROMPTON, T.R. **Determination of organic substances in water**. Editora Wiley, 1984.

DEAN, J. R. Accelerated solvent extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated soil. **Analytical Communications**, 33, 191-192, 1996.

DELAY, M., SCHMITT, D AND FRIMMEL, F. H. Wassergesättigte Säulenversuche Zur Bestimmung Der Quellstarke Anorganischer Schadstoffe Aus Lockermaterialien. **Vom Wasser**, 100, 49-60, 2003.

DELAY, M., LAGER, T., SCHULZ, H. D., FRIMMEL, F. H. Comparison of leaching tests to determine and quantify the release of inorganic contaminants in demolition waste. **Waste Management**, 27, 248-255, 2007.

DELGADO-POVEDANO, M.M., LUQUE DE CASTRO, M.D. Ultrasound-assisted analytical emulsification-extraction. Trends in **Analytical Chemistry**, 45, 2013.

DO, L.; LUNDSTEDT, S.; HAGLUND, P. Optimization of selective pressurized liquid extraction for extraction and in-cell clean-up of PCDD/Fs in **soils and sediments**. **Chemosphere**, 90, 2414-2419, 2013.

EMMRICH, M.; LAHRZ, T.; SPYRA, W. Influence of solvents and gas chromatographic injector conditions on the detectability of nitroaromatic compounds. **Journal of Chromatography A**, 918, 1, 121-126, 2001.

FARAJZADEH, M.A., SEYEDI, S. E., SHALAMZARI, M. S. BAMOROWAT, M. Dispersive liquid–liquid microextraction using extraction solvent lighter than water. **Journal of Separation Science**, 32, 2009.

FERREIRA, V.R., GOUVEIA, C.D., SILVA, C.A., FERNANDES, A.N., GRASSI, M.T. Optimization of an analytical protocol for the extraction, fractionation and determination of aromatic and aliphatic hydrocarbons in sediments. **Journal of Brazilian Chemical Society**, 23, 8, 1461-1468, 2012.

GALUSZKA, A; MIGASZEWSKI, Z.; NAMIESNIK, J. The 12 principles of green analytical chemistry and the significance mnemonic of green analytical practices. **Trends in Analytical chemistry**, 50, 2013.

GIERGIELEWICZ-MOŻAJSKA H., DĄBROWSKI L., NAMIEŚNIK J. Accelerated Solvent Extraction (ASE) in the analysis of environmental solid samples - some aspects of theory and practice. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, 31, 149-165, 2001.

GUO, L. E LEE, H.K. Low-density solvent-based solvent demulsification dispersive liquid–liquid microextraction for the fast determination of trace levels of sixteen priority polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental water samples. **Journal of Chromatography A**, 1218, 2011.

GRAHAM, M. C. ALLAN, R., FALLICK, A. E., FARMER, J.G. Investigation of extraction and clean-up procedures used in the quantification and stable isotopic characterisation of PAHs in contaminated urban soils. *Science of the Total Environment*, 360, 81– 89, 2006.
HATZINGER, P.B. e ALEXANDER, M. Effect of Aging of Chemicals in Soil on Their Biodegradability and Extractability. **Environmental Science & Technology**, 29, 2, 537–545, 1995.

HEEMKEN, O.; THEOBALD, N.; WENCLAWIAK, B. W. Comparison of ASE and SFE with Soxhlet, Sonication, and Methanolic Saponification Extractions for the Determination of Organic Micropollutants in Marine Particulate Matter. **Analytical Chemistry** , 69, 2171 – 2180, 1997.

HERRERA-HERRERA, A. V.; Asensio-Ramos, M.; Hernández-Borges, J.; Rodríguez-Delgado, M. A. Dispersive liquid-liquid microextraction for determination of organic analytes. **Trends in Analytical Chemistry**, 29, 7, 728-751, 2010.

HUSSEN, A.; WESTBOM, R.; NEGUSSIE, M.; MATHIASSEN, L.; BJÖRKLUND, E. Selective pressurized liquid extraction for multi-residue analysis of organochlorine pesticides in soil. **Journal of Chromatography A**, 1152, 247-253, 2007.

