

UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI

Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Química de Minas Gerais

Lázaro Chaves Sicupira

**METODOLOGIAS DE EXTRAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE
DIOXINAS E FURANOS POLICLORADOS EM AMOSTRAS DE ÁGUA**

Diamantina

2019

Lázaro Chaves Sicupira

**METODOLOGIAS DE EXTRAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE
DIOXINAS E FURANOS POLICLORADOS EM AMOSTRAS DE ÁGUA**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Química de Minas Gerais da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Flaviano Oliveira Silvério
Coorientadora: Profa. Dra. Gevany Paulino de Pinho

Diamantina

2019

Elaborado com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S567m

Sicupira, Lázaro Chaves

Metodologias de extração para determinação simultânea de dioxinas e furanos policlorados em amostras de água / Lázaro Chaves Sicupira, 2019.

150 p. : il.

Orientador: Flaviano Oliveira Silvério
Coorientadora: Gevany Paulino de Pinho

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Química) - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2019.

CDD 540

Lázaro Chaves Sicupira

**METODOLOGIAS DE EXTRAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE
DIOXINAS E FURANOS POLICLORADOS EM AMOSTRAS DE ÁGUA**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Química de Minas Gerais da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor.

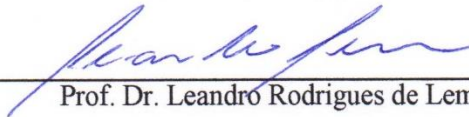
Orientador: Prof. Dr. Flaviano Oliveira Silvério
Coorientadora: Profa. Dra. Gevany Paulino de Pinho

Data de aprovação 25 / 09 / 19.



Prof. Dr. Flaviano Oliveira Silvério

Universidade Federal de Minas Gerais



Prof. Dr. Leandro Rodrigues de Lemos

Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri



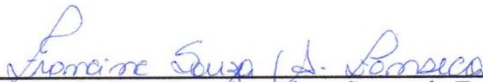
Prof. Dr. Paulo Henrique Fidêncio

Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri



Prof. Dr. Douglas Lopes Cassimiro

Universidade Estadual de Montes Claros



Profa. Dra. Francine Alves Souza da Fonseca

Universidade Federal de Minas Gerais

Diamantina

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus a saúde e disposição para enfrentar os desafios.

À minha mãe, irmã e esposa a força, incentivo e apoio incondicional.

Aos professores Flaviano e Gevany a orientação, ensinamentos, incentivos e conselhos.

Aos meus colegas do LPA a parceria e aprendizado.

Ao IECT/UFVJM, ICA/UFMG, FAPEMIG, CNPq e CAPES os recursos financeiros e estrutura física para desenvolver a pesquisa.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, obrigado!

PRODUTOS GERADOS NESTE TRABALHO

1. Sicupira, L. C.; Tiago, J. P. F.; De Pinho, G. P.; Silvério, F. O.; Simultaneous Determination of 2,3,7,8-TCDD and 2,3,7,8-TCDF in Water Samples by LLE-LTP and HPLC-DAD. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 2019, 30 (6), 1284-1292 (**Artigo publicado**).
2. Sicupira, L. C.; De Pinho, G. P.; Silvério, F. O.; Comparative Study of Four Extraction Methodologies for Simultaneous Determination of 2,3,7,8-TCDD and 2,3,7,8-TCDF in Water Samples, 2019 (**Manuscrito submetido a Environmental Science and Pollution Research**).
3. Sicupira, L. C.; Barbosa, E. S.; De Pinho, G. P.; Silvério, F. O.; Avaliação de uma nova estratégia para quantificação de PCDD/Fs por ICP-MS/MS em amostras aquosas. XXXII Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química, Juiz de Fora - MG, 2018 (**Apresentação de trabalho**).
4. Sicupira, L. C.; Determinação Simultânea de 2,3,7,8-TCDD e 2,3,7,8-TCDF por HPLC-ICP-MS/MS. Workshop sobre Aplicações em ICP-MS/MS, Montes Claros – MG, 2018 (**Apresentação de palestra**).
5. XXXII Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química, Juiz de Fora - MG, 2018 (**Participação em evento**).
6. I Workshop Discente do Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Química de Minas Gerais, Itajubá – MG, 2017 (**Participação em evento**).
7. Utilização do ChemStation, Universidade Federal de Minas Gerais, Montes Claros – MG, 2017 (**Minicurso**).

RESUMO

As dioxinas e furanos policlorados estão entre os poluentes orgânicos persistentes mais tóxicos que existem e podem ser encontrados em diferentes matrizes ambientais como ar, água e solo. Portanto, o monitoramento desses compostos no ambiente é importante para identificação de potenciais riscos à saúde das pessoas. Este trabalho teve como objetivo comparar as metodologias microextração líquido-líquido dispersiva (MELLD), QuEChERS (sigla do inglês *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged e Safe*), extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (ELL-PBT) e extração líquido-líquido (ELL) para determinação simultânea de 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-*p*-dioxina (2,3,7,8-TCDD) e 2,3,7,8-tetraclorodibenzofurano (2,3,7,8-TCDF) em amostras aquosas. Para isso, foi necessário otimizar e validar as metodologias MELLD, QuEChERS e ELL-PBT para determinação desses analitos em matrizes aquosas. Assim como, estabelecer as condições ideais para analisar esses compostos por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos (CLAE-DAD). As quatro metodologias foram comparadas através do tempo de preparo de amostra, volume de solvente orgânico, seletividade, taxa de recuperação, desvio padrão relativo, limite de quantificação e linearidade. As melhores condições de análise foram: coluna Kinetex, temperatura de 30 °C, fase móvel 100% acetonitrila, vazão de 0,5 mL min⁻¹ e comprimentos de onda de 227 nm para 2,3,7,8-TCDF e 232 nm para 2,3,7,8-TCDD. As condições ótimas de extração foram 1,0 mL de acetonitrila contendo 50,0 µL de tetracloreto de carbono e 5,0 mL de água, agitadas em vórtex por 1 min para MELLD, 4,0 mL de acetonitrila e 4,0 mL de água, homogeneizadas em vórtex por 1 min para QuEChERS e 8,0 mL de acetonitrila e 4,0 mL de água, agitadas em vórtex por 1 min e mantidas a -20 °C por 1 h para ELL-PBT. As taxas de recuperação variaram de 93,5 - 105,5%, os desvios padrões relativos foram inferiores a 10,8% e o limite de quantificação foi 5,3 µg L⁻¹ para MELLD, 4,8 µg L⁻¹ para QuEChERS e 2,4 µg L⁻¹ para ELL-PBT. As principais características apresentadas pelas três metodologias otimizadas foram taxas de recuperação elevadas, precisão, exatidão, linearidade, seletividade e extratos limpos sem a necessidade da etapa de “limpeza” dos extratos. A ELL também apresentou taxas de recuperação elevadas, entretanto não foi seletiva para os compostos estudados. A MELLD foi a metodologia mais adequada para preparar amostras de água para determinação simultânea de 2,3,7,8-TCDD e 2,3,7,8-TCDF devido ao seu menor consumo de solventes orgânicos, menor tempo de preparo de amostra e cromatogramas com menos sinais de interferentes.

Palavras-chave: 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-*p*-dioxina; 2,3,7,8-tetraclorodibenzofurano; microextração líquido-líquido dispersiva; QuEChERS; partição em baixa temperatura; extração líquido-líquido.

ABSTRACT

Polychlorinated dioxins and furans are among the most toxic persistent organic pollutants in existence and can be found in different environmental matrices such as air, water and soil. Therefore, the monitoring of these compounds in the environment is important to identify potential risks to human health. This study aimed to compare the dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME), Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe (QuEChERS), liquid-liquid extraction with low-temperature partition (LLE-LTP) and liquid-liquid extraction (LLE) methodologies for simultaneous determination of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzofuran and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in aqueous samples. To do so, it was necessary to optimize and validate the DLLME, QuEChERS and LLE-LTP methodologies to determine these analytes in aqueous matrices. As well, establish the ideal conditions to analyze these compounds by high-performance liquid chromatography with diode array detection (HPLC-DAD). The four methodologies were compared through sample preparation time, organic solvent volume, selectivity, recovery, relative standard deviation, limit of quantification and linearity. The best analysis conditions were: Kinetex column, temperature of 30 °C, mobile phase 100% acetonitrile, flow rate of 0.5 mL min⁻¹ and wavelengths of 227 nm for 2,3,7,8-tetrachlorodibenzofuran and 232 nm for 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. The optimum extraction conditions were 1.0 mL of acetonitrile containing 50.0 μL carbon tetrachloride and 5.0 mL of water, homogenized in a vortex for 1 min for DLLME, 4.0 mL of acetonitrile and 4.0 mL of water, agitated in a vortex for 1 min for QuEChERS and 8.0 mL of acetonitrile and 4.0 mL of water, homogenized in a vortex for 1 min and then maintained at -20 °C for 1 hour for LLE-LTP. Recovery rates ranged from 93.5 - 105.5%, relative standard deviations were less than 10.8% and the limit of quantification of 5.3 μg L⁻¹ for MELLD, 4.8 μg L⁻¹ for QuEChERS and 2.4 μg L⁻¹ for ELL-PBT. The main characteristics showed by the three optimized methodologies were high recovery rates, precision, accuracy, linearity, selectivity and clean extracts without the need for the “cleaning” step of the extracts. The ELL also showed high recovery rates, however it was not selective for the studied compounds. The MELLD was the most appropriate methodology for preparing water samples for simultaneous determination of 2,3,7,8-TCDD and 2,3,7,8-TCDF due to its lower consumption of organic solvents, shorter sample preparation time. and chromatograms with fewer interfering signals.

Keywords: 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin; 2,3,7,8-tetrachlorodibenzofuran; Dispersive Liquid-Liquid Microextraction; QuEChERS; Low-Temperature Partition; Liquid-Liquid Extraction.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1. REFERENCIAL TEÓRICO	11
1. INTRODUÇÃO.....	11
2. OBJETIVOS.....	12
2.1. Objetivo geral	12
2.2. Objetivos específicos.....	12
3. REFERENCIAL TEÓRICO.....	13
3.1. Dioxinas e furanos policlorados	13
3.2. Efeitos tóxicos das dioxinas e furanos policlorados	15
3.3. Contaminação ambiental com dioxinas e furanos policlorados	16
3.4. Metodologias de extração de dioxinas e furanos policlorados em matrizes aquosas.....	16
3.4.1. Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (MELLD).....	19
3.4.2. QuEChERS (sigla do inglês <i>Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged e Safe</i>)	26
3.4.3. Extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (ELL-PBT).....	31
3.5. Técnicas de análise para dioxinas e furanos policlorados	36
3.6. Validação de metodologias analíticas.....	38
3.6.1. Linearidade	38
3.6.2. Efeito de Matriz.....	56
3.6.3. Seletividade	58
3.6.4. Limites de detecção e quantificação.....	59
3.6.5. Exatidão e precisão.....	60
3.7. Testes estatísticos para comparação de médias	61
4. REFERÊNCIAS	64
CAPÍTULO 2. DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE 2,3,7,8-TCDD E 2,3,7,8-TCDF EM AMOSTRAS DE ÁGUA POR ELL-PBT E CLAE-DAD	78
RESUMO.....	78
ABSTRACT	79
RESUMO GRÁFICO.....	80
1. INTRODUÇÃO.....	81
2. EXPERIMENTAL.....	82
2.1. Reagentes e soluções	82
2.2. Equipamentos	83

2.3. Análises cromatográficas.....	83
2.4. ELL-PBT	84
2.5. Validação da Metodologia.....	87
2.6. Amostras reais	88
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	88
3.1. Otimização das condições cromatográficas.....	88
3.2. ELL-PBT.....	93
3.3. Validação da Metodologia.....	95
3.3.1. Linearidade	96
3.3.2. Efeito de Matriz.....	99
3.3.3. Seletividade	100
3.3.4. Limite de quantificação	101
3.3.5. Exatidão e precisão.....	101
3.4. Amostras reais	101
4. CONCLUSÃO.....	102
5. REFERÊNCIAS	102

CAPÍTULO 3. ESTUDO COMPARATIVO DE QUATRO METODOLOGIAS DE EXTRAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE 2,3,7,8-TCDD E 2,3,7,8-TCDF EM AMOSTRAS DE ÁGUA..... 107

RESUMO.....	107
ABSTRACT	108
RESUMO GRÁFICO.....	109
1. INTRODUÇÃO.....	110
2. EXPERIMENTAL.....	111
2.1. Reagentes e soluções	111
2.2. Equipamentos	111
2.3. Análises cromatográficas.....	112
2.4. MELLD	112
2.5. QuEChERS.....	114
2.6. ELL-PBT	116
2.7. ELL.....	116
2.8. Validação das metodologias MELLD e QuEChERS	120
2.9. Amostras reais	121

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	122
3.1. MELLD	122
3.2. QuEChERS.....	124
3.3. Validação das metodologias MELLD e QuEChERS	127
3.3.1. Linearidade	127
3.3.2. Efeito de Matriz.....	133
3.3.3. Seletividade	134
3.3.4. Limites de detecção e quantificação.....	135
3.3.5. Exatidão e precisão.....	136
3.4. Amostras reais	136
3.5. Comparação entre as quatro metodologias estudadas neste trabalho.....	137
3.5.1. Tempo de preparo de amostra	138
3.5.2. Volume de solvente orgânico	138
3.5.3. Seletividade	139
3.5.4. Taxas de recuperação e desvio padrão relativo	141
3.5.5. Limite de quantificação	141
3.5.6. Linearidade	142
4. CONCLUSÃO.....	142
5. REFERÊNCIAS	142
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	150

CAPITULO 1. REFERENCIAL TEÓRICO

1. INTRODUÇÃO

As dioxinas e furanos policlorados estão entre os poluentes orgânicos persistentes mais tóxicos que existem e, podem ser detectados em diferentes matrizes ambientais como ar, água, solos e alimentos como carnes, leites e peixes (RODENBURG *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2017). A presença dessas substâncias em concentrações acima do determinado pelas legislações pode representar um risco ao ambiente e às pessoas, pois esses compostos podem provocar problemas de saúde como câncer e doenças de pele (CUI *et al.*, 2017; HADDAD *et al.*, 2018; HUE *et al.*, 2018; KAHN *et al.*, 2018).

Diante deste cenário, o monitoramento contínuo destes analitos no ambiente e em matrizes alimentares é importante e necessário para assegurar a saúde humana e preservação do meio ambiente. Entretanto, este processo requer etapas eficientes de extração e detecção desses compostos (XU *et al.*, 2013; LU *et al.*, 2016), pois os limites máximos de resíduos estabelecidos pelas legislações Norte Americana são extremamente baixos para água e matrizes alimentares. Atualmente, a concentração máxima permitida para dioxinas policloradas em água potável é de 30 pg L⁻¹ (US EPA, 2009). No Brasil, ainda não existe uma legislação que define os limites máximos destes compostos em água potável e em matrizes alimentares (CONAMA, 2005 e 2011).

A metodologia de referência utilizada para extração de dioxinas e furanos policlorados em amostras aquosas é a extração líquido-líquido (ELL) (US EPA, 1994). Essa metodologia é simples de executar e pode ser empregada com elevada eficiência para várias matrizes líquidas (ALEXOVIC *et al.*, 2017). No entanto, durante a etapa de execução da ELL ocorre consumo elevado de solventes orgânicos, que em geral chega até 720,0 mL (3 repetições de 240,0 mL) de solvente orgânico para uma amostra em triplicata (US EPA, 1994).

Por isso, várias metodologias de extração têm sido otimizadas e validadas visando oferecer os mesmos níveis de eficiência de extração da ELL e com menor consumo de solvente. Nesta direção, destacam-se a metodologia QuEChERS (sigla do inglês *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged e Safe*), a microextração líquido-líquido dispersiva (MELLD) e a extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (ELL-PBT). Essas metodologias têm alcançado ótimas porcentagens de extração para vários tipos de contaminantes ambientais, porém, até o momento, não foram aplicadas para determinação de dioxinas e furanos

policlorados em amostras aquosas (PINTO, *et al.*, 2018; SOUZA *et al.*, 2018; KAIUM, 2018 *et al.*, 2018; HU *et al.*, 2018; DE BARROS *et al.*, 2018; MESQUITA *et al.*, 2018).

Desta forma, pretende-se com este estudo otimizar e validar estas três metodologias de extração na determinação desses analitos em água e, posteriormente, comparar com a metodologia de referência que é a ELL, como recomendado pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (US EPA, sigla do inglês *United States Environmental Protection Agency*) (US EPA, 1994).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Este trabalho teve como objetivo comparar quatro metodologias de extração para determinação simultânea de 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-*p*-dioxina (2,3,7,8-TCDD) e 2,3,7,8-tetraclorodibenzofurano (2,3,7,8-TCDF) em amostras de água.

2.2. Objetivos Específicos

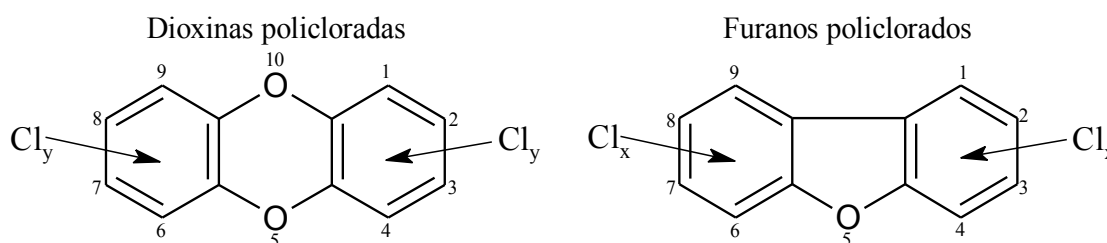
- Estabelecer as condições ideais para quantificar os analitos alvos por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos (CLAE-DAD);
- Otimizar e validar as metodologias MELLD, QuEChERS e ELL-PBT para determinação simultânea dos compostos alvos em amostras de água;
- Aplicar a metodologia ELL para determinação simultânea dos analitos alvos em amostras de água;
- Comparar as quatro metodologias de extração avaliadas quanto ao tempo de preparo de amostra, volume de solvente orgânico, seletividade, taxa de recuperação, desvio padrão relativo, limite de quantificação e linearidade.
- Aplicar as metodologias otimizadas e validadas em diferentes amostras reais de água.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. Dioxinas e furanos policlorados

As dioxinas policloradas são constituídas por dois anéis aromáticos ligados por dois átomos de oxigênio, já os furanos policlorados possuem um átomo de oxigênio ligando dois anéis aromáticos. Esses anéis podem apresentar de um a oito átomos de cloro e suas estruturas químicas gerais estão representadas na Figura 1.1. Esses compostos halogenados são estruturalmente muito estáveis, extremamente hidrofóbicos e apresentam baixa volatilidade (CUI *et al.*, 2017; MCCULLOCH *et al.*, 2017; MEGLOULI *et al.*, 2018).

Figura 1.1. Estruturas químicas gerais das moléculas das dioxinas e furanos policlorados, em que x e y podem variar de 1 a 4.

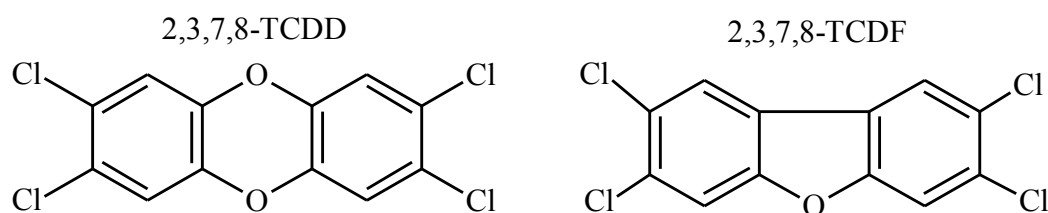


Fonte: adaptado de HOOGENBOOM *et al.*, 2015.

As dioxinas e furanos policlorados representam uma família de 210 congêneres¹, sendo 75 dioxinas policloradas e 135 furanos policlorados. Desses compostos, 17 congêneres substituídos por cloro nas posições 2, 3, 7 e 8 destacam-se por serem os mais tóxicos (Tabela 1.1). Entre estes, 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-*p*-dioxina (2,3,7,8-TCDD) e 2,3,7,8-tetraclorodibenzofurano (2,3,7,8-TCDF) são as dioxinas e furanos que apresentam maior toxicidade, respectivamente (US EPA, 2010; BRAUNE & MALLORY, 2017; GUEMIZA *et al.*, 2017; RODENBURG *et al.*, 2017; PISKORSKA-PLISZCZYŃSKA *et al.*, 2017; NUNES *et al.*, 2018; VERBRUGGE *et al.*, 2018). As estruturas químicas do 2,3,7,8-TCDD e 2,3,7,8-TCDF são apresentadas na Figura 1.2.

¹ Substâncias diferentes que apresentam estruturas e propriedades químicas similares (ANDRADE *et al.*, 2017).

Figura 1.2. Estruturas químicas do 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-*p*-dioxina (2,3,7,8-TCDD) e do 2,3,7,8-tetraclorodibenzofurano (2,3,7,8-TCDF).



Fonte: REINER *et al.*, 2006.

Tabela 1.1. Congêneres das dioxinas e furanos policlorados classificados como mais tóxicos

Congêneres	
Furanos policlorados	Dioxinas policloradas
2,3,7,8-Tetraclorodibenzofurano	2,3,7,8-Tetraclorodibenzo- <i>p</i> -dioxina
1,2,3,7,8-Pentaclorodibenzofurano	1,2,3,7,8-Pentaclorodibenzo- <i>p</i> -dioxina
2,3,4,7,8-Pentaclorodibenzofurano	1,2,3,4,7,8-Hexaclorodibenzo- <i>p</i> -dioxina
1,2,3,4,7,8-Hexaclorodibenzofurano	1,2,3,6,7,8-Hexaclorodibenzo- <i>p</i> -dioxina
1,2,3,6,7,8-Hexaclorodibenzofurano	1,2,3,7,8,9-Hexaclorodibenzo- <i>p</i> -dioxina
1,2,3,7,8,9-Hexaclorodibenzofurano	1,2,3,4,6,7,8-Heptaclorodibenzo- <i>p</i> -dioxina
2,3,4,6,7,8-Hexaclorodibenzofurano	Octaclorodibenzo- <i>p</i> -dioxina
1,2,3,4,6,7,8-Heptaclorodibenzofurano	
1,2,3,4,7,8,9-Heptaclorodibenzofurano	
Octaclorodibenzofurano	

Fonte: adaptado de US EPA, 1994; US EPA, 2010.

As dioxinas e furanos policlorados são considerados Poluentes Orgânicos Persistentes (POPs) devido ao seu tempo de meia-vida² muito longo de até 100 anos (SADOWSKA *et al.*, 2017), e alta resistência à degradação física, química e biológica. Eles estão presentes em vários ambientes, tais como água, ar, solo, sedimentos e vegetação. Além disso, podem bioacumular³ em animais e biomagnificar⁴ na cadeia alimentar, atingindo níveis muito elevados nos organismos que estão no seu topo, incluindo os humanos. Portanto, a mobilidade e disponibilidade desses compostos têm sido um tema discutido com frequência pela comunidade científica e, por isso, eles são amplamente investigados (XU *et al.*, 2013; HADDAD *et al.*, 2018; HSU *et al.*, 2018; LOUCHOUARN *et al.*, 2018; MCCULLOCH *et al.*, 2017; RATHNA *et al.*, 2018; METELKOVA *et al.*, 2019).

3.2. Efeitos tóxicos das dioxinas e furanos policlorados

As dioxinas e furanos policlorados estão entre as substâncias mais tóxicas conhecidas pela humanidade e podem representar riscos adversos a saúde humana (CUI *et al.*, 2017; HUE *et al.*, 2018). A elevada toxicidade destes compostos está relacionada com a sua estabilidade e tendência a acumular nos tecidos adiposos, onde podem atingir altas concentrações antes da excreção (CASALEGNO *et al.*, 2016).

A exposição dos seres humanos a níveis elevados das dioxinas e furanos policlorados, mesmo por um período curto, pode resultar em lesões como cloracne, condição semelhante a acne grave que pode durar anos e, escurecimento irregular da pele. Exposição crônica, a dose extremamente baixa destes compostos, pode ser relacionada a incidência elevada de diabetes, diferentes tipos de cânceres e alterações no sistema reprodutivo, nervoso, endócrino e imunológico (BEN *et al.*, 2017; CUI *et al.*, 2017; HADDAD *et al.*, 2018; HSU *et al.*, 2018; HUE *et al.*, 2018; KAHN *et al.*, 2018; LOYOLA-SEPÚLVEDA *et al.*, 2018).

² Tempo necessário para a massa de um composto químico diminuir pela metade (GUERRA *et al.*, 2019).

³ Acúmulo de compostos químicos nos organismos vivos (TREVIZANI *et al.*, 2016).

⁴ Aumento da concentração de compostos químicos nos organismos vivos ao longo da cadeia alimentar (TREVIZANI *et al.*, 2016).

3.3. Contaminação ambiental com dioxinas e furanos policlorados

As dioxinas e furanos policlorados podem ter origem natural ou antrópica (METELKOVA *et al.*, 2019). As principais fontes naturais desses compostos são incêndios florestais e erupções vulcânicas (MCCULLOCH *et al.*, 2017; RATHNA *et al.*, 2018). Já as fontes antrópicas podem ser diversas e aumentaram substancialmente com a revolução industrial (MCCULLOCH *et al.*, 2017).

A principal rota de emissão antrópica envolve a combustão de resíduos sólidos contendo cloro, especialmente plásticos (BRAUNE & MALLORY, 2017; CHAKRABORTY *et al.*, 2018; HADDAD *et al.*, 2018). Estima-se que 90% das dioxinas e furanos policlorados que estão na atmosfera são produzidos a partir da incineração de resíduos (CUI *et al.*, 2017). Outras fontes importantes desses compostos incluem gases emitidos por motores a combustão interna, produção de metais, geração de energia a partir de carvão, branqueamento de papel e celulose utilizando cloro, produção de alguns pesticidas como triclorofenóis e pentaclorofenol (RIMAYI *et al.*, 2016; LOUCHOUARN *et al.*, 2018; PARERA *et al.*, 2018).

As dioxinas e furanos policlorados são liberados extensivamente no ar, na água, nos sedimentos e no solo, por isso, seu monitoramento é um processo complexo (LU *et al.*, 2016; HADDAD *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2018). Além disso, devido à sua estabilidade química e biológica, eles estão presentes em todo o mundo, inclusive em regiões distantes de onde eles foram gerados (XU *et al.*, 2013; GUEMIZA *et al.*, 2017).

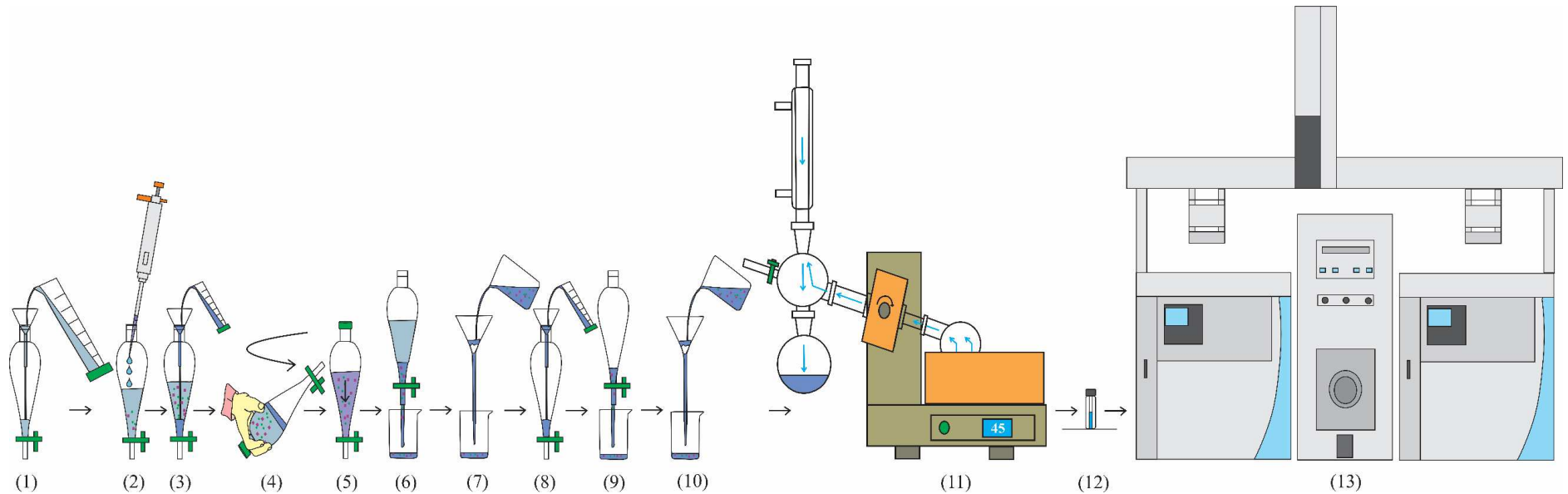
No Brasil, as principais fontes de dioxinas e furanos policlorados estão na produção de metais, seguida da incineração de resíduos (AUGUSTI *et al.*, 2014). Alguns trabalhos identificaram estes compostos em amostras de peixes (AUGUSTI *et al.*, 2014), leite materno (FERREIRA & MOREIRA, 2015), aves (FERREIRA, 2015), leite de vaca (ROCHA *et al.*, 2016) e solos (PUSSENTE *et al.*, 2017).

3.4. Metodologias de extração de dioxinas e furanos policlorados em matrizes aquosas

O monitoramento de dioxinas e furanos policlorados em amostras aquosas é um processo mais complexo do que em outras matrizes ambientais devido ao limite máximo de resíduo desses compostos em água ser extremamente baixo ($0,000000030 \text{ mg L}^{-1}$ (30 pg L^{-1})). Por essa razão, os dados sobre a concentração e distribuição das dioxinas e furanos policlorados em matrizes aquosas são ainda escassos, enquanto existe um número substancial de estudos sobre esses compostos em outras matrizes (US EPA, 2009; LU *et al.*, 2016).

A metodologia de referência para extração de dioxinas e furanos policlorados em amostras aquosas é a extração líquido-líquido (ELL) (US EPA, 1994). Essa metodologia se baseia na partição dos analitos entre a fase orgânica e aquosa, como apresentado na Figura 1.3. A ELL se destaca pela simplicidade e praticidade de suas etapas, entretanto apresenta desvantagens como o consumo elevado de solventes orgânicos, que em geral atinge 720,0 mL (3 repetições de 240,0 mL) de diclorometano empregados para uma amostra em triplicata na metodologia 1613 da US EPA (1994) e tempos de preparo de amostra longos (> 1 h) (REZAAE *et al.*, 2006; WU *et al.*, 2009; DASGUPTA *et al.*, 2011; ROBLES-MOLINA *et al.*, 2013).

Figura 1.3. Diagrama demonstrando todas as etapas da ELL até a análise cromatográfica.



Etapa 1: adicionar 1,0 L da amostra (água) ao funil de separação; etapa 2: fortificar a amostra com os analitos alvo; etapa 3: adicionar 60,0 mL de diclorometano (fase extratora). O diclorometano é mais denso que a amostra e, por isso, depositará na parte inferior do funil de separação; etapa 4: agitar durante 2 min com alívio periódico da pressão; etapa 5: esperar o diclorometano decantar durante 10 min; etapa 6: recolher a fase decantada (extrato) em um bquer; etapa 7: drenar o extrato através de um funil com sulfato de sódio anidro suportado por papel de filtro; repetir as etapas 3, 4, 5, 6 e 7 mais duas vezes; etapa 8: lavar o funil de separação com 20,0 mL de diclorometano; etapa 9: recolher o extrato em um bquer; etapa 10: drenar o extrato através de um funil com sulfato de sódio anidro suportado por papel de filtro; repetir as etapas 8, 9 e 10 mais duas vezes; etapa 11: concentrar o extrato reunido no evaporador rotatório; etapa 12: transferir o extrato concentrado para um *insert*; etapa 13: quantificar os compostos alvo por cromatografia em fase gasosa de alta resolução com espectrometria de massas de alta resolução.

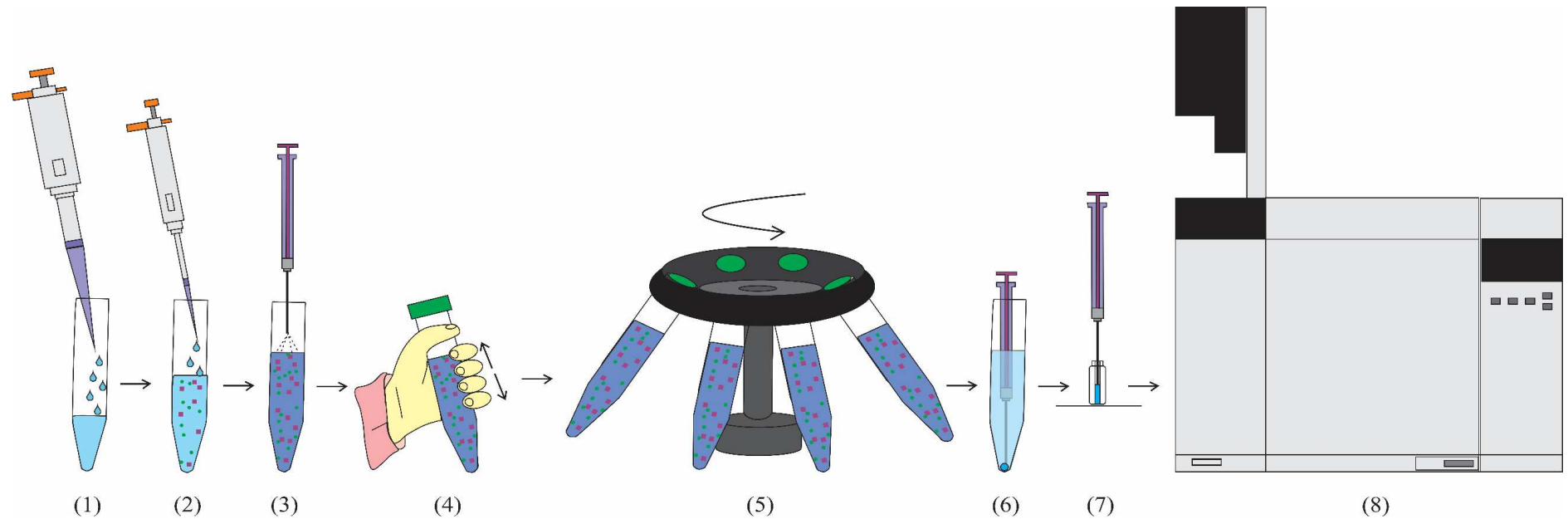
Fonte: adaptado de US EPA, 1994; KNIGHT *et al.*, 2014.

Dessa forma, as metodologias microextração líquido-líquido dispersiva (MELLD), QuEChERS (Sigla do inglês *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged e Safe*) e extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (ELL-PBT) surgem como propostas promissoras para extração de dioxinas e furanos policlorados em amostras aquosas.

3.4.1. Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (MELLD)

A MELLD foi desenvolvida por Rezaee e colaboradores em 2006 e, desde então, tornou-se uma metodologia de preparação de amostras muito citada na literatura. Esta metodologia consiste em duas etapas: formação de uma solução turva através da injeção de uma mistura de solventes de extração e dispersor em amostra aquosa. Nessa etapa, os analitos alvos da fase aquosa migram para o solvente de extração que está disperso na amostra aquosa como gotículas muito finas. Em seguida, ocorre um processo de separação das fases promovido pela centrifugação. Após a centrifugação, os compostos alvos ficam retidos na fase sedimentada (solvente de extração) e, posteriormente, podem ser determinados por instrumentos analíticos apropriados (REZAEI *et al.*, 2010). As etapas da MELLD estão ilustradas na Figura 1.4.

Figura 1.4. Diagrama demonstrando todas as etapas da MELLD até a análise cromatográfica.



Etapa 1: adicionar 5,0 mL da amostra (água) ao tubo de ensaio de vidro com fundo cônico de 10,0 mL; etapa 2: fortificar a amostra com os analitos alvo; etapa 3: transferir 1,0 mL de acetona (solvente dispersor) contendo 8 µL de tetracloroetileno (solvente de extração) com o auxílio de uma seringa. O tetracloroetileno é mais denso que a amostra e, por isso, depositará na parte inferior do tubo; etapa 4: agitar manualmente; etapa 5: centrifugar a 6000 rpm por 1,5 min; etapa 6: coletar 2 µL da fase sedimentada com o auxílio de uma seringa; etapa 7: transferir o extrato para um *vial*; etapa 8: quantificar os compostos alvo por cromatografia em fase gasosa e detecção por ionização em chama.

Fonte: adaptado de REZAEI *et al.*, 2006; MARTINS *et al.*, 2012.

Na MELLD, os principais fatores que afetam a taxa de recuperação dos analitos alvos são o solvente de extração, volume do solvente de extração, solvente dispersor e volume do solvente dispersor (REZAEI *et al.*, 2010).

São utilizados solventes de extração mais densos que a água, com capacidade de extração dos compostos de interesse, compatíveis com os sistemas cromatográficos e poucos solúveis em água. Hidrocarbonetos halogenados tais como clorobenzeno, clorofórmio, tetracloreto de carbono e tetracloroetileno são geralmente selecionados como solventes de extração (REZAEI *et al.*, 2006; KOZANI *et al.*, 2007; MARTINS *et al.*, 2014; SADEGHI *et al.*, 2016). Entretanto, esses solventes são muito tóxicos e o seu uso deve ser evitado. Com isso, algumas modificações propostas para a MELLD podem incluir a utilização de solventes com densidade menor que a água, mas com baixa toxicidade como o dodecan-1-ol, octan-1-ol e heptan-1-ol (LIU *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2013; ZHAO *et al.*, 2014; CALDAS *et al.*, 2016).

O volume ideal de solvente de extração deve garantir pelo menos 5 μL de fase sedimentada que é a quantidade mínima necessária para determinação dos analitos alvos. Contudo, essa quantidade não deve ser muito superior a 5 μL , pois o fator de concentração diminui para volumes de fase sedimentada elevados (REZAEI *et al.*, 2006; KOZANI *et al.*, 2007; REZAEI *et al.*, 2010).

Os solventes dispersores utilizados devem ser miscíveis na fase extratora e aquosa. Eles devem dispersar o solvente de extração como gotículas muito finas na amostra. Metanol, acetonitrila e acetona são usualmente selecionados como solventes dispersores. Fatores relevantes para a sua escolha incluem principalmente a taxa de recuperação do composto de interesse, menor toxicidade e baixo custo (KOZANI *et al.*, 2007; REZAEI *et al.*, 2010).

O volume do solvente dispersor afeta diretamente a formação da dispersão constituída pela amostra aquosa, o agente dispersante e a fase extratora. Quando o volume do solvente dispersor for diferente de 1,0 mL pode não dispersar a solução eficientemente, o que aumenta a solubilidade dos analitos alvos na água e diminui a eficiência de extração. Além disso, a variação do volume do solvente dispersor pode alterar a quantidade da fase sedimentada, por isso, quando esse for alterado é necessário mudar o volume do solvente de extração para atingir a quantidade ideal da fase sedimentada (REZAEI *et al.*, 2006; KOZANI *et al.*, 2007; REZAEI *et al.*, 2010).

Uma solução para esses problemas tem sido a substituição dos solventes dispersores por agitação em vórtex e radiação ultrassônica. Essa alteração aumenta a dispersão do solvente de extração e favorece o aumento da superfície de contato entre a fase extratora e a fase aquosa.

Assim, a migração dos compostos de interesse entre as duas fases imiscíveis aumenta sem utilizar o solvente dispersor (DUARTE *et al.*, 2016).

O tempo de extração é um dos fatores mais importantes na maioria das metodologias de preparação de amostras. Na MELLD, esse tempo é definido como o intervalo entre a injeção do solvente dispersor, contendo o solvente de extração e o início da centrifugação. Como o contato entre solvente de extração e fase aquosa (amostra) é facilitado pelo solvente dispersor, a transferência dos analitos alvos da amostra para a fase de extração acontece instantaneamente. Conseqüentemente, o estado de equilíbrio é alcançado rapidamente, com isso o tempo de extração é reduzido, geralmente alguns segundos. Essa é a vantagem mais importante da MELLD (REZAEI *et al.*, 2006). Outras vantagens da MELLD incluem a simplicidade de operação, baixo custo, alta taxa de recuperação e alto fator de concentração (REZAEI *et al.*, 2010). Apesar dessas vantagens, essa metodologia até o momento não foi aplicada para extração de dioxinas e furanos policlorados. Portanto, este trabalho é pioneiro para o monitoramento desses compostos utilizando MELLD.