IGWE, J.C e UKAOGO .P. O. Environmental Effects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. **Journal of Natural Sciences Research**, 5, 7, 117- 131, 2015.

JINSHUI, C.; GUIFENG, D.; LINA, L.; AARON KETTLE, A. Accelerated Solvent Extraction — GC-MS Analysis and Detection of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Soil. Thermo Fisher Scientific. **Application Update** 313, 2013.

KHAN, Z., TROQUET, J. e VACHELARD, C. Sample preparation and analytical techniques for the determination of polyaromatic hydrocarbons in soils. **International Journal Environmental Science Technology**, 2, 3, 275-286, 2005.

KENNY, D. V. E OLESIK, S.V. Extraction of Bituminous Coal Fly Ash for Polynuclear Aromatic Hydrocarbons: Evaluation of Modified and Unmodified Supercritical Fluid Extraction, Enhanced Fluidity Solvents, and Accelerated Solvent Extraction. **Journal of Chromatographic Science**, 36, 66-72, 1998.

KETTLE, A. Use of Accelerated Solvent Extraction with in-cell clean up to eliminate sample clean up during sample preparation. Application Note 70632. **Thermo Fischer Scientific**, 2013.

KOCÚROVÁ, L.; BALOGH, I.; SANDREJOVÁ, J.; ANDRUCH, V. Recent advances in dispersive liquid- liquid microextraction using organic solvents lighter than water. **A review. Microchemical Journal**, 102, 11-17, 2012.

LAGER, T., DELAY, M., KARIUS, V., HAMER, K., FRIMMEL, F. H., SCHULZ, H. D., Determination And Quantification Of The Release Of Inorganic Contaminants From Municipal Waste Incineration Ash. **Acta Hydrobiol.** 34, 73-85, 2006.

LANÇAS, F.M. Cromatografia Líquida Moderna. Campinas: **Editora Átomo**, 2009.

LAU, E. V.; GAN, S.; NG, H. K. Extraction Techniques for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Soils **International Journal of Analytical Chemistry**, v. 2010, 2010.

LEITE, N. F., ZAMORA, P. G. P., GRASSI, M.T. Multifactorial optimization approach for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in river sediments by gas chromatography - quadrupole ion trap selected ion storage mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, 1192, 273–281, 2008.

LEONG, M. D. E HUANG, S. D. Low toxic dispersive liquid–liquid microextraction using halosolvents for extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples **Journal of Chromatography A**, 1211, 2008.

LEPSCH, I. F. **Formação e conservação dos solos**. São Paulo: Oficina de Textos, 2002.

LI, K.; LANDRIAULT, M.; FINGAS, M.; LLOMPART, M. Accelerated solvent extraction (ASE) of environmental organic compounds in soils using a modified supercritical fluid extractor. **Journal of Hazardous Materials**, 102, p. 93-104, 2003.

LUCHESE, E. B.; FAVERO, L. O. B.; LENZI, E. **Fundamentos da Química do Solo, Teoria e Prática**. Rio de Janeiro: Freitas Bastos Editora, 2001.

LUNDSTEDT, S.; HAGLUND, P.; OBERG, L. Simultaneous extraction and fractionation of polycyclic aromatic hydrocarbons and their oxygenated derivatives in soil using selective pressurized liquid extraction. **Analytical Chemistry**, 78, 9, 2993-3000, 2006.

LUNDSTEDT, S. **Analysis of PAHs and their transformation products in contaminated soil and remedial processes**. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/265100739_Analysis_of_PAHs_and_their_transf

ormation_products_in_contaminated_soil_and_remedial_processes. Acesso em: outubro de 2016

MALISZEWSKA-KORDYBACH, B.; SMRECZAK, B.; KLIMKOWICZ-PAWLAS, A.; TERELAK, H. Monitoring of the total content of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in arable soils in Poland. **Chemosphere**, 73, 1284–1291, 2008.

MANAHAN, S. E. **Environmental Chemistry**. Boca Raton: CRC Press LLC, 2000.

MCBRIDE, M.B. **Environmental Chemistry of Soils**. New York: Oxford University Press, 1994.