A Tabela 1.2 apresenta alguns exemplos de aplicação da MELLD para recuperação de diferentes compostos químicos a partir de matrizes aquosas. Dentre as informações contidas nesta tabela, vale destacar as elevadas taxas de recuperação dos compostos de interesse, a quantidade de sistemas cromatográficos que foram compatíveis com a metodologia e a diversidade de solventes que podem ser utilizados como solventes de extração ou dispersores. Tais informações mostram a importância e aplicabilidade desta metodologia. Além disso, é importante ressaltar os elevados fatores de concentração alcançados pelos estudos relatados na Tabela 1.2, que variaram de 23 a 100.000 vezes e os volumes de solventes orgânicos utilizados que foram no máximo 2,0 mL.

Tabela 1.2. Aplicação da metodologia MELLD em matrizes aquosas

Analito(s) alvo(s)	Matriz	Solvente de extração	Solvente Dispersor	LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Técnicas de análise	Fator de concentração	Recuperação (%)	Referência
Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos	5,0 mL de água	8,0 μL de tetracloroetileno	1000,0 μL de acetona	0,007 a 0,030 0,0005	-	CG-DIC	603 a 1113	82,0 a 111,0	REZAEI <i>et al.</i> , 2006
Clorobenzeno	5,0 mL de água	9,5 μL de clorobenzeno	500,0 μL de acetona	a 0,0500	-	CG-DCE	711 a 813	71,1 a 81,3	KOZANI <i>et al.</i> , 2007
Bifenilas policloradas	5,0 mL de água	10,0 μL de clorobenzeno	500,0 μL de acetona	< 0,002 0,0003	-	CG-DCE	< 540	92,0 a 114,0	REZAEI <i>et al.</i> , 2008
Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos	7,0 mL de água	10,0 μL de 1-bromo-3-methylbutano	50,0 μL de ácido propanoico	a 0,0078 0,0014	-	CG-EM	372 a 1308	87,0 a 105,0	LEONG <i>et al.</i> , 2010
Piretroides	5,0 mL de água	8,0 μL de dodecan-1-ol	750,0 μL de metanol	a 0,0029 0,0005	-	CG-DCE	475 a 790	73,9 a 114,5	LIU <i>et al.</i> , 2010
Pesticidas organoclorados	8,0 mL de água	10,0–12,0 μL de acetato de dodecila e dodecan-2-ol	60,0-120,0 μL de água com surfactante	a 0,0050 0,0018	-	CG-DCE	1881 a 3530	19,9 a 115,9	LI <i>et al.</i> , 2013
Pesticidas organoclorados	30,0 mL de água	50,0 μL de n-octano	Agitação em vórtex por 4 min	a 0,0084	-	CG-DCE	153 a 214	76,7 a 107,2	SHEN <i>et al.</i> , 2013
Clorofenóis	5,0 mL de água	12,0 μL de heptan-1-ol	Agitação em shaker por 1 min	0,05 a 0,20	-	CG-EM	256 a 1169	90,3 a 117,3	WANG <i>et al.</i> , 2013
Pesticidas organoclorados	5,0 mL de água	20,0 μL de tolueno	200,0 μL de acetona	0,024 a 0,111	-	CG-DCE	271 a 474	71,4 a 114,5	ZHAO <i>et al.</i> , 2014

Tabela 1.2. (Continuação)

Analito(s) alvo(s)	Matriz	Solvente de extração	Solvente Dispersor	LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Técnicas de análise	Fator de concentração	Recuperação (%)	Referência
Pesticidas organofosforados, organoclorados, dinitroanilinas, anilidas, ureias substituídas, matérias-primas, intermediários e metabólitos das reações	5,0 mL de água	50,0 μL de tetracloreto de carbono	2000,0 μL de acetona	-	0,03 e 0,10	CG-EM/EM	-	70,0 a 120,0	MARTINS <i>et al.</i> , 2014
Pesticidas organofosforados e sulfoniluréias	5,0 mL de água	160,0 μL de octan-1-ol	1000,0 μL de acetonitrila	0,8 a 3,3	2,5 a 11,0	CLAE-DAD	-	81,0 a 121,0	BEDASSA <i>et al.</i> , 2015
Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos	10,0 mL de água mineral	500,0 μL de clorofórmio	1000,0 μL de acetona	0,03 a 0,10	-	CG-EM	93 a 129	71,0 a 90,0	SADEGHI <i>et al.</i> , 2016
Pesticidas e produtos farmacêuticos e de cuidado pessoal	10,0 mL de água	120,0 μL de octan-1-ol	750,0 μL de acetona	-	0,0125 a 1,25	CL-EM / EM	-	60,0 a 120,0	CALDAS <i>et al.</i> , 2016
Triazinas, triazinonas e triazol	5,0 mL de água	100,0 μL de tolueno	Agitação em vórtex por 30 s e sonicação por 1 min a 40 °C	0,10 a 2,71	0,30 a 8,22	CG-EM	-	77,2 a 109,0	DUARTE <i>et al.</i> , 2016
Anti-inflamatório e antibióticos	5,0 mL de água	800,0 μL de diclorometano	1200,0 μL de metanol/acetoneitrila (1:1, v/v)	0,006 a 0,091	0,018 a 0,281	CLUE-EM/EM	23 a 49	76,8 a 99,9	GUAN <i>et al.</i> , 2016
Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos	100,0 mL de água	300,0 μL de iso-octano	Ultrassom por 2 min e agitação por 10 min	0,001 a 0,009	0,003 a 0,022	CG-EM	10000 a 100000	97,0 a 108,0	AVINO <i>et al.</i> , 2017

Tabela 1.2. (Continuação)

Analito(s) alvo(s)	Matriz	Solvente de extração	Solvente dispersor	LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Técnicas de análise	Fator de concentração	Recuperação (%)	Referência
Cocaína e seus metabólitos	5,0 mL de efluentes hospitalares	150,0 μL de clorofórmio	350,0 μL de metanol	-	0,3	CLAE-DF e CLAE-DAD	-	98,3	MARTINS <i>et al.</i> , 2017
Micotoxinas	5,0 mL de chá	620,0 μL de acetato de etila	950,0 μL de acetonitrila	0,05 a 10	0,2 a 33,0	CL-EM/EM	-	65,0 a 127,0	PALLARÉS <i>et al.</i> , 2017
Atrazina e seus produtos de transformação	5,0 mL de água	163,0 μL de diclorometano	550,0 μL de acetona	0,050 a 0,250	0,150 a 0,900	CG-EM	-	99,6 a 118,6	DELLA-FLORA <i>et al.</i> , 2018
Glifosato, glufosinato e ácido aminometilfosfônico	2,5 mL de água de irrigação	230,0 μL de diclorometano	650,0 μL de acetona	0,05 a 0,35	1,0	CLUE-EM/EM	-	94,9 a 118,1	PINTO <i>et al.</i> , 2018
Doxorrubicina, daunorrubicina, epirrubicina e irinotecano	10,0 mL de efluentes hospitalares	500,0 μL de clorofórmio	800,0 μL de metanol	-	1,0	CLAE-DF	-	74,3 a 90,0	SOUZA <i>et al.</i> , 2018

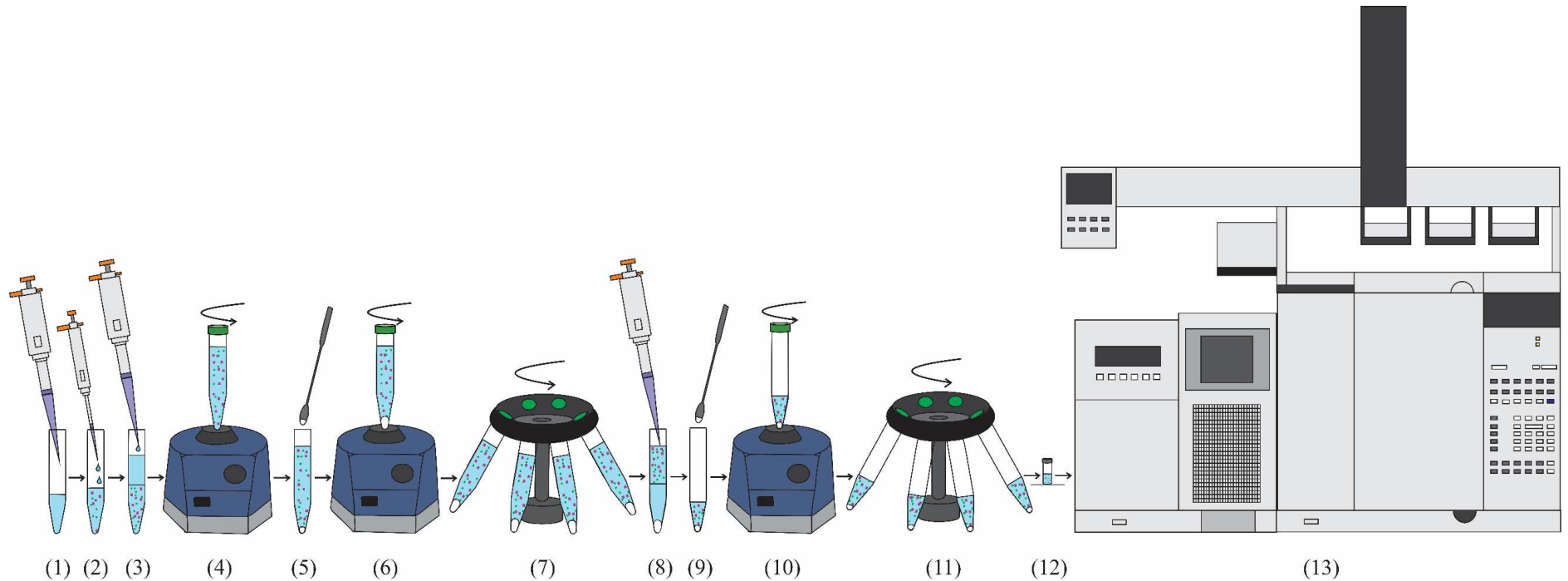
LD: limite de detecção; LQ: limite de quantificação; CG-DIC: cromatografia em fase gasosa e detecção por ionização em chama; CG-DCE: cromatografia em fase gasosa com detecção por captura de elétrons; CG-EM: cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas; CG-EM/EM: cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas com triplo quadrupolo; CLAE-DAD: cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos; CL-EM/EM: cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas com triplo quadrupolo; CLUE-EM/EM: cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas com triplo quadrupolo; CLAE-DF: cromatografia líquida de alta eficiência e detecção por fluorescência.

3.4.2. *QuEChERS* (sigla do inglês *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged e Safe*)

A denominação QuEChERS está associada a características como *Quick* (rápido), *Easy* (fácil), *Cheap* (econômico), *Effective* (efetivo), *Rugged* (robusto) e *Safe* (seguro). Essa metodologia foi desenvolvida por Anastassiades e colaboradores em 2003 e, desde então, tornou-se umas das principais metodologias empregadas para análises de contaminantes em diferentes matrizes (FERREIRA *et al.*, 2016).

Essa metodologia é constituída primeiramente pela extração dos compostos alvos com acetonitrila, seguida da etapa de partição líquido-líquido induzida pela adição simultânea de sulfato de magnésio (MgSO₄) e cloreto de sódio (NaCl) e, posterior limpeza dos extratos pela extração em fase sólida dispersiva (EFS-d) (CERQUEIRA *et al.*, 2014; FERREIRA *et al.*, 2016). As etapas dessa metodologia estão ilustradas na Figura 1.5.

Figura 1.5. Diagrama demonstrando todas as etapas da metodologia QuEChERS até a análise cromatográfica.



Etapa 1: adicionar 10,0 mL da amostra (água) ao tubo falcon de 50,0 mL; etapa 2: fortificar a amostra com os analitos alvos; etapa 3: adicionar 10,0 mL de acetonitrila (fase extratora). A acetonitrila é menos densa que a amostra e, portanto, é o sobrenadante; etapa 4: agitar em vórtex por 1 min; etapa 5: adicionar simultaneamente 4 g de sulfato de magnésio anidro e 1 g de cloreto de sódio; etapa 6: agitar em vórtex por 1 min; etapa 7: centrifugar a 5000 rpm por 5 min; etapa 8: transferir 1,0 mL do sobrenadante para um tubo falcon de 15,0 mL; etapa 9: adicionar simultaneamente 25 mg de amina primária-secundária (*primary secondary amine*, PSA) e 150 mg de sulfato de magnésio anidro; etapa 10: agitar em vórtex por 30 s; etapa 11: centrifugar a 6000 rpm por 1 min; etapa 12: transferir o extrato para um *vial*; etapa 13: quantificar os compostos alvos por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas.

Fonte: adaptado de ANASTASSIADES *et al.*, 2003; FERREIRA *et al.*, 2016; CORREIA-SÁ *et al.*, 2018.

As principais variações da metodologia original incluem a substituição do cloreto de sódio por acetato de amônia ($C_2H_7NO_2$) ou de sódio ($C_2H_3NaO_2$) e substituição da EFS-d por cloreto de cálcio ($CaCl_2$), óxido de zircônio (ZrO_2) ou mistura de octadecil (C18) com óxido de zircônio. Outras variações importantes englobam a utilização de outros solventes de extração, tais como acetato de etila e simplificação da metodologia para um único passo (SHAO *et al.*, 2017).

Na metodologia QuEChERS a principal vantagem é a taxa de recuperação elevada (próximas a 100%) (BRONDI *et al.*, 2011; FERREIRA *et al.*, 2016; HAIMOVICI *et al.*, 2016). Contudo, essa metodologia foi pouco aplicada para extração de dioxinas e furanos policlorados, apenas Haimovici e colaboradores (2016) a utilizaram em amostras de sedimentos. Portanto, até o momento, não existem trabalhos sobre a recuperação destes compostos em matrizes aquosas pela metodologia QuEChERS.

Apesar dessa metodologia ter sido desenvolvida para matrizes sólidas como frutas e vegetais, ela também pode ser aplicada para matrizes aquosas como pode ser observado na Tabela 1.3. A aplicação da metodologia QuEChERS em matrizes aquosas destaca-se pela elevada taxa de recuperação, pois todos os estudos apresentados nesta tabela alcançaram taxas de recuperação próximas a 100%. Além disso, pode-se observar a presença da acetonitrila em quase todas as fases extratoras, esse solvente permite a extração de analitos alvos em uma ampla faixa de polaridade, é compatível com vários sistemas cromatográficos e é seletivo, o que colabora com a diversidade de técnicas de análise mostrada na Tabela 1.3. Vale ressaltar, que os sais sulfato de magnésio anidro e cloreto de sódio são os mais utilizados para essa metodologia em amostras aquosas, todos os estudos citados nesta tabela utilizaram pelo menos um desses sais.

Essa metodologia é menos aplicada a matrizes aquosas quando comparada com a MELLD (Tabela 1.2 (pg 23)), esse fato pode ser explicado pelo volume de fase extratora utilizado por cada metodologia. A metodologia QuEChERS utiliza maiores volumes (até 20,0 mL) e, por isso, o extrato obtido precisa ser concentrado antes da etapa de análise. A inclusão da etapa de concentração aumenta o tempo de execução dessa metodologia e a torna menos competitiva em relação a outras metodologias.

Tabela 1.3. Aplicação da metodologia QuEChERS em matrizes aquosas

Analito(s) alvo(s)	Matriz	Fase extratora	Sais	Técnicas de análise	LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação (%)	Referência
Pesticidas atrazina, fipronil, α -endossulfano e β -endossulfano	10,0 g de água	10,0 mL de acetonitrila	4 g de sulfato de magnésio anidro e 1 g de cloreto de sódio	CG-EM	3	-	63,0 a 116,0	BRONDI <i>et al.</i> , 2011
Bifenilas policlorados	10,0 mL de água	15,0 mL de acetonitrila	0,5 g de citrato de sódio dibásico sesquiidratado, 1 g de citrato trissódico diidratado, 4 g de sulfato de magnésio anidro e 1 g de cloreto de sódio	CG-EM/EM	< 0,1	0,04 a 0,30	90,0 a 109,0	SHI <i>et al.</i> , 2012
Herbicida propisochlor	10,0 mL de água	20,0 mL de acetonitrila	5 g de cloreto de sódio	CLUE-EM/EM	0,03 a 0,12	0,1 a 0,4	73,7 a 94,9	WU <i>et al.</i> , 2013
Fungicida oxathiapiprolin e seus metabólitos	10,0 g de água	7,5 mL de água (1% de ácido fórmico) e 10,0 mL de acetonitrila	3 g de cloreto de sódio e 3 g de sulfato de magnésio	UCLAE-EM/EM	-	0,1	64,8 a 112,7	JU <i>et al.</i> , 2015
Estrógenos, andrógenos, progestágenos, glicocorticoides, mineralocorticoides e hormônios tireoidianos	5,0 mL de água	5,0 mL de acetato de etila	4 g de sulfato de sódio anidro, 1 g de cloreto de sódio	UCLAE-EM/EM	0,01 a 0,98	-	69,1 a 120,5	YANG <i>et al.</i> , 2015
Pesticidas malatião, clorpirifós, profenofós, clorfenapir, piriproxifeno, λ -cialotrina, α -cipermetrina e coumaphós	10,0 mL de água	2,5 mL de acetonitrila (1% ácido acético)	4 g de sulfato de magnésio anidro e 1 g de cloreto de sódio	CG-EM	0,3 a 4,0	-	85,3 a 107,0	GHANI & HANAFI, 2016

Tabela 1.3. (Continuação)

Analito(s) alvo(s)	Matriz	Fase extratora	Sais	Técnicas de análise	LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação (%)	Referência
Pesticidas 3-hidroxi-carbofurano, carbendazim, carbofurano, ciproconazol, difenoconazol, imidaclopride, tiabendazol, tiametoxam, tiofanato-metilico e espiroclorfenol	10,0 mL de água de coco	10,0 mL de acetonitrila (1% ácido acético)	4 g de sulfato de magnésio e 1,7 g de acetato de sódio anidro	CL-EM/EM	3	10	89,0 a 120,0	FERREIRA <i>et al.</i> , 2016
Produtos farmacêuticos e de cuidado pessoal	10,0 mL de água	10,0 mL de acetonitrila (1% ácido acético)	4 g de sulfato de magnésio e 0,2 g de acetato de amônio	CL-EM/EM	0,001 a 0,167	0,002 a 0,250	73,0 a 125,0	KACHHAWAHA <i>et al.</i> , 2017
Herbicida indaziflam e seus metabólitos	5,0 g de água	10,0 mL de acetonitrila contendo 1% de hidróxido de amônio	2 g de cloreto de sódio	UCLAE-EM/EM	0,003 a 0,110	0,01 a 0,36	83,5 a 104,3	HU <i>et al.</i> , 2018
Niclosamida quinoide	10,0 mL de água	10,0 mL de acetonitrila	4 g de sulfato de magnésio e 1 g de cloreto de sódio	CLUE-EM/EM	0,1	5	82,5 a 99,9	KAIUM <i>et al.</i> , 2018

LD: limite de detecção; LQ: limite de quantificação; CG-EM: cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas; CG-EM/EM: cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas com triplo quadrupolo; CLUE-EM/EM: cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas com triplo quadrupolo; UCLAE-EM/EM: ultra cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas com triplo quadrupolo; CL-EM/EM: cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas com triplo quadrupolo.

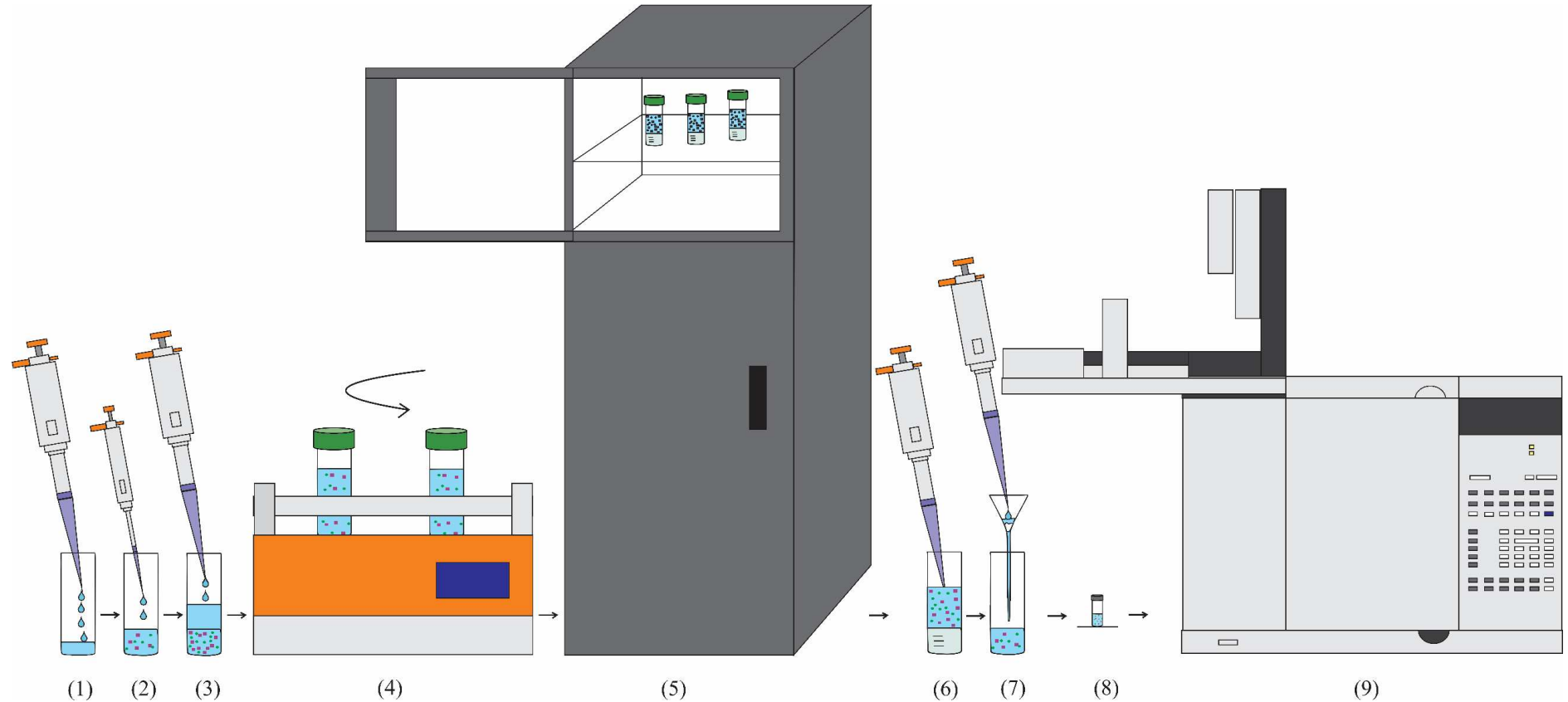
3.4.3. Extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (ELL-PBT)

A ELL-PBT foi desenvolvida por McCulley e McKinley em 1964 para determinação de pesticidas clorados em gordura (MAIA *et al.*, 2017). Porém, somente em 2007 essa metodologia foi denominada como extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura por Vieira e colaboradores (2007).

Nos últimos 12 anos ela foi aprimorada para diferentes contaminantes em diferentes matrizes como água (VIEIRA *et al.*, 2007; GOULART *et al.*, 2010; SILVÉRIO *et al.*, 2012; DA SILVEIRA *et al.*, 2016; MESQUITA *et al.*, 2017; DE BARROS *et al.*, 2018), alface (COSTA *et al.*, 2015), leite (DO REGO *et al.*, 2017; REZENDE *et al.*, 2017), lodo de esgoto (ANDRADE *et al.*, 2017; MAIA *et al.*, 2017; MESQUITA *et al.*, 2017), mel (DE PINHO *et al.*, 2010), solo (MESQUITA *et al.*, 2017), tomate (RODRIGUES *et al.*, 2017) e urina humana (MAGALHÃES *et al.*, 2012). É importante ressaltar que em matrizes sólidas não acontece partição, mas sim purificação em baixa temperatura e, por isso, nesse caso, a metodologia foi denominada extração sólido-líquido com purificação em baixa temperatura (ESL-PBT).

A ELL-PBT consiste em adicionar uma fase orgânica (1,0 a 8,0 mL) à amostra aquosa (0,5 a 6,0 mL), seguido do abaixamento da temperatura para -20 °C por 1 a 6 h. Nessas condições, a fase aquosa solidifica, enquanto o sobrenadante líquido, constituído principalmente de solvente orgânico e analitos alvos solubilizados podem ser prontamente isolados e subsequentemente analisados (MAGALHÃES *et al.*, 2012; SILVÉRIO *et al.*, 2012). As etapas dessa metodologia estão ilustradas na Figura 1.6.

Figura 1.6. Diagrama demonstrando todas as etapas da ELL-PBT até a análise cromatográfica.



Etapa 1: adicionar 4,0 mL da amostra (água) ao frasco de vidro de 22,0 mL; etapa 2: fortificar a amostra com os analitos alvos; etapa 3: adicionar 8,0 mL de acetonitrila (fase extratora). A acetonitrila é menos densa que a amostra e, portanto, é o sobrenadante; etapa 4: agitar em mesa agitadora por 15 min; etapa 5: manter a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 3 h; etapa 6: coletar o sobrenadante com o auxílio de uma pipeta; etapa 7: drenar o extrato através de um funil com sulfato de sódio anidro suportado por papel de filtro; etapa 8: transferir o extrato para um vial; etapa 9: quantificar os analitos alvos por cromatografia em fase gasosa com detecção por captura de elétrons.

Fonte: adaptado de VIEIRA *et al.*, 2007; DO REGO *et al.*, 2015.

A eficiência da ELL-PBT pode ser influenciada por fatores como adição de sal, seleção da mistura extratora e proporção amostra/mistura extratora. A seleção cuidadosa desses parâmetros pode reduzir o tempo de preparo de amostra e garantir maiores taxas de recuperação (COSTA *et al.*, 2015).

A adição de sais pode aumentar a recuperação dos analitos alvos devido à solvatação dos íons por moléculas de água, facilitando a migração desses analitos para a fase orgânica (GOULART *et al.*, 2010). Entretanto, os sais podem dificultar a formação de fase única e, conseqüentemente, reduzir a recuperação dos compostos de interesse (VIEIRA *et al.*, 2007).

O aumento da polaridade da mistura extratora pode dificultar o congelamento da fase aquosa e, conseqüentemente, diminuir a eficiência da extração. Considerando que a migração dos analitos alvos para o solvente orgânico acontece durante o congelamento da fase aquosa, a permanência dela no estado líquido pode dificultar a partição dos solutos e, assim, reduzir as taxas de recuperação (VIEIRA *et al.*, 2007).

O aumento da proporção amostra/mistura extratora de 1/1 para 1/2 v/v pode contribuir para a migração dos compostos alvos para a fase orgânica, independe das matrizes e analitos estudados. Portanto, a utilização da proporção 1/2 proporciona taxas de recuperação próximas a 100% (VIEIRA *et al.*, 2007; GOULART *et al.*, 2012).

A principal vantagem dessa metodologia é que apenas uma etapa tem sido suficiente para obter o extrato limpo. Além disso, a ELL-PBT apresenta taxas de recuperação elevadas, próximas a 100% (GOULART *et al.*, 2010; MAGALHÃES *et al.*, 2012; MESQUITA *et al.*, 2017). Apesar das vantagens citadas, essa metodologia tem sido pouco explorada para extração de dioxinas e furanos policlorados, pois apenas Andrade e colaboradores (2017) a aplicaram na matriz lodo de esgoto.

A ELL-PBT foi utilizada com sucesso para recuperação de diferentes compostos químicos a partir de matrizes aquosas como pode ser observado na Tabela 1.4. A recuperação da maioria dos analitos alvos foi próxima a 100% e todos os estudos apresentados nesta tabela obtiveram extratos limpos sem a necessidade da etapa de limpeza dos extratos.

Assim como QuEChERS (Tabela 1.3 (pg 29)), essa metodologia é menos aplicada a matrizes aquosas quando comparada com MELLD (Tabela 1.2 (pg 23)). Este fato pode ser explicado pela necessidade de concentrar os extratos (até 8,0 mL) antes da etapa de análise. Além disso, a maioria das metodologias citadas na Tabela 1.4 tem período de congelamento igual ou superior a 3 h. Esses tempos podem ser considerados longos quando comparado com outras metodologias, como, por exemplo, a MELLD que a etapa de extração ocorre em segundos.

Tabela 1.4. Aplicação da metodologia ELL-PBT em matrizes aquosas

Analito(s) alvo(s)	Matriz	Fase extratora	Tempo de congelamento	Técnicas de análise	LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação (%)	Referência
Piretroides	4,0 mL de água	6,5 mL acetonitrila / 1,5 mL acetato de etila	6 h	CG-DCE	1,1 a 3,2	3,3 a 9,6	82,3 a 93,4	VIEIRA <i>et al.</i> , 2007
Carbamatos	2,0 mL de água	4,0 mL de acetonitrila	3 h	CLAE-UV	5,0 a 10,0	17,0 a 33,0	> 90,0	GOULART <i>et al.</i> , 2010
Carbamatos	2,0 mL de Suco ou leite	4,0 mL de acetonitrila	3 h	CLAE-UV	8 a 15	25 a 50	93,0 a 97,0	GOULART <i>et al.</i> , 2012
Benzodiazepinas	0,5 mL de Urina	0,5 mL de acetonitrila	1 h	CL-EMAR	< 5	-	72,3 a 117,0	MAGALHÃES <i>et al.</i> , 2012
Pesticidas clorpirifós, λ -cialotrina, permetrina e bifentrina	4,0 mL de água	8,0 mL de acetonitrila	1 h	CLAE-UV	< 3,5	10	> 86,0	SILVÉRIO <i>et al.</i> , 2012
Pesticida clorpirifós	6,0 mL de água	6,5 mL acetonitrila / 1,5 mL acetato de etila	3 h	CG-DCE	-	-	-	DA SILVEIRA <i>et al.</i> , 2016
Fungicidas azoxistrobina, difenoconazol e clorotalonil	4,0 mL de água	4,0 mL de acetonitrila	3 h	CG-DCE	0,7 a 4,2	2,33 a 13,98	89,3 a 109,8	RODRIGUES <i>et al.</i> , 2017
Compostos farmacêuticos ativos	4,0 mL de água	3,0 mL de acetonitrila	3 h	CLAE-IES-EM/EM	0,00015 a 0,01230	0,00043 a 0,04060	46,0 a 135,0	DE BARROS <i>et al.</i> , 2018
Pesticidas organoclorados	4,0 mL de água	8,0 mL de acetonitrila	1 h	CG-EM	-	500	91,0 a 108,0	MESQUITA <i>et al.</i> , 2018

LD: limite de detecção; LQ: limite de quantificação; CG-DCE: cromatografia em fase gasosa com detecção por captura de elétrons; CLAE-UV: cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por ultravioleta; CL-EMAR: cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas de alta resolução; CLAE-IES-EM/EM: cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas com triplo quadrupolo com ionização por electrospray; CG-EM: cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas.

3.5. Técnicas de análise para dioxinas e furanos policlorados

Em geral, o monitoramento de dioxinas e furanos policlorados em matrizes ambientais é realizado através do método de referência 1613 da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (US EPA, sigla do inglês *United States Environmental Protection Agency*). Nesse método, a determinação desses compostos é realizada por cromatografia em fase gasosa de alta resolução com espectrometria de massas de alta resolução (CGAR-EMAR). Essa técnica consegue atingir os limites máximos de resíduos desses compostos alvos em amostras de água (30 pg L^{-1}), definidos pela legislação Norte Americana (US EPA, 1994; US EPA, 2009).

Outras técnicas instrumentais de análise têm sido empregadas na determinação desses compostos, com destaque para a cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) (ANDRADE *et al.*, 2017), cromatografia em fase gasosa com detecção por captura de elétrons (CG-DCE) (SIKITI *et al.*, 2012), cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas com triplo quadrupolo (CG-EM/EM) (ÁBALOS *et al.*, 2016), cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por ultravioleta (CLAE-UV) (SIRIMANNE *et al.*, 1996; SANZ *et al.*, 2002; YANG *et al.*, 2003; REZAEI *et al.*, 2015; NAKISA *et al.*, 2015) e fluorescência (CLAE-DF) (FERNÁNDEZ *et al.*, 1999; FERNÁNDEZ *et al.*, 2001) (Tabela 1.5). Quando essas técnicas são empregadas na quantificação desses analitos é necessário o emprego de metodologias de extração com etapas de concentração para permitir que os limites máximos de resíduos desses compostos sejam alcançados, como pode ser observado em trabalhos anteriores (REZAEI *et al.*, 2015; ÁBALOS *et al.*, 2016; ANDRADE *et al.*, 2017).

Tabela 1.5. Aplicação da CLAE para análises de dioxinas e furanos policlorados

Analito(s) alvo(s)	Técnica de separação e detecção	Comprimento de onda (nm)	Coluna	Temperatura da coluna (°C)	Fase móvel	Fluxo (mL min ⁻¹)	Volume injetado (μL)	LD (μg L ⁻¹)	LQ (μg L ⁻¹)	Referência
2,3,7,8-TCDF e outros furanos	CLAE -DF	-	C18 (150 x 3,9 mm, 4 μm)	-	Metanol:água (85:15)	1,0	20,0	0,7	-	FERNÁNDEZ <i>et al.</i> , 1999
2,3,7,8-TCDF e outros furanos	CLAE -DF	-	C18 (150 x 3,9 mm, 4 μm)	-	Metanol:água (75:15, até 6 min; 85:15, 6 a 10 min; 90:10, 10 a 30 min)	1,0	20,0	1,04 a 1,53	-	FERNÁNDEZ <i>et al.</i> , 2001
2,3,7,8-TCDD e outras dioxinas	CLAE-UV	-	C18 (150 x 3,9 mm, 4 μm)	-	Metanol:água (90:10)	1,0 até 14 min e 1,5 de 14 a 35 min	20,0	0,06	-	SANZ <i>et al.</i> , 2002
2,3,7,8-TCDD e outras dioxinas	CLAE-UV	254 nm (2,3,7,8-TCDD)	NPE (150 x 4,6 mm, 5 μm)	30	Metanol:água (80:20)	1,0	20,0	0,2	0,3	REZAEI <i>et al.</i> , 2015
2,3,7,8-TCDF e outros furanos	CLAE-UV	254 nm (2,3,7,8-TCDF)	NPE (150 x 4,6 mm, 5 μm)	30	Metanol:água (80:20)	1,0	20,0	0,1	0,3	NAKISA <i>et al.</i> , 2015

LD: limite de detecção; LQ: limite de quantificação; 2,3,7,8-TCDD: 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-*p*-dioxina; 2,3,7,8-TCDF: 2,3,7,8-tetraclorodibenzofurano; CLAE-DF: cromatografia líquida de alta eficiência e detecção por fluorescência; CLAE-UV: cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por ultravioleta; C18: octadecil; NPE: nitrofeniletila.

3.6. Validação de metodologias analíticas

Os procedimentos de validação devem incluir, quando aplicável, os seguintes parâmetros de desempenho: linearidade, efeito de matriz, seletividade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), exatidão e precisão (INMETRO, 2016). Os métodos utilizados para avaliação desses parâmetros não são padronizados em relação aos delineamentos experimentais e ferramentas estatísticas (DE SOUZA, 2007). Assim, neste texto estão inseridos apenas delineamentos e ferramentas utilizadas para validar as metodologias otimizadas neste trabalho.

3.6.1. Linearidade

Linearidade de uma metodologia analítica é a sua capacidade de obter, dentro de uma determinada faixa, resultados que são diretamente proporcionais à concentração do analito alvo na amostra (ICH, 2010; INMETRO, 2016). A primeira etapa da avaliação da linearidade consiste em realizar o seguinte delineamento experimental (THOMPSON *et al.*, 2002; DE SOUZA, 2007; INMETRO, 2016; NATA, 2018):

- (1) Determinar o intervalo de concentração da curva analítica, ou seja, faixa de linearidade. É importante ressaltar que esse intervalo deve abranger 0 a 150% ou 50 a 150% da provável concentração do composto alvo na amostra e seu menor valor deve ser limitado pelo LQ;
- (2) Preparar uma curva analítica com pelo menos seis níveis de concentração equidistantes e com três repetições independentes para cada nível. Essa curva deve ser preparada em extrato da matriz;
- (3) Realizar as análises das soluções preparadas para obtenção dos dados experimentais.

A segunda etapa do estudo da linearidade consiste em aplicar o método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO) aos dados experimentais obtidos na primeira etapa. A aplicação desse método permite estimar os parâmetros e resíduos (e_i) da regressão⁵, com suas respectivas variâncias⁶, assim como o coeficiente de determinação (R^2). Os parâmetros estimados são os coeficientes de inclinação (a) e interseção (b) e, através deles, é possível construir a equação da reta de regressão de acordo com a Eq. (1.1) (DRAPER & SMITH, 1998; DE SOUZA, 2007; MONTGOMERY & RUNGER, 2009; ICH, 2010; INMETRO, 2016).

⁵Relação entre uma variável de resposta (y) e uma independente (x) (MONTGOMERY & RUNGER, 2009).

⁶Medida da variabilidade dos dados em relação à média (MONTGOMERY & RUNGER, 2009).

$$\hat{y}_i = a + bx_i \quad (1.1)$$

Onde:

\hat{y}_i : variável dependente estimada pela equação de regressão;

a : coeficiente de interseção;

b : coeficiente de inclinação;

x_i : concentração conhecida do analito alvo.

As estimativas dos coeficientes de inclinação e interseção pelo MMQO estão demonstradas nas Eq. (1.2) e (1.3), respectivamente (DRAPER & SMITH, 1998; DE SOUZA, 2007; MONTGOMERY & RUNGER, 2009).

$$b = \frac{S_{xy}}{S_{xx}} \quad (1.2)$$

$$a = \bar{y} - b\bar{x} \quad (1.3)$$

Sendo:

$$S_{xy} = \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y}) = \sum_{i=1}^n x_i y_i - \frac{\sum_{i=1}^n x_i \sum_{i=1}^n y_i}{n}$$

$$S_{xx} = \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 = \sum_{i=1}^n x_i^2 - \frac{(\sum_{i=1}^n x_i)^2}{n}$$

$$\bar{y} = \frac{\sum_{i=1}^n y_i}{n}$$

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

Onde:

y_i : resposta medida (sinal instrumental como absorvância, altura ou área do pico, etc);

n : número de pontos da curva de calibração;

S_{xy} : soma de produtos de x por y;

S_{xx} : soma de quadrados de x;

\bar{x} : média das concentrações conhecidas do analito;

\bar{y} : média das respostas medidas.

Para cada valor x_i , no qual uma resposta y_i esteja disponível, o resíduo da regressão (e_i) é dado pela diferença entre a resposta medida (y_i) e o valor estimado pela equação da reta de regressão (\hat{y}_i), como apresentado pela Eq. (1.4) (DE SOUZA, 2007; INMETRO, 2016). Esses resíduos são empregados para realizar o teste de Jackknife (valores extremos) e também verificar se é adequado utilizar o MMQO nos dados obtidos na primeira etapa (DE SOUZA, 2007; MONTGOMERY & RUNGER, 2009; INMETRO, 2016).

$$e_i = y_i - \hat{y}_i \quad (1.4)$$

As variâncias da inclinação (S_b^2), da interseção (S_a^2) e dos resíduos da regressão ($S_{e_i}^2$) podem ser calculadas pelas Eq. (1.5), (1.6) e (1.7), respectivamente (DRAPER & SMITH, 1998; DE SOUZA, 2007; MONTGOMERY & RUNGER, 2009).

$$S_b^2 = \frac{S_{xy}}{S_{xx}} \quad (1.5)$$

$$S_a^2 = S_{e_i}^2 \frac{\sum_{i=1}^n x_i^2}{nS_{xx}} \quad (1.6)$$

$$S_{e_i}^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 2} \quad (1.7)$$

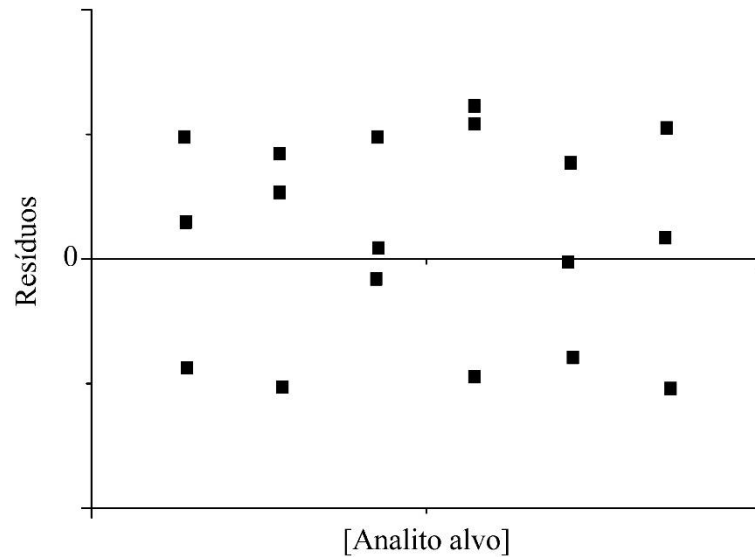
Já o coeficiente de determinação (R^2) é definido pela Eq. (1.8) e representa a quantidade de variabilidade nos dados que é explicado pelo modelo de regressão (DRAPER & SMITH, 1998; DE SOUZA, 2007; MONTGOMERY & RUNGER, 2009).

$$R^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - \bar{y})^2}{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2} \quad (1.8)$$

Para dar prosseguimento à segunda etapa é necessário realizar o teste de Jacknife que permite identificar e excluir valores extremos que afetam significativamente a estimativa dos parâmetros da regressão. Para tanto, devem ser construídos gráficos dos resíduos da regressão versus os níveis de concentração. Os perfis desses gráficos estão ilustrados nas Figuras 1.7, 1.8, 1.9 e 1.10 (DE SOUZA, 2007; MONTGOMERY & RUNGER, 2009; INMETRO, 2016).

O gráfico da Figura 1.7 representa um padrão de comportamento satisfatório, enquanto os demais padrões (Figuras 1.8, 1.9 e 1.10) representam anomalias (MONTGOMERY & RUNGER, 2009).

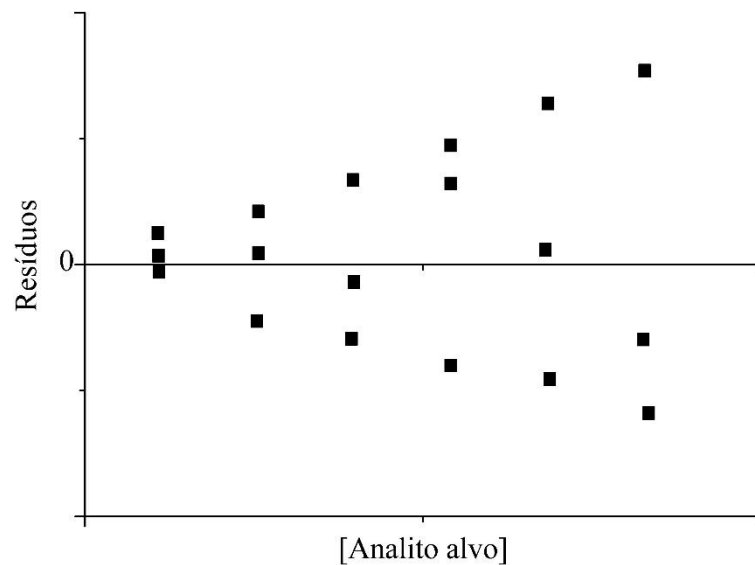
Figura 1.7. Gráfico representando os resíduos da regressão com um perfil de comportamento satisfatório.



Fonte: adaptado MONTGOMERY & RUNGER, 2009.

Resíduos semelhantes ao padrão do gráfico da Figura 1.8 (funil) indicam que a variância das observações pode estar aumentando proporcionalmente aos valores de x_i ou y_i . Nesse caso, é apropriado fazer transformações na variável y como \sqrt{y} , $\ln y$ e $1/y$ (MONTGOMERY & RUNGER, 2009).

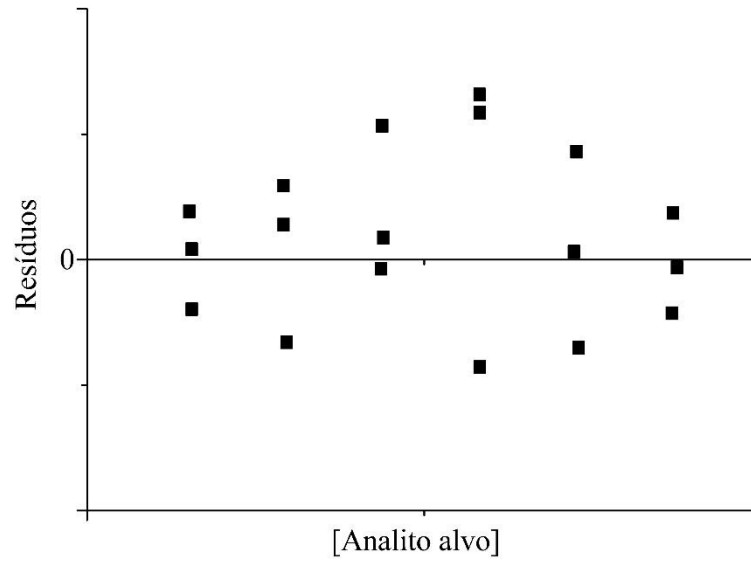
Figura 1.8. Gráfico representando os resíduos da regressão com um perfil de comportamento no formato funil.



Fonte: adaptado MONTGOMERY & RUNGER, 2009.

Gráficos similares ao padrão da Figura 1.9 (arco duplo) também indicam desigualdade das variâncias. Portanto, é adequado fazer transformações na variável y como \sqrt{y} , $\ln y$ e $1/y$ (MONTGOMERY & RUNGER, 2009).

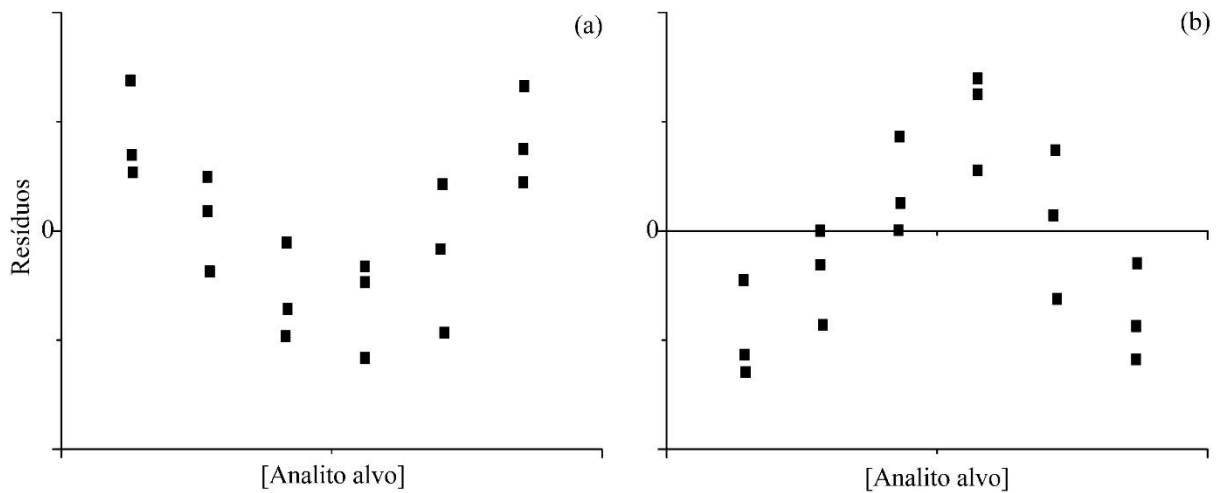
Figura 1.9. Gráfico representando os resíduos da regressão com um perfil de comportamento no formato arco duplo.



Fonte: adaptado MONTGOMERY & RUNGER, 2009.

Os gráficos semelhantes ao padrão da Figura 1.10 (U ou “U invertido”) sugerem desvio da linearidade, portanto, o modelo utilizado não é adequado. Na situação apresentada, é aconselhável adicionar termos de ordens maiores ao modelo (MONTGOMERY & RUNGER, 2009).

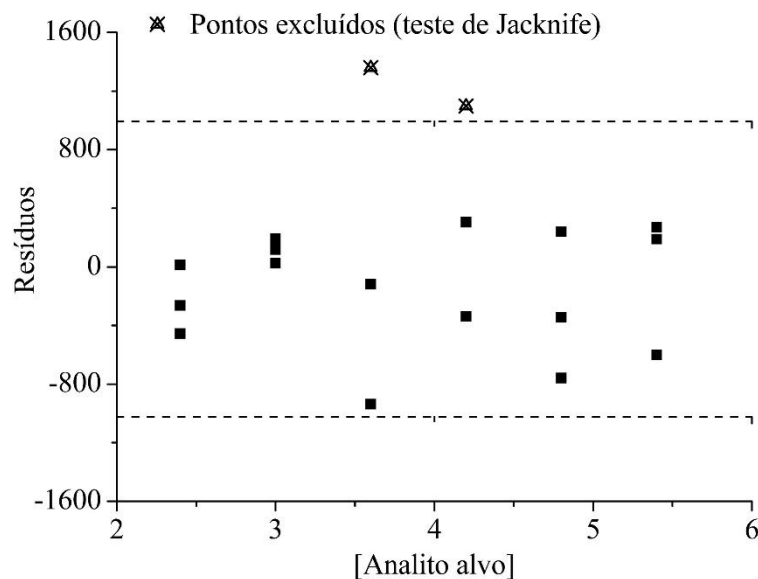
Figura 1.10. Gráfico representando os resíduos da regressão com um perfil de comportamento no formato U (a) e “U invertido” (b).



Fonte: adaptado MONTGOMERY & RUNGER, 2009.

Em seguida, duas linhas pontilhadas horizontais correspondentes a $\pm t_{(1-\alpha/2;n-2)}S_{res}$ devem ser utilizadas para indicar a faixa de variação aceitável para os resíduos que apresentaram perfis semelhantes ao padrão satisfatório (Figura 1.7 (pg 40)). Valores de resíduos fora dessa faixa são considerados valores extremos, por isso, devem ser excluídos como pode ser observado na Figura 1.11 (DE SOUZA, 2007).

Figura 1.11. Gráfico representando os resíduos da regressão com exclusão de valores extremos.



Fonte: adaptado DE SOUZA, 2007.

Os valores extremos identificados pela faixa de variação aceitável devem ser confirmados individualmente pelo método dos resíduos padronizados de Jackknife, cuja estatística é o J_{e_i} (Eq. (1.9)) (DE SOUZA, 2007).

$$J_{e_i} = r_i \sqrt{\frac{n-p-1}{n-p-r_i^2}} \quad (1.9)$$

Sendo:

$$r_i = \frac{e_i}{s_{e_i}}$$

$$s_{e_i} = s_{res} \sqrt{1-h_i}$$

$$h_i = \frac{1}{n} + \frac{(x_i - \bar{x})^2}{S_{xx}}$$

Onde:

n : número de pontos da curva de calibração;

p : número de parâmetros do modelo;

r_i : resíduo padronizado;

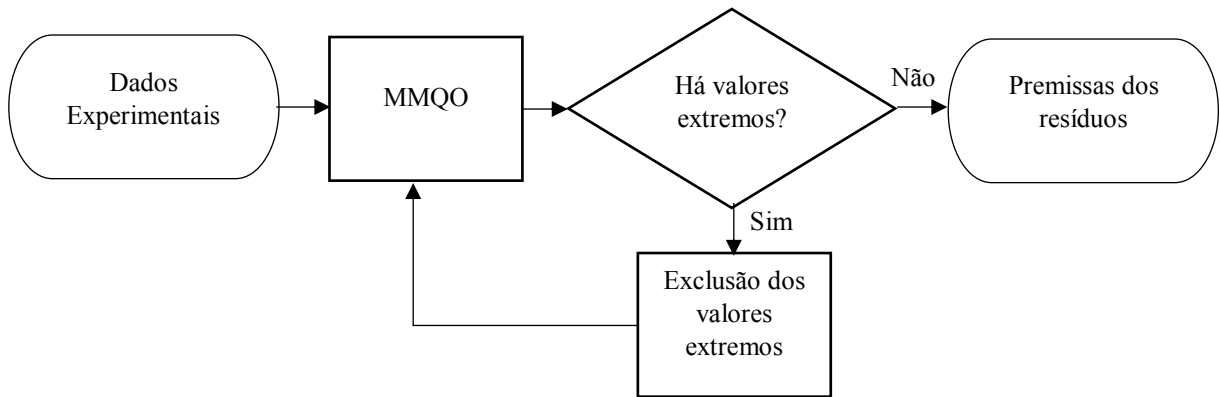
s_{e_i} : erro padrão do resíduo;

s_{res} : desvio padrão dos resíduos da regressão;

h_i : ponto de alavanca.

Os valores de J_{e_i} maiores que $t_{(1-\alpha/2; n-p-1)}$ são considerados valores extremos e devem ser removidos. No entanto, os dados excluídos não podem ser superiores a 22,2% dos dados originais e as três repetições de um mesmo nível de concentração não podem ser removidos simultaneamente. É importante ressaltar que o MMQO tem que ser aplicado novamente após as exclusões. A sequência de procedimentos pode ser observada na Figura 1.12 (HORWITZ, 1995; DE SOUZA, 2007).

Figura 1.12. Aplicação do teste de Jackknife.

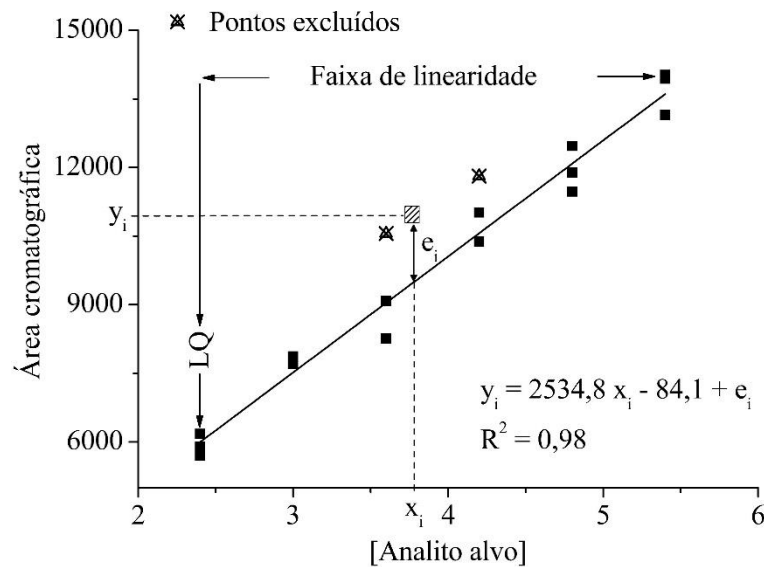


MMQO = método dos mínimos quadrados ordinários.

Fonte: adaptado DE SOUZA, 2007.

A Figura 1.13 representa um exemplo de curva analítica com seis níveis de concentração equidistante, sendo o primeiro nível o LQ. Nesse gráfico as concentrações do analito alvo foram traçadas versus as respostas medidas (áreas dos picos cromatográficos) e foram indicados o resíduo (e_i), faixa de linearidade, LQ, pontos excluídos, equação da reta e coeficiente de determinação.

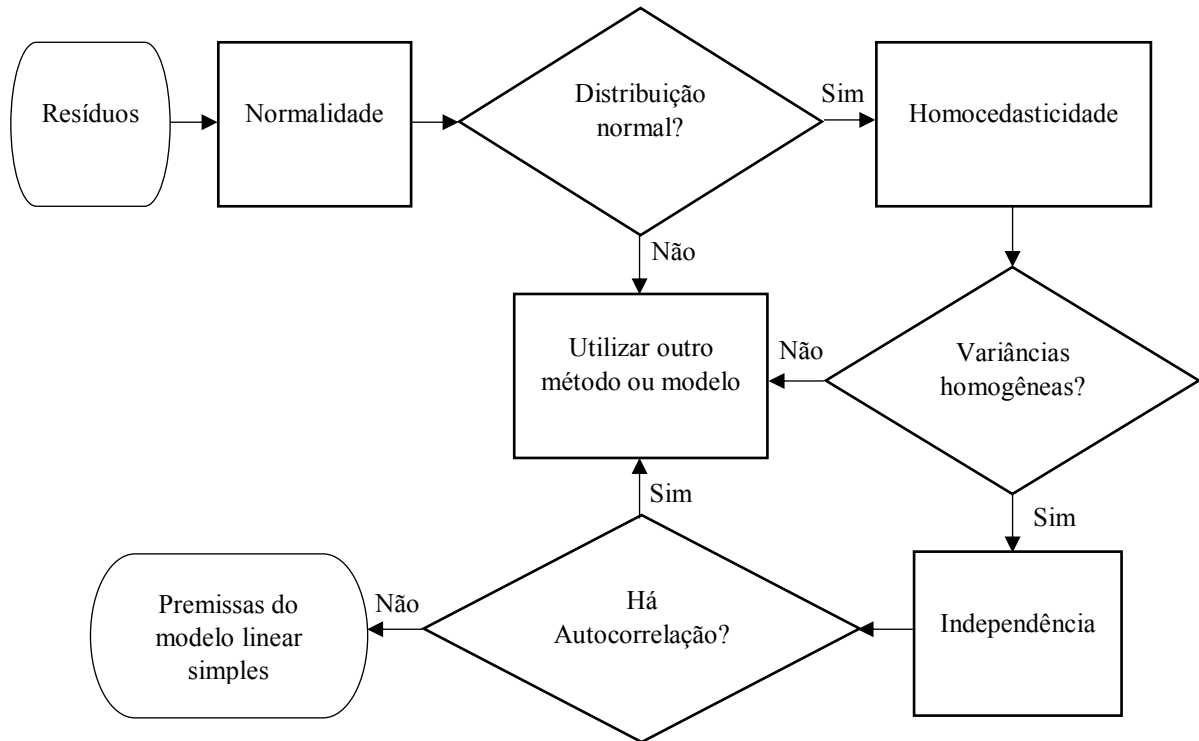
Figura 1.13. Gráfico representando uma curva analítica com a identificação do resíduo (e_i), faixa de linearidade, LQ, equação da reta e coeficiente de determinação (R^2).



Fonte: adaptado EURACHEM, 2014.

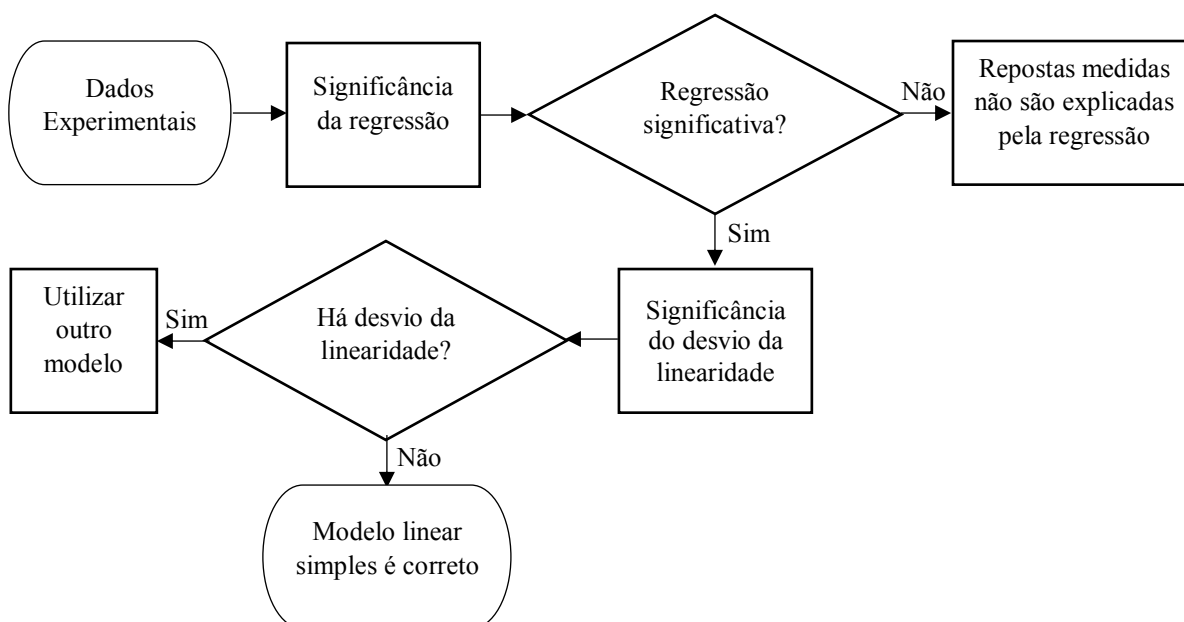
A terceira etapa consiste em validar a utilização do MMQO através da avaliação das premissas⁷ dos resíduos da regressão e do modelo linear simples como pode ser observado nas Figuras 1.14 e 1.15, respectivamente (DE SOUZA, 2007).

Figura 1.14. Avaliação das premissas dos resíduos da regressão estimados pelo método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO).



Fonte: adaptado DE SOUZA, 2007.

⁷Proposições (DE SOUZA, 2007).

Figura 1.15. Avaliação das premissas do modelo linear simples.

Fonte: adaptado DE SOUZA, 2007.

A normalidade⁸ deve ser a primeira premissa dos resíduos da regressão a ser avaliada de acordo com a Figura 1.14 (pg 45). O teste utilizado para esse parâmetro é o de Ryan-Joiner. Neste teste são avaliadas as duas hipóteses mostradas na Tabela 1.6 (RYAN & JOINER, 1976; DE SOUZA, 2007).

Tabela 1.6. Avaliação da normalidade dos resíduos da regressão pelo teste de Ryan-Joiner

Hipótese nula (H_0)	Os resíduos da regressão seguem a distribuição normal, ou seja, os desvios da normalidade não são significativos
Hipótese alternativa (H_1)	Os resíduos da regressão seguem outra distribuição de probabilidade, ou seja, os desvios da normalidade são significativos
Critério de rejeição	Rejeitar H_0 se $R < R_{crit}$

R: coeficiente de correlação do teste de Ryan-Joiner (estatística do teste); R_{crit} : coeficiente de correlação crítico.

Fonte: adaptado DE SOUZA, 2007.

⁸Fenômeno estatístico que ocorre quando os resíduos da regressão seguem a distribuição normal (DE SOUZA, 2007).

Para calcular a estatística do teste de Ryan-Joiner (R) é necessário, primeiramente, organizar os resíduos da regressão em ordem crescente. Em seguida, é construído um gráfico desses resíduos, já organizados, versus o valor normal esperado (q_i) (DE SOUZA, 2007).

O q_i utilizado neste gráfico é calculado pela Eq. 1.10 (DE SOUZA, 2007).

$$q_i = \Phi^{-1} \frac{(i - \frac{3}{8})}{(n + \frac{1}{4})}, i = 1, \dots, n \quad (1.10)$$

Onde:

i : i -ésimo ponto da curva de calibração;

n : número de pontos da curva de calibração;

q_i : valor normal esperado;

Φ_i : inverso de uma função de distribuição normal padrão.

O coeficiente de correlação do teste de Ryan-Joiner é calculado de forma análoga ao coeficiente de correlação linear através da Eq. (1.11) (DE SOUZA, 2007).

$$R_{eq} = \frac{S_{eq}}{\sqrt{S_{ee} \times S_{qq}}} \quad (1.11)$$

Sendo:

$$\begin{aligned} S_{eq} &= \sum_{i=1}^n (e_i - \bar{e})(q_i - \bar{q}) = \sum_{i=1}^n e_i q_i - \frac{\sum_{i=1}^n e_i \sum_{i=1}^n q_i}{n} \\ S_{ee} &= \sum_{i=1}^n (e_i - \bar{e})^2 = \sum_{i=1}^n e_i^2 - \frac{(\sum_{i=1}^n e_i)^2}{n} \\ S_{qq} &= \sum_{i=1}^n (q_i - \bar{q})^2 = \sum_{i=1}^n q_i^2 - \frac{(\sum_{i=1}^n q_i)^2}{n} \\ \bar{e} &= \frac{\sum_{i=1}^n e_i}{n} \\ \bar{q} &= \frac{\sum_{i=1}^n q_i}{n} \end{aligned}$$

Já os coeficientes de correlação críticos, em diferentes níveis de significância, podem ser calculados pelas Eq. (1.12), (1.13) e (1.14) (RYAN & JOINER, 1976).

$$R_{crit}(n) \approx 1,0070 - \frac{0,1371}{\sqrt{n}} - \frac{0,3682}{n} + \frac{0,7780}{n^2}, \text{ para } \alpha = 0,10 \quad (1.12)$$

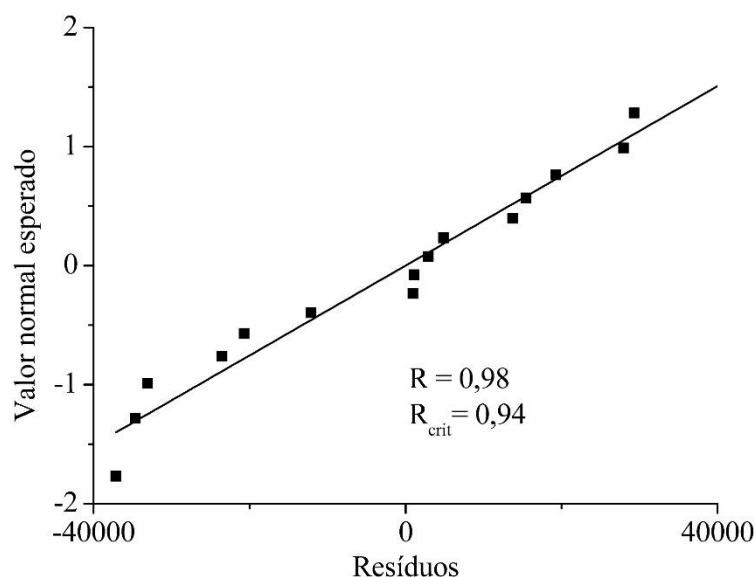
$$R_{crit}(n) \approx 1,0063 - \frac{0,1288}{\sqrt{n}} - \frac{0,6118}{n} + \frac{1,3505}{n^2}, \text{ para } \alpha = 0,05 \quad (1.13)$$

$$R_{crit}(n) \approx 0,9963 - \frac{0,0211}{\sqrt{n}} - \frac{1,4106}{n} + \frac{3,1791}{n^2}, \text{ para } \alpha = 0,01 \quad (1.14)$$

É importante ressaltar que além de testar as hipóteses da Tabela 1.6 (pg 46), é necessário avaliar o perfil do gráfico construído para calcular a estatística do teste de Ryan-Joiner (Figura 1.16). Se os dados estudados pertencerem a uma distribuição normal, este gráfico é obtido como uma linha reta. Já os dados provenientes de outras distribuições apresentam algum grau de curvatura ou são distribuídos aleatoriamente (DE SOUZA, 2007).

A Figura 1.16 representa os exemplos de resíduos de regressão que seguem a distribuição normal. Como o coeficiente de correlação (0,98) foi maior que o valor crítico (0,94), a hipótese nula de normalidade dos resíduos não pode ser rejeitada, ou seja, os desvios da normalidade não são significativos. Além disso, a linha reta apresentada nesta figura indica que os dados pertenceram a uma distribuição normal.

Figura 1.16. Gráfico representando a probabilidade normal dos resíduos da regressão.



R: coeficiente de correlação do teste de Ryan-Joiner; R_{crit} : coeficiente de correlação crítico.

Fonte: adaptado DE SOUZA, 2007.

A segunda premissa dos resíduos da regressão a ser avaliada é a homocedasticidade⁹ (Figura 1.14 (pg 45)). Para tanto, é aplicado o teste de Levene modificado por Brown e Forsythe que consiste em testar as duas hipóteses apresentadas na Tabela 1.7 (BROWN & FORSYTHE, 1974; DE SOUZA, 2007).

⁹Fenômeno estatístico que ocorre quando as variâncias dos resíduos da regressão não diferem entre si (DE SOUZA, 2007).

Tabela 1.7. Avaliação da homocedasticidade dos resíduos da regressão pelo teste de Levene modificado por Brown e Forsythe

Hipótese nula (H_0)	As variâncias dos resíduos da regressão não diferem entre si, ou seja, há homocedasticidade
Hipótese alternativa (H_1)	As variâncias dos resíduos são diferentes, ou seja, há heterocedasticidade
Critério de rejeição	Rejeitar H_0 se $t_L > t_{crit}$

t_L : estatística t de Levene; t_{crit} : t crítico.

Fonte: adaptado DE SOUZA (2007).

O t crítico (t_{crit}) utilizado nesse teste é definido como $t_{(1-\alpha/2; n_1 + n_2 - 2)}$. Já a estatística t de Levene é calculada pela Eq. (1.15). Para isso, os resíduos da regressão devem ser divididos em dois grupos de tamanho n_1 e n_2 , quando possível os tamanhos destes grupos devem ser iguais, entretanto as replicatas de um mesmo nível de concentração não podem pertencer a grupos diferentes (DE SOUZA, 2007).

$$t_L = \frac{(\bar{d}_1 - \bar{d}_2)}{\sqrt{(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2})S_p^2}} \quad (1.15)$$

Sendo:

$$\bar{d}_k = \sum \frac{|\tilde{e}_k - e_{kj}|}{n_k}$$

$$S_p^2 = \frac{(SQD_1 + SQD_2)}{(n_1 + n_2 - 2)}$$

$$SQD_k = \sum_{j=1}^{n_k} (\tilde{e}_k - e_{kj})^2$$

Onde:

\bar{d}_k : média dos módulos das diferenças entre o j-ésimo resíduo e a mediana¹⁰ de cada grupo, k = 1 e k = 2;

\tilde{e}_k : mediana de cada grupo;

e_{kj} : j-ésimo resíduo de cada grupo;

n_k : número de observações em cada grupo;

S_p^2 : variância combinada;

SQD_k : soma dos quadrados das diferenças entre o j-ésimo resíduo e a mediana de cada grupo, k = 1 e k = 2.

A Tabela 1.8 mostra os resíduos da regressão que apresentam comportamento homocedástico. Como a estatística t_L (0,779) é menor que o valor crítico (2,131), a hipótese nula não pode ser rejeitada e, portanto, os resíduos da regressão não diferem entre si, ou seja, há homocedasticidade.

Tabela 1.8. Exemplo de dados da avaliação da homogeneidade das variâncias dos resíduos da regressão

	N	A	t_{crit}	t_L
Analito alvo	17	0,05	2,131	0,779

n: número de observações, α : nível de significância; t_{crit} : t crítico; t_L : estatística t de Levene.

Contudo, se os resíduos da regressão apresentarem comportamento heterocedástico, o teste de Levene modificado deve ser repetido após transformações nas variáveis, como raiz quadrada, logaritmo e inverso. Se mesmo assim heterocedasticidade permanecer, os parâmetros da regressão não devem ser estimados pelo MMQO, mas sim pelo método dos mínimos quadrados ponderados (MMQP) (THOMPSON *et al.*, 2002; DE SOUZA, 2007; INMETRO, 2016)

A terceira premissa dos resíduos da regressão a ser avaliada é a independência¹¹ (Figura 1.14 (pg 45)). O teste a ser aplicado é o de Durbin-Watson que confronta as duas hipóteses apresentadas na Tabela 1.9 (DURBIN & WATSON, 1951; DE SOUZA, 2007).

¹⁰Valor que divide os dados em duas metades (MONTGOMERY & RUNGER, 2009).

¹¹Fenômeno estatístico que ocorre quando não há autocorrelação dos resíduos da regressão (DE SOUZA, 2007).

Tabela 1.9. Avaliação da independência dos resíduos da regressão pelo teste de Durbin-Watson

Hipótese nula (H_0)	Os resíduos da regressão são independentes, ou seja, não há autocorrelação
Hipótese alternativa (H_1)	Os resíduos da regressão não são independentes, ou seja, há autocorrelação
Critério de rejeição	Rejeitar H_0 se $d < d_L$; Não rejeitar H_0 se $d > d_U$; Não conclusivo se $d_L < d < d_U$

d : estatística de Durbin-Watson; d_L : limite crítico inferior; d_U : limite crítico superior.

Fonte: adaptado DE SOUZA, 2007.

A estatística de Durbin-Watson é calculada pela Eq. (1.16) (DRAPER & SMITH, 1998; DE SOUZA, 2007).

$$d = \frac{\sum_{i=2}^n (e_i - e_{i-1})^2}{\sum_{i=1}^n e_i^2} \quad (1.16)$$

Onde:

e_i : resíduos;

e_{i-1} : resíduos imediatamente anteriores.

Já os valores de d_L e d_U podem ser estimados, considerando diferentes níveis de significância, pelas Eq. (1.17) a (1.22) (DE SOUZA, 2007).

$$d_L \approx 1,9693 - \frac{2,8607}{\sqrt{n}} - \frac{3,4148}{n} + \frac{16,6400}{n^2}, \text{ para } \alpha = 0,05 \quad (1.17)$$

$$d_U \approx 1,9832 - \frac{3,0547}{\sqrt{n}} - \frac{1,3862}{n} + \frac{16,3662}{n^2}, \text{ para } \alpha = 0,05 \quad (1.18)$$

$$d_L \approx 1,9845 - \frac{3,6875}{\sqrt{n}} - \frac{2,6136}{n} + \frac{20,6393}{n^2}, \text{ para } \alpha = 0,025 \quad (1.19)$$

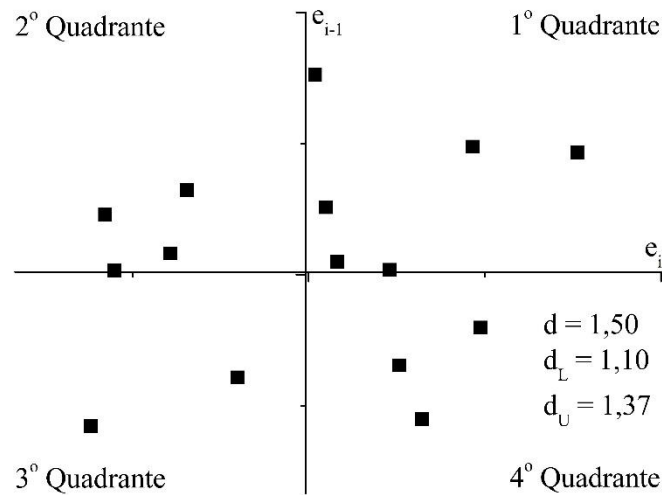
$$d_U \approx 1,9480 - \frac{3,1647}{\sqrt{n}} - \frac{0,6472}{n} + \frac{31,5772}{n^2}, \text{ para } \alpha = 0,025 \quad (1.20)$$

$$d_L \approx 1,9934 - \frac{4,5929}{\sqrt{n}} - \frac{1,3228}{n} + \frac{20,2288}{n^2}, \text{ para } \alpha = 0,01 \quad (1.21)$$

$$d_U \approx 1,9784 - \frac{4,2974}{\sqrt{n}} - \frac{1,0812}{n} + \frac{29,6862}{n^2}, \text{ para } \alpha = 0,01 \quad (1.22)$$

A independência dos resíduos da regressão também deve ser avaliada pelo gráfico dos valores de resíduo (e_i) versus seus valores imediatamente anteriores (e_{i-1}). A independência é demonstrada por uma distribuição aleatória dos resíduos nos quatro quadrantes como pode ser observado na Figura 1.17.

Figura 1.17. Representação de gráficos de Durbin-Watson sem autocorrelação.

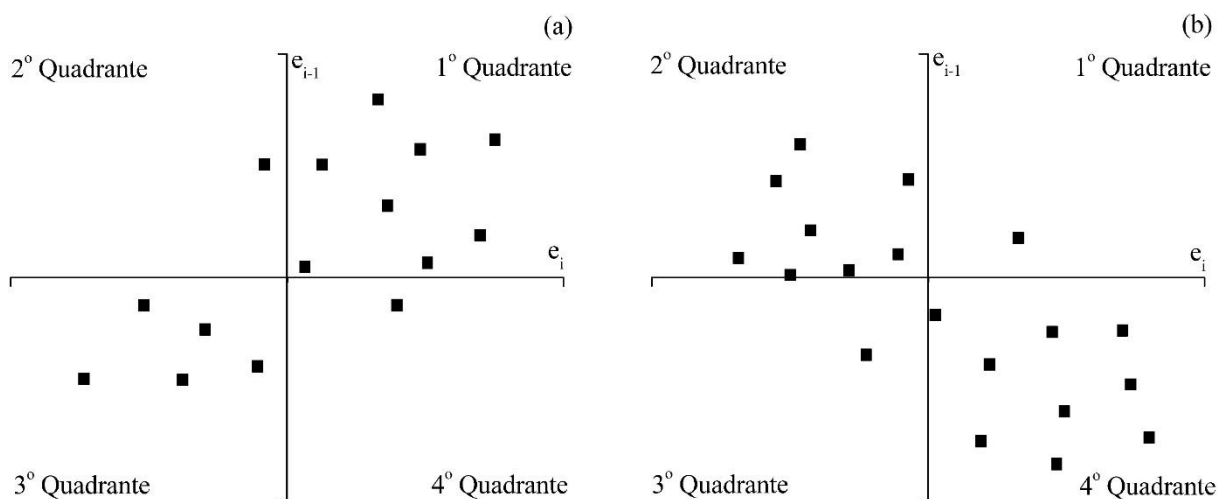


e_i : resíduos; d : estatística de Durbin-Watson; d_L : limite crítico inferior; d_U : limite crítico superior.

Fonte: adaptado DE SOUZA, 2007.

Entretanto, a concentração desses resíduos no primeiro e terceiro (Figura 1.18 (a)) ou no segundo e quarto quadrantes (Figura 1.18 (b)) indicam correlação positiva e negativa, respectivamente (DE SOUZA, 2007).

Figura 1.18. Representação de gráficos de Durbin-Watson com autocorrelação positiva (a) e negativa (b).



e_i : resíduos.

Fonte: adaptado DE SOUZA, 2007.

A independência dos resíduos apresentada na Figura 1.17 pode ser confirmada pelo teste de hipótese descrito na Tabela 1.9 (pg 51). Como o valor da estatística de Durbin-Watson

apresentado nessa figura foi maior que o limite crítico superior ($1,50 > 1,37$), a hipótese nula não pode ser rejeitada e, portanto, os resíduos são independentes.

A etapa 3 não é finalizada com a confirmação das três premissas dos resíduos da regressão, ainda é necessário avaliar as premissas do modelo de regressão linear simples, significância da regressão e do desvio da linearidade, como apresenta a Figura 1.15 (pg 46). A estatística utilizada para verificar essas premissas é a razão entre as variâncias, que segue a distribuição de F com os respectivos graus de liberdade¹². Essa estatística é calculada através da tabela da análise de variância (ANOVA) que deve ser construída de acordo com a Tabela 1.10 (DRAPER & SMITH, 1998; DE SOUZA, 2007; BAZILIO *et al.*, 2012; INMETRO, 2016).

Tabela 1.10. Análise de variância (ANOVA) para significância da regressão e do desvio da linearidade (falta de ajuste)

FV	GL	SQ	QM	F	F _{crit}
Regressão	1	$\frac{[\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})]^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$	$\frac{SQ_{Regr}}{GL_{Regr}}$	$\frac{MQ_{Regr}}{S_{Res}^2}$	$F_{(1-\alpha; 1; n-2)}$
Resíduos	$n - 2$	$\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2$	$\frac{SQ_{Res}}{GL_{Res}} = S_{Res}^2$		
Desvio da linearidade	$u - 2$	$\sum_{k=1}^u n_k (\hat{y}_k - \bar{y}_k)^2$	$\frac{SQ_{Desv}}{GL_{Desv}}$	$\frac{MQ_{Desv}}{MQ_{ErroPuro}}$	$F_{(1-\alpha; u-2; n-u)}$
Erro puro	$n - u$	$\sum_{k=1}^u \sum_{j=1}^{n_k} (y_{kj} - \bar{y}_k)^2$	$\frac{SQ_{ErroPuro}}{GL_{ErroPuro}}$		
Total	$n - 1$	$\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2$	$\frac{SQ_{Total}}{GL_{Total}}$		

FV: fonte de variação; GL: graus de liberdade; SQ: soma dos quadrados; QM: quadrados médios; F: razão entre variâncias; F_{crit}: F crítico; α : nível de significância; S_{Res}^2 : valor estimado do quadrado médio do resíduo; y_i : resposta medida; \bar{y} : média das respostas medidas; \bar{y}_k : média das respostas medidas do k-ésimo nível de concentração; \hat{y}_i : variável dependente estimada pela equação da reta; \hat{y}_k : variável dependente estimada pela equação da reta para o k-ésimo nível de concentração; y_{kj} : j-ésima resposta medida do k-ésimo nível de concentração; x_i : concentração do analito alvo; \bar{x} : média das concentrações do analito alvo; n : número de pontos da curva de calibração; n_k : número de pontos j em cada nível de concentração k ; u : número de níveis de concentração.

Fonte: Adaptado DE SOUZA, 2007; BAZILIO *et al.*, 2012

¹²Número de comparações independentes que podem ser feitas entre os elementos de uma mesma amostra (MONTGOMERY & RUNGER, 2009).

Já as hipóteses utilizadas para avaliar a significância da regressão e do desvio da linearidade estão descritas nas Tabelas 1.11 e 1.12, respectivamente (DE SOUZA, 2007).

Tabela 1.11. Hipóteses testadas para avaliação da significância da regressão

Hipótese nula (H_0)	Regressão linear não é significativa, ou seja, variação dos valores de y_i não é explicada pela regressão
Hipótese alternativa (H_1)	Regressão linear é significativa, ou seja, variação dos valores de y_i é explicada pela regressão
Critério de rejeição	Rejeitar H_0 se $F > F_{crit}$

F: razão entre variâncias; F_{crit} : F crítico

Fonte: adaptado DE SOUZA, 2007.