MCDONALD, P.D. E BOUVIER, E. S. P. **A Sample Preparation Primer and Guide to Solid-Phase Extraction Methods Development**, Waters, 2001.

MELAMED, R., GASPAR, J.C., MIEKELEY, N. **Pó-de-rocha como fertilizante alternativo para sistemas de produção sustentáveis em solos tropicais**. (Série estudos e documentos, 72). Disponível em: <http://www.cetem.gov.br/serie_sed.htm>. Acesso em: junho de 2013.

MÖLDER, L. **Estonian oil shale retorting industry at the crossroads**. *Oil Shale*, 21, 2, 97-98, 2004.

NICOLINI, J. **Avaliação do impacto ambiental de solos de área experimental da Embrapa Clima Temperado onde foram aplicados subprodutos do xisto da Petrobras-SIX como condicionadores de solo**. Tese de doutorado. Universidade Federal do Paraná, Departamento de Química, 2011.

NOLLET, L. **Chromatographic Analysis of the Environment**, 3ª edição, 584-585, CRC Press, 2005.

NORTHCOTT, G. L. e JONES, K. C. Spiking hydrophobic organic compounds into soil and sediment : a review and critique of adopted procedures. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 19, 10, 2000, 2418-2430, 2000a.

NORTHCOTT, G. L. e JONES, K. C. Developing a standard spiking procedure for the introduction of hydrophobic organic compounds into field-wet soil. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 19, 10, 2000, 2409-2417, 2000b.

OLUSEYI, T.; OLAYINKA, K.; ALO, B.; SMITH, R.M. Improved Analytical Extraction and Clean-up Techniques for the Determination of PAHs in Contaminated Soil Samples. **Environmental Pollution**, 12, 5 (3), 681-690, 2011.

ORECCHIO, S. Assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in soil of a Natural Reserve (Isola delle Femmine) (Italy) located in front of a plant for the production of cement. **Journal of Hazardous Materials**, 173, 358–368, 2010.

PASTOR-BELDA, M.; GARRIDO, I.; CAMPILLO, N.; VIÑAS, P.; HELLIN, P.; FLORES, P.; FENOLL, J. Dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of new generation pesticides in soils by liquid chromatography and tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, 15, 1394, 1-8, 2015.

PATNAIK, P. **Handbook of Environmental Analysis: Chemical Pollutants in Air, Water, Soil, and Solid Wastes**, 2ª Edição, 36-38, CRC Press, 2010.

PENA, M.T.; CASAIS, M.C.; MEJUTO, M.C.; CELA, R. Optimization of the matrix solid-phase dispersion sample preparation procedure for analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in soils: comparison with microwave-assisted extraction. **Journal of Chromatography A**, 1165(1-2):32-38, 2007.

PEREIRA, B. F., PILLON, C. N., MANGRICH, A. S., BAHNMULLER, S., DELAY, M., ABBT-BRAUN, G. E FRIMMEL, F. H. **Dinâmica de sorção de compostos orgânicos e inorgânicos em solo e subprodutos do xisto e do carvão**, VII Encontro Brasileiro de Substâncias Húmicas. 30/10 a 01/11/2007a.

PEREIRA, B. F., PILLON, C. N., MANGRICH, A. S., BAHNMULLER, S., DELAY, M., ABBT-BRAUN, G. E FRIMMEL, F. H. **Dinâmica De Sorção De Compostos Orgânicos e Inorgânicos Em Solo E Em Resíduos Da Indústria Do Carvão Mineral**. 30a Reunião Anual Da Sociedade Brasileira De Química. 31/05 A 03/06/2007b

PEREIRA, I.S., ANTUNES, L. E. C., SILVEIRA, C. A. P., MESSIAS, R. S., GARDIN, J. P. P., SCHENEIDER, F. C., PILLON, C. N. Caracterização Agronômica da Amoreira-preta Cultivada no Sul do Estado do Paraná. **Projeto Xisto Agrícola** – Documentos 271. 2009b.