Tabela 1.12. Hipóteses testadas para avaliação da significância do desvio da linearidade

Hipótese nula (H_0)	Modelo linear simples é correto, ou seja, não há desvio da linearidade
Hipótese alternativa (H_1)	Modelo linear simples não é correto, ou seja, há desvio da linearidade
Critério de rejeição	Rejeitar H_0 se $F > F_{crit}$

F: razão entre variâncias; F_{crit} : F crítico.

Fonte: adaptado DE SOUZA, 2007.

O F crítico utilizado para verificar a significância da regressão é definido como $F_{(1-\alpha; 1; n-2)}$. Enquanto $F_{(1-\alpha; u-2; n-u)}$ é utilizado como F crítico para avaliar significância do desvio da linearidade (DE SOUZA, 2007).

A Tabela 1.13 apresenta um exemplo da análise de variância (ANOVA) para significância da regressão e do desvio da linearidade. Os dados desta tabela apresentam regressão significativa com $F(6,28 \times 10^2) > F_{crit}(4,54)$ e desvio linear não significativo com $F(1,93) < F_{crit}(3,36)$.

Tabela 1.13. Exemplo da análise de variância (ANOVA) para significância da regressão e do desvio da linearidade

FV	GL	SQ	QM	F	F _{crit}
Regressão	1	$6,18 \times 10^{13}$	$6,18 \times 10^{13}$	$6,28 \times 10^2$	4,54
Resíduos	15	$1,48 \times 10^{12}$	$9,84 \times 10^{10}$		
Desvio da linearidade	4	$6,08 \times 10^{11}$	$1,52 \times 10^{11}$	1,93	3,36
Erro puro	11	$8,67 \times 10^{11}$	$7,88 \times 10^{10}$		
Total	16	$6,33 \times 10^{13}$	$3,96 \times 10^{12}$		

FV: fonte de variação; GL: graus de liberdade; SQ: soma dos quadrados; QM: quadrados médios; F: razão entre variâncias

Com a confirmação das premissas dos resíduos da regressão e do modelo linear simples, Figuras 1.14 (pg 45) e 1.15 (pg 46), é correto afirmar que os parâmetros da regressão podem ser estimados pelo método dos mínimos quadrados ordinários e que a metodologia estudada é linear no intervalo de concentração avaliado.

3.6.2. Efeito de Matriz

As matrizes contêm além dos analitos de interesse, diversos outros constituintes que, em geral, alteram a resposta das técnicas analíticas. Essa interferência é denominada efeito de matriz e, no caso de matrizes mais complexas, como as alimentares, esse efeito é mais pronunciado e, por isso, uma etapa adicional de limpeza dos extratos pode ser necessária para amenizá-lo (DE PINHO *et al.*, 2009; EC, 2017; NATA, 2018). É importante salientar que as alterações geradas pelos componentes da matriz não dependem apenas das características dos compostos, mas também da metodologia utilizada para preparar e analisar a amostra. Portanto, fatores além das características dos compostos podem ser considerados na interpretação dos resultados do efeito de matriz (DE PINHO *et al.*, 2009; HAIMOVICI *et al.*, 2016).

Existem várias alternativas para verificar o efeito de matriz. Uma destas alternativas é avaliar esse efeito através de duas curvas analíticas, uma em solvente e outra em extrato da matriz. É importante observar que esta última também é utilizada na avaliação da linearidade e, portanto, nesta etapa é preciso construir apenas a curva em solvente. Outra observação relevante é que o estudo da linearidade realizado para os dados da curva em extrato da matriz também deve ser aplicado para a curva em solvente, assim como os níveis de concentração das duas curvas devem ser os mesmos (CHAMKASEM & HARMON, 2016; PIMENTA, 2016).

Essas curvas são comparadas através da razão entre os coeficientes angulares obtidos para a curva analítica em extrato da matriz e em solvente, multiplicada por 100, de acordo com a Eq. (1.23). Sendo que valor igual a 100% indica que nenhum efeito de matriz está presente. Se o valor for menor que 100%, indica que há redução na resposta cromatográfica do analito alvo causada pela matriz (efeito de matriz negativo). Se o valor for superior a 100%, indica que há um aumento na resposta cromatográfica do analito alvo provocado pela matriz (efeito de matriz positivo) (CHAMKASEM & HARMON, 2016; PIMENTA, 2016).

$$EM (\%) = \frac{a_{matriz}}{a_{solvente}} \times 100 \quad (1.23)$$

Onde:

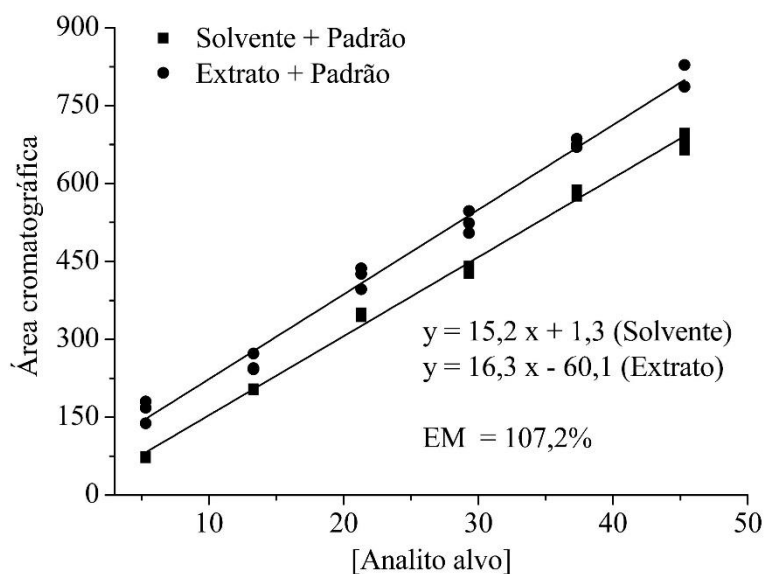
EM : efeito de matriz;

a_{matriz} : coeficiente angular da curva analítica em extrato da matriz;

$a_{solvente}$: coeficiente angular da curva analítica em solvente.

Na Figura 1.19 são apresentadas duas curvas analíticas, uma em extrato da matriz e outra em solvente, que foram construídas para avaliar o efeito de matriz descrito anteriormente. Neste exemplo ocorreu um aumento da resposta cromatográfica do analito alvo (107,2%), ou seja, efeito de matriz positivo.

Figura 1.19. Gráficos representando as curvas analíticas obtidas para o analito alvo em extrato da matriz e solvente.



Fonte: adaptado DE SOUZA, 2007.

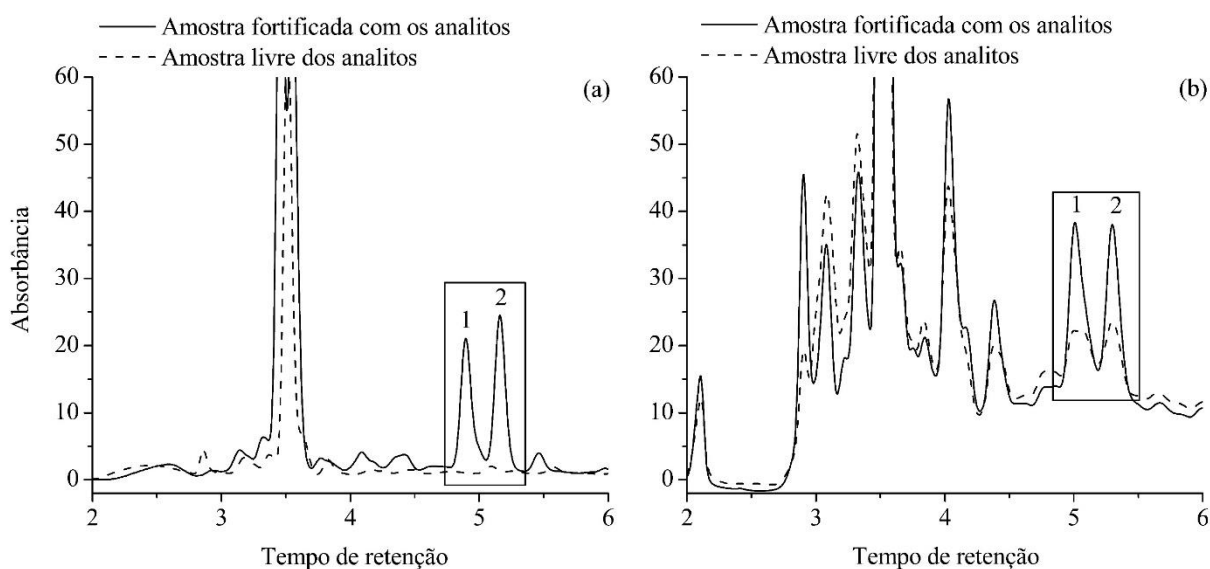
3.6.3. Seletividade

O termo seletividade refere-se à capacidade da metodologia identificar o analito alvo na presença de outros compostos, matrizes ou de outro material potencialmente interferente. Uma metodologia é considerada seletiva quando o resultado obtido para o analito de interesse pode ser diferenciado dos resultados de outros compostos (AOAC, 2002; EURACHEM, 2014; INMETRO, 2016).

Para avaliar esse parâmetro a metodologia a ser validada deve ser aplicada a amostra livre do analito alvo (amostra branca) e a amostra fortificada com esse analito em concentração conhecida, com pelo menos 6 repetições independentes para cada amostra. Em seguida, devem ser realizadas comparações visuais dos cromatogramas obtidos (análise qualitativa), sendo que a ausência de sinais cromatográficos no tempo de retenção do composto alvo para a amostra branca indica que a metodologia é seletiva (THOMPSON *et al.*, 2002; DE SOUZA, 2007).

A Figura 1.20 (a) apresenta um cromatograma atribuído a metodologia que foi seletiva, onde no tempo de retenção dos compostos 1 e 2 não existem sinais de interferentes. Já a Figura 1.20 (b), um cromatograma de uma metodologia não seletiva, onde é possível observar a presença de interferentes no mesmo tempo de retenção dos compostos de interesse.

Figura 1.20. Representação dos cromatogramas do extrato da amostra livre dos analitos alvos (---) e extrato da amostra fortificada com os compostos 1 e 2 (—) para a metodologia 1 (a) e metodologia 2 (b).



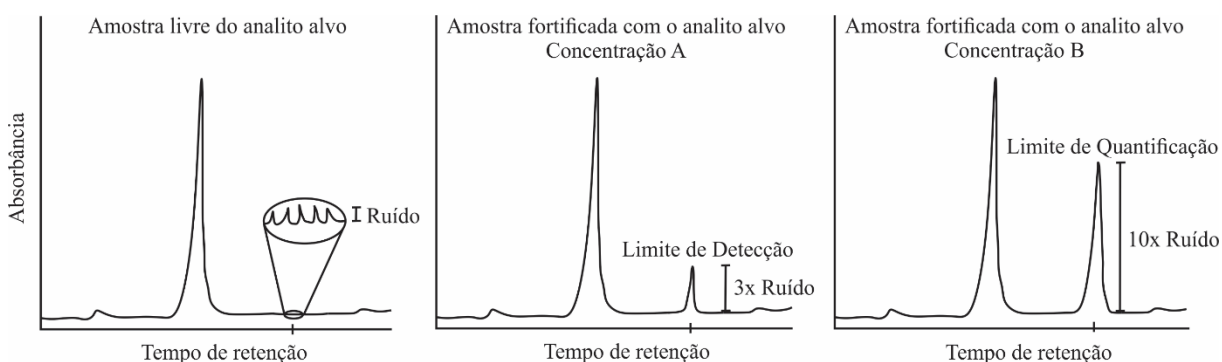
3.6.4. Limites de detecção e quantificação

O limite de detecção (LD) é definido como a menor quantidade de analito alvo que pode ser detectada em uma amostra, mas não necessariamente quantificada como um valor preciso. Já o limite de quantificação (LQ) é definido como a menor quantidade de analito de interesse que pode ser quantificada com precisão em uma amostra (AOAC, 2002; THOMPSON *et al.*, 2002; ICH, 2010; INMETRO, 2016).

O LD e LQ podem ser determinados pela relação sinal/ruído comparando as intensidades ou áreas dos sinais medidos para uma amostra fortificada com o analito alvo (amostra fortificada) com os ruídos de uma amostra livre desses analito (amostra branca). Relações sinal/ruído de 3:1 e 10:1 são normalmente consideradas aceitáveis para estimativa do LD e LQ, respectivamente. É importante ressaltar que o tempo de retenção do ruído na amostra branca deve ser o mesmo do sinal medido para o composto alvo na amostra fortificada. Além disso, essa abordagem só pode ser aplicada em procedimentos analíticos que apresentem ruído de linha de base, devem ser realizadas pelo menos 6 repetições independentes tanto para as amostras fortificadas como para as brancas e a matriz utilizada deve ser preferencialmente livre do analito de interesse (THOMPSON *et al.*, 2002; ICH, 2010; EURACHEM, 2014; US EPA, 2016; INMETRO, 2016).

A Figura 1.21 apresenta um exemplo de determinação do LD e LQ pela relação sinal/ruído, em que é possível observar que a intensidade do ruído na amostra livre de analito alvo é 3 vezes menor que o sinal medido na amostra com concentração A e 10 vezes menor que na amostra com concentração B e, portanto, as concentrações A e B foram definidas como LD e LQ, respectivamente.

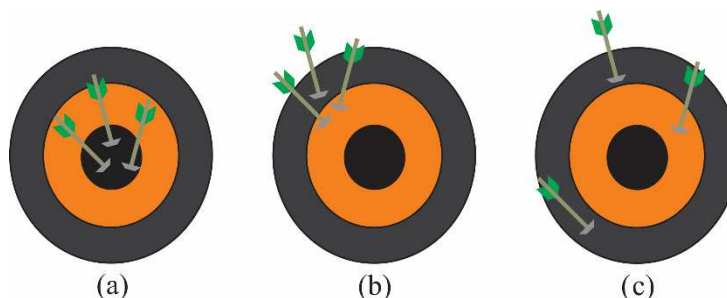
Figura 1.21. Representação dos cromatogramas utilizados para a determinação do LD e LQ pela relação sinal/ruído. Sendo a concentração A menor que a B.



3.6.5. Exatidão e precisão

A exatidão de uma metodologia analítica expressa a proximidade dos resultados encontrados com o valor de referência e deve ser especificada em termos das taxas médias de recuperação do analito alvo. Já a precisão expressa a proximidade entre os resultados encontrados e deve ser especificada em termos do desvio padrão relativo das taxas de recuperação do composto de interesse (THOMPSON *et al.*, 2002; ICH, 2010; EURACHEM, 2014). A Figura 1.22 representa a diferença entre exatidão e precisão, as ilustrações desta figura mostram alguns dos possíveis resultados de um jogo de dardos, onde o jogador deve acertar o centro do alvo (valor de referência). Os resultados na Figura 1.22 (a) foram precisos e exatos, visto que os dardos estão agrupados (precisos) e estão no centro do alvo (exatos). Na Figura 1.22 (b) foram precisos, mas não exatos, sendo que os dardos estão agrupados (precisos), mas não estão no centro do alvo (não exatos). Na Figura 1.22 (c) não foram precisos e nem exatos, posto que os dardos não estão agrupados (não precisos) e estão fora do centro do alvo (não exatos) (NATA, 2018).

Figura 1.22. Representação de alguns dos possíveis resultados de um jogo de dardos.



Fonte: adaptado BROWN *et al.*, 2005; NATA, 2018.

Para avaliar a exatidão da metodologia devem ser realizados experimentos de recuperação do analito alvo a partir de amostras fortificadas, utilizando pelo menos três níveis de concentração dentro da faixa de linearidade, com três repetições para cada nível. Metodologia com taxas médias de recuperação dentro do intervalo de 70 a 120% deve ser considerada exata (RIBANI *et al.*, 2004; ICH, 2010; EC, 2017).

A precisão da metodologia também é avaliada através de experimentos de recuperação do analito alvo a partir de amostras fortificadas, porém deve ser utilizado apenas um nível de concentração, com sete repetições. A metodologia deve ter desvios padrão relativos menores que 20% para ser considerada precisa (RIBANI *et al.*, 2004; ICH, 2010; EC, 2017).

A Tabela 1.14 mostra um exemplo de metodologia exata e precisa, uma vez que as taxas médias de recuperação do analito alvo estão dentro da faixa de 70 a 120 % e os desvios padrão relativos são menores que 20%.

Tabela 1.14. Exemplo de taxas de recuperação médias e desvios padrão relativos para experimentos de fortificação/recuperação

	Recuperação ± DPR (%)		
	5 µg L ⁻¹ ^a	25 µg L ⁻¹ ^b	45 µg L ⁻¹ ^a
Analito alvo	102,1 ± 9,2	103,8 ± 7,4	98,9 ± 4,5

^a Média das três replicatas; ^b Média das sete replicatas; DPR: desvio padrão relativo

3.7. Testes estatísticos para comparação de médias

A comparação de médias é um procedimento importante nos estudos de otimização de metodologias de preparo de amostra. Geralmente, as condições ótimas dessas metodologias são definidas através da comparação das médias das taxas de recuperação do analito alvo para os diferentes tratamentos¹³. No entanto, para as tomadas de decisões é necessário avaliar se as médias para os diferentes tratamentos são iguais ou diferentes (BARBOSA *et al.*, 2014; ANDRADE *et al.*, 2017).

Os experimentos de otimização com apenas dois tratamentos podem ser avaliados através do teste F. Essa estatística é calculada através da tabela de análise de variância (ANOVA) que pode ser construída de acordo com a Tabela 1.15 (SAMPAIO, 2002; MONTGOMERY & RUNGER, 2009).

¹³Nível específico de um fator de interesse. Assim, se o fator for a fase extratora, os níveis são as diferentes fases extratoras avaliadas (MONTGOMERY & RUNGER, 2009).

Tabela 1.15. Análise de variância (ANOVA) para experimentos com um fator¹⁴

FV	GL	SQ	QM	F	F _{crit}
Tratamentos	$u - 1$	$\sum_{i=1}^a \frac{y_i^2}{n} - \frac{y_{..}^2}{N}$	$\frac{SQ_{trat}}{GL_{trat}}$	$\frac{MQ_{trat}}{MQ_{res}}$	$F_{(\alpha; u-1; u(n-1))}$
Resíduos	$u(n - 1)$	$SQ_{total} - SQ_{trat}$	$\frac{SQ_{res}}{GL_{res}} = S_{res}^2$		
Total	$un - 1$	$\sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^n y_{ij}^2 - \frac{y_{..}^2}{N}$	$\frac{SQ_{total}}{GL_{total}}$		

FV: fonte de variação; GL: graus de liberdade; SQ: soma dos quadrados; QM: quadrados médios; F: razão entre variâncias; F_{crit}: F crítico; α : nível de significância; u: número de tratamentos; n: número de observações de um tratamento; N: an, número total de observações; y_{ij} : representa a j-ésima observação sujeita ao i-ésimo tratamento; $y_{i.}$: total das observações sujeitas ao i-ésimo tratamento; $y_{..}$: total global de todas as observações.

Fonte: Adaptado SAMPAIO, 2002; MONTGOMERY & RUNGER, 2009.

As hipóteses utilizadas para avaliar se há diferenças significativas entre os tratamentos estudados estão descritos na Tabela 1.16 (MONTGOMERY & RUNGER, 2009).

Tabela 1.16. Hipóteses testadas para avaliar se os tratamentos são significativamente diferentes

Hipótese nula (H ₀)	As médias dos tratamentos são iguais, ou seja, o fator estudado não tem efeito.
Hipótese alternativa (H ₁)	As médias dos tratamentos são diferentes, ou seja, o fator estudado tem efeito.
Critério de rejeição	Rejeitar H ₀ se $F > F_{crit}$

F: razão entre variâncias.

Fonte: adaptado MONTGOMERY & RUNGER, 2009.

Para experimentos com mais de dois tratamentos também é utilizado teste F (Tabela 1.15). Entretanto, se for encontrada alguma diferença entre as médias dos tratamentos é preciso determinar quais dos tratamentos são iguais ou diferentes entre si. Nesse caso, é necessário realizar testes estatísticos para comparação de médias como, por exemplo, o Tukey (PIMENTEL-GOMES, 1990; SAMPAIO, 2002).

¹⁴Refere-se ao parâmetro que o pesquisador tem interesse de estudar. Um fator pode ser, por exemplo, temperatura, volume ou fase extratora (MONTGOMERY & RUNGER, 2009).

Segundo o teste de Tukey as médias de dois tratamentos são significativamente diferentes toda vez que o módulo da diferença entre elas for igual ou maior do que a diferença mínima significativa (dms). Portanto, para realizar esse teste é necessário calcular a dms de acordo com a Eq. 1.24 (PIMENTEL-GOMES, 1990; SAMPAIO, 2002).

$$dms = q(\alpha, u, GL_{res}) \sqrt{\frac{S_{res}^2}{r}} \quad (1.24)$$

Onde:

q : valor tabelado por Tukey em função do número de tratamento e dos graus de liberdade do resíduo;

α : nível de significância;

u : número de tratamentos;

GL_{res} : grau de liberdade do resíduo

S_{res}^2 : valor estimado do quadrado médio do resíduo;

r : número de repetições.

A Tabela 1.17 apresenta um exemplo de análise de variância para experimentos com um fator, três tratamentos e três repetições para cada tratamento.

Tabela 1.17. Exemplo da análise de variância (ANOVA) para experimentos com um fator

FV	GL	SQ	QM	F	F _{crit}
Tratamentos	2	354,667	177,333	28,500	0,052
Resíduos	6	37,333	6,222		
Total	8	392,000	49,000		

FV: fonte de variação; GL: graus de liberdade; SQ: soma dos quadrados; QM: quadrados médios; F: razão entre variâncias

Nesse exemplo nem todas as médias dos tratamentos são iguais, já que $F(28,500) > F_{crit}(0,052)$. Portanto, foi necessário aplicar o teste de Tukey para determinar quais dos tratamentos são iguais ou diferentes entre si. A Tabela 1.18 apresenta os resultados do teste de Tukey para esses tratamentos.

Tabela 1.18. Exemplo da aplicação do teste de Tukey

Comparações	Diferença entre as médias	dms	Decisão
Tratamentos 1 e 2	3,333	6,143	Iguais
Tratamentos 1 e 3	11,333	4,047	Diferentes
Tratamentos 2 e 3	14,667	6,484	Diferentes

dms: diferença mínima significativa.

Para os tratamentos 1 e 2 a dms foi maior que a diferença entre as suas médias, portanto, as médias desses tratamentos são iguais. Já os tratamentos 1 e 3 e 2 e 3 apresentaram diferenças entre médias maiores que a dms e, por isso, suas médias foram consideradas diferentes.

4. REFERÊNCIAS

ÁBALOS, M. *et al.* Meeting the European Commission performance criteria for the use of triple quadrupole GC-MS/MS as a confirmatory method for PCDD/Fs and dl-PCBs in food and feed samples. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 408, n. 13, p. 3511–3525, may 2016.

ALEXOVIC, M. *et al.* Automation of dispersive liquid–liquid microextraction and related techniques. Approaches based on flow, batch, flow-batch and in-syringe modes. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 86, p. 39–55, jan. 2017.

ANASTASSIADES, M. *et al.* Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. **Journal of AOAC International**, v. 86, n. 2, p. 412–431, apr. 2003.

ANDRADE, V. F. *et al.* Fast extraction of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxin and polychlorinated dibenzofuran in sewage sludge and soil samples. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 52, n. 4, p. 267–273, apr. 2017.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals**; Washington D.C., USA, 2002.

AUGUSTI, D. V. *et al.* Method validation and occurrence of dioxins and furans (PCDD/Fs) in fish from Brazil. **Analytical Methods**, v. 6, n. 6, p. 1963–1969, 2014.

AVINO, P. *et al.* New protocol based on high-volume sampling followed by DLLME-GC-IT/MS for determining PAHs at ultra-trace levels in surface water samples. **Microchemical Journal**, v. 133, p. 251–257, jul. 2017.

BARBOSA, E. S. *et al.* Otimização e validação da extração sólido-líquido e purificação em baixa temperatura de HPAs em lodo de esgoto. **Química Nova**, v. 37, n. 3, p. 404-410, feb. 2014.

BAZILIO, F. S.; BOMFIM, M. V. J.; ALMEIDA, R. J.; Abrantes, S. M. P. Uso de planilha eletrônica na verificação da adequação de curva analítica ao modelo linear. **Revista Analytica**, n. 59, p. 60-67, jun. 2012.

BEDASSA, T.; GURE, A.; MEGERSA, N. Low density solvent based dispersive liquid-liquid microextraction and preconcentration of multiresidue pesticides in environmental waters for liquid chromatographic analysis. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 70, n. 10, p. 1199–1206, oct. 2015.

BEN, Y. *et al.* Exposure assessment of PCDD/Fs for the population living in the vicinity of municipal waste incinerator: Additional exposure via local vegetable consumption. **Environmental Pollution**, v. 224, p. 532–540, may 2017.

BRAUNE, B. M.; MALLORY, M. L. Declining trends of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins, dibenzofurans and non-ortho PCBs in Canadian Arctic seabirds. **Environmental Pollution**, v. 220, p. 557–566, jan. 2017.

BRONDI, S. H. G. *et al.* Evaluation of the QuEChERS Method and Gas Chromatography–Mass Spectrometry for the Analysis Pesticide Residues in Water and Sediment. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 86, n. 1, p. 18–22, jan. 2011.

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

BROWN, T. L., *et al.* **Química: a ciência central**. 9. ed. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2005.

CALDAS, S. S. *et al.* Multi-residue method for determination of 58 pesticides, pharmaceuticals and personal care products in water using solvent demulsification dispersive liquid–liquid microextraction combined with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Talanta**, v. 146, p. 676–688, jan. 2016.

CASALEGNO, M.; RAOS, G.; SELLO, G. From dioxin to dioxin congeners: understanding the differences in hydrophobic aggregation in water and absorption into lipid membranes by means of atomistic simulations. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 18, n. 26, p. 17731–17739, 2016.

CERQUEIRA, M. B. R. *et al.* Evaluation of the QuEChERS method for the extraction of pharmaceuticals and personal care products from drinking-water treatment sludge with determination by UPLC-ESI-MS/MS. **Chemosphere**, v. 107, p. 74–82, jul. 2014.

CHAKRABORTY, P. *et al.* PCBs and PCDD/Fs in soil from informal e-waste recycling sites and open dumpsites in India: Levels, congener profiles and health risk assessment. **Science of The Total Environment**, v. 621, p. 930–938, apr. 2018.

CHAMKASEM, N.; HARMON, T. Direct determination of glyphosate, glufosinate, and AMPA in soybean and corn by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 408, n. 18, p. 4995–5004, jul. 2016.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE (CONAMA). Resolução N° 357, de 17 de março de 2005. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, Brasil, 2005.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE (CONAMA). Resolução N° 430, de 13 de maio de 2011. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, Brasil, 2011.

CORREIA-SÁ, L. *et al.* Micro-QuEChERS extraction coupled to GC–MS for a fast determination of Bisphenol A in human urine. **Journal of Chromatography B**, v. 1072, p. 9–16, jan. 2018.

COSTA, A. I. G. *et al.* Determination of pesticides in lettuce using solid–liquid extraction with low temperature partitioning. **Food Chemistry**, v. 181, p. 64–71, aug. 2015.

CUI, Y. Y. *et al.* Adsorption of dioxin by bag filter + powdered activated carbon. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 228, n. 4, apr. 2017.

DA SILVEIRA, T. M. *et al.* Study of Analytical Techniques to Determine Chlorpyrifos in the Surface Waterways of the Rural Zone of Ouro Branco, Brazil: A Case Study. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 227, n. 9, sep. 2016.

DASGUPTA, S. *et al.* Extraction of pesticides, dioxin-like PCBs and PAHs in water-based commodities using liquid–liquid microextraction and analysis by gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 38, p. 6780–6791, sep. 2011.

DE BARROS, A. L. C. *et al.* Determination of nine pharmaceutical active compounds in surface waters from Paraopeba River Basin in Brazil by LTPE-HPLC-ESI-MS/MS. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 20, p. 19962–19974, jul. 2018.

DE PINHO, G. P. *et al.* Efeito de matriz na quantificação de agrotóxicos por cromatografia gasosa. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 987–995, apr. 2009.

DE PINHO, G. P. *et al.* Optimization of the liquid–liquid extraction method and low temperature purification (LLE–LTP) for pesticide residue analysis in honey samples by gas chromatography. **Food Control**, v. 21, n. 10, p. 1307–1311, aug. 2010.

DE SOUZA, S. V. C. **Procedimento para validação Intralaboratorial de métodos de ensaio: Delineamento e aplicabilidade em análises de alimentos.** Tese de doutorado. Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

DELLA-FLORA, A. *et al.* Fast, cheap and easy routine quantification method for atrazine and its transformation products in water matrixes using a DLLME-GC/MS method. **Analytical Methods**, v. 10, n. 45, p. 5447–5452, 2018.

DO REGO, E. C. P. *et al.* The validation of a new high throughput method for determination of chloramphenicol in milk using liquid–liquid extraction with low temperature partitioning (LLE-LTP) and isotope-dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry (ID-LC-MS/MS). **Analytical Methods**, v. 7, n. 11, p. 4699–4707, 2015.

DO REGO, E. C. P. *et al.* Feasibility study for development of candidate reference material for food analysis: Chloramphenicol in milk powder. **Measurement**, v. 98, p. 300–304, feb. 2017.

DRAPER, N. R.; SMITH, H. **Applied regression analysis.** 3. ed. New York: Wiley. 1998.

DUARTE, J. S.; DORES, E. F. G. C.; VILLA, R. D. Microextração líquido-líquido dispersiva assistida por vórtex e ultrassom aplicada à determinação de agrotóxicos triazinas, triazinonas e o triazol flutriafol em água. **Química Nova**, v. 39, n. 8, p. 925-931, 2016.

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

EURACHEM. **The fitness for purpose of analytical methods - A laboratory guide to method validation and related topics.** Second edition, 2014.

EUROPEAN COMMISSION (EC). **Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed**. SANTE/11813, 2017.

FERNÁNDEZ, A. E.; FERRERA, Z. S.; RODRÍGUEZ, J. J. S. Application of cloud-point methodology to the determination of polychlorinated dibenzofurans in sea water by high-performance liquid chromatography. **Analyst**, v. 124, n. 4, p. 487–491, jan. 1999.

FERNÁNDEZ, A. E.; FERRERA, Z. S.; RODRÍGUEZ, J. J. S. Microwave-assisted extraction of organochlorine compounds in marine sediments with organized molecular systems. **Chromatographia**, v. 53, n. 7, p. 375–379, apr. 2001.

FERREIRA, A. P.; MOREIRA, M. F. R. Dioxins and furans in breast milk: a case study of mothers from southern Rio de Janeiro, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 31, n. 5, p. 1107–1111, may 2015.

FERREIRA, A. P. Polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins, dibenzofurans, and biphenyls in fregata magnificens from Ilha Grande bay, Rio de Janeiro state, South-Eastern Brazil. **Brazilian Journal of Oceanography**, v. 63, n. 1, p. 43–50, mar. 2015.

FERREIRA, J. A. *et al.* Determination of pesticides in coconut (*Cocos nucifera* Linn.) water and pulp using modified QuEChERS and LC–MS/MS. **Food Chemistry**, v. 213, p. 616–624, dec. 2016.

GHANI, S. B. A.; HANAFI, A. H. QuEChERS method combined with GC–MS for pesticide residues determination in water. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 71, n. 5, p. 508–512, may 2016.

GOULART, S. M. *et al.* Determination of carbamates in beverages by liquid-liquid extraction with low temperature partitioning and liquid chromatography. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 6, p. 1154–1165, jun. 2012.

GOULART, S. M. *et al.* Optimization and validation of liquid–liquid extraction with low temperature partitioning for determination of carbamates in water. **Analytica Chimica Acta**, v. 671, n. 1, p. 41–47, 25 jun. 2010.

GUAN, J. *et al.* Simultaneous determination of 12 pharmaceuticals in water samples by ultrasound-assisted dispersive liquid–liquid microextraction coupled with ultra-high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 408, n. 28, p. 8099–8109, nov. 2016.

GUEMIZA, K. *et al.* Influence of soil parameters on the efficiency of the attrition process to remove metals, PCP, dioxins and furans from contaminated soils. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 228, n. 12, dec. 2017.

GUERRA, E. *et al.* Study of photostability of three synthetic dyes commonly used in mouthwashes. **Microchemical Journal**, v. 146, p. 776–781, may 2019.

HADDAD, A.; MOQBEL, S.; ABDELHADI, M. Evaluating the effect of rain on the fate of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins (PCDDs) and polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) accumulated in polluted trees in Amman, Jordan. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 11, p. 10644–10653, apr. 2018.

HAIMOVICI, L. *et al.* A modified QuEChERS approach for the screening of dioxins and furans in sediments. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 408, n. 15, p. 4043–4054, jun. 2016.

HOOGENBOOM, R. *et al.* European developments following incidents with dioxins and PCBs in the food and feed chain. **Food Control**, v. 50, p. 670–683, apr. 2015.

HORWITZ, W. Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies. **Pure and Applied Chemistry**, v. 67, p. 331–343, 1995.

HSU, Y. C. *et al.* National surveillance of 2,3,7,8-substituted polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins/furans in soil in Taiwan. **Chemosphere**, v. 203, p. 239–252, jul. 2018.

HU, M. *et al.* Method development and validation of indaziflam and its five metabolites in soil, water, and fruits by modified QuEChERS and UHPLC-MS/MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, n. 39, p. 10300–10308, oct. 2018.

HUE, N. T. M. *et al.* Site-specific bioaccumulation of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and polychlorinated dibenzofurans (PCDD/PCDFs) in mothers and their infants living in vicinity of Bien Hoa airbase, Southern Vietnam. **Environmental Geochemistry and Health**, v. 40, n. 6, p. 2539–2549, dec. 2018.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE (ICH). **Validation of analytical procedures: text and methodology Q₂ (R₁)**. Geneva, Suíça, 2010.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL (INMETRO). **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos**. Rio de Janeiro, Brasil, 2016.

JU, C. *et al.* Rapid residue analysis of oxathiapiprolin and its metabolites in typical Chinese soil, water, and sediments by a modified quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe method with ultra-high-performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry: Liquid Chromatography. **Journal of Separation Science**, v. 38, n. 6, p. 909–916, mar. 2015.

KACHHAWAHA, A. S. *et al.* Optimization of a modified QuEChERS method for multiresidue analysis of pharmaceuticals and personal care products in sewage and surface water by LC-MS/MS. **Journal of AOAC International**, v. 100, n. 3, p. 592–597, may 2017.

KAHN, L. G. *et al.* Adolescents exposed to the World Trade Center collapse have elevated serum dioxin and furan concentrations more than 12 years later. **Environment International**, v. 111, p. 268–278, feb. 2018.

KAIUM, A. *et al.* Validation of QuEChERS-based UPLC-MS/MS method for determination of quinoid niclosamide (LDS) residue in water, soil and rice samples. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 98, n. 7, p. 644–654, may 2018.

KNIGHT, A. W. *et al.* A simple-rapid method to separate uranium, thorium, and protactinium for U-series age-dating of materials. **Journal of Environmental Radioactivity**, v. 134, p. 66–74, aug. 2014.

KOZANI, R. *et al.* Part-per-trillion determination of chlorobenzenes in water using dispersive liquid–liquid microextraction combined gas chromatography–electron capture detection. **Talanta**, v. 72, n. 2, p. 387–393, apr. 2007.

LEONG, M. I. *et al.* Low toxic dispersive liquid–liquid microextraction using halo solvents for extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 34, p. 5455–5461, aug. 2010.

LI, Y.; CHEN, P. S.; HUANG, S. D. Water with low concentration of surfactant in dispersed solvent-assisted emulsion dispersive liquid–liquid microextraction for the determination of organochlorine pesticides in aqueous samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1300, p. 51–57, jul. 2013.

LIU, L. *et al.* Application of DLLME to the determination of pyrethroids in aqueous samples. **Chromatographia**, v. 72, n. 9–10, p. 1017–1020, nov. 2010.

LOUCHOUARN, P. *et al.* Limited mobility of dioxins near San Jacinto super fund site (waste pit) in the Houston Ship Channel, Texas due to strong sediment sorption. **Environmental Pollution**, v. 238, p. 988–998, jul. 2018.

LOYOLA-SEPÚLVEDA, R. *et al.* Contributions of dioxins and furans to the urban sediment signature: The role of atmospheric particles. **Science of The Total Environment**, v. 615, p. 751–760, feb. 2018.

LU, F. *et al.* Levels and profiles of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxin and dibenzofurans in raw and treated water from water treatment plants in Shenzhen, China. **Environmental Pollution**, v. 211, p. 233–240, apr. 2016.

MAGALHÃES, E. J. *et al.* Fast determination of benzodiazepines in human urine via liquid-liquid extraction with low temperature partitioning and LC-HRMS. **American Journal of Analytical Chemistry**, v. 3, p. 118-124, feb. 2012.

MAIA, M. R. *et al.* Solid-liquid extraction with low temperature purification coupled with gas chromatography and mass spectrometry for determination of polychlorinated biphenyls in sewage sludge. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, n. 1, p. 179-186, 2017.

MARTINS, A. F. *et al.* Occurrence of cocaine and metabolites in hospital effluent - A risk evaluation and development of a HPLC method using DLLME. **Chemosphere**, v. 170, p. 176–182, mar. 2017.

MARTINS, M. L. *et al.* Microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME): fundamentos e aplicações. **Scientia Chromatographica**, v. 4, n. 1, p. 29–45, 2012.

MARTINS, M. L. *et al.* Determination of pesticides and related compounds in water by dispersive liquid-liquid microextraction and gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry. **Analytical Methods**, v. 6, n. 14, p. 5020, 2014.

MCCULLOCH, R. *et al.* A novel atmospheric pressure photoionization – mass spectrometry (APPI-MS) method for the detection of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofuran homologues in real environmental samples collected within the vicinity of industrial incinerators. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 421, p. 135–143, oct. 2017.

MEGLOULI, H. *et al.* Arbuscular mycorrhizal inoculum sources influence bacterial, archaeal, and fungal communities' structures of historically dioxin/furan-contaminated soil but not the pollutant dissipation rate. **Mycorrhiza**, v. 28, n. 7, p. 635–650, oct. 2018.

MESQUITA, T. C. R. *et al.* Easy and fast extraction methods to determine organochlorine pesticides in sewage sludge, soil, and water samples based at low temperature. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 53, n. 3, p. 199–206, mar. 2018.

METELKOVA, L. *et al.* Occurrence of PCDD/PCDFs, dioxin-like PCBs, and PBDEs in surface sediments from the Neva River and the Eastern Gulf of Finland (Russia). **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 8, p. 7375–7389, mar. 2019.

MONTGOMERY, D. C.; RUNGER, G. C. **Estatística aplicada e probabilidade para engenheiros**. 5. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2009.

NAKISA, A. *et al.* Determination of the most toxic polychlorodibenzofurans in fresh milk from Southwest Iran. **Food and Nutrition Sciences**, v. 6, p. 955, 2015.

NATIONAL ASSOCIATION OF TESTING AUTHORITIES (NATA). **General Accreditation Guidance - Validation and verification of quantitative and qualitative test methods**. Sydney, Austrália, 2018.

NUNES, C. M. *et al.* Reference material for the determination of polychlorodibenzo-*p*-dioxins, polychlorodibenzo-furans, and polychlorinated biphenyls in fish: production process, homogeneity, and stability. **Food Analytical Methods**, v. 11, n. 3, p. 808–823, mar. 2018.

PALLARÉS, N. *et al.* Multimycotoxin LC–MS/MS Analysis in tea beverages after dispersive liquid–liquid microextraction (DLLME). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n. 47, p. 10282–10289, nov. 2017.

PARERA, J. *et al.* Long-term monitoring programme of polychlorinated dioxins and polychlorinated furans in ambient air of Catalonia, Spain (1994–2015). **Science of The Total Environment**, v. 633, p. 738–744, aug. 2018.

PIMENTA, E. M. **Extração de glifosato e ácido aminometilfosfônico da madeira de eucalipto e quantificação por HPLC-ICP-MS/MS**. Dissertação de Mestrado. Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Minas Gerais, Montes Claros, 2016.

PIMENTEL-GOMES, F. **Curso de Estatística Experimental**. 13. ed. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1990.

PINTO, E.; SOARES, A. G.; FERREIRA, I. M. P. L. V. O. Quantitative analysis of glyphosate, glufosinate and AMPA in irrigation water by in situ derivatization–dispersive liquid–liquid

microextraction combined with UPLC-MS/MS. **Analytical Methods**, v. 10, n. 5, p. 554–561, 2018.

PISKORSKA-PLISZCZYŃSKA, J. *et al.* Application of the AhR reporter gene assay for the determination of PCDD/Fs and DL-PCBs in feed samples. **Journal of Veterinary Research**, v. 61, n. 4, p. 473–481, dec. 2017.

PUSSENTE, I. *et al.* PCDD/Fs and PCBs in soils: a study of case in the city of Belo Horizonte-MG. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, n. 5, p. 858-867, 2017.

RATHNA, R.; VARJANI, S.; NAKKEERAN, E. Recent developments and prospects of dioxins and furans remediation. **Journal of Environmental Management**, v. 223, p. 797–806, oct. 2018.

REINER, E. J. *et al.* Advances in analytical techniques for polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins, polychlorinated dibenzofurans and dioxin-like PCBs. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 386, n. 4, p. 791–806, oct. 2006.

REZAEI, M. *et al.* Determination of organic compounds in water using dispersive liquid–liquid microextraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1116, n. 1–2, p. 1–9, may 2006.

REZAEI, M.; YAMINI, Y.; FARAJI, M. Evolution of dispersive liquid–liquid microextraction method. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 16, p. 2342–2357, apr. 2010.

REZAEI, F. *et al.* Development of a dispersive liquid–liquid microextraction method for the determination of polychlorinated biphenyls in water. **Journal of Hazardous Materials**, v. 158, n. 2, p. 621–627, oct. 2008.

REZAEI, M. *et al.* Determination of polychlorinated dibenzo dioxin levels in fresh milk from the dairy factories of Southwest Iran. **Journal of Environmental & Analytical Toxicology**, v. 5, n. 5, p. 1–5, jun. 2015.

REZENDE, F. B. F. *et al.* Determination of formaldehyde in bovine milk using a high sensitivity HPLC-UV method. **Microchemical Journal**, v. 134, p. 383–389, sep. 2017.

RIBANI, M. *et al.* Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771–780, oct. 2004.

RIMAYI, C. *et al.* Distribution of 2,3,7,8-substituted polychlorinated dibenzo-*p*-dioxin and polychlorinated dibenzofurans in the Jukskei and Klip/Vaal catchment areas in South Africa. **Chemosphere**, v. 145, p. 314–321, feb. 2016.

ROBLES-MOLINA, J. *et al.* Comparative evaluation of liquid–liquid extraction, solid-phase extraction and solid-phase microextraction for the gas chromatography–mass spectrometry determination of multiclass priority organic contaminants in wastewater. **Talanta**, v. 117, p. 382–391, dec. 2013.

ROCHA, D. A. M. *et al.* Determination of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans (PCDD/Fs) in Brazilian cow milk. **Science of The Total Environment**, v. 572, p. 177–184, dec. 2016.

RODENBURG, L. A. *et al.* Forensic analysis of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxin and furan fingerprints to elucidate dechlorination pathways. **Environmental Science & Technology**, v. 51, n. 18, p. 10485–10493, sep. 2017.

RODRIGUES, A. A. Z. *et al.* Pesticide residue removal in classic domestic processing of tomato and its effects on product quality. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 52, n. 12, p. 850–857, dec. 2017.

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

SADEGHI, R. *et al.* Validation of an analytical method for determination of 13 priority polycyclic aromatic hydrocarbons in mineral water using dispersive liquid-liquid microextraction and GC-MS. **Iranian journal of pharmaceutical research**, v. 15, n. 1, p. 157–168, 2016.

SADOWSKA, A. *et al.* Transcriptional profiling of porcine granulosa cells exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. **Chemosphere**, v. 178, p. 368–377, jul. 2017.

SAMPAIO, I. B. M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. 2. ed. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2002.

SANZ, C. P.; FERREIRA, Z. S.; RODRÍGUEZ, J. J. S. Extraction and preconcentration of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins using the cloud-point methodology: Application to their determination in water samples by high-performance liquid chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v. 470, n. 2, p. 205–214, oct. 2002.

SHAO, G.; AGAR, J.; GIESE, R. W. Cold-induced aqueous acetonitrile phase separation: A salt-free way to begin quick, easy, cheap, effective, rugged, safe. **Journal of Chromatography A**, v. 1506, p. 128–133, jul. 2017.

SHEN, Z. *et al.* Low-density magnetofluid dispersive liquid–liquid microextraction for the fast determination of organochlorine pesticides in water samples by GC-ECD. **Analytica Chimica Acta**, v. 793, p. 37–43, sep. 2013.

SHI, J. W. *et al.* Development of a screening method for the determination of PCBs in water using QuEChERS extraction and gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry. **Analytical Sciences**, v. 28, n. 2, p. 167–173, 2012.

SIKITI, P. *et al.* Simultaneous determination of tetrachloro dibenzo-*p*-dioxin and poly-aromatic chlorinated biphenyls in aqueous environment using liquid phase microextraction. **Physics and Chemistry of the Earth**, v. 50–52, p. 98–103, jan. 2012.

SILVÉRIO, F. O. *et al.* Análise de agrotóxicos em água usando extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura por cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, v. 35, n. 10, p. 2052–2056, 2012.

SIRIMANNE, S. R. *et al.* Quantification of polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins in human serum by combined micelle-mediated extraction (cloud-point extraction) and HPLC. **Analytical Chemistry**, v. 68, n. 9, p. 1556–1560, may 1996.

SOUZA, D. M.; REICHERT, J. F.; MARTINS, A. F. A simultaneous determination of anti-cancer drugs in hospital effluent by DLLME HPLC-FLD, together with a risk assessment. **Chemosphere**, v. 201, p. 178–188, jun. 2018.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, n. 5, p. 835–855, jan. 2002.

TREVIZANI, T. H. *et al.* Bioaccumulation of heavy metals in marine organisms and sediments from Admiralty Bay, King George Island, Antarctica. **Marine Pollution Bulletin**, v. 106, n. 1–2, p. 366–371, may 2016.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (US EPA). **Method 1613: tetra-through octa-chlorinated dioxins and furans by isotope dilution HRGC/HRMS**. Engineering and Analysis Division (4303), Washington D.C., USA, 1994.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (US EPA). **National primary drinking water regulations**. May. 2009. Disponível em: <https://www.epa.gov/ground-water-and-drinking-water>. Acesso em: junho 2018.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (US EPA). **Recommended toxicity equivalence factors (TEFs) for human health risk assessments of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin and dioxin-like compounds**; Risk Assessment Forum, Washington D.C., USA, 2010.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (US EPA). **Definition and procedure for the determination of the method detection limit, revision 2**. Washington D.C., USA, 2016.

VERBRUGGE, L. A.; KAHN, L.; MORTON, J. M. Pentachlorophenol, polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and polychlorinated dibenzo furans in surface soil surrounding pentachlorophenol-treated utility poles on the Kenai National Wildlife Refuge, Alaska USA. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 19, p. 19187–19195, jul. 2018.

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

WANG, K. D.; CHEN, P. S.; HUANG, S. D. Simultaneous derivatization and extraction of chlorophenols in water samples with up-and-down shaker-assisted dispersive liquid–liquid microextraction coupled with gas chromatography/mass spectrometric detection. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 406, n. 8, p. 2123–2131, may 2013.

WANG, T. *et al.* Emission characteristics and relationships among PCDD/Fs, chlorobenzenes, chlorophenols and PAHs in the stack gas from two municipal solid waste incinerators in China. **RSC Advances**, v. 7, n. 70, p. 44309–44318, 2017.

WANG, X.; CHEN, J.; NI, Y. Polychlorinated dibenzo-*p*-dioxin and dibenzofuran precursors and formation mechanisms during non-wood pulp chlorine bleaching process. **Chemosphere**, v. 211, p. 1–9, nov. 2018.

WU, R. N. *et al.* Analysis of patulin in apple products by liquid–liquid extraction, solid phase extraction and matrix solid-phase dispersion methods: a comparative study. **European Food Research and Technology**, v. 228, n. 6, p. 1009–1014, apr. 2009.

WU, X. *et al.* Determination of Herbicide Propisochlor in Soil, Water and Rice by Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe (QuEChERS) Method Using by UPLC-ESI-MS/MS. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, v. 34, n. 3, p. 917–921, 2013.

XU, W.; WANG, X.; CAI, Z. Analytical chemistry of the persistent organic pollutants identified in the Stockholm Convention: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 790, p. 1–13, aug. 2013.

YANG, J. S.; LEE, D. W.; LIM, H. Microwave-Assisted Extraction (MAE) of Polychlorinated Biphenyls and Polychlorinated Dibenzo-*p*-Dioxins from Fly Ash and Sea Sediments: Effect of Water and Removal of Interferences. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 26, n. 5, p. 803–818, apr. 2003.

YANG, M. *et al.* Determination of 26 endocrine disrupting chemicals in fish and water using modified QuEChERS combined with solid-phase extraction and UHPLC-MS/MS. **Analytical Methods**, v. 7, n. 19, p. 8418–8431, 2015.

ZHAO, W. *et al.* Determination of organochlorine pesticides in snow water samples by low density solvent based dispersive liquid-liquid microextraction: Sample Preparation. **Journal of Separation Science**, v. 37, n. 18, p. 2599–2604, sep. 2014.

CAPÍTULO 2. DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE 2,3,7,8-TCDD E 2,3,7,8-TCDF EM AMOSTRAS DE ÁGUA POR ELL-PBT E CLAE-DAD

RESUMO

Dioxinas e furanos policlorados são poluentes orgânicos persistentes que podem ser encontrados em matrizes ambientais, tais como a água. Esses compostos são altamente tóxicos e, portanto, o desenvolvimento de novas metodologias de extração simples, rápidas, eficientes e de baixo custo são altamente desejáveis. Este trabalho teve como objetivo otimizar e validar a metodologia de extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura de 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-*p*-dioxina e 2,3,7,8-tetraclorodibenzofurano em amostras de água. As condições ótimas de extração foram 8,0 mL de acetonitrila e 4,0 mL de água, homogeneizadas em vórtex por 1 min e mantidas a -20 °C por 1 h. As taxas de recuperação dos analitos alvos foram próximas a 100% e o desvio padrão relativo foi inferior a 7%. A metodologia foi precisa, exata, linear em 2,4 - 5,4 $\mu\text{g L}^{-1}$ e seletiva, com limite de quantificação de 2,4 $\mu\text{g L}^{-1}$. A metodologia otimizada foi aplicada em dez amostras reais de água e os resultados mostraram que os analitos alvos não foram detectados.

Palavras-chave: dioxinas; furanos; metodologias de extração; partição em baixa temperatura.

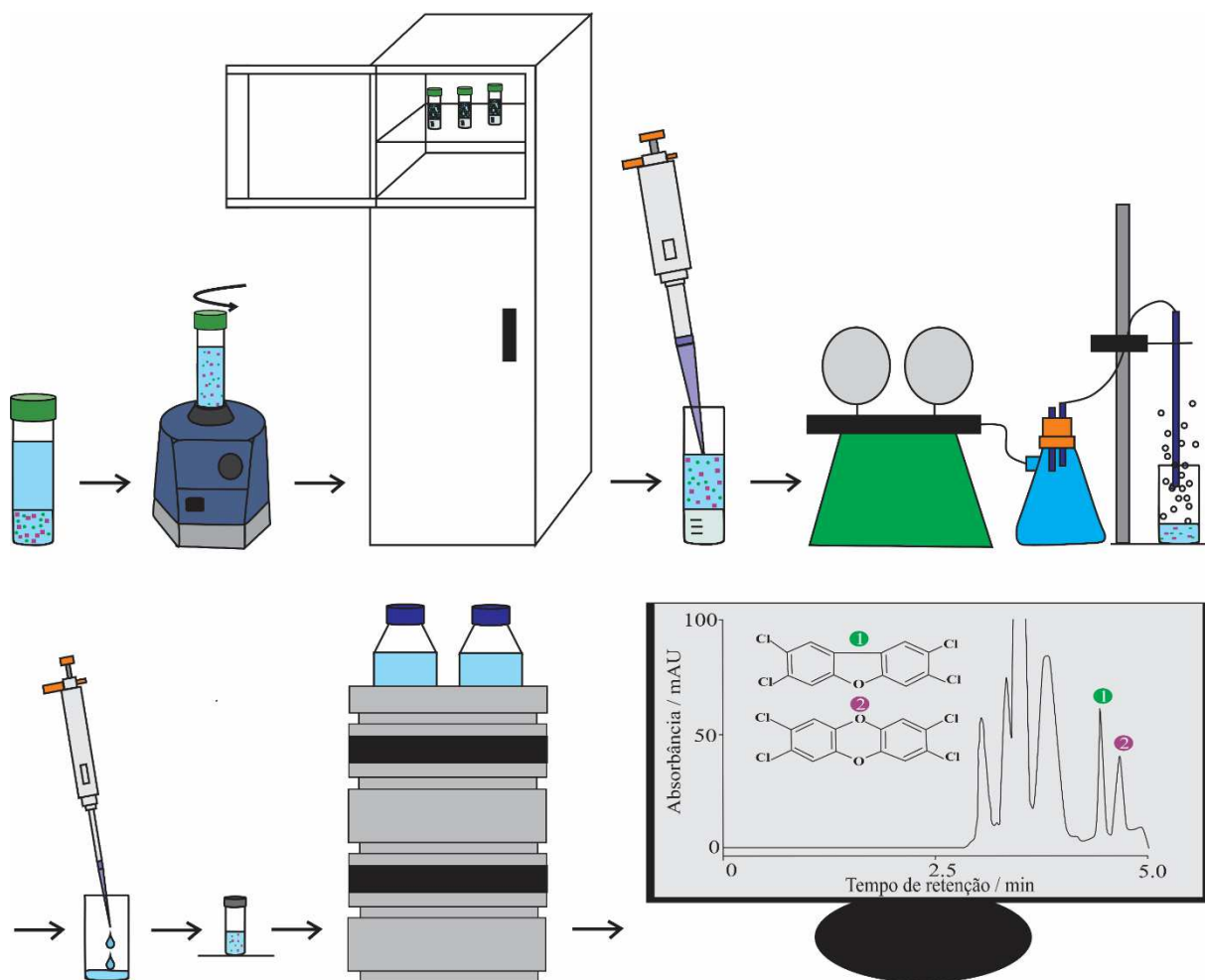
ABSTRACT

Polychlorinated dioxins and furans are persistent organic pollutants which can be found in the environmental matrix, such as water. These compounds are highly toxic and therefore developing new extraction methodologies that are simple, fast, efficient and cost less is highly desirable. This study aimed to optimize and validate the liquid-liquid extraction with low-temperature partition methodology of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzofuran in water samples. The optimum extraction conditions were 8.0 mL of the acetonitrile and 4.0 mL of the water, homogenized in a vortex for 1 min and then maintained at -20 °C for 1 hour. The analytes recovery percentage was close to 100% and relative standard deviation was less than 7%. The methodology was precise, accurate, linear at 2.4 - 5.4 $\mu\text{g L}^{-1}$, and selective, with a quantification limit of 2.4 $\mu\text{g L}^{-1}$. The optimized methodology was applied in ten real water samples and the results showed that these analytes were not detected.

Keywords: dioxins; furans; extraction methodologies; low-temperature partition.

RESUMO GRÁFICO

Figura 2.1. Resumo gráfico representando a metodologia ELL-PBT seguida pela análise por CLAE-DAD utilizada no presente estudo.



1. INTRODUÇÃO

As dioxinas e furanos policlorados são classificados como poluentes prioritários, devido aos seus efeitos carcinogênicos, mutagênicos e tóxicos (THUAN *et al.*, 2011; SIKITI *et al.*, 2012; SALAMANCA *et al.*, 2016; XIE *et al.*, 2018). Os congêneres com átomos de cloro nas posições 2, 3, 7 e 8 dos anéis aromáticos são considerados os mais tóxicos e podem ser detectados em quase todos os ecossistemas (SIKITI *et al.*, 2012; PUSSENTE *et al.*, 2017).

As dioxinas e furanos policlorados são formados principalmente por processos térmicos envolvendo compostos orgânicos clorados como a queima de lixo urbano e incêndios florestais. Esses compostos também podem ser formados em fábricas de papel e celulose, bem como por indústrias químicas e de defensivos agrícolas (SIKITI *et al.*, 2012; METELKOVA *et al.*, 2019).

As dioxinas e furanos policlorados são substâncias lipofílicas com baixa volatilidade e apresentam tempo de meia-vida de 7 a 10 anos em humanos e 25 a 100 anos no meio ambiente (SADOWSKA *et al.*, 2017). Além disso, eles são resistentes a degradação química e biológica, portanto são persistentes no ambiente (ÁBALOS *et al.*, 2016; SALAMANCA *et al.*, 2016). Apesar da baixa solubilidade na água, as dioxinas e furanos policlorados podem ser encontrados em ambientes aquáticos como a água do mar e peixes (VALLEJO *et al.*, 2015). Assim, a exposição humana a esses compostos pode ocorrer principalmente, através do consumo de água ou alimentos contaminados (SIKITI *et al.*, 2012).

A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (US EPA, sigla do inglês *United States Environmental Protection Agency*) definiu o limite máximo de resíduos (LMR) para dioxinas policloradas em água potável como 0,000000030 mg L⁻¹ (30 pg L⁻¹) (US EPA, 2009). No Brasil, o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) através das Resoluções 357 (CONAMA, 2005) e 430 (CONAMA, 2011) não define o LMR para dioxinas e furanos policlorados em amostras de água.

A extração desses compostos a partir de amostras de água já foi realizada através da extração em fase sólida (EFS) (CHOI *et al.*, 2007; YOUN *et al.*, 2015), microextração em fase sólida (MEFS) (YABUTA *et al.*, 2004; SANCHEZ-PRADO *et al.*, 2006), microextração em fase líquida (MEFL) (SIKITI *et al.*, 2012), extração no ponto nuvem (EPN) (FERNÁNDEZ *et al.*, 1999; SANZ *et al.*, 2002) e extração líquido-líquido (ELL), sendo este último a metodologia de referência (US EPA, 1994).

Recentemente, a extração sólido-líquido com purificação em baixa temperatura (ESL-PBT) foi relatada como uma metodologia simples, rápida e eficiente para extração de dioxinas e furanos policlorados de solo agrícola e lodo de esgoto (ANDRADE *et al.*, 2017). Apesar do

sucesso da ESL-PBT na extração desses compostos de matrizes sólidas, até o momento não há relatos sobre utilização dessa metodologia para análise de dioxinas e furanos policlorados em água.

Em amostras aquosas, essa metodologia é denominada extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (ELL-PBT) (MAIA *et al.*, 2017). Ela consiste em adicionar uma fase orgânica à matriz aquosa e é fundamentada na partição dos analitos entre as duas fases devido ao abaixamento da temperatura para -20 °C. Os componentes não alvos da matriz são congelados com a fase aquosa, enquanto os compostos alvos são extraídos pela fase orgânica que permanece líquida nessa temperatura (SILVÉRIO *et al.*, 2012).

Após as extrações, esses compostos podem ser analisados por cromatografia em fase gasosa de alta resolução acoplada à espectrometria de massas de alta resolução (CGAR-EMAR), que tem sido aplicada como técnica de referência pela US EPA (1994). Porém, outras alternativas têm sido utilizadas, tais como cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) (ANDRADE *et al.*, 2017), cromatografia em fase gasosa com detecção por captura de elétrons (CG-DCE) (SIKITI *et al.*, 2012), cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas com triplo quadrupolo (CG-EM/EM) (ÁBALOS *et al.*, 2016), cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por ultravioleta (CLAE-UV) (SIRIMANNE *et al.*, 1996; SANZ *et al.*, 2002; YANG *et al.*, 2003; REZAEI *et al.*, 2015; NAKISA *et al.*, 2015) e fluorescência (CLAE-DF) (FERNÁNDEZ *et al.*, 1999; FERNÁNDEZ *et al.*, 2001).

Este estudo teve como objetivo otimizar e validar a extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (ELL-PBT) de 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-*p*-dioxina (2,3,7,8-TCDD) e 2,3,7,8-tetraclorodibenzofurano (2,3,7,8-TCDF) em amostras de água e determinar as melhores condições cromatográficas para a análise dos extratos por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos (CLAE-DAD).

2. EXPERIMENTAL

2.1. Reagentes e soluções

Os solventes grau CLAE hexano e metanol (MET) foram adquiridos da Dinâmica (Brasil), acetonitrila (ACN) da J. T. Baker (EUA) e acetato de etila (ACT) da Vetec (Brasil). Todos os solventes foram filtrados em membrana de nylon de poro de 0,2 μm , que foi adquirida

da Supelco (EUA). As soluções padrão de 2,3,7,8-TCDD (50 mg L^{-1}) e 2,3,7,8-TCDF (50 mg L^{-1}) foram adquiridas da Cambridge Isotope Laboratories (EUA) e Sigma-Aldrich (EUA), respectivamente. As soluções estoque dos padrões foram preparadas na concentração de 12 mg L^{-1} e as soluções de trabalho, na concentração de 2 mg L^{-1} . Todas as soluções foram armazenadas a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$. Sulfato de sódio anidro foi adquirido da Vetec (Brasil) com pureza superior a 99%.

2.2. Equipamentos

Os equipamentos utilizados na ELL-PBT foram: Centrífuga da Kindly (Brasil), vórtex da Scilogex (EUA), micropipeta Labmate Pro 20 - $200 \pm 0,1 \mu\text{L}$ da HTL (Polônia), micropipeta Labmate Pro 100 - $1000 \pm 1 \mu\text{L}$ da HTL (Polônia), micropipeta Labmate Pro 1000 - $5000 \pm 5 \mu\text{L}$ da HTL (Polônia), bomba de vácuo da Primatec (Brasil) e balança analítica da Shimadzu (Brasil).

2.3. Análises cromatográficas

As análises cromatográficas foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos - CLAE-DAD (modelo 1290, Agilent Technologies, Alemanha). O volume de injeção foi $20 \mu\text{L}$. As variáveis otimizadas estão apresentadas na Tabela 2.1.

Tabela 2.1. Condições cromatográficas otimizadas

Parâmetros	
Comprimento de onda	200 nm
	227 nm
	232 nm
Coluna cromatográfica	Coluna Kinetex (C18) (100A, 150 mm x 4,60 mm, 5 μ m, Phenomenex) Coluna Poroshell 120 EC-C18 (50 mm x 4,60 mm, 2,7 μ m, Agilent Technologies)
Composição da fase móvel no modo isocrático	Acetonitrila e água ^a
	Metanol e água ^a
Taxa de fluxo	0,5 mL min ⁻¹
	1,0 mL min ⁻¹
Temperatura da coluna	30 °C
	35 °C

^a Proporções: 100:0; 95:05; 90:10; 85:15; 80:20; 75:25 e 70:30.

2.4. ELL-PBT

O parâmetro avaliado para otimizar as condições de extração é apresentado na Tabela 2.2. A análise de variância (ANOVA) foi utilizada para verificar se há diferenças significativas entre as médias das taxas de recuperação para as duas condições avaliadas.

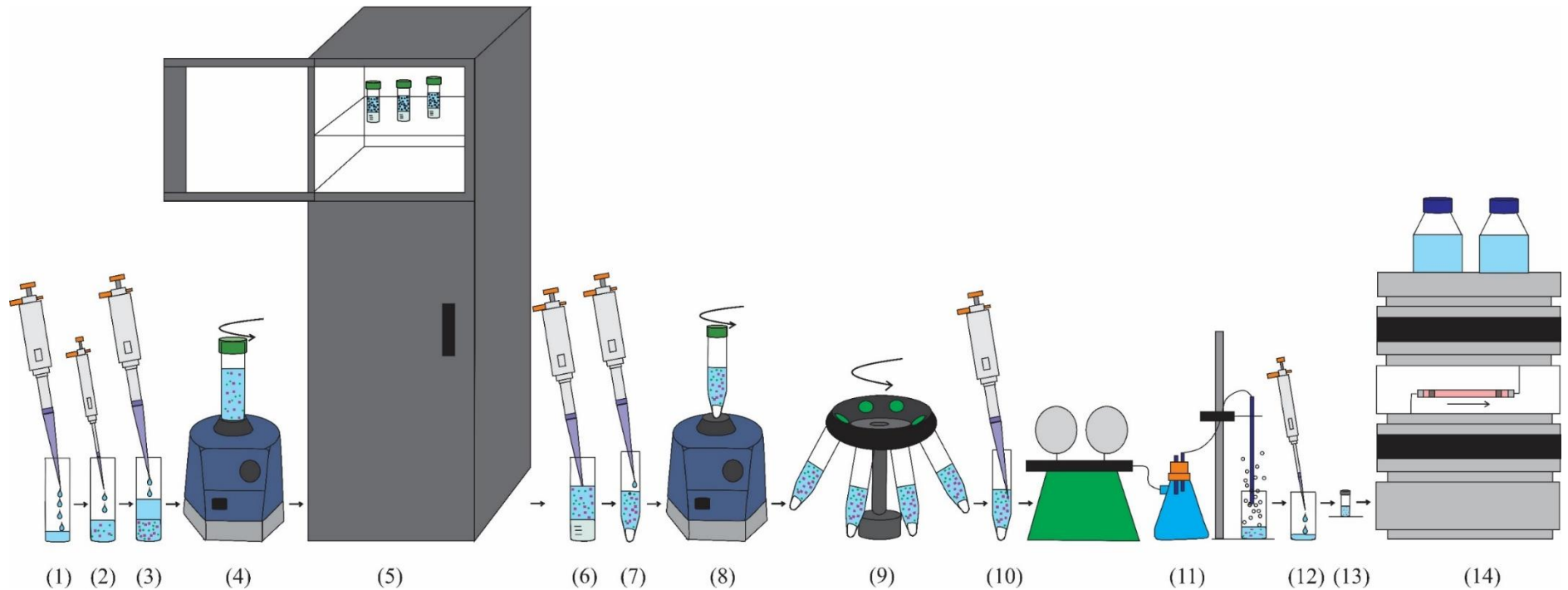
Tabela 2.2. Parâmetro avaliado na ELL-PBT de 2,3,7,8-TCDD e 2,3,7,8-TCDF em amostras de água

Parâmetro	Nível
Mistura extratora	8,0 mL acetonitrila
	6,5 mL acetonitrila/1,5 mL acetato de etila

Na metodologia otimizada, em um frasco de vidro de 22,0 mL foram adicionados 4,0 mL de água Milli-Q e depois fortificou a amostra com 197,0 μ L de soluções padrão contendo 2,3,7,8-TCDD e 2,3,7,8-TCDF em hexano, na concentração de 2 mg L⁻¹. Em seguida, 8,0 mL da mistura extratora foram adicionados à amostra fortificada (Tabela 2.2). O sistema foi homogeneizado em vórtex por 1 min e, então, mantido a -20 °C por 1 h para o completo congelamento da fase aquosa. A fase líquida (orgânica) do sistema bifásico foi transferida para um tubo de polipropileno de 15,0 mL contendo 375 mg de sulfato de sódio anidro. O sistema foi homogeneizado por 1 min em vórtex e centrifugado a 4000 rpm (2950 xg) por 10 min. 5,0

mL do extrato foram transferidos para um frasco de vidro de 5,0 mL, completamente evaporados sob fluxo de ar e ressuspensos em 600 μ L de acetonitrila, antes de armazenar a 4 °C. A quantificação dos analitos alvos foi feita por comparação de áreas cromatográficas, utilizando uma solução padrão com concentração conhecida. As etapas dessa metodologia estão ilustradas na Figura 2.2.

Figura 2.2. Diagrama demonstrando todas as etapas da metodologia ELL-PBT/CLAE-DAD utilizada no presente estudo.



Etapa 1: adicionar 4,0 mL de água ao frasco de vidro de 22 mL; etapa 2: fortificar a amostra com 197,0 μL de soluções padrão contendo 2,3,7,8-TCDD e 2,3,7,8-TCDF em hexano, na concentração de 2 mg L⁻¹; etapa 3: adicionar 8,0 mL de acetonitrila. A acetonitrila é menos densa que a amostra e, portanto, é o sobrenadante; etapa 4: agitar em vórtex por 1 min; etapa 5: manter a -20 °C por 1 h; etapa 6: coletar o sobrenadante com o auxílio de uma pipeta; etapa 7: transferir o sobrenadante para um tubo falcon de 15,0 mL contendo 375 mg de sulfato de sódio anidro; etapa 8: agitar em vórtex por 10 min; etapa 9: centrifugar a 4000 rpm por 10 min; etapa 10: transferir 5,0 mL do extrato para um frasco de vidro de 5,0 mL; etapa 11: evaporar completamente o extrato; etapa 12: ressuspender o extrato em 600,0 μL de acetonitrila; etapa 13: transferir o extrato para um vial; etapa 14: quantificar os analitos alvos por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos.

2.5. Validação da Metodologia

A validação da metodologia foi realizada através da avaliação dos parâmetros analíticos: linearidade, efeito de matriz, seletividade, limite de quantificação (LQ), precisão e exatidão (THOMPSON *et al.*, 2002; DE SOUZA & JUNQUEIRA, 2005; ICH, 2010; US EPA, 2016; ANDRADE *et al.*, 2017; EC, 2017). A linearidade foi avaliada através de curvas analíticas da matriz fortificada em seis níveis de concentração: 2,4; 3,0; 3,6; 4,2; 4,8 e 5,4 $\mu\text{g L}^{-1}$, com três repetições independentes para cada nível. Os parâmetros de regressão linear foram estimados pelo método dos mínimos quadrados ordinários e com base na análise dos resíduos da regressão, com exclusão máxima de 22,2% dos dados (teste de Jackknife). Os resíduos de regressão linear foram avaliados pelos parâmetros de normalidade (teste de Ryan e Joiner), homocedasticidade (teste de Brown e Forsythe) e independência (teste de Durbin e Watson). A análise de variância (ANOVA) foi aplicada às curvas analíticas para verificar as duas premissas do modelo de regressão linear simples, significância da regressão e do desvio da linearidade (DE SOUZA & JUNQUEIRA, 2005).

O efeito da matriz foi avaliado pela injeção dos compostos alvos em solvente (acetonitrila) e no extrato da matriz, ambos contendo os dois contaminantes alvos nas concentrações de 2,4; 3,6 e 4,8 $\mu\text{g L}^{-1}$, e a variação da resposta cromatográfica (VRC) foi calculada de acordo com a Eq. (2.1) (ANDRADE *et al.*, 2017). A análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey foram utilizados para verificar se há diferenças significativas entre as variações das respostas cromatográficas para os níveis avaliados.

$$VRC(\%) = \frac{\bar{A}_{matriz} - \bar{A}_{solvente}}{\bar{A}_{solvente}} \times 100 \quad (2.1)$$

Onde:

\bar{A}_{matriz} : média das áreas cromatográficas obtidas para cada composto no extrato da matriz;

$\bar{A}_{solvente}$: média das áreas cromatográficas obtidas para cada composto no solvente.

A seletividade foi investigada através da comparação dos cromatogramas dos extratos da matriz fortificada e da matriz livre das dioxinas e furanos policlorados, em seis repetições independentes (THOMPSON *et al.*, 2002).

O limite de quantificação (LQ) foi determinado fortificando amostras de água com a menor quantidade possível de 2,3,7,8-TCDD e 2,3,7,8-TCDF que pode ser quantificada utilizando as condições experimentais otimizadas para metodologia ELL-PBT. O LQ foi considerado como dez vezes o sinal do ruído da linha de base das amostras isentas dos compostos de interesse (amostras brancas) (US EPA, 2016).

A exatidão e precisão foram avaliadas através de experimentos de recuperação dos analitos alvos a partir da matriz fortificada, utilizando dois níveis de concentração, 2,4 e 4,8 $\mu\text{g L}^{-1}$, com sete repetições cada. A exatidão foi analisada pela taxa de recuperação dos compostos de interesse, sendo considerado aceitável valores entre 70 e 120%. A precisão foi avaliada pelo desvio padrão relativo (DPR) das replicatas, sendo o critério de aceitabilidade o DPR menor que 20% (EC, 2017).

2.6. Amostras reais

A ELL-PBT otimizada e validada foi aplicada na análise de amostras da solução do pesticida Tordon na concentração de 0,5 mg L^{-1} . As amostras citadas possuem substâncias produzidas a partir de fenóis clorados (ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D)), que podem ter dioxinas e furanos policlorados em sua composição (KAIUOMOVA *et al.*, 2001).

As amostras de água da estação de tratamento de esgoto foram analisadas antes e após o tratamento. Na literatura existem relatos de dioxinas e furanos policlorados em água de esgoto, provenientes principalmente de atividades industriais e, em amostras de água tratada devido à cloração durante o tratamento e exposição à radiação solar após o tratamento (SAPPINGTON *et al.*, 2015; VALLEJO *et al.*, 2015; LU *et al.*, 2016).

As amostras de água de piscina foram analisadas em razão da sua quantidade elevada de cloro e exposição diária ao sol.

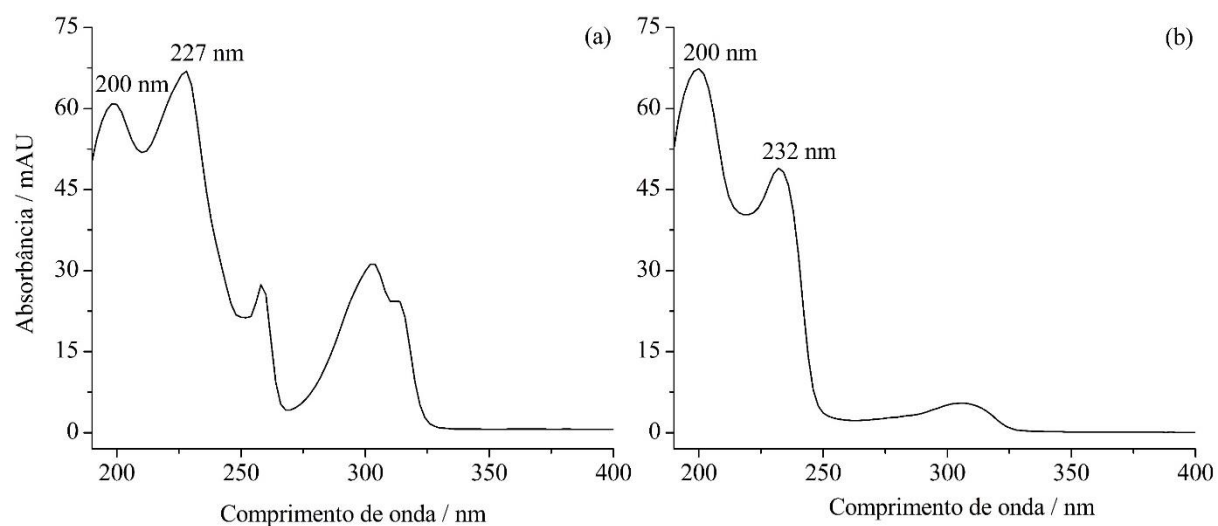
Amostras de água aquecidas em forno de micro-ondas dentro de recipientes plásticos (polipropileno (PP) e polietileno tereftalato (PET)) foram analisadas devido à possibilidade de formação de dioxinas e furanos policlorados na presença de compostos orgânicos, cloro e calor (NESTRICK *et al.*, 1991; METELKOVA *et al.*, 2019). Todas as amostras foram analisadas em triplicata.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Otimização das condições cromatográficas

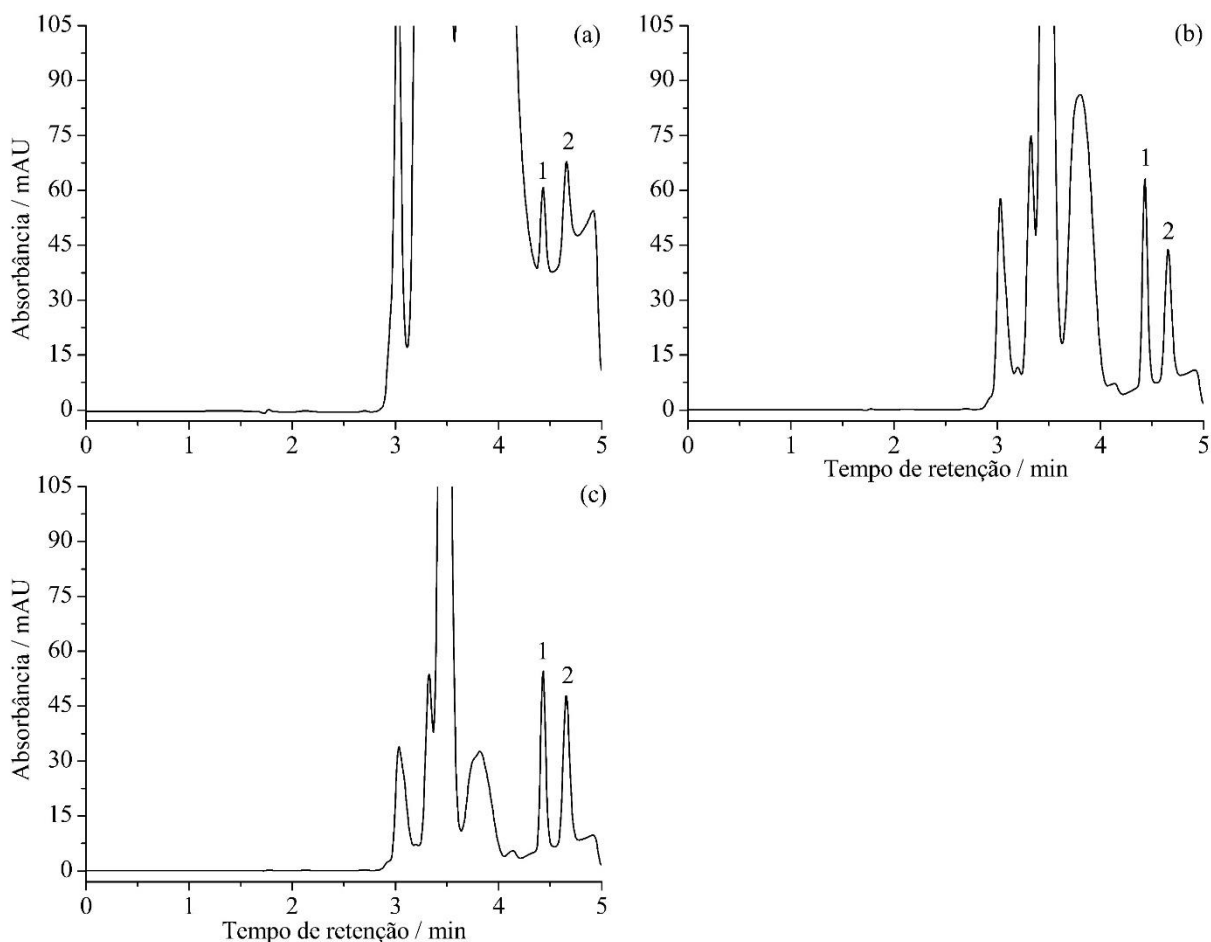
A primeira etapa do estudo consistiu em definir o melhor comprimento de onda para a determinação de cada composto alvo. Os espectros de absorção obtidos no CLAE-DAD são apresentados na Figura 2.3.

Figura 2.3. Representação dos espectros de absorção na região do ultravioleta da solução padrão de 2,3,7,8-TCDF (a) e 2,3,7,8-TCDD (b) em hexano, na concentração de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$.



Os comprimentos de onda de máxima absorbância para 2,3,7,8-TCDF foram 200 e 227 nm e para 2,3,7,8-TCDD foram 200 e 232 nm. Esses comprimentos de onda foram avaliados no CLAE-DAD e os cromatogramas obtidos estão apresentados nas Figuras 2.4 (a) a (c).