PEREIRA, B. F., DOLATTO, R. G., CARDOSO, E. M. C., LEAL, A. M., NICOLINI, J., SILVEIRA, C. A. P., PILLON, C. N., FERREIRA, L. H. G. Caracterização Química – avaliação de risco dos sólidos de xisto. **Projeto Xisto Agrícola – Relatório Interno**, 2009a.

PEREIRA, H. S., VITTI, G. C. Efeito do uso do xisto em características químicas do solo e nutrição do tomateiro. **Horticultura Brasileira**, 22, 2, 2004.

PETROBRAS. SIX: **Unidade de Negócio da Industrialização do Xisto**. Disponível em: <<http://www.petrobras.com.br>>. Acesso em: março de 2011a.

PLACHÁ, D.; RACLAVSKÁ, H.; MATÝSEK, D.; RÜMMELI, M. H. The polycyclic aromatic hydrocarbon concentrations in soils in the Region of Valasske Mezirici, the Czech Republic. **Geochemical Transactions**, 10, 12, 2009.

POOLE, S.K.; DEAN, T.A.; OUDSEMA, J.W.; POOLE, C.F. Sample preparation for chromatographic separation: an overview. **Analytica Chimica Acta**, 236, 3–42, 1990.

PORTELLA, G.; POATER, J.; SOLÀ, M. Assessment of Clar's aromatic π -sextet rule by means of PDI, NICS and HOMA indicators of local aromaticity. **Journal of Physical Organic Chemistry**. 18, 8, 785-791, 2005.

POSTER, D.L., SCHANTZ, M.M., SANDER, L. C., WISE, S.A. Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in environmental samples: a critical review of gas chromatographic (GC) methods. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 386, 859–881, 2006.

PYLE, S.M.; BETOWSKI, L.D.; MARCUS, A.B.; WINNIK, W. Analysis of PAHs by ion trap tandem mass spectrometry. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, 8, 183-190, 1997.

QUINTO, M.; SPADACCINO, G.; NARDIELLO, D.; PALERMO, C.; AMODIO, P.; LI, D.; CENTONZE, D. Microextraction by packed sorbent coupled with gas chromatography–mass spectrometry: A comparison between “draw-eject” and “extract-discard” methods under equilibrium conditions for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water. **Journal of Chromatography A**, 1371, 30-38, 2014.

RAIJ, B. Fertilidade do solo e adubação. Piracicaba: Agronômica Ceres, **Associação Brasileira para a Pesquisa da Potassa e do Fosfato**, 1991.

RAMOS, L.; VREULS, J. J.; BRINKMAN, U.A. Miniaturised pressurised liquid extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from soil and sediment with subsequent large-volume injection-gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, 891, 2, 275-86, 2000.

REID, B. J.; NORTHCOTT, G. L.; JONES, K. C., SEMPLE, K. T. Evaluation of spiking procedures for the introduction of poorly water soluble contaminants into soil. **Environmental Science & Technology**, 32, 3224-3227, 1998.

REZAEI, M.; ASSADI, Y.; HOSSEINI, M.R.M.; AGHAEI, E.; AHMADIA, F.; BERIJANI, S. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid–liquid microextraction. **Journal of Chromatography A**, 1116, 2006.

RICHTER, B. E.; JONES, B. A.; EZZELL, J. L.; PORTER, N. L. Accelerated Solvent Extraction: A Technique for Sample Preparation. **Analytical Chemistry**, 68, 6, 1033–1039, 1996.

RICHTER, P.; JIMÉNEZ, M.; SALAZAR, R.; MARICÁN, A. Ultrasound-assisted pressurized solvent extraction for aliphatic and polycyclic aromatic hydrocarbons from soils. **Journal of Chromatography A**, 1132(1-2), 15-20, 2006.

RODRIGUEZ-DELGADO, M. A., HERRERA-HERRERA, V., ASENSIO-RAMOS, M., HERNÁNDEZ-BORGES, J. Dispersive Liquid Liquid Microextraction for Determination of Organic Analytes. **Trends in Analytical Chemistry**, 29, 7, 2010.

SAIM, N.; DEAN, J.R.; ABDULLAH, M.P.; ZAKARIA, Z. An experimental design approach for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons from highly contaminated soil using accelerated solvent extraction. **Analytical Chemistry**, 70, 2, 420–424, 1998.

SALGUEIRO-GONZÁLEZ, N.; TURNES-CAROU, I.; MUNIATEGUI-LORENZO, S.; LÓPEZ-MAHÍA, P.; PRADA-RODRÍGUEZ, D. Analysis of endocrine disruptor compounds in marine sediments by in cell clean up-pressurized liquid extraction-liquid chromatography tandem mass spectrometry determination. **Analytica Chimica Acta**, 852, 112–120, 2014.

SALEH, A., YAMINI, Y., FARAJI, M., REZAEI, M., GHAMBARIAN, M. Ultrasound-assisted emulsification microextraction method based on applying low density organic solvents followed by gas chromatography analysis for the determination of polycyclic

aromatic hydrocarbons in water samples. **Journal of Chromatography A**, 1216, 6673, 2009.

SANTUCCI, J. Rochagem: alternativa sustentável aos fertilizantes convencionais. **CR conselho em revista**, 89, 17-19, 2012.

SCHWARZENBACH, R.P., GSCHWEND, P.M., IMBODEN, D.M. **Environmental Organic Chemistry**. USA: Wiley-Interscience, 1995.

SKOOG, D.; WEST, D.; HOLLER, F.; CROUCH, S. **Fundamentos de Química Analítica**. 8ª edição. São Paulo: Editora Thomson, 2006.

SILVA, M. T., HERMO, B.S., GARCÍA-RODEJA, E., VÁZQUEZ FREIRE, N. Reutilization of granite powder as an amendment and fertilizer for acid soils. **Chemosphere**, 61, 993–1002, 2005.

SMALLWOOD, I. M. **Handbook of organic solvent properties**. London : Arnold ; New York : Halsted Press, 1996.

SONG, Y.F., JING, X., FLEISCHMANN, S., WILKE, B.M. COMPARATIVE study of extraction methods for the determination of PAHs from contaminated soils and sediments **Chemosphere**, 48, 993–1001, 2002.

SMITH, R. M. Before the injection—modern methods of sample preparation for separation techniques. **Journal of Chromatography A**, 1000, 3–27, 2003.

SPOSITO, G. **The chemistry of soils**. 2nd ed. New York: Oxford University Press, 2008.

STIGLIANI, W. M. E SPIRO, T. G. **Química Ambiental 2ª Edição**. Editora Pearson, 2009.
SUBEDI, B.; AGUILAR, L.; ROBINSON, E. M.; HAGEMAN, K. J.; BJÖRKLUND, E.; SHEESLEY, R.J.; USENKO, S. Selective pressurized liquid extraction as a sample-preparation technique for persistent organic pollutants and contaminants of emerging concern. **Trends Analytical Chemistr**, 68, 119-132, 2015.

TANG, L.; TANG, X., ZHU, Y., ZHENG, M., MIAO, Q. Contamination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in urban soils in Beijing, China. **Environment International**, 31, 822 – 828, 2005.

TAVERNA, L. **Protocolo analítico em escala reduzida para determinação de n-alcenos, HPA e esteróis em sedimentos e diagnostico ambiental preliminar**. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

THEODORO, S. Alternativa para os descartes ou subprodutos: depoimento. **CR conselho em revista**, 89, 17-19, 2012.

TUVIKENE, A., HUUSKONEN, S., KOPONEN, K., RITOLA, O., MAUER, U., LINDSTRM-SEPPA, P. Oil Shale Processing as a Source of Aquatic Pollution: Monitoring of the Biologic Effects in Caged and Feral Freshwater Fish. **Environmental Health Perspectives**, 107, 9, 1999.

US-EPA. **Method 3630C – Silica Gel clean up.** Disponível em:

<https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-12/documents/3630c.pdf>. 1996.

US-EPA. **Method 3545A - Pressurized Fluid Extraction (PFE).** Disponível em:

<http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/3545a.pdf>. 1998

US-EPA. **Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs).** United States Office of Solid Waste
Disponível em:

<http://www.epa.gov/osw/hazard/wastemin/minimize/factshts/pahs.pdf>. 2008.