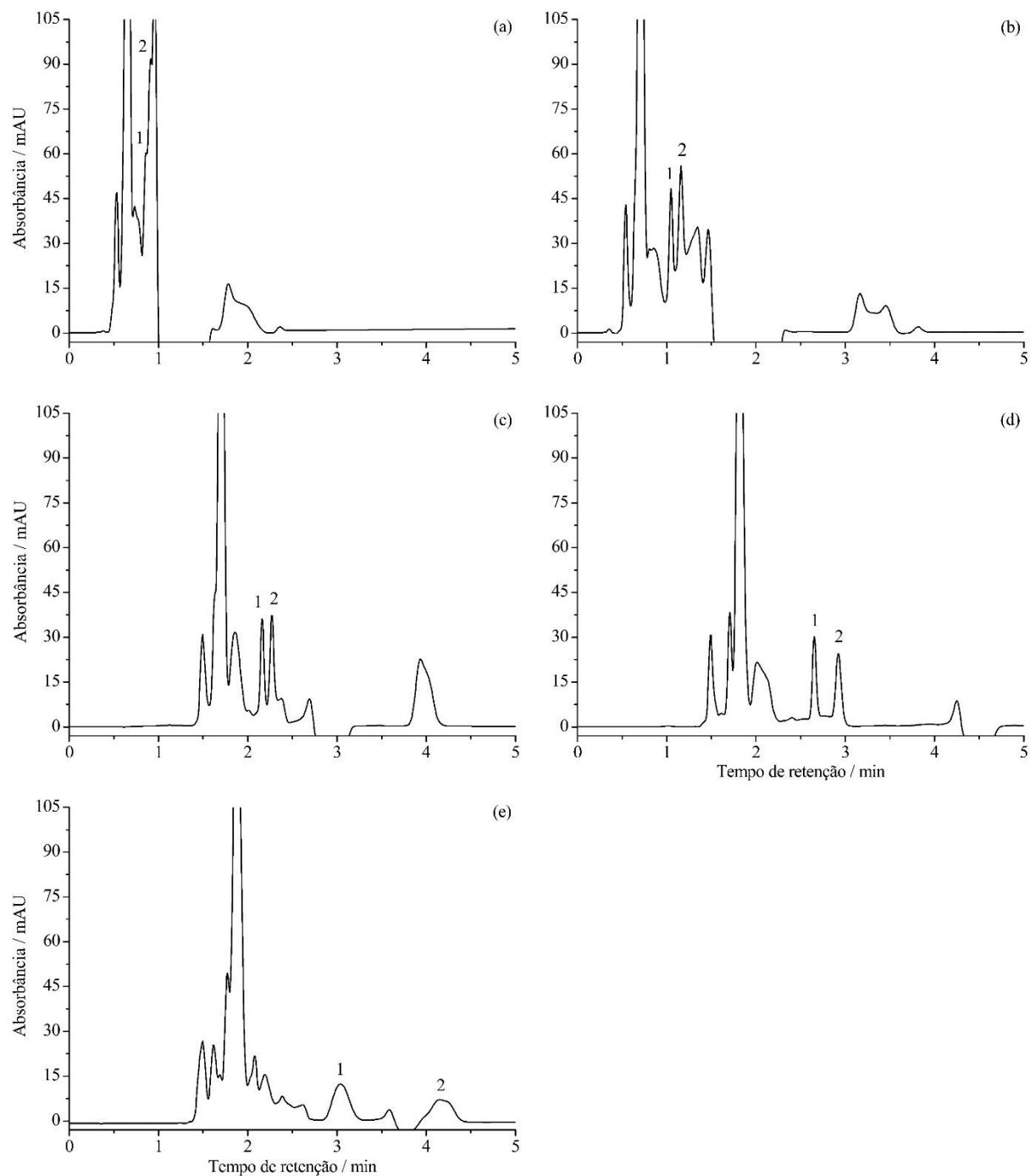
Figura 2.4. Representação dos cromatogramas da solução padrão de 2,3,7,8-TCDF (composto 1) e 2,3,7,8-TCDD (composto 2) em hexano, na concentração de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$. Condições cromatográficas: coluna Kinetex, fase móvel ACN: $\text{H}_2\text{O} = 100: 0$, taxa de fluxo = $0,5 \text{ mL min}^{-1}$, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$ e $\lambda = 200 \text{ nm}$ (a), $\lambda = 227 \text{ nm}$ (b) e $\lambda = 232 \text{ nm}$ (c).



Os resultados mostraram que os sinais dos compostos alvos a 200 nm não foram adequadamente separados, como apresentado na Figura 2.4 (a). Por outro lado, 227 e 232 nm foram seletivos, como pode ser observado na Figura 2.4 (b) e (c). Portanto, esses valores foram selecionados para a detecção simultânea de 2,3,7,8-TCDF e 2,3,7,8-TCDD, respectivamente. Estudos semelhantes empregaram 232 nm para detectar dioxinas policloradas substituídas nas posições: 1,2,6,9; 1,4,7,8; 1,2,3,4; 1,2,4,6,9 e 1,2,3,4,7 (SIRIMANNE *et al.*, 1996).

A segunda etapa deste estudo foi escolher a melhor composição da fase móvel e coluna cromatográfica. Os cromatogramas obtidos em cada coluna são apresentados na Figura 2.5 (a) a (e).

Figura 2.5. Representação dos cromatogramas da solução padrão de 2,3,7,8-TCDF (composto 1) e 2,3,7,8-TCDD (composto 2) em hexano, na concentração de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$. Coluna Poroshell, taxa de fluxo = $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$ e $\lambda = 232 \text{ nm}$: (a) ACN: $\text{H}_2\text{O} = 100:0$ e (b) ACN: $\text{H}_2\text{O} = 95:05$; e coluna Kinetex, taxa de fluxo = $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$ e $\lambda = 232 \text{ nm}$: (c) ACN: $\text{H}_2\text{O} = 100:0$, (d) ACN: $\text{H}_2\text{O} = 95:05$ e (e) MET: $\text{H}_2\text{O} = 95:05$.



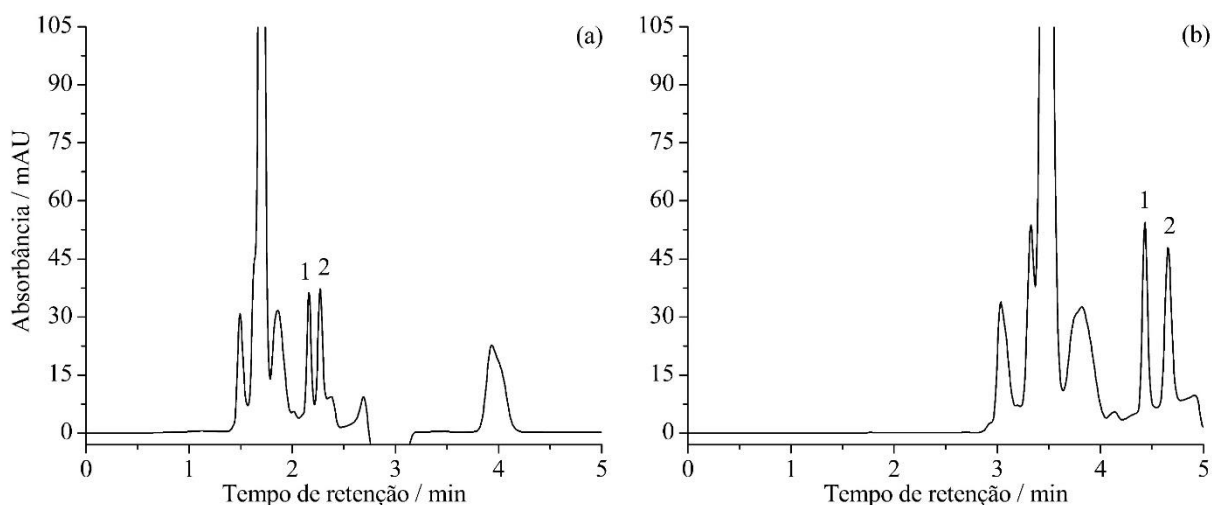
Os cromatogramas obtidos a partir das análises realizadas com a coluna Kinetex, utilizando apenas acetonitrila como fase móvel, apresentaram os picos das dioxinas e furanos

policlorados separados, estreitos e agudos (Figura 2.5 (c)). Posteriormente, os sinais cromatográficos obtidos da coluna Poroshell, utilizando a proporção acetonitrila/água 95:05 como fase móvel, apresentaram resultados semelhantes (Figura 2.5 (b)). No entanto, a coluna Kinetex forneceu um cromatograma com área cromatográfica maior e, por isso, foi escolhida para realização das próximas etapas deste trabalho.

Diferentes trabalhos descrevem a utilização de acetonitrila e água ou metanol e água em diferentes proporções como fase móvel para determinação de dioxinas e furanos policlorados por CLAE (SIRIMANNE *et al.*, 1996; FERNÁNDEZ *et al.*, 1999; FERNÁNDEZ *et al.*, 2001; SANZ *et al.*, 2002; YANG *et al.*, 2003; REZAEI *et al.*, 2015; NAKISA *et al.*, 2015). Contudo, a melhor fase móvel, neste estudo, foi obtida utilizando apenas acetonitrila, como pode ser verificado na Figura 2.5 (c). A adição de outros solventes, tais como água ou metanol, alargou os sinais cromatográficos, reduzindo sua intensidade e elevando o tempo de retenção, como pode ser observado na Figura 2.5 (d) e (e).

A terceira etapa deste trabalho foi escolher a melhor taxa de fluxo para a fase móvel. Os resultados obtidos são apresentados nas Figuras 2.6 (a) e (b).

Figura 2.6. Representação dos cromatogramas da solução padrão de 2,3,7,8-TCDF (composto 1) e 2,3,7,8-TCDD (composto 2) em hexano, na concentração de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$. Coluna Kinetex, fase móvel ACN: $\text{H}_2\text{O} = 100:0$, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$, $\lambda = 232 \text{ nm}$, taxa de fluxo = $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ (a) e $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ (b).

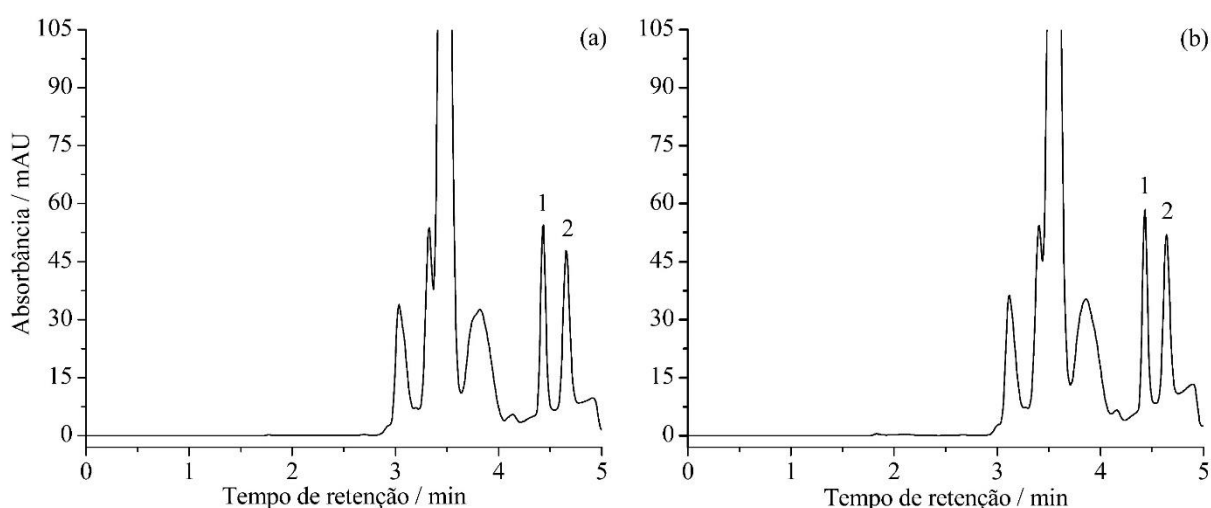


Os cromatogramas mostraram que a melhor taxa de fluxo para a fase móvel foi de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$, pois alcançou sinais mais intensos e maiores áreas cromatográficas para os sinais de dioxinas e furanos policlorados. Similarmente, um estudo para análise de organoclorados (2-

clorofenol e 2,4-diclorofenol) mostrou áreas cromatográficas maiores com a taxa de fluxo de $0,4 \text{ mL min}^{-1}$ (KADMI *et al.*, 2015).

A quarta etapa deste trabalho teve como objetivo avaliar a melhor temperatura (30 e 35 °C) da coluna cromatográfica. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 2.7.

Figura 2.7. Representação dos cromatogramas da solução padrão de 2,3,7,8-TCDF (composto 1) e 2,3,7,8-TCDD (composto 2) em hexano, na concentração de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$. Coluna Kinetex, fase móvel ACN: $\text{H}_2\text{O} = 100: 0$, taxa de fluxo = $0,5 \text{ mL min}^{-1}$, $\lambda = 232 \text{ nm}$, $T = 30 \text{ °C}$ (a) e 35 °C (b).



A intensidade e tempo de retenção dos sinais cromatográficos dos compostos alvos foram muito semelhantes em ambas as temperaturas. Sendo assim, 30 °C foi escolhido porque o cromatograma apresentou linha de base com menos ruídos e está de acordo com outros estudos (NAKISA *et al.*, 2015; REZAEI *et al.*, 2015).

Após otimizar as condições cromatográficas para analisar as dioxinas e furanos policlorados por CLAE-DAD, as condições de extração também foram otimizadas para esses compostos.

3.2. ELL-PBT

As condições iniciais de extração foram baseadas no trabalho de Silvério *et al.* (2012). Em geral, o tempo de congelamento de 30 min foi suficiente para separar as fases, no entanto, a fase aquosa permaneceu parcialmente líquida. Quando a fase aquosa não está completamente congelada, quantidade relevante de água permanece na fase orgânica, reduzindo a taxa de

recuperação e elevando o tempo de evaporação do extrato. Nesse estudo, 1 h foi suficiente para congelar completamente a fase aquosa e alcançar taxas de recuperação próximas a 100%.

Embora água e acetonitrila sejam miscíveis em todas as proporções, a agitação em vórtex por 1 min é um parâmetro importante para aplicação dessa metodologia em amostras reais, considerando que muitas amostras podem ter partículas e o vórtex permite maior eficiência na homogeneização (DE PINHO *et al.*, 2010). Portanto, a etapa de agitação em vórtex por 1 min foi mantida.

A acetonitrila é tradicionalmente utilizada na ELL-PBT como solvente de extração (SILVÉRIO *et al.*, 2012), porém neste estudo foi necessário avaliar a adição de pequenas quantidades de solventes apolares (acetato de etila) na fase orgânica para extração de dioxinas e furanos policlorados, devido ao caráter lipofílico desses compostos. As duas fases de extração alcançaram taxas de recuperação próximas a 100%, conforme apresentado na Figura 2.8. Entretanto, a extração com acetonitrila gerou um cromatograma mais limpo, ou seja, com menos sinais atribuídos aos interferentes (Figura 2.9). Portanto, a acetonitrila foi escolhida como a fase apropriada para extrair esses compostos da água. Resultados semelhantes foram relatados por Andrade *et al.* (2017) e Silvério *et al.* (2012) utilizando a mesma fase de extração.

Figura 2.8. Gráfico representando as taxas de recuperação de 2,3,7,8-TCDF e 2,3,7,8-TCDD em ELL-PBT.

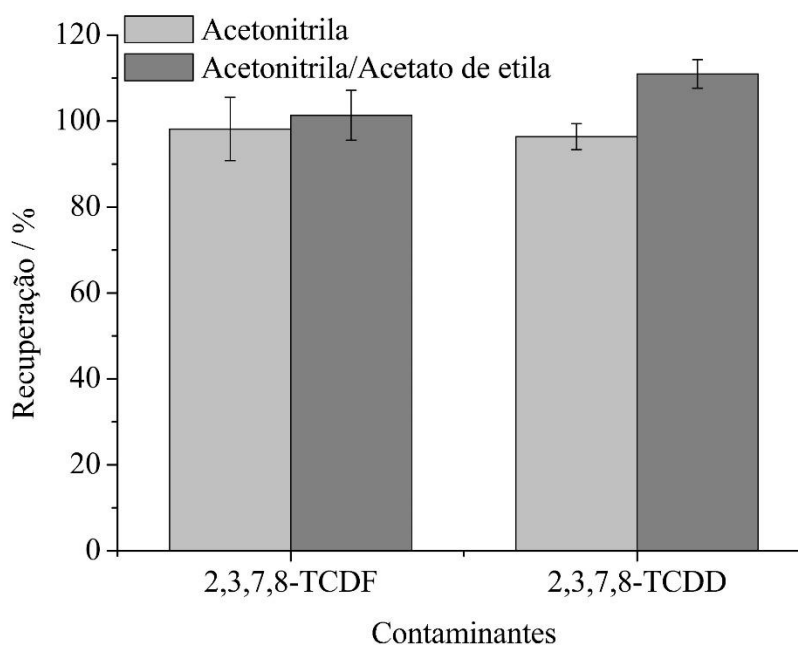
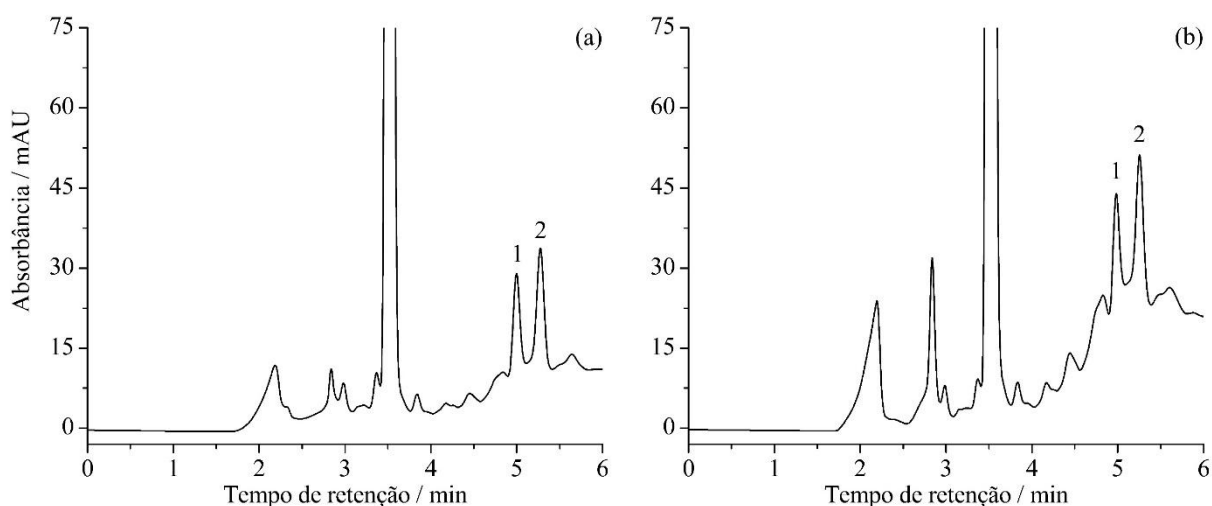


Figura 2.9. Representação dos cromatogramas dos extratos da matriz fortificada com 2,3,7,8-TCDF (composto 1) e 2,3,7,8-TCDD (composto 2) para a metodologia ELL-PBT. (a) ACN e (b) ACN/ACT 6,5/1,5 (v/v).



Estudos prévios mostraram que a relação 8,0/4,0 mL de solvente orgânico/água alcançou as maiores taxas de recuperação de contaminantes químicos (VIEIRA *et al.*, 2007; GOULART *et al.*, 2010; DE PINHO *et al.*, 2014). Similarmente, este estudo obteve taxa de recuperação de aproximadamente 100%.

A metodologia proposta neste estudo adicionou uma etapa de concentração do extrato. Esta etapa atingiu um fator de concentração próximo a 10 vezes e, conseqüentemente, o limite de quantificação atingido foi de $2,4 \mu\text{g L}^{-1}$ (Tabela 2.3).

A etapa de validação foi iniciada após otimização das condições de extração das dioxinas e furanos policlorados a partir da matriz aquosa.

3.3. Validação da Metodologia

Neste trabalho, a ELL–PBT foi validada por seis das principais figuras de mérito: linearidade, efeito de matriz, seletividade, limite de quantificação, precisão e exatidão (THOMPSON *et al.*, 2002). A Tabela 2.3 apresenta os principais resultados do estudo de validação da ELL–PBT de 2,3,7,8-TCDF e 2,3,7,8-TCDD em amostras de água.

Tabela 2.3. Resultados do estudo de validação da ELL–PBT de 2,3,7,8-TCDF e 2,3,7,8-TCDD em amostras de água

Analito alvo	Faixa de linearidade ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Equação da reta	R^2	Recuperação \pm DPR (%)		LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)
				$2,4 \mu\text{g L}^{-1}$ ^a	$4,8 \mu\text{g L}^{-1}$ ^a	
2,3,7,8-TCDF	2,4 – 5,4	$Y = 253482,2 X - 8407,5$	0,9815	$98,1 \pm 4,5$	$107,0 \pm 5,2$	2,4
2,3,7,8-TCDD	2,4 – 5,4	$Y = 200076,2 X + 762527,1$	0,9871	$104,4 \pm 6,6$	$102,1 \pm 3,0$	2,4

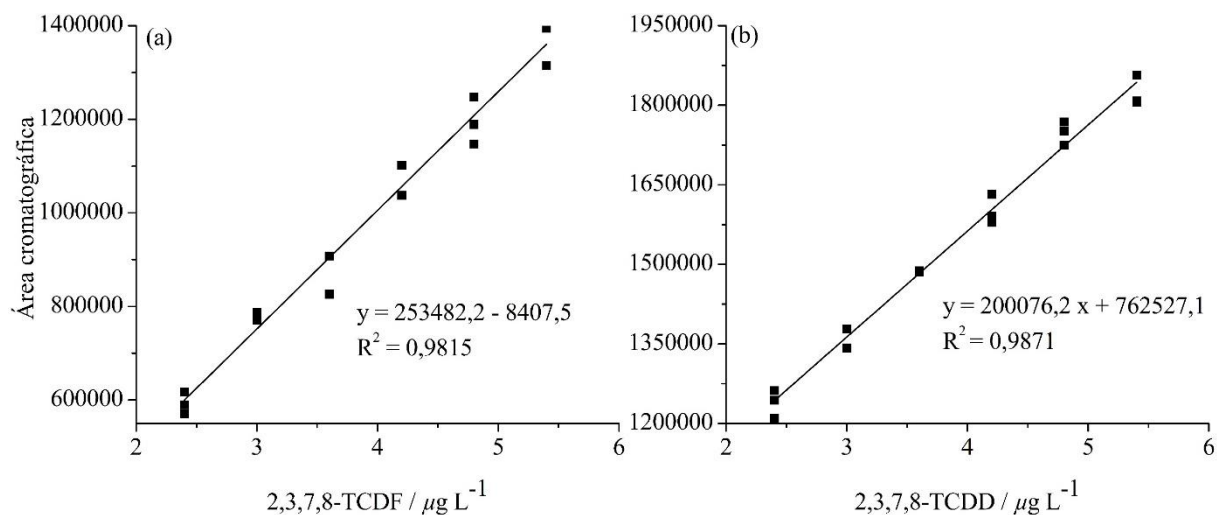
^aMédia das sete replicatas; R^2 : coeficiente de determinação; DPR: desvio padrão relativo; LQ: limite de quantificação.

3.3.1. Linearidade

A linearidade foi analisada através de seis níveis de concentração equidistantes, com três repetições independentes para cada nível, sendo o LQ o primeiro nível da curva, como pode ser observado na Figura 2.10 (a) e (b). Os parâmetros e resíduos da regressão, assim como o coeficiente de determinação (R^2), foram estimados pelo método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO), com exclusão dos valores extremos pelo teste de Jacknife, como apresenta a Figura 2.11 (a) e (b). Para cada exclusão, o MMQO foi aplicado novamente, obtendo assim os valores das estimativas dos coeficientes de inclinação, interseção e determinação apresentados na Tabela 2.3. O valor de R^2 foi superior a 0,98, indicando a variabilidade dos dados coletados explicada pelo modelo de regressão (MONTGOMERY & RUNGER, 2009).

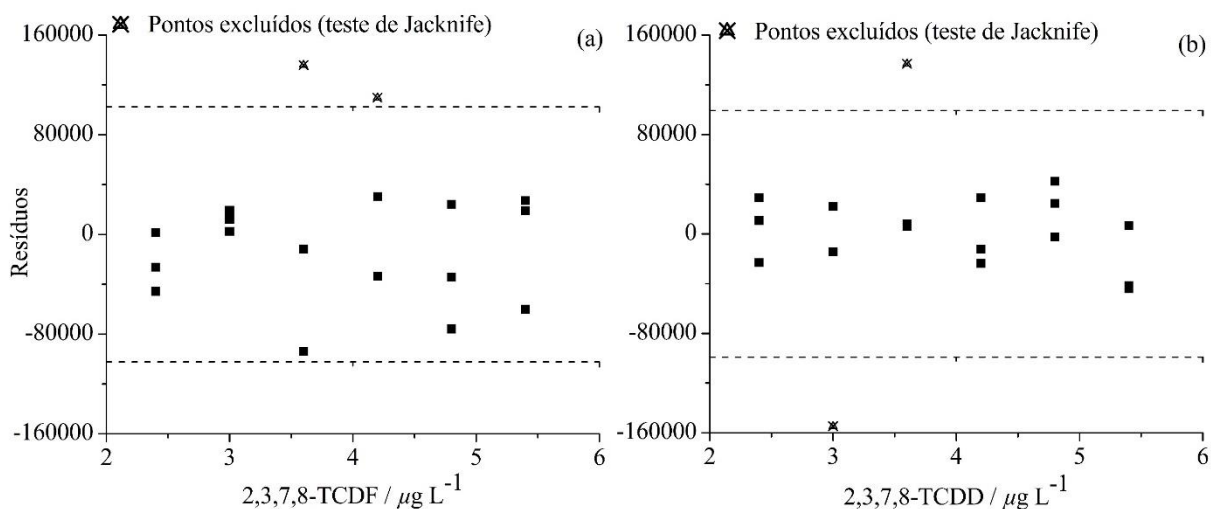
Contudo, foi necessário avaliar o uso do MMQO através das proposições relativas aos resíduos da regressão (normalidade, homocedasticidade e independência) e modelo linear simples (significância da regressão e do desvio da linearidade).

Figura 2.10. Gráficos representando as curvas analíticas para 2,3,7,8-TCDF (a) e 2,3,7,8-TCDD (b).



R^2 : coeficiente de determinação.

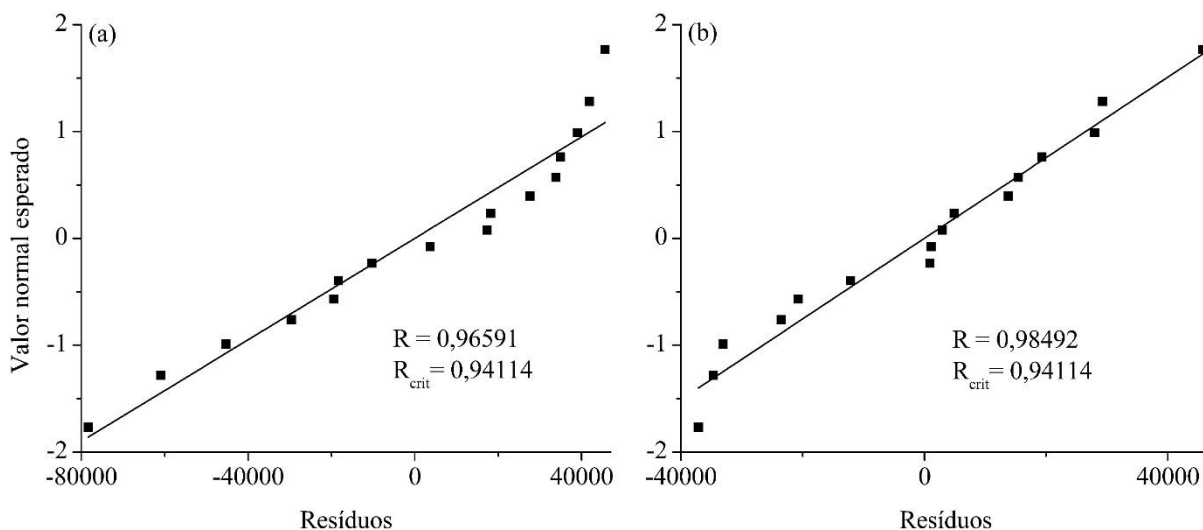
Figura 2.11. Gráficos representando os resíduos da regressão linear para 2,3,7,8-TCDF (a) e 2,3,7,8-TCDD (b), após a exclusão dos valores extremos (teste de Jacknife).



A normalidade dos resíduos da regressão foi avaliada pelo teste Ryan-Joiner, para tanto foi construído um gráfico que mostra a probabilidade normal dos resíduos de regressão (Figura 2.12 (a) e (b)). Os coeficientes de correlação encontrados nos gráficos foram maiores que o coeficiente de correlação crítico (0,94114) obtido pela interpolação polinomial, portanto, pode-

se concluir, com um nível de significância de 0,05, que os resíduos seguiram a distribuição normal.

Figura 2.12. Gráficos representando a probabilidade normal dos resíduos de regressão para 2,3,7,8-TCDF (a) e 2,3,7,8-TCDD (b).

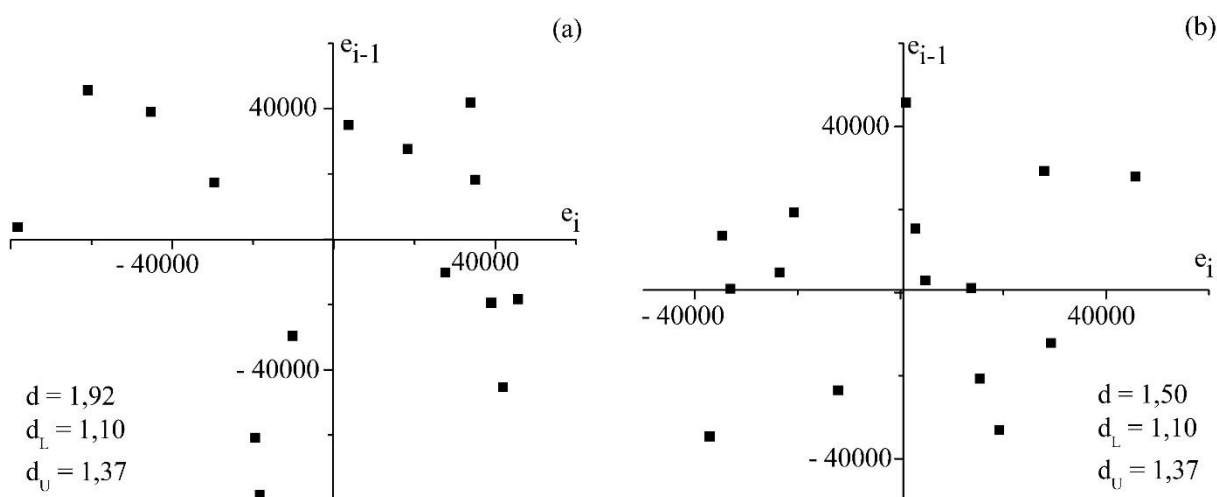


R: coeficiente de correlação do teste de Ryan-Joiner.

A homocedasticidade dos resíduos de regressão foi investigada pelo teste de Levene adaptado por Brown-Forsythe. Esse teste comprovou que não existem diferenças entre as variâncias dos resíduos da regressão, confirmando a homocedasticidade. Além disso, a distribuição dos resíduos ao longo dos níveis de concentração estudados foi homogênea (Figura 2.11 (pg 96)).

A independência dos resíduos de regressão foi analisada pelo teste de Durbin-Watson e não se observou autocorrelação em um nível de significância de 0,05. Uma representação gráfica dos dados foi realizada para confirmar esse resultado e, foi obtida uma distribuição aleatória dos resíduos nos quatro quadrantes, demonstrando sua independência, como pode ser visto na Figura 2.13 (a) e (b).

Figura 2.13. Representação de gráficos de Durbin-Watson para 2,3,7,8-TCDF (a) e 2,3,7,8-TCDD (b).



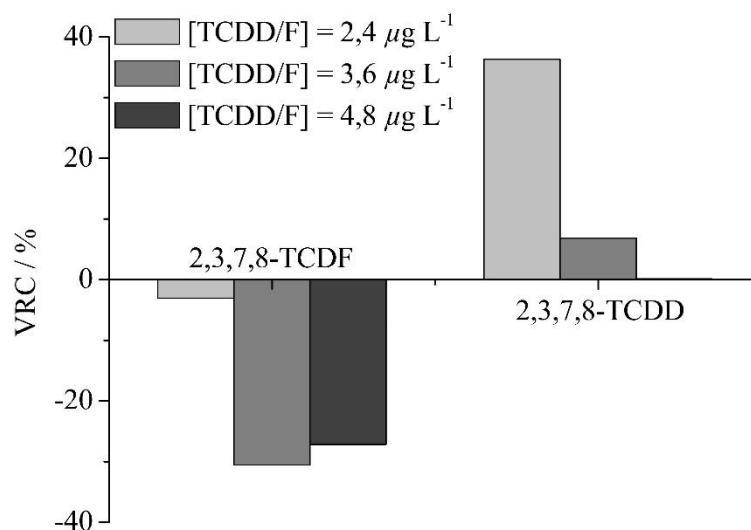
d: estatística de Durbin-Watson, d_L : limite crítico inferior; d_U : limite crítico superior e e_i : resíduo.

Os dados foram ajustados ao modelo linear ao longo do intervalo avaliado de 2,4 a 5,4 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Tabela 2.3 (pg 95)), com regressão significativa e desvio da linearidade não significativo para nível de significância igual a 0,05. Portanto, pode-se afirmar que o MMQO foi adequado para os dados estudados. Todas as avaliações sobre a linearidade seguiram os procedimentos propostos por De Souza & Junqueira (2005) e Bazilio *et al.* (2012).

3.3.2. Efeito de Matriz

O efeito de matriz foi avaliado comparando a resposta cromatográfica dos dois analitos alvos em acetonitrila e em extrato da matriz obtido a partir da ELL-PBT. Os resultados mostraram uma redução da resposta do sinal de 2,3,7,8-TCDF ao CLAE-DAD, portanto, efeito negativo que foi mais pronunciado em concentrações elevadas. Enquanto para o 2,3,7,8-TCDD foi observado um aumento, indicando um efeito positivo que foi maior em concentrações menores. Relatos prévios evidenciaram que o efeito de matriz é muito comum em matrizes complexas como lodo de esgoto e solo (DE PINHO *et al.*, 2009), e menos significativo em matrizes menos complexas como água, frutas e sucos (KADMI *et al.*, 2015). No entanto, o efeito de matriz, neste estudo, foi detectado em matriz aquosa como pode ser observado na Figura 2.14.

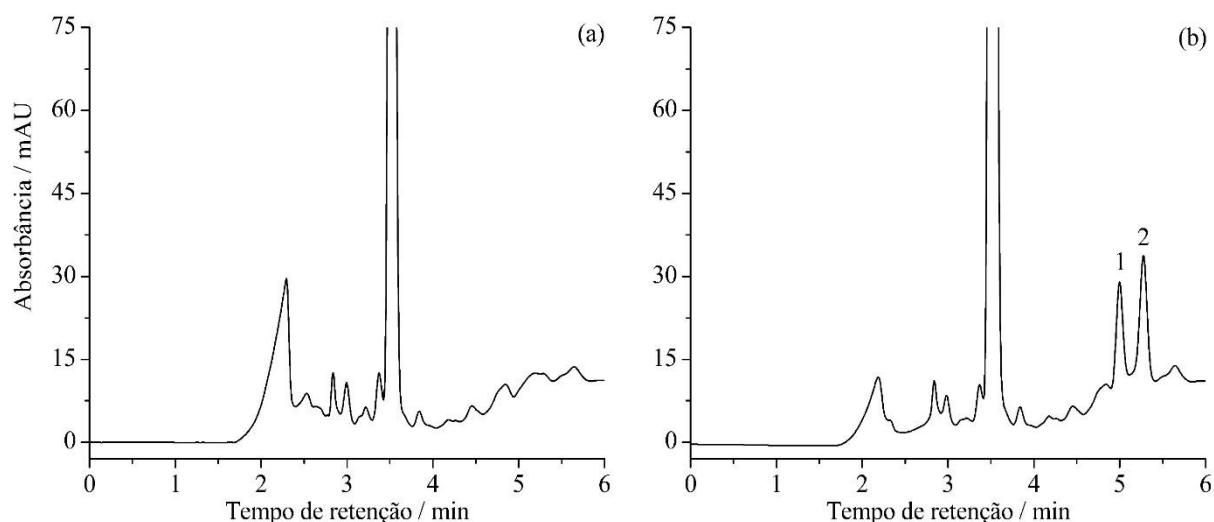
Figura 2.14. Gráfico representando a variação da reposta cromatográfica (VRC) do 2,3,7,8-TCDF e 2,3,7,8-TCDD em acetonitrila e em extrato da matriz.



3.3.3. Seletividade

A ELL-PBT mostrou seletividade para 2,3,7,8-TCDF e 2,3,7,8-TCDD devido à ausência de sinais cromatográficos de interferentes no tempo de retenção dos compostos analisados no extrato da matriz livre dos analitos alvos como pode ser observado na Figura 2.15 (a).

Figura 2.15. Representação dos cromatogramas do extrato da matriz livre dos analitos alvos (a) e do extrato da matriz fortificada com 2,3,7,8-TCDF (composto 1) e 2,3,7,8-TCDD (composto 2) (b) para a metodologia ELL-PBT.



3.3.4. Limite de quantificação

O limite de quantificação é a menor concentração que a metodologia pode operar com precisão aceitável (THOMPSON *et al.*, 2002). Assim, o LQ da metodologia ELL-PBT otimizada neste trabalho para ambos os compostos foi $2,4 \mu\text{g L}^{-1}$ (Tabela 2.3 (pg 95)).

Estudo prévio que utilizou extração no ponto nuvem seguida pela análise por CLAE-DAD não determinou o LQ para 2,3,7,8-TCDD, mas indicou o intervalo de trabalho de 1 a $128 \mu\text{g L}^{-1}$ (SANZ *et al.*, 2002).

A extração líquido-líquido seguida pela análise por CLAE-DAD foi utilizada para analisar 2,3,7,8-TCDF, alcançando LQ de $0,3 \mu\text{g L}^{-1}$, sendo este valor inferior ao encontrado neste estudo (NAKISA *et al.*, 2015). É importante destacar que este trabalho foi o primeiro a analisar simultaneamente 2,3,7,8-TCDF e 2,3,7,8-TCDD empregando ELL-PBT e CLAE-DAD.

3.3.5. Exatidão e precisão

A exatidão e precisão da metodologia foram avaliadas simultaneamente para os níveis de concentração de $2,4$ e $4,8 \mu\text{g L}^{-1}$, com sete repetições cada. As taxas médias de recuperação dos analitos alvos da matriz e desvios padrão relativos (DPR) são apresentadas na Tabela 2.3 (pg 95). A metodologia foi exata e precisa, pois a recuperação dos compostos alvos entre 98,1

a 107% e DPR entre 3,0 e 6,6% estão dentro da faixa recomendada pela Comissão Europeia (EC, sigla do inglês *European Commission*), que estabelece recuperação variando de 70 a 120%, e DPR menor que 20% (EC, 2017).

3.4. Amostras reais

Após a validação da metodologia, a ELL-PBT foi utilizada para analisar diferentes amostras de água. Os resultados mostraram que as dioxinas e furanos policlorados não foram detectados em nenhuma das amostras analisadas. Similarmente, dioxinas não foram encontradas na aplicação da extração no ponto nuvem e CLAE-UV em amostras de água das Ilhas Canárias, na Espanha (SANZ *et al.*, 2002). No entanto, as dioxinas e furanos policlorados foram quantificados em amostras de água coletadas em Shenzhen, China, antes ($32,93 \text{ pg L}^{-1}$) e depois ($0,64 \text{ pg L}^{-1}$) do tratamento, utilizando CGAR-EMAR (LU *et al.*, 2016). A presença de dioxinas e furanos policlorados em amostras reais depende de vários fatores como tipo de matriz, concentração dos analitos alvos e período de coleta da amostra. Portanto, vários dos estudos encontrados na literatura não quantificaram as dioxinas e furanos policlorados em amostras reais (SIRIMANNE *et al.*, 1996; FERNÁNDEZ *et al.*, 1999; SANZ *et al.*, 2002; YANG *et al.*, 2003; SIKITI *et al.*, 2012; ANDRADE *et al.*, 2017).

4. CONCLUSÃO

A ELL-PBT seguida pela análise por CLAE-DAD foi mais rápida, simples e exigiu menos etapas de manipulação de amostras do que outras metodologias descritas na literatura para determinação de 2,3,7,8-TCDD e 2,3,7,8-TCDF em matrizes aquosas. Além disso, essa metodologia foi eficiente, de baixo custo e utilizou pequena quantidade de solvente orgânico. Os extratos foram limpos e etapas de “limpeza” subsequentes não foram necessárias. A validação da metodologia permitiu avaliar as principais figuras de mérito (precisão, exatidão, linearidade, efeito de matriz e seletividade) para certificar a confiabilidade dos resultados. Os níveis de detectabilidade encontrados por essa metodologia são similares a outras metodologias que utilizaram os mesmos sistemas de detecção, principalmente devido ao fator de concentração alcançado.

5. REFERÊNCIAS

ÁBALOS, M. *et al.* Meeting the European Commission performance criteria for the use of triple quadrupole GC-MS/MS as a confirmatory method for PCDD/Fs and dl-PCBs in food and feed samples. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 408, n. 13, p. 3511–3525, may 2016.

ANDRADE, V. F. *et al.* Fast extraction of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxin and polychlorinated dibenzofuran in sewage sludge and soil samples. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 52, n. 4, p. 267–273, apr. 2017.

BAZILIO, F. S.; BOMFIM, M. V. J.; ALMEIDA, R. J.; Abrantes, S. M. P. Uso de planilha eletrônica na verificação da adequação de curva analítica ao modelo linear. **Revista Analytica**, n. 59, p. 60-67, jun. 2012.

CHOI, J. W. *et al.* Semi-automated disk-type solid-phase extraction method for polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans in aqueous samples and its application to natural water. **Journal of Chromatography A**, v. 1157, n. 1–2, p. 17–22, jul. 2007.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE (CONAMA). Resolução N° 357, de 17 de março de 2005. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, Brasil, 2005.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE (CONAMA). Resolução N° 430, de 13 de maio de 2011. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, Brasil, 2011.