US-EPA. **Sampling and analysis of waters, wastewaters, soils and wastes.** Disponível em:

<http://www.epa.vic.gov.au/~media/Publications/IWRG701.pdf>. 2009.

US-EPA. **Method 8270D: Semivolatile Organic Compounds By Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC/MS).** Disponível em:

<http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/8270d.pdf>. Acesso em junho de 2013a.

US-EPA. **Method 3540D Soxhlet Extraction.** Disponível em:

<http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/3540c.pdf>. Acesso em junho de 2013b.

US-EPA. **Method 3550C: Ultrasonic Extraction.** Disponível em:

<http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/3550c.pdf>. Acesso em junho de 2013c.

US-EPA. **Method 610—polynuclear aromatic hydrocarbons.** Disponível em:

http://water.epa.gov/scitech/methods/cwa/organics/upload/2007_07_10_methods_method_organics_610.pdf. Acesso em: junho de 2015.

US-EPA. **Method 8270D: Semivolatile Organic Compounds By Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC/MS).** Disponível em:

<http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/8270d.pdf>. Acesso em dezembro de 2017a.

VICHAPONG, J.; BURAKHAM, R.; SUPALAX SRIJARANAI, S. Alternative Liquid–Liquid Microextraction as Cleanup for Determination of Neonicotinoid Pesticides Prior HPLC Analysis. *Chromatographia*, 79, 5, 285-291, 2016.

XU, H.; DING, Z.; LV, L.; SONG, D. FENGA, Y. A novel dispersive liquid–liquid microextraction based on solidification of floating organic droplet method for determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous samples. *Analytica Chimica Acta*, 636, 28-33, 2009.

ZANELLA, R., MARTINS, M. L., PRIMEL, E. G., CALDAS, S. S., PRESTES, O. D., ADAIME, M. D. Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME): fundamentos e aplicações. *Scientia Chromatographica*, 4, 1, 2012.

ZGOŁA-GRZESKOWIAK, A. E GRZESKOWIAK, T. Dispersive liquid-liquid microextraction Trends in Analytical Chemistry, 30, 9, 2011.

ZHAO, E.; ZHAO, W.; HAN, L.; JIANG, S.; ZHOU, Z. Application of dispersive liquid-liquid microextraction for the analysis of organophosphorus pesticides in watermelon and cucumber. *Journal of Chromatography A*, 1175, 1,137-140, 2007.

ZHANG, Q.; LIANG, T.; WANG, L.; CAO, H. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons from soil samples using selective pressurized liquid extraction. *Analytical Methods* 8, 2441-2446, 2012.

WANG, W.; MENG, B.; LU, X.; LIU, Y.; TAO, S. Extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons and organochlorine pesticides from soils: A comparison between Soxhlet extraction, microwave-assisted extraction and accelerated solvent extraction techniques. *Analytica Chimica Acta*, 602, p. 211-222, 2007.

WANG, Q.; YIN, J.; PAN, H.; XUB, F.; YANG, Y. A novel method based on combining ultrasonic-assisted dispersive solid-phase extraction and low-density solvent dispersive liquid-liquid microextraction (UA-DSPE-LDS-DLLME) for the determination of organophosphorus pesticides in soil. *Analytical Methods*, 18, 7335-7342, 2014.

WANG, X.; WANG, Y.; QIN, Y.; DING, L.; CHEN, Y.; XIE, F. Sensitive and selective determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in mainstream cigarette smoke using a graphene-coated solid-phase microextraction fiber prior to GC/MS. *Talanta*, 140, 102-108, 2015.

WELLS, D. E.; HESS, P. S. *Sample Handling and Trace Analysis of Pollutants: Techniques, Applications and Quality Assurance*. Elsevier, 78-80, 2000.

WU, Q.; WANG, C.; LIU, Z.; WU, C.; ZENG, X.; WEN, J.; WANG, Z. Dispersive solid-phase extraction followed by dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of some sulfonylurea herbicides in soil by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1216, 29, 5504-5510, 2009.