DE PINHO, G. P. *et al.* Efeito de matriz na quantificação de agrotóxicos por cromatografia gasosa. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 987–995, apr. 2009.

DE PINHO, G. P. *et al.* Optimization of the liquid–liquid extraction method and low temperature purification (LLE–LTP) for pesticide residue analysis in honey samples by gas chromatography. **Food Control**, v. 21, n. 10, p. 1307–1311, oct. 2010.

DE PINHO, G. P. *et al.* Determination of Chlorobenzenes in Sewage Sludge by Solid-Liquid Extraction with Purification at Low Temperature and Gas Chromatography Mass Spectrometry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 25, n. 7, p. 1292-1301, 2014.

DE SOUZA, S. V. C.; JUNQUEIRA, R. G. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. **Analytica Chimica Acta**, v. 552, n. 1–2, p. 25–35, nov. 2005.

EUROPEAN COMMISSION (EC). **Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed**. SANTE/11813, 2017.

FERNÁNDEZ, A. E.; FERRERA, Z. S.; RODRÍGUEZ, J. J. S. Application of cloud-point methodology to the determination of polychlorinated dibenzofurans in sea water by high-performance liquid chromatography. **Analyst**, v. 124, n. 4, p. 487–491, jan. 1999.

FERNÁNDEZ, A. E.; FERRERA, Z. S.; RODRÍGUEZ, J. J. S. Microwave-assisted extraction of organochlorine compounds in marine sediments with organized molecular systems. **Chromatographia**, v. 53, n. 7, p. 375–379, apr. 2001.

GOULART, S. M. *et al.* Optimization and validation of liquid–liquid extraction with low temperature partitioning for determination of carbamates in water. **Analytica Chimica Acta**, v. 671, n. 1, p. 41–47, jun. 2010.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE (ICH). **Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1)**. Geneva, Suíça, 2010.

KADMI, Y. *et al.* Controlling contamination for determination of ultra-trace levels of priority pollutants chlorophenols in environmental water matrices. **Arabian Journal of Chemistry**, jun. 2015.

KAIUMOVA, D. *et al.* Toxic effects of the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on lymphoid organs of the rat. **Chemosphere**, v. 43, n. 4–7, p. 801–805, jun. 2001.

LU, F. *et al.* Levels and profiles of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxin and dibenzofurans in raw and treated water from water treatment plants in Shenzhen, China. **Environmental Pollution**, v. 211, p. 233–240, apr. 2016.

MAIA, M. R. *et al.* Solid-liquid extraction with low temperature purification coupled with gas chromatography and mass spectrometry for determination of polychlorinated biphenyls in sewage sludge. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, n. 1, p. 179–186, 2017.

METELKOVA, L. *et al.* Occurrence of PCDD/PCDFs, dioxin-like PCBs, and PBDEs in surface sediments from the Neva River and the Eastern Gulf of Finland (Russia). **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 8, p. 7375–7389, mar. 2019.

MONTGOMERY, D. C.; RUNGER, G. C. **Estatística Aplicada e Probabilidade para Engenheiros**. 5. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2009.

NAKISA, A. *et al.* Determination of the most toxic polychlorodibenzofurans in fresh milk from Southwest Iran. **Food and Nutrition Sciences**, v. 06, p. 955, 2015.

NESTRICK, T. J.; LAMPARSKI, L. L.; CRAMM, R. H. Procedure and initial results for the determination of low part per quadrillion levels of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzofuran in polyethylene. **Chemosphere**, v. 22, p. 215–228, jan. 1991.

PUSSENTE, I. *et al.* PCDD/Fs and PCBs in soils: a study of case in the city of Belo Horizonte-MG. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, n. 5, p. 858-867, 2017.

REZAEI, M. *et al.* Determination of polychlorinated dibenzo dioxin levels in fresh milk from the dairy factories of Southwest Iran. **Journal of Environmental & Analytical Toxicology**, v. 5, n. 5, p. 1–5, jun. 2015.

SADOWSKA, A. *et al.* Transcriptional profiling of porcine granulosa cells exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. **Chemosphere**, v. 178, p. 368–377, jul. 2017.

SALAMANCA, M.; CHANDÍA, C.; HERNÁNDEZ, A. Impact of forest fires on the concentrations of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxin and dibenzofurans in coastal waters of central Chile. **Science of The Total Environment**, v. 573, p. 1397–1405, dec. 2016.

SANCHEZ-PRADO, L. *et al.* Monitoring the photochemical degradation of triclosan in wastewater by UV light and sunlight using solid-phase microextraction. **Chemosphere**, v. 65, n. 8, p. 1338–1347, nov. 2006.

SANZ, C. P.; FERREIRA, Z. S.; RODRÍGUEZ, J. J. S. Extraction and preconcentration of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins using the cloud-point methodology: Application to their determination in water samples by high-performance liquid chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v. 470, n. 2, p. 205–214, oct. 2002.

SAPPINGTON, E. N.; BALASUBRAMANI, A.; RIFAI, H. S. Polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and polychlorinated dibenzofurans (PCDD/Fs) in municipal and industrial effluents. **Chemosphere**, v. 133, p. 82–89, aug. 2015.

SIKITI, P. *et al.* Simultaneous determination of tetrachloro dibenzo-*p*-dioxin and poly-aromatic chlorinated biphenyls in aqueous environment using liquid phase microextraction. **Physics and Chemistry of the Earth**, v. 50–52, p. 98–103, jan. 2012.

SILVÉRIO, F. O. *et al.* Análise de agrotóxicos em água usando extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura por cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, v. 35, n. 10, p. 2052–2056, 2012.

SIRIMANNE, S. R. *et al.* Quantification of polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins in human serum by combined micelle-mediated extraction (cloud-point extraction) and HPLC. **Analytical Chemistry**, v. 68, p. 1556–1560, may 1996.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, n. 5, p. 835–855, jan. 2002.

THUAN, N. T. *et al.* Analysis of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and furans in various aqueous samples in Taiwan. **Chemosphere**, v. 83, n. 6, p. 760–766, apr. 2011.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (US EPA). **Method 1613: tetra-through octa-chlorinated dioxins and furans by isotope dilution HRGC/HRMS**. Engineering and Analysis Division (4303), Washington D.C., USA, 1994.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (US EPA). **National primary drinking water regulations**. May 2009. Disponível em: <https://www.epa.gov/ground-water-and-drinking-water>. Acesso em: junho 2018.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (US EPA). **Definition and procedure for the determination of the method detection limit, revision 2**. Washington D.C., USA, 2016.

VALLEJO, M. *et al.* Overview of the PCDD/Fs degradation potential and formation risk in the application of advanced oxidation processes (AOPs) to wastewater treatment. **Chemosphere**, v. 118, p. 44–56, jan. 2015.

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

XIE, H. Q. *et al.* 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin induces alterations in myogenic differentiation of C2C12 cells. **Environmental Pollution**, v. 235, p. 965–973, apr. 2018.

YABUTA, H. *et al.* Solid-phase microextraction for the evaluation of partition coefficients of a chlorinated dioxin and hexachlorobenzene into humic substances. **Analytical Sciences**, v. 20, n. 5, p. 787–791, may 2004.

YANG, J. S.; LEE, D. W.; LIM, H. Microwave-Assisted Extraction (MAE) of Polychlorinated Biphenyls and Polychlorinated Dibenzo-*p*-Dioxins from Fly Ash and Sea Sediments: Effect of Water and Removal of Interferences. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 26, n. 5, p. 803–818, apr. 2003.

YOUN, Y. Y. *et al.* High-throughput method of dioxin analysis in aqueous samples using consecutive solid phase extraction steps with the new C18 Ultraflow™ pressurized liquid extraction and automated clean-up. **Chemosphere**, v. 118, p. 124–129, jan. 2015.

**CAPÍTULO 3. ESTUDO COMPARATIVO DE QUATRO METODOLOGIAS DE
EXTRAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE 2,3,7,8-TCDD E
2,3,7,8-TCDF EM AMOSTRAS DE ÁGUA**

RESUMO

Dioxinas e furanos policlorados estão entre os poluentes mais tóxicos que existem e podem ser detectados em diferentes matrizes ambientais como ar, água e solo. Portanto, o monitoramento desses compostos no ambiente é necessário para assegurar a saúde das pessoas. Este trabalho teve como objetivo comparar quatro metodologias de extração para determinação de 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-*p*-dioxina e 2,3,7,8-tetraclorodibenzofurano em amostras aquosas. As quatro metodologias foram comparadas através do tempo de preparo de amostra, volume de solvente orgânico, seletividade, taxa de recuperação, desvio padrão relativo, limite de quantificação e linearidade. As taxas de recuperação variaram de 93,5 - 105,5% e os desvios padrões relativos foram inferiores a 10,8%. As metodologias foram precisas, exatas, lineares e seletivas, com limite de quantificação de 5,3 $\mu\text{g L}^{-1}$ para MELLD, 4,8 $\mu\text{g L}^{-1}$ para QuEChERS e 2,4 $\mu\text{g L}^{-1}$ para ELL-PBT. Entretanto, microextração líquido-líquido dispersiva apresentou menor consumo de solventes orgânicos (1,05 mL) e menor tempo de preparo de amostra (10 min). Portanto, foi sugerida como a metodologia mais adequada para preparação de amostras aquosas para determinação de 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-*p*-dioxina e 2,3,7,8-tetraclorodibenzofurano. É importante ressaltar que a utilização da microextração líquido-líquido dispersiva para determinar esses compostos é inédita.

Palavras-chave: dioxinas; furanos; microextração líquido-líquido dispersiva; QuEChERS; partição em baixa temperatura; extração líquido-líquido.

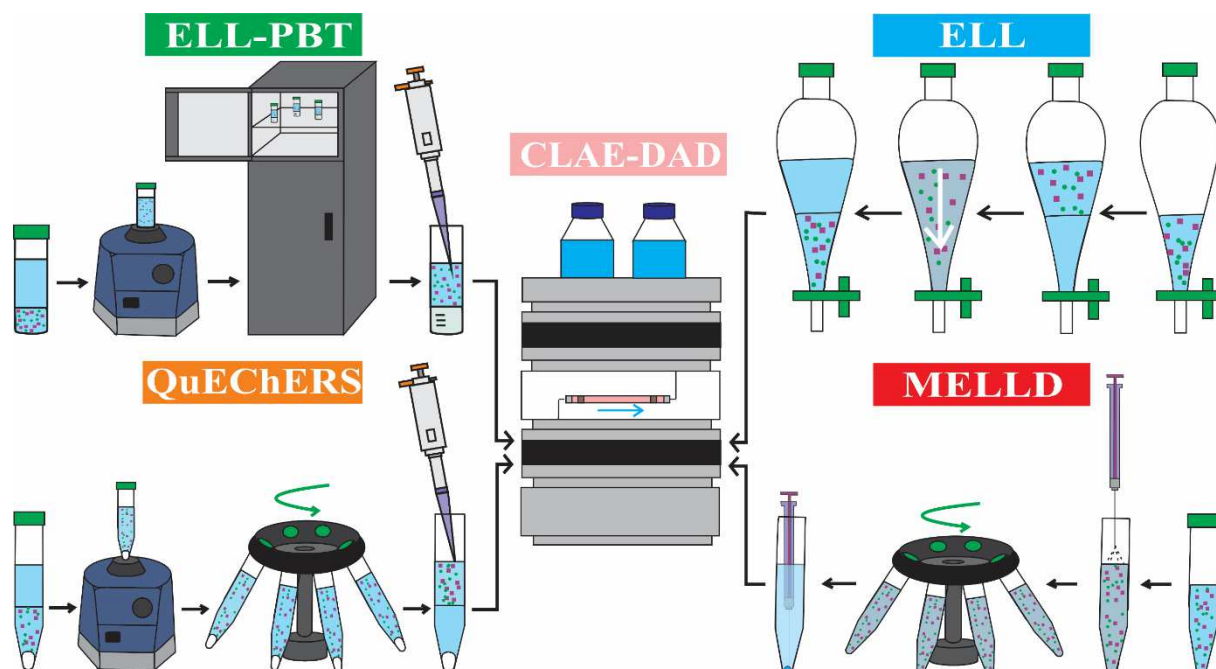
ABSTRACT

Polychlorinated dioxins and furans are among the most toxic pollutants and can be detected in different environmental matrices such as air, water and soil. Therefore, the monitoring of these compounds in the environment is necessary to ensure the health of the people. This work aimed to compare four extraction methodologies for determination of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzofuran in aqueous samples. The four methodologies were compared through sample preparation time, organic solvent volume, selectivity, recovery, relative standard deviation, limit of quantification and linearity. Recovery rates ranged from 93.5 - 105.5% and relative standard deviations were less than 10.8%. The methodologies were precise, accurate, linear and selective, with limit of quantification of 5.3 $\mu\text{g L}^{-1}$ for MELLD, 4.8 $\mu\text{g L}^{-1}$ for QuEChERS and 2.4 $\mu\text{g L}^{-1}$ for ELL-PBT. However, dispersive liquid-liquid microextraction showed lower consumption of organic solvents (1.05 mL) and shorter sample preparation time (10 min). Therefore, it was suggested as the most appropriate methodology for preparing aqueous samples for determination of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzofuran. It is important to note that the use of dispersive liquid-liquid microextraction for determination these compounds is unpublished.

Keywords: dioxins, furans, QuEChERS, dispersive liquid-liquid microextraction, low-temperature partition, liquid-liquid extraction.

RESUMO GRÁFICO

Figura 3.1. Resumo gráfico representando as metodologias MELLD, QuEChERS, ELL-PBT e ELL seguidas pela análise por CLAE-DAD utilizadas no presente estudo.



1. INTRODUÇÃO

As dioxinas e furanos policlorados são poluentes orgânicos persistentes amplamente distribuídos no meio ambiente (NUNES *et al.*, 2018; LU *et al.*, 2019). Dadas as suas características lipofílicas e estabilidade química, estes compostos tendem a bioacumular nas cadeias alimentares (BRAUNE & MALLORY, 2017; VERBRUGGE *et al.*, 2018; HANANO *et al.*, 2019), causando diversos efeitos tóxicos em animais e humanos (METELKOVA *et al.*, 2019; AIDA-YASUOKA *et al.*, 2019). Desta forma, é de vital importância o desenvolvimento de novas metodologias analíticas que forneçam dados sobre a distribuição e fontes potenciais desses compostos.

A detecção de dioxinas e furanos policlorados em amostras aquosas é mais complexa do que em outras matrizes devido ao limite máximo de resíduos desses compostos em água ser extremamente baixo (30 pg L^{-1}) (US EPA, 2009). Por esta razão, os dados sobre a concentração e distribuição deles em água são mais escassos, enquanto o número de estudos sobre dioxinas e furanos policlorados em matrizes como solos, sedimentos e alimentos é muito superior (LU *et al.*, 2016; MCCULLOCH *et al.*, 2017).

A metodologia de referência para extração de dioxinas e furanos policlorados a partir de amostras aquosas é a extração líquido-líquido (ELL) (US EPA, 1994). As principais vantagens da ELL incluem simplicidade e aplicabilidade a muitos tipos de amostras líquidas. No entanto, essa metodologia tem desvantagens como tempos de preparo de amostra longos ($> 1 \text{ h}$ por repetição) (WU *et al.*, 2009; ROBLES-MOLINA *et al.*, 2013) e elevado consumo de amostra (1 L por repetição) e solvente orgânico (240,0 mL de diclorometano por repetição) (US EPA, 1994).

Desta forma, a microextração líquido-líquido dispersiva (MELLD), QuEChERS (sigla do inglês *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged e Safe*) e extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (ELL-PBT) surgem como propostas promissoras para extração de dioxinas e furanos policlorados em matrizes aquosas (REZAEI *et al.*, 2010; FERREIRA *et al.*, 2016; MESQUITA *et al.*, 2018).

As principais vantagens dessas metodologias incluem número reduzido de etapas, no máximo duas e taxas de recuperação elevadas, geralmente próximas a 100%. Além disso, a MELLD, QuEChERS e ELL-PBT utilizam menos solventes e geram menos resíduos que a ELL (REZAEI *et al.*, 2010; FERREIRA *et al.*, 2016; MESQUITA *et al.*, 2017). Devido estas vantagens, todas essas metodologias já foram utilizadas para recuperar diferentes contaminantes ambientais em matrizes aquosas (REZAEI *et al.*, 2006; VIEIRA *et al.*, 2007;

DELLA-FLORA *et al.*, 2018; HU *et al.*, 2018; KAIUM *et al.*, 2018; MESQUITA *et al.*, 2018). Contudo, apenas a ELL-PBT foi aplicada para dioxinas e furanos policlorados em amostras de água (SICUPIRA *et al.*, 2019).

Este trabalho teve como objetivo comparar as metodologias MELLD, QuEChERS e ELL-PBT e ELL para determinação simultânea de 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-*p*-dioxina e 2,3,7,8-tetraclorodibenzofurano em amostras de água. Para isso, foi necessário otimizar e validar as metodologias MELLD e QuEChERS para determinação desses analitos em matrizes aquosas.

2. EXPERIMENTAL

2.1. Reagentes e soluções

Os solventes grau CLAE hexano, diclorometano e tetracloreto de carbono foram adquiridos da Dinâmica (Brasil), acetonitrila da J.T. Baker (EUA) e acetato de etila da Vetec (Brasil). Todos os solventes foram filtrados em membrana de nylon com poros de 0,2 μm , que foi adquirida da Supelco (EUA). As soluções padrão de 2,3,7,8-TCDD (50 mg L⁻¹) e 2,3,7,8-TCDF (50 mg L⁻¹) foram adquiridas da Cambridge Isotope Laboratories (EUA) e da Sigma-Aldrich (EUA), respectivamente. As soluções estoque dos padrões foram preparadas na concentração de 12 mg L⁻¹ e as soluções de trabalho foram preparadas na concentração de 2 mg L⁻¹. Todas as soluções foram armazenadas a -20 °C. Sulfato de sódio anidro e cloreto de sódio foram adquiridos da Vetec (Brasil) com pureza superior a 99% e sulfato de magnésio heptaidratado da Synth (Brasil) com pureza entre 98 e 102%.

2.2. Equipamentos

Os equipamentos utilizados nas metodologias de extração foram: centrífuga Excelsa Baby da Fanem (Brasil), balança analítica da Shimadzu (Brasil), seringa Gastight da Hamilton (EUA), micropipeta Labmate Pro 5 - 50 \pm 0,1 μL da HTL (Polônia), micropipeta Labmate Pro 20 - 200 \pm 0,1 μL da HTL (Polônia), micropipeta Labmate Pro 100 - 1000 \pm 1 μL da HTL (Polônia), micropipeta Labmate Pro 1000 - 5000 \pm 5 μL da HTL (Polônia), bomba de vácuo da Primatec (Brasil) e vórtex da Scilogex (EUA).

2.3. Análises cromatográficas

As análises cromatográficas foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos – CLAE-DAD (modelo 1290, Agilent Technologies, Alemanha). A coluna Kinetex C18 (100A, 150 mm x 4,60 mm, 5 μm , Phenomenex) foi utilizada para separar os analitos alvos. A temperatura da coluna foi mantida a 30 °C. A composição da fase móvel foi 100% de acetonitrila no modo isocrático, com vazão de 0,5 mL min^{-1} . O volume de injeção foi de 20,0 μL . A detecção de 2,3,7,8-TCDF e 2,3,7,8-TCDD foi realizada em $\lambda = 227 \text{ nm}$ e $\lambda = 232 \text{ nm}$, respectivamente. A quantificação dos analitos alvos foi realizada por comparação de áreas cromatográficas, utilizando solução padrão com concentração conhecida (SICUPIRA *et al.*, 2019).

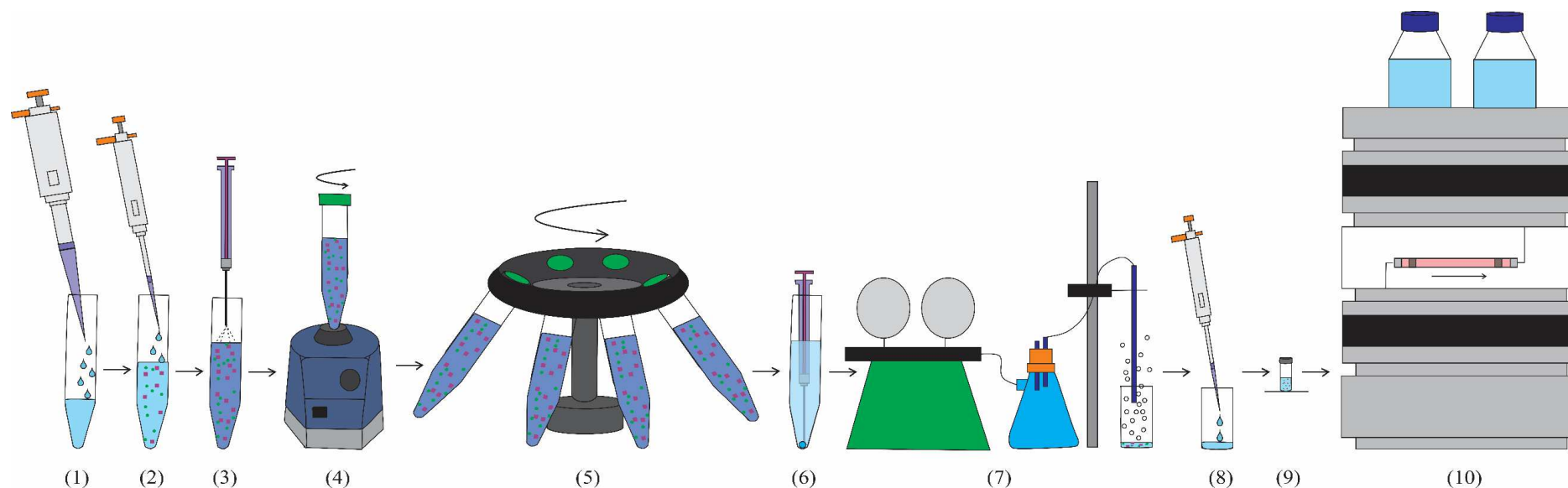
2.4. MELLD

Uma mistura de 1,0 mL de acetonitrila (solvente dispersor) contendo 50,0 μL de tetracloreto de carbono (solvente de extração) foi transferida rapidamente em 5,0 mL de amostra de água Milli-Q fortificada com 267,0 μL de solução padrão contendo 2,3,7,8-TCDD e 2,3,7,8-TCDF em acetonitrila, na concentração de 2 mg L^{-1} . Nessa etapa, uma seringa Gastight da Hamilton (EUA) de 5,0 mL foi utilizada para transferir a mistura. Em seguida, o sistema foi homogeneizado em vórtex por 1 min e centrifugado a 3500 rpm (1901 x g) por 5 min. 15,0 μL do extrato (fase sedimentada) foram transferidos para um frasco de vidro de 5,0 mL, completamente evaporados sob fluxo de ar, ressuspendidos em 400,0 μL de acetonitrila, transferidos para um *vial* e analisados por CLAE-DAD.

A metodologia descrita acima foi otimizada em duas etapas. A primeira consistiu em definir a composição da mistura formada pelo solvente dispersor e de extração. Para tanto, o volume do solvente dispersor foi fixado em 1,0 mL e foram avaliados oito volumes para o solvente de extração (10,0; 20,0; 40,0; 50,0; 60,0; 80,0; 100,0 e 120,0 μL) e dois solventes dispersores, acetona e acetonitrila. Já a segunda etapa consistiu em avaliar dois modos de agitação: vórtex por 1 min e agitação manual. A análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey foram utilizados para verificar se há diferenças significativas entre as condições otimizadas.

As etapas dessa metodologia estão ilustradas na Figura 3.2.

Figura 3.2. Diagrama demonstrando todas as etapas da metodologia MELLD/CLAE-DAD utilizada no presente estudo.



Etapa 1: adicionar 5,0 mL da amostra (água) ao tubo falcon de 15,0 mL; etapa 2: fortificar a amostra com os analitos alvos; etapa 3: transferir 1,0 mL de acetoneitrila (solvente dispersor) contendo 50,0 μL de tetracloreto de carbono (solvente de extração) com o auxílio de uma seringa Gastight da Hamilton de 5,0 mL. O tetracloreto de carbono é mais denso que a amostra e, por isso, depositará na parte inferior do tubo; etapa 4: agitar em vórtex por 1 min; etapa 5: centrifugar a 3500 rpm por 5 min; etapa 6: transferir 15 μL da fase sedimentada para um frasco de vidro de 5,0 mL; etapa 7: evaporar completamente o extrato; etapa 8: ressuspender o extrato em 400,0 μL de acetoneitrila; etapa 9: transferir o extrato para um *vial*; etapa 10: quantificar os compostos alvos por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos.

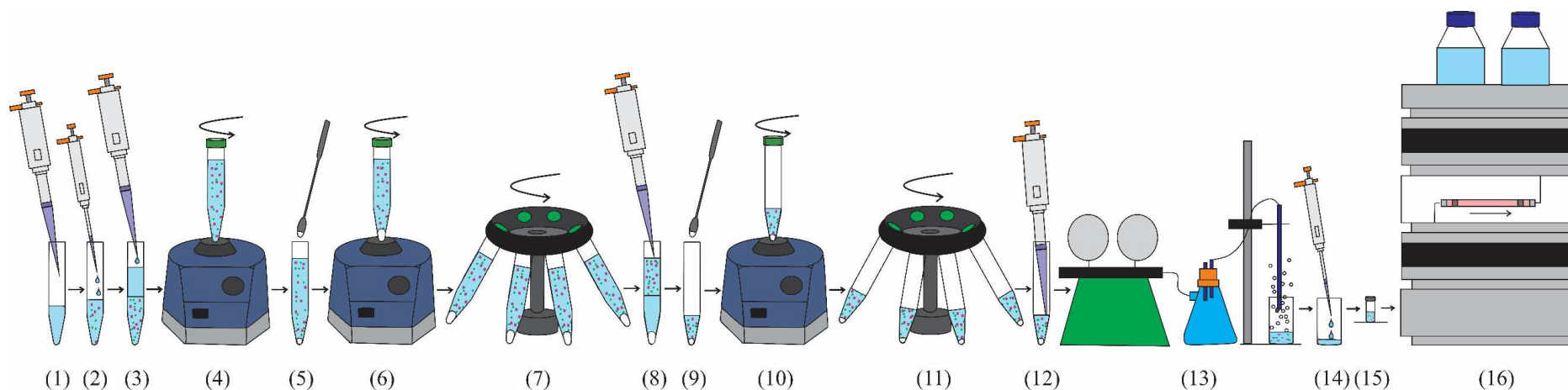
2.5. QuEChERS

Uma amostra de 4,0 mL de água Milli-Q foi transferida para um tubo de polipropileno de 15,0 mL e fortificada com 202,0 μL de solução padrão contendo 2,3,7,8-TCDD e 2,3,7,8-TCDF em hexano, na concentração de 2 mg L⁻¹. Em seguida, 4,0 mL de acetonitrila foram adicionados à amostra fortificada e a mistura foi homogeneizada por 1 min em vórtex. Posteriormente, 1,6 g de sulfato de magnésio anidro (MgSO₄) e 0,4 g de cloreto de sódio (NaCl) foram adicionados simultaneamente à mistura e esta foi homogeneizada por 1 min em vórtex e centrifugada a 3500 rpm (1901 x g) por 10 min. O sobrenadante (extrato) dessa mistura foi transferido para um tubo de polipropileno de 15,0 mL contendo 1,5 g de sulfato de magnésio anidro (MgSO₄) e estes foram homogeneizados por 1 min em vórtex e centrifugados a 3500 rpm (1901 x g) por 10 min. 2,5 mL dos extratos foram transferidos para um frasco de vidro de 5,0 mL, completamente evaporados sob fluxo de ar, ressuspensos em 600,0 μL de acetonitrila, transferidos para um *vial* e analisados por CLAE-DAD.

Para otimizar essa metodologia foram realizados testes para determinar a quantidade ideal de sais para separar as fases e secar o extrato. Para tanto, diferentes quantidades de sulfato de magnésio anidro (1,5, 1,6, e 1,7 g) e cloreto de sódio (0,4 e 0,5 g) foram adicionadas ao sistema. Além disso, foi avaliada a interferência da quantidade destes sais no volume final do extrato recuperado para etapa de evaporação. A análise de variância (ANOVA) foi utilizada para verificar se há diferenças significativas entre as condições otimizadas.

As etapas dessa metodologia estão ilustradas na Figura 3.3.

Figura 3.3. Diagrama demonstrando todas as etapas da metodologia QuEChERS/CLAE-DAD utilizada no presente estudo.



Etapa 1: adicionar 4,0 mL da amostra (água) ao tubo falcon de 15,0 mL; etapa 2: fortificar a amostra com os analitos alvos; etapa 3: adicionar 4,0 mL de acetonitrila (fase extratora). A acetonitrila é menos densa que a amostra e, portanto, é o sobrenadante; etapa 4: agitar em vórtex por 1 min; etapa 5: adicionar simultaneamente 1,6 g de sulfato de magnésio anidro e 0,4 g de cloreto de sódio; etapa 6: agitar em vórtex por 1 min; etapa 7: centrifugar a 3500 rpm por 10 min; etapa 8: transferir o sobrenadante para um tubo falcon de 15,0 mL; etapa 9: adicionar 1,5 g de sulfato de magnésio anidro; etapa 10: agitar em vórtex por 1 min; etapa 11: centrifugar a 3500 rpm por 10 min; etapa 12: transferir 2,5 mL do extrato para um frasco de vidro de 5,0 mL; etapa 13: evaporar completamente o extrato; etapa 14: ressuspender o extrato em 600,0 μL de acetonitrila; etapa 15: transferir o extrato para um *vial*; etapa 16: quantificar os compostos alvos por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos.

2.6. ELL-PBT

Uma amostra de 4,0 mL de água Milli-Q foi transferida para um frasco de vidro de 22,0 mL e fortificada com 197,0 μL de solução padrão contendo 2,3,7,8-TCDD e 2,3,7,8-TCDF em hexano, na concentração de 2 mg L⁻¹. Em seguida, 8,0 mL de acetonitrila foi adicionada à amostra fortificada. A mistura foi homogeneizada por 1 min em vórtex e mantida a -20 °C, por 1 h, para a completa separação das fases e limpeza dos extratos. Posteriormente, a fase orgânica líquida (extrato) foi transferida para um tubo de polipropileno de 15,0 mL contendo 375 mg de sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄) e, em seguida, foram homogeneizados por 1 min em vórtex e centrifugado a 3500 rpm (1901 x g) por 10 min. 5,0 mL do extrato foram transferidos para um frasco de vidro de 5,0 mL, completamente evaporados sob fluxo de ar, ressuspensionado em 600,0 μL de acetonitrila, transferido para um *vial* e analisado por CLAE-DAD (SICUPIRA *et al.*, 2019).

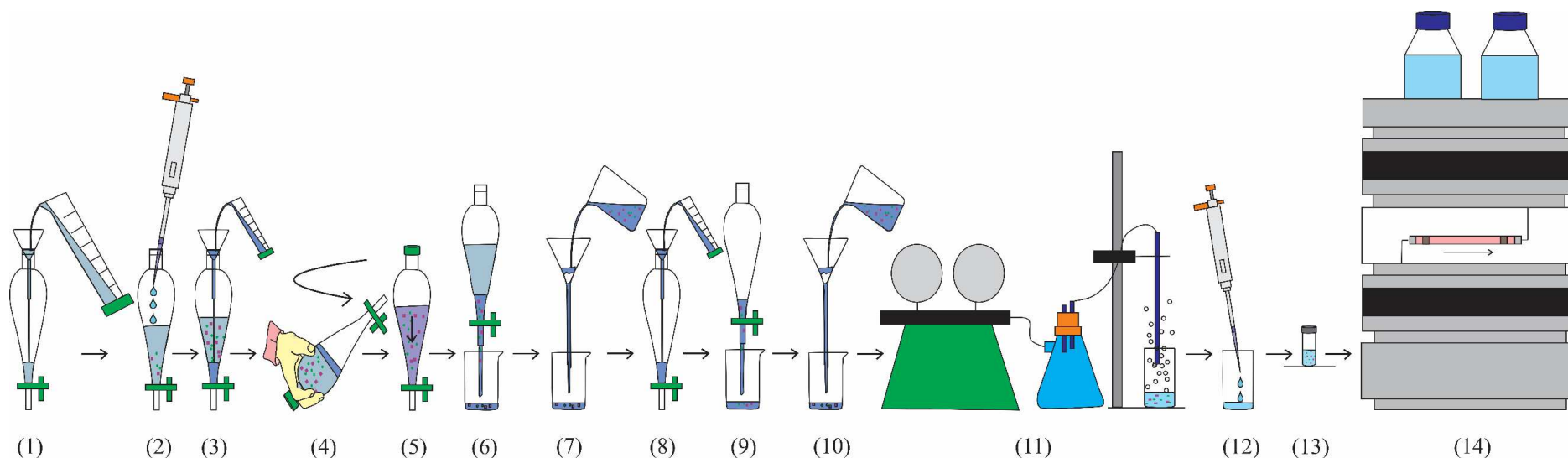
As etapas dessa metodologia estão ilustradas na Figura 2.2 (pg 85).

2.7. ELL

Uma amostra de 200,0 mL de água Milli-Q foi transferida para um funil de separação de 250,0 mL e fortificada com 120,0 μL de solução padrão contendo 2,3,7,8-TCDD e 2,3,7,8-TCDF em hexano, na concentração de 2 mg L⁻¹. Em seguida, 12,0 mL de diclorometano foram adicionados à amostra fortificada e esta foi extraída agitando o funil de separação por 2 min com alívio periódico da pressão. O extrato (diclorometano) foi deixado decantar durante 10 min e, em seguida, drenado através de um funil com sulfato de sódio anidro suportado por papel de filtro. A amostra de água foi extraída mais duas vezes com porções de 12,0 mL de diclorometano e cada uma foi drenada através de sulfato de sódio anidro. Após a terceira extração, o funil de separação foi lavado com 4,0 mL de diclorometano e este foi drenado através de sulfato de sódio anidro. A etapa de lavagem foi repetida duas vezes (US EPA, 1994). O extrato reunido foi completamente evaporado sob fluxo de ar, ressuspensionado em 600,0 μL de acetonitrila, transferido para um *vial* e analisado por CLAE-DAD.

As etapas dessa metodologia estão ilustradas na Figura 3.4.

Figura 3.4. Diagrama demonstrando todas as etapas da metodologia ELL/CLAE-DAD utilizada no presente estudo.



Etapa 1: adicionar 200,0 mL da amostra (água) ao funil de separação; etapa 2: fortificar a amostra com os analitos alvos; etapa 3: adicionar 12,0 mL de diclorometano (fase extratora). O diclorometano é mais denso que a amostra e, por isso, depositará na parte inferior do funil de separação; etapa 4: agitar durante 2 min com alívio periódico da pressão; etapa 5: esperar o diclorometano decantar durante 10 min; etapa 6: recolher a fase decantada (extrato) em um béquer; etapa 7: drenar o extrato através de um funil com sulfato de sódio anidro suportado por papel de filtro; repetir as etapas 3, 4, 5, 6 e 7 mais duas vezes; etapa 8: lavar o funil de separação com 4,0 mL de diclorometano; etapa 9: recolher o extrato em um béquer; etapa 10: drenar o extrato através de um funil com sulfato de sódio anidro suportado por papel de filtro; repetir as etapas 8, 9 e 10 mais duas vezes; etapa 11: evaporar completamente o extrato reunido; etapa 12: ressuspender o extrato em 600,0 μL de acetonitrila; etapa 13: transferir o extrato para um *vial*; etapa 14: quantificar os compostos alvos por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos.

Fonte: adaptado US EPA, 1994.

A Figura 3.5 apresenta as etapas dos procedimentos experimentais descritos anteriormente para facilitar a comparação entre as quatro metodologias estudadas.

Figura 3.5. Comparação das quatro metodologias utilizadas para a determinação simultânea de 2,3,7,8-TCDD e 2,3,7,8-TCDF em amostras de água.

MELLD ^a	QuEChERS ^a	ELL-PBT ^b	ELL ^c
1- 5,0 mL de amostra	1- 4,0 mL de amostra	1- 4,0 mL de amostra	1- 200,0 mL de amostra
2- Fortificar a amostra	2- Fortificar a amostra	2- Fortificar a amostra	2- Fortificar a amostra
3- 1,0 mL de acetonitrila contendo 50,0 μ L tetracloreto de carbono	3- 4,0 mL de acetonitrila	3- 8,0 mL de acetonitrila	3- 12,0 mL de diclorometano
4- Vórtex por 1 min	4- Vórtex por 1 min	4- Vórtex por 1 min	4- Agitar por 2 min
5- Centrifugar a 3500 rpm por 5 min	5- 4 g de MgSO ₄ anidro e 1 g de NaCl	5- Manter a -20 °C por 1 h	5- Decantar por 10 min
6- Transferir 15,0 μ L da fase sedimentada para um frasco de vidro	6- Vórtex por 1 min	6- Transferir a fase líquida para um tubo de polipropileno	6- Drenar o extrato através de um funil com NaSO ₄ anidro
7- Evaporar completamente o extrato e ressuspender em 400 μ L de acetonitrila	7- Centrifugar a 3500 rpm por 10 min	7- 375 mg de Na ₂ SO ₄ anidro	7- Repetir as etapas 3, 4, 5 e 6 mais duas vezes
8- CLAE-DAD	8- Transferir o sobrenadante para um tubo de polipropileno	8- Vórtex por 1 min	8- Lavar o funil com 4,0 mL de diclorometano
Tempo de preparo de amostra: 10 min ^d	9- 1,5 g de MgSO ₄ anidro	9- Centrifugar a 3500 rpm por 10 min	9- Drenar o extrato através de um funil com NaSO ₄ anidro
Volume de solvente orgânico utilizado por amostra: 1,05 mL	10- Vórtex por 1 min	10- Transferir 5,0 mL do sobrenadante para um frasco de vidro	10- Repetir as etapas 8 e 9 mais duas vezes
Volume de amostra: 5,0 mL	11- Centrifugar a 3500 rpm por 10 min	11- Evaporar completamente o extrato e ressuspender em 600,0 μ L de acetonitrila	11- Evaporar completamente o extrato reunido e ressuspender em 600,0 μ L de acetonitrila
Massa de sal por amostra: não utilizou	12- Transferir 2,5 mL do sobrenadante para um frasco de vidro	12- CLAE-DAD	12- CLAE-DAD
	13- Evaporar completamente o extrato e ressuspender em 600,0 μ L de acetonitrila	Tempo de preparo de amostra: 90 min ^d	Tempo de preparo de amostra: 95 min ^d
	14- CLAE-DAD	Volume de solvente orgânico utilizado por amostra: 8,0 mL	Volume de solvente orgânico utilizado por amostra: 48,0 mL
	Tempo de preparo de amostra: 60 min ^d	Volume de amostra: 4,0 mL	Volume de amostra: 200,0 mL
	Volume de solvente orgânico utilizado por amostra: 4,0 mL	Massa de sal por amostra: 375,0 mg	Massa de sal por amostra: aproximadamente 5,0 g
	Volume de amostra: 4,0 mL		
	Massa de sal por amostra: 6,5 g		

^aMetodologia proposta; ^bSICUPIRA *et al.*, 2019; ^cAdaptado de US EPA, 1994; ^dNão inclui CLAE-DAD.

2.8. Validação das metodologias MELLD e QuEChERS

As metodologias MELLD e QuEChERS foram validadas através da avaliação dos seguintes parâmetros de desempenho: linearidade, efeito matriz, seletividade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), precisão e exatidão (THOMPSON *et al.*, 2002; DE SOUZA & JUNQUEIRA, 2005; ICH, 2010; CHAMKASEM e HARMON, 2016; US EPA, 2016; EC, 2017). A linearidade foi avaliada através de curvas analíticas do extrato da matriz fortificado em seis níveis de concentração 5,3, 13,3, 21,3, 29,3, 37,3 e 45,3 $\mu\text{g L}^{-1}$ para MELLD e 4,8, 12,0, 19,2, 26,4, 33,6 e 40,8 $\mu\text{g L}^{-1}$ para QuEChERS, com três repetições independentes para cada nível. Os parâmetros de regressão linear foram estimados pelo método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO). Os valores extremos foram identificados e excluídos pelo teste Jacknife. A utilização do MMQO foi validada através da avaliação da normalidade (teste de Ryan e Joiner), independência (teste de Durbin e Watson) e homocedasticidade (teste de Brown e Forsythe) dos resíduos da regressão, assim como, da análise de variância (ANOVA) para significância da regressão e do desvio da linearidade (DE SOUZA & JUNQUEIRA, 2005).

Duas curvas analíticas contendo os dois analitos alvos foram construídas para avaliar o efeito matriz, uma em acetonitrila e outra no extrato da matriz, em seis níveis de concentração 5,3, 13,3, 21,3, 29,3, 37,3 e 45,3 $\mu\text{g L}^{-1}$ para MELLD, e 4,8, 12,0, 19,2, 26,4, 33,6 e 40,8 $\mu\text{g L}^{-1}$ para QuEChERS, com três repetições independentes para cada nível. Os coeficientes angulares das curvas analíticas foram estimados pelo MMQO. Os efeitos produzidos pelos componentes da matriz foram avaliados pela razão entre os coeficientes angulares obtidos para cada analito no extrato da matriz e no solvente, multiplicado por 100, de acordo com a Eq. (3.1). Sendo que valor igual a 100% indica que nenhum efeito de matriz está presente. Se o valor for menor que 100%, indica que há redução na resposta cromatográfica do analito alvo causada pelos componentes da matriz (efeito de matriz negativa). Se o valor for superior a 100%, indica que há um aumento na resposta cromatográfica do composto alvo causado pelos componentes da matriz (efeito de matriz positivo) (CHAMKASEM & HARMON, 2016).

$$EM (\%) = \frac{a_{matriz}}{a_{solvente}} \times 100 \quad (3.1)$$

Onde:

EM : efeito de matriz,

a_{matriz} : coeficiente angular da curva analítica em extrato da matriz;

$a_{solvente}$: coeficiente angular da curva analítica em solvente.

A seletividade das metodologias MELLD e QuEChERS foi avaliada comparando os cromatogramas do extrato da matriz livre dos analitos alvos e do extrato da matriz fortificada, contendo os dois contaminantes alvos na concentração de $40,0 \mu\text{g L}^{-1}$ para MELLD e $36,0 \mu\text{g L}^{-1}$ para QuEChERS, em seis réplicas independentes (THOMPSON *et al.*, 2002).

O LD e LQ foram determinados fortificando amostras de água com a menor quantidade possível de 2,3,7,8-TCDD e 2,3,7,8-TCDF que pode ser detectada ou quantificada utilizando as metodologias MELLD ou QuEChERS, seguida pela análise por CLAE-DAD. O LD e LQ foram considerados como 3 e 10 vezes o sinal do ruído da linha de base das amostras livres dos analitos de interesse, respectivamente (US EPA, 2016).

A exatidão foi avaliada por experimentos de fortificação/recuperação utilizando três níveis de concentração, 5,3, 21,3 e $40,0 \mu\text{g L}^{-1}$ para MELLD e 4,8, 19,2 e $36,0 \mu\text{g L}^{-1}$ para QuEChERS, em três repetições para cada nível. Valores de recuperação entre 70 e 120% foram considerados aceitáveis (EC, 2017).

A precisão foi avaliada pelo desvio padrão relativo (DPR) obtido a partir de experimentos de fortificação/recuperação. Os testes foram realizados na concentração de $21,3 \mu\text{g L}^{-1}$ para MELLD e $19,2 \mu\text{g L}^{-1}$ para QuEChERS, em sete repetições. O critério de aceitabilidade foi $\text{DPR} \leq 20\%$ (EC, 2017).

2.9. Amostras reais

As metodologias validadas MELLD e QuEChERS foram aplicadas para a determinação simultânea de 2,3,7,8-TCDD e 2,3,7,8-TCDF em quatro amostras aquosas. A primeira amostra foi coletada em uma barragem próxima a um forno de produção de carvão vegetal localizado na cidade de Turmalina, Minas Gerais, Brasil, já que a combustão de madeira é uma provável fonte de dioxinas e furanos policlorados (SCHATOWITZ *et al.*, 1994).

Duas amostras de água foram coletadas no distrito industrial da cidade de Montes Claros, Minas Gerais, Brasil, onde estão localizados os rios Vieira e Cintra. Além de indústrias de vários segmentos como têxteis, alimentos e biotecnologia, também há incineradores de resíduos industriais nessa região. É importante enfatizar que a principal fonte de emissão de dioxinas e furanos policlorados envolve a combustão de resíduos sólidos contendo cloro, especialmente os plásticos (BRAUNE & MALLORY, 2017; CHAKRABORTY *et al.*, 2018; HADDAD *et al.*, 2018).

A última amostra de água foi coletada na estação de tratamento de esgoto da cidade de Montes Claros, Minas Gerais, Brasil. Há relatos na literatura de dioxinas e furanos policlorados

em água de esgoto, principalmente de atividades industriais (VALLEJO *et al.*, 2015; SAPPINGTON *et al.* 2015; LU *et al.*, 2016).

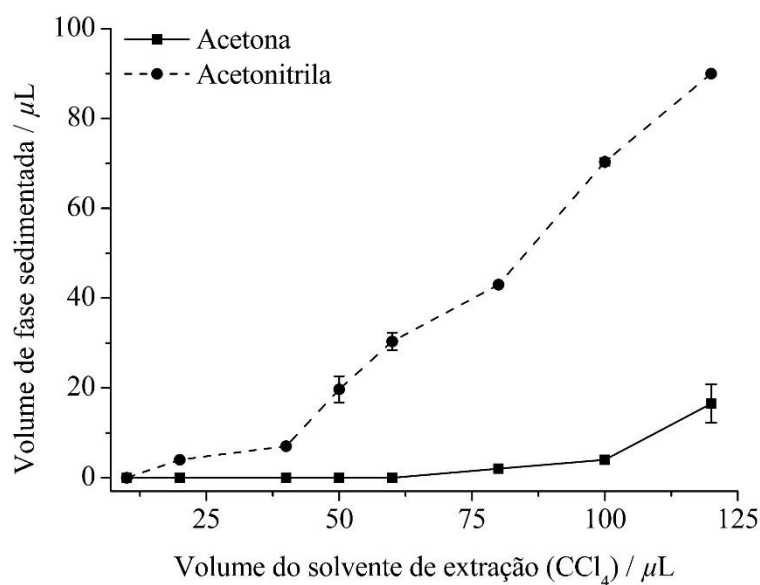
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. MELLD

A metodologia MELLD utilizada para extração de 2,3,7,8-TCDD e 2,3,7,8-TCDF a partir de matrizes aquosas foi baseada no estudo realizado por Rezaee *et al.* (2006) para Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) em amostras de água. A otimização dessa metodologia foi dividida em duas etapas, na primeira foi definida a composição da mistura solvente dispersor e de extração. Para tanto, o volume do solvente dispersor foi fixado em 1,0 mL. Visto que estudos anteriores demonstraram que as maiores taxas de recuperação são alcançadas com 1,0 mL do solvente dispersor (REZAEI *et al.*, 2006; BEDASSA *et al.*, 2015; SADEGHI *et al.*, 2016).

Em seguida, foram avaliados oito volumes para o solvente de extração (10,0; 20,0; 40,0; 50,0; 60,0; 80,0; 100,0 e 120,0 μL) e dois solventes dispersores (acetonitrila e acetona), como apresentado na Figura 3.6.

Figura 3.6. Gráfico representando o efeito do volume de CCl_4 no volume de fase sedimentada para dois solventes dispersores (acetona (---) e acetonitrila (—)) em MELLD.



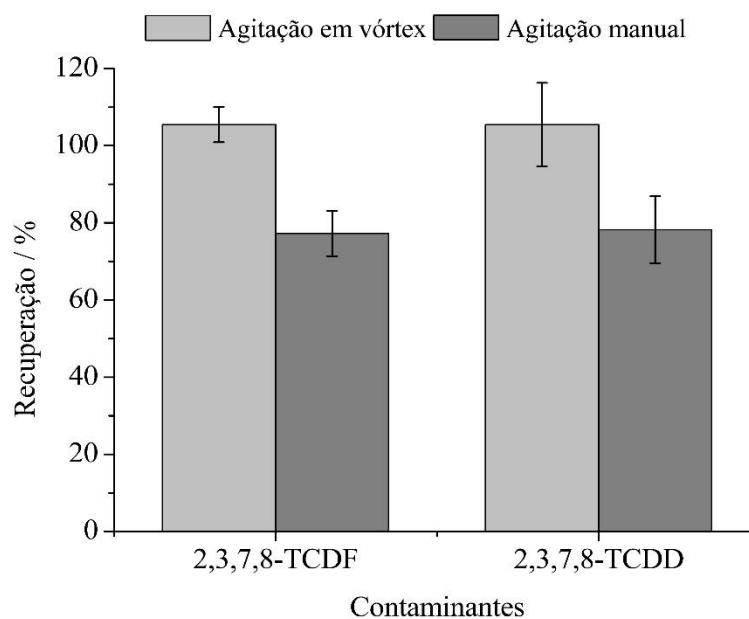
A acetonitrila foi definida como solvente dispersor. De acordo com a Figura 3.6 (pg 122), esse solvente permitiu a deposição de maiores volumes do solvente de extração (tetracloreto de carbono). Para utilizar acetona seria necessário pelo menos 120,0 μL do solvente de extração, o que diminuiria o fator de concentração da metodologia. Esse resultado pode ser explicado pela diferença na polaridade dos solventes, visto que a acetonitrila é mais polar que a acetona e, portanto, tem menos afinidade pelo tetracloreto de carbono, que por sua vez é menos polar que ambos os solventes. Estudos similares também utilizaram acetonitrila como solvente dispersor para tetracloreto de carbono (FARAJZADEH *et al.*, 2009; ZHOU *et al.*, 2009; CALDAS *et al.*, 2010; CUI *et al.*, 2013; PASTOR-BELDA *et al.*, 2015).

Em seguida, o volume de solvente de extração selecionado foi 50,0 μL , sendo que não foi possível coletar a fase sedimentada com precisão para volumes inferiores a 50,0 μL e o fator de concentração da metodologia diminuiu para volumes maiores que 50,0 μL . Além disso, volumes a partir de 60,0 μL depositam instantaneamente, antes mesmo da etapa de centrifugação, afetando a taxa de recuperação dos analitos alvos.

Estudos similares obtiveram maiores volumes de fase sedimentada utilizando volumes de solvente de extração inferiores a 50,0 μL . Essa diferença é consequência das maiores rotações utilizadas nesses estudos, geralmente 5000 ou 6000 rpm (REZAEE *et al.*, 2006; WANG *et al.*, 2014; DUARTE *et al.*, 2016; PINTO *et al.*, 2018). No entanto, no presente estudo, 3500 rpm foram suficientes para separar as fases e alcançar taxas de recuperação próximas a 100%. Além disso, resultados semelhantes já foram obtidos utilizando a mesma rotação (SOUZA *et al.*, 2018).

Para finalizar a primeira etapa de otimização, foi necessário definir o solvente de extração que deve apresentar características como baixa solubilidade em água, capacidade de extração dos compostos alvos, compatibilidade com o sistema cromatográfico e densidade maior que água (REZAEE *et al.*, 2006). Em geral, os solventes mais densos são halogenados, no entanto, estes solventes não podem ser injetados no CLAE-DAD. A solução encontrada para este problema foi evaporar completamente o extrato e ressuspender em acetonitrila que é também a fase móvel. Dessa forma, foi possível avaliar a utilização de tetracloreto de carbono como solvente de extração e, este proporcionou taxas de recuperação próximas a 100%, como pode ser observado na Figura 3.7. Estudos anteriores também utilizaram o tetracloreto de carbono como solvente de extração para compostos organoclorados e alcançaram resultados semelhantes ao presente estudo (ZHAO *et al.*, 2011; SOUZA *et al.*, 2018; MARTINS *et al.*, 2014).

Figura 3.7. Gráfico representando as taxas de recuperação de 2,3,7,8-TCDF e 2,3,7,8-TCDD em MELLD.



A segunda etapa de otimização consistiu em determinar o modo de agitação. Dois modos foram avaliados: vórtex por 1 min e agitação manual. As maiores taxas de recuperação foram alcançadas nos experimentos que utilizaram o vórtex, aproximadamente 100% (Figura 3.7). Esse resultado é consequência da agitação em vórtex intensificar o processo de dispersão do solvente de extração. O que contribui para o aumento da superfície de contato entre solvente de extração e amostra, e promove a partição dos compostos de interesse entre as duas fases imiscíveis (DUARTE *et al.*, 2016). Estudos anteriores também utilizaram sistemas de agitação vigorosos para aumentar as taxas de recuperação e alcançar valores próximos a 100% (DUARTE *et al.*, 2016; AVINO *et al.*, 2017; PINTO *et al.*, 2018; SOUZA *et al.*, 2018).

Após otimizar a MELLD, a etapa de otimização da metodologia QuEChERS foi iniciada.

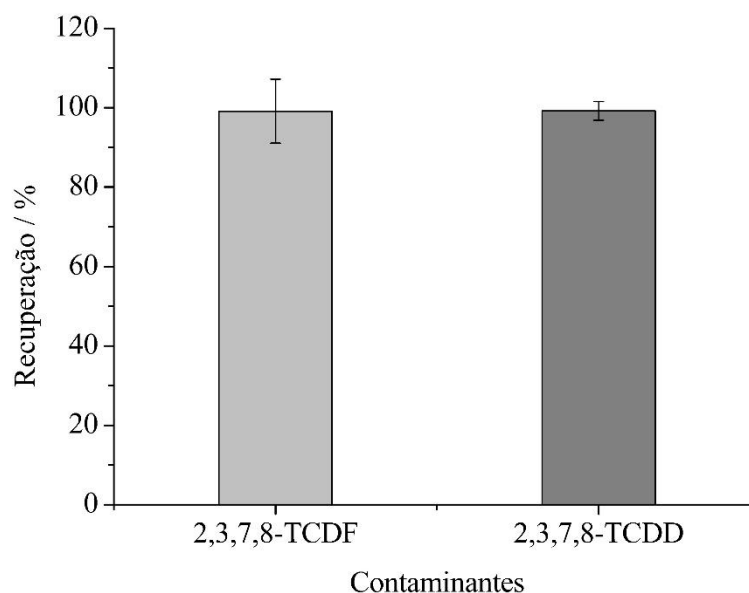
3.2. QuEChERS

A metodologia QuEChERS utilizada, neste trabalho, foi baseada em estudo realizado por Anastassiades & Lehotay (2003) para pesticidas em amostras de frutas e vegetais. Foram avaliadas as melhores condições de extração dos pesticidas nesse estudo anterior e a partir dessas foi proposta uma estratégia para a extração de 2,3,7,8-TCDD e 2,3,7,8-TCDF em amostras aquosas.

O primeiro parâmetro avaliado foi o solvente de extração. Em QuEChERS, geralmente os solventes utilizados são acetato de etila, diclorometano e acetonitrila. No entanto, acetonitrila é aplicada com maior frequência devido suas elevadas taxas de recuperação e menor quantidade de componentes da matriz co-extraídos (KAIUM *et al.*, 2018). Além disso, estudos anteriores relataram acetonitrila como solvente de extração para dioxinas e furanos policloradas em diferentes matrizes (HAIMOVICI *et al.*, 2016; ANDRADE *et al.*, 2017; SICUPIRA *et al.*, 2019). Portanto, neste estudo, acetonitrila foi selecionada como solvente de extração.

Após a seleção da acetonitrila foi necessário determinar a proporção entre amostra e solvente de extração. Para tanto, os volumes da amostra e solvente de extração foram fixados em 4,0 mL. Com esta proporção (1:1) foram alcançadas taxas de recuperação próximas a 100 % (Figura 3.8) e, por isso, não foi necessário avaliar outras condições. Similarmente, estudos anteriores utilizaram a mesma proporção para matrizes aquosas (YANG *et al.*, 2015, FERREIRA *et al.*, 2016; KACHHAWAHA *et al.*, 2017; KAIUM *et al.*, 2018).

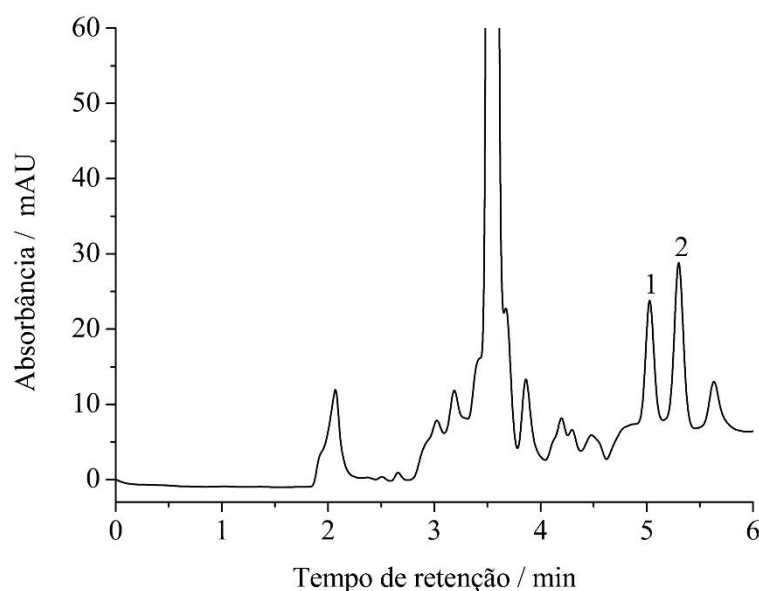
Figura 3.8. Gráfico representando as taxas de recuperação de 2,3,7,8-TCDF e 2,3,7,8-TCDD em QuEChERS.



Em seguida, foram realizados testes para determinar a quantidade ideal dos sais responsáveis por separar as fases e secar os extratos. A adição simultânea de 1,6 g de $MgSO_4$ e 0,4 g de $NaCl$ promoveu a separação completa das fases e 1,5 g de $MgSO_4$ foi suficiente para obter cromatogramas com poucos sinais de interferentes (Figura 3.9). Nessas condições, o volume de extrato recuperado para a etapa de evaporação foi 2,5 mL e, com este valor, foi possível obter um fator de concentração de 4,2. É importante ressaltar, que quantidades maiores

dos sais diminui o volume do extrato recuperado para a etapa de evaporação e, conseqüentemente, o fator de concentração e limite de quantificação da metodologia. Similarmente, estudos anteriores utilizaram proporcionalmente as mesmas quantidades de amostra, solvente de extração e sais (ANASTASSIADES & LEHOTAY, 2003; YANG *et al.*, 2015; GHANI & HANAFI, 2016).

Figura 3.9. Representação do cromatograma do extrato da matriz fortificada com 2,3,7,8-TCDF (composto 1) e 2,3,7,8-TCDD (composto 2) para a metodologia QuEChERS.



É importante destacar que os principais parâmetros de otimização da metodologia QuEChERS já foram amplamente estudados por Anastassiades & Lehotay (2003). Por esse motivo, alguns estudos que propuseram a utilização dessa metodologia para amostras aquosas não precisaram otimizá-la ou conseguiram alcançar elevadas taxas de recuperação otimizando apenas um parâmetro (BRONDI *et al.*, 2011; SHI *et al.*, 2012; WU *et al.*, 2013; FERREIRA *et al.*, 2016; GHANI & HANAFI, 2016; KACHHAWAHA *et al.*, 2017; KAIUM *et al.*, 2018). Resultados semelhantes foram encontrados no presente estudo, as condições estabelecidas baseadas no estudo de Anastassiades & Lehotay (2003) proporcionaram taxas de recuperação próximas a 100 % (Figura 3.8 (pg 125)), sendo assim, foi necessário otimizar apenas um parâmetro.

Após otimizar as condições de extração de 2,3,7,8-TCDD e 2,3,7,8-TCDF a partir de matrizes aquosas utilizando MELLD ou QuEChERS, a etapa de validação das metodologias foi iniciada.

3.3. Validação das metodologias MELLD e QuEChERS

As metodologias MELLD e QuEChERS foram validadas através das seguintes figuras de mérito: linearidade, efeito de matriz, seletividade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão e exatidão (THOMPSON *et al.*, 2002; DE SOUZA & JUNQUEIRA, 2005; ICH, 2010; US EPA, 2016; EC, 2017). O nível de significância adotado nos testes de hipóteses foi $\alpha = 0,05$. A Tabela 3.1 mostra os principais resultados do estudo de validação das metodologias MELLD e QuEChERS para extrair 2,3,7,8-TCDD e 2,3,7,8-TCDF a partir de amostras de água.

Tabela 3.1. Resultados do estudo de validação da MELLD e QuEChERS de 2,3,7,8-TCDF e 2,3,7,8-TCDD em amostras de água

	MELLD		QuEChERS	
	2,3,7,8-TCDF	2,3,7,8-TCDD	2,3,7,8-TCDF	2,3,7,8-TCDD
Coefficiente de inclinação	134426,1	163206,4	141779,3	151065,1
Coefficiente de interseção	390871,8	600885,2	2088020,0	1780350,0
R ²	0,9910	0,9909	0,9923	0,9767
LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	2,7	2,7	2,4	2,4
LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	5,3	5,3	4,8	4,8
Faixa de linearidade ($\mu\text{g L}^{-1}$)	5,3 a 45,3	5,3 a 45,3	4,8 a 40,8	4,8 a 40,8

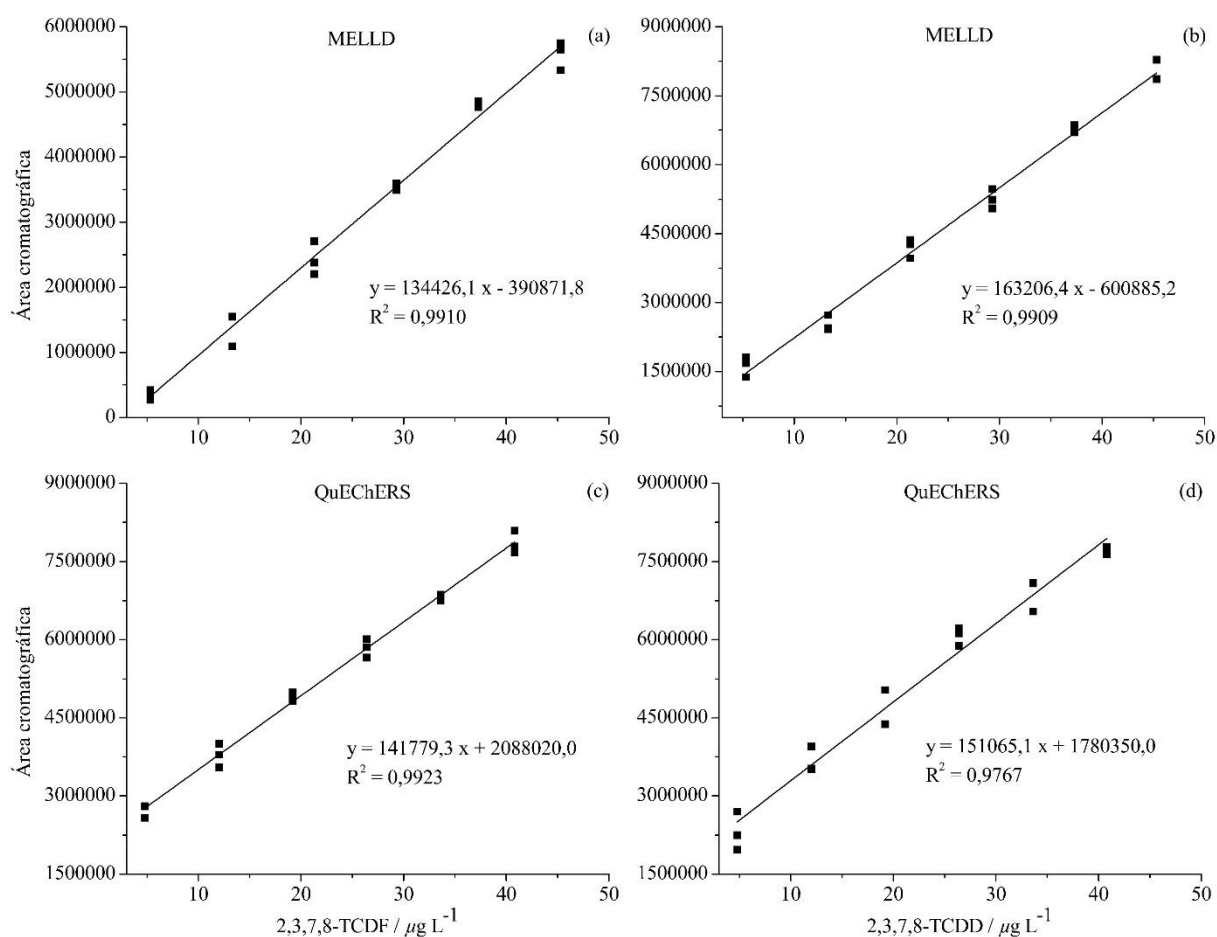
R²: coeficiente de determinação; LD: limite de detecção; LQ: limite de quantificação.

Fonte: elaborada pelo autor.

3.3.1. Linearidade

A linearidade foi avaliada através de curvas analíticas em seis níveis de concentração equidistantes, com três repetições independentes para cada nível, como apresentado na Figura 3.10. O LQ foi definido como o nível de menor concentração das curvas analíticas e as faixas de linearidade utilizadas foram de 5,3 a 45,3 $\mu\text{g L}^{-1}$ para MELLD e de 4,8 a 40,8 $\mu\text{g L}^{-1}$ para QuEChERS (Tabela 3.1).

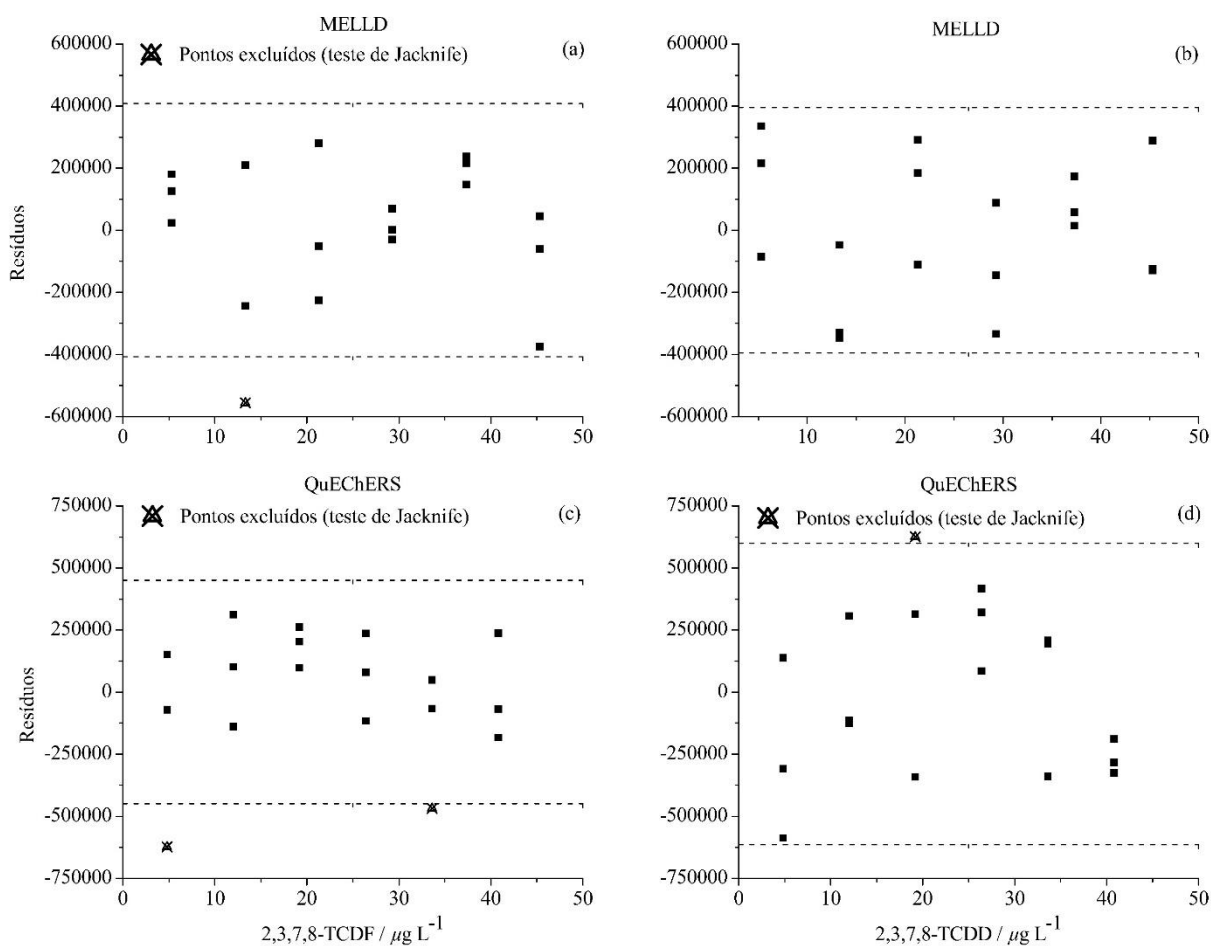
Figura 3.10. Gráficos representando as curvas analíticas para 2,3,7,8-TCDF (a e c) e 2,3,7,8-TCDD (b e d) em extrato da matriz.



R^2 : coeficiente de determinação.

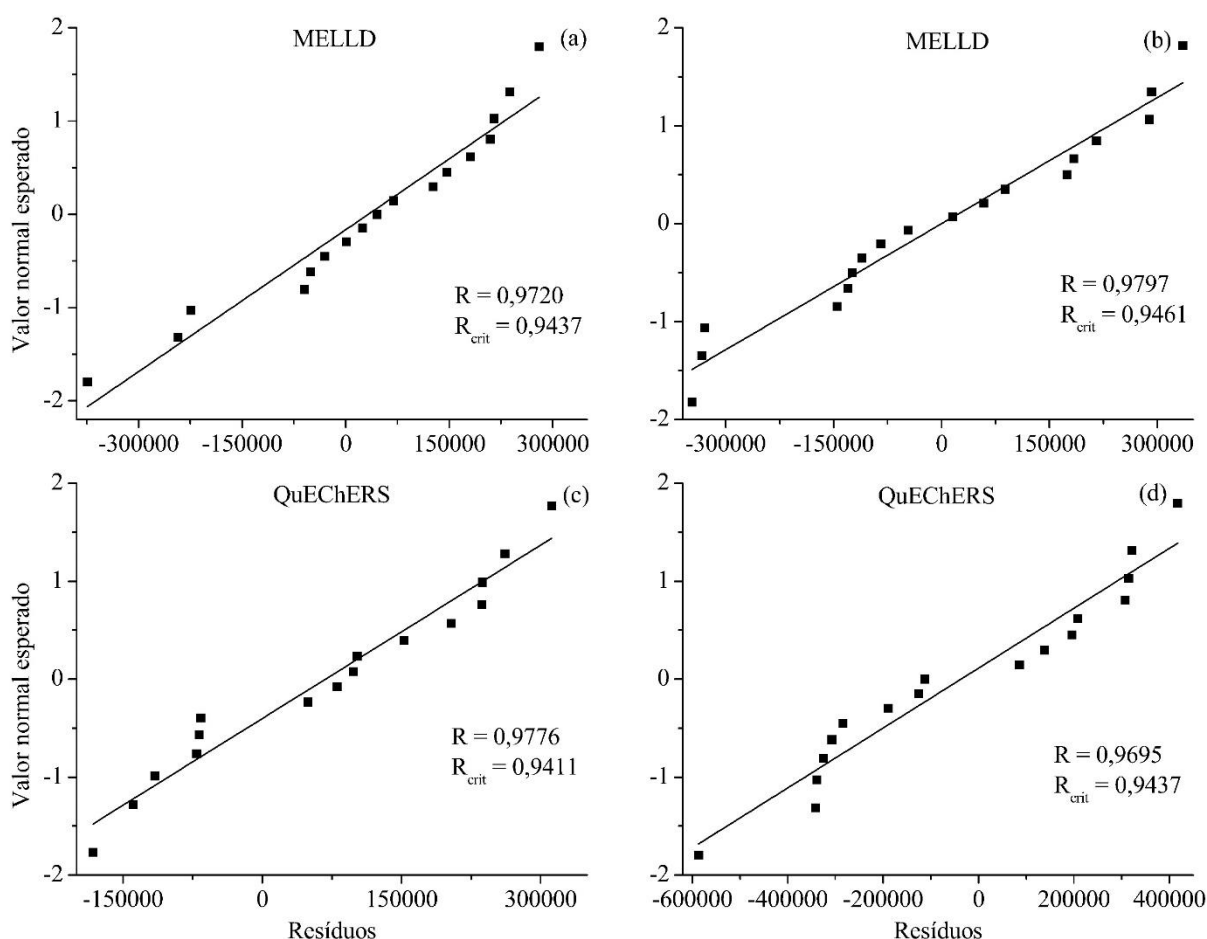
O coeficiente de determinação (R^2) e parâmetros e resíduos da regressão foram estimados pelo método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO), com exclusão máxima de 22,2% dos dados originais (teste de Jacknife) (Figura 3.11). É importante ressaltar que a cada exclusão, o MMQO foi aplicado novamente, obtendo assim os valores dos coeficientes de inclinação, interseção e determinação apresentados na Tabela 3.1 (pg 127). Os coeficientes de determinação apresentados nessa tabela são superiores a 0,97, indicando que pelo menos 97% da variabilidade dos dados coletados é explicada pelo modelo de regressão. Contudo, foi necessário avaliar a viabilidade de aplicar o MMQO. Para tanto, foram realizados os testes de normalidade, homocedasticidade e independência dos resíduos da regressão, assim como, da análise de variância (ANOVA) para significância da regressão e do desvio da linearidade.

Figura 3.11. Gráficos representando os resíduos da regressão para 2,3,7,8-TCDF (a e c) e 2,3,7,8-TCDD (b e d), após a exclusão dos valores extremos (teste de Jackknife).



A normalidade dos resíduos da regressão foi testada pelo teste Ryan-Joiner (Figura 3.12). Os coeficientes de correlação obtidos nos gráficos da probabilidade normal dos resíduos de regressão (0,9720, 0,9797, 0,9776 e 0,9695) foram superiores ao coeficiente de correlação crítico (0,9437, 0,9461, 0,9411, 0,9437), respectivamente. Portanto, o desvio da normalidade não foi significativo, ou seja, os resíduos da regressão seguem distribuição normal.

Figura 3.12. Gráficos representando a probabilidade normal dos resíduos de regressão para 2,3,7,8-TCDF (a e c) e 2,3,7,8-TCDD (b e d).



R: coeficiente de correlação do teste Ryan-Joiner; R_{crit}: coeficiente de correlação crítico.

A homocedasticidade dos resíduos de regressão foi verificada pelo teste de Levene adaptado por Brown-Forsythe. As estatísticas t de Levene (t_L) foram inferiores aos t críticos (t_{crit}) (Tabela 3.2). Portanto, as variâncias dos resíduos da regressão não diferem entre si, ou seja, há homocedasticidade. Este resultado foi confirmado pela distribuição homogênea dos resíduos da regressão ao longo dos níveis de concentração estudados, como pode ser visto na Figura 3.11 (pg 129).

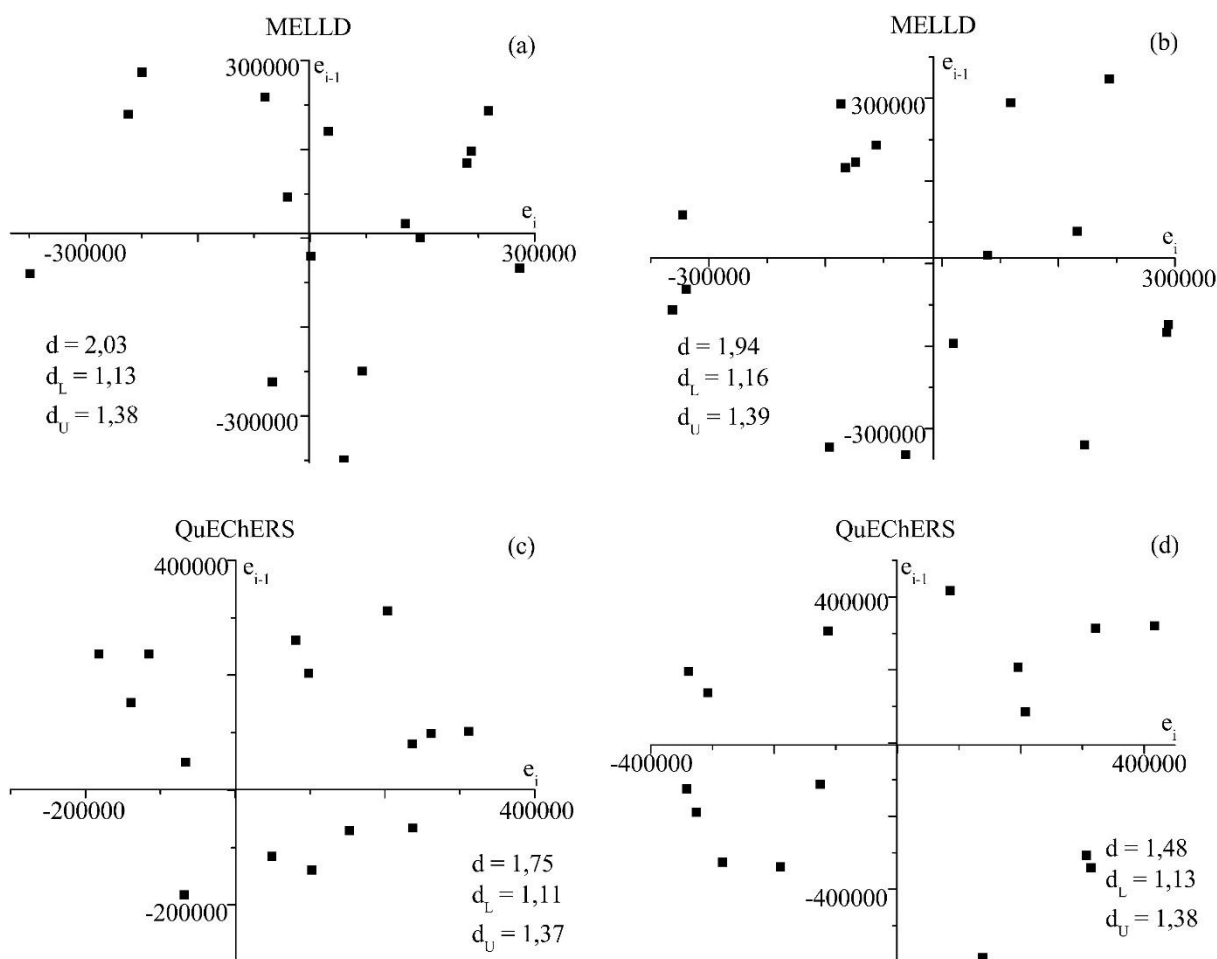
Tabela 3.2. Dados da avaliação da homogeneidade das variâncias dos resíduos da regressão

Estatística	MELLD		QuEChERS	
	2,3,7,8-TCDF	2,3,7,8-TCDD	2,3,7,8-TCDF	2,3,7,8-TCDD
n	17	18	16	17
t _{crit}	2,131	2,120	2,145	2,131
t _L	-0,531	1,041	-0,091	0,779

n: número de observações; t_{crit}: t crítico; t_L: estatística t de Levene.

A independência dos resíduos da regressão foi verificada pelo teste de Durbin-Watson. As estatísticas de Durbin-Watson calculadas (2,03, 1,94, 1,75 e 1,48) foram maiores que os limites críticos superiores (1,38, 1,39, 1,37 e 1,38), respectivamente, sugerindo que não houve autocorrelação. Além disso, na Figura 3.13 é possível observar que os resíduos da regressão estão distribuídos aleatoriamente nos quatro quadrantes, o que indica a independência dos dados.

Figura 3.13. Representação de gráficos de Durbin-Watson para 2,3,7,8-TCDF (a e c) e 2,3,7,8-TCDD (b e d).



e_i : resíduos; d : estatística de Durbin-Watson; d_L : limite crítico inferior; d_U : limite crítico superior.

Foi avaliado se os dados obtidos neste estudo ajustam ao modelo linear simples. As quatro curvas examinadas apresentaram regressão significativa ($F > F_{crit}$) e desvio da linearidade não significativo ($F < F_{crit}$) (Tabela 3.3), sugerindo ajuste ao modelo linear simples na faixa de 5,3 a 45,3 $\mu\text{g L}^{-1}$ para MELLD e de 4,8 a 40,8 $\mu\text{g L}^{-1}$ para QuEChERS para ambos os analitos alvos. Estas avaliações sobre a linearidade seguiram os procedimentos propostos por DE SOUZA & JUNQUEIRA (2005).

Tabela 3.3. Análise de variância (ANOVA) para significância da regressão e do desvio da linearidade

Estatística	MELLD		QuEChERS	
	2,3,7,8-TCDF	2,3,7,8-TCDD	2,3,7,8-TCDF	2,3,7,8-TCDD
Regressão				
n	17	18	16	17
F _{crit}	4,54	4,49	4,60	4,54
F	1,65 x 10 ³	1,75 x 10 ³	1,79 x 10 ³	6,28 x 10 ²
Desvio da linearidade				
n	17	18	16	17
F _{crit}	3,36	3,25	3,48	3,36
F	1,37	2,39	0,45	1,93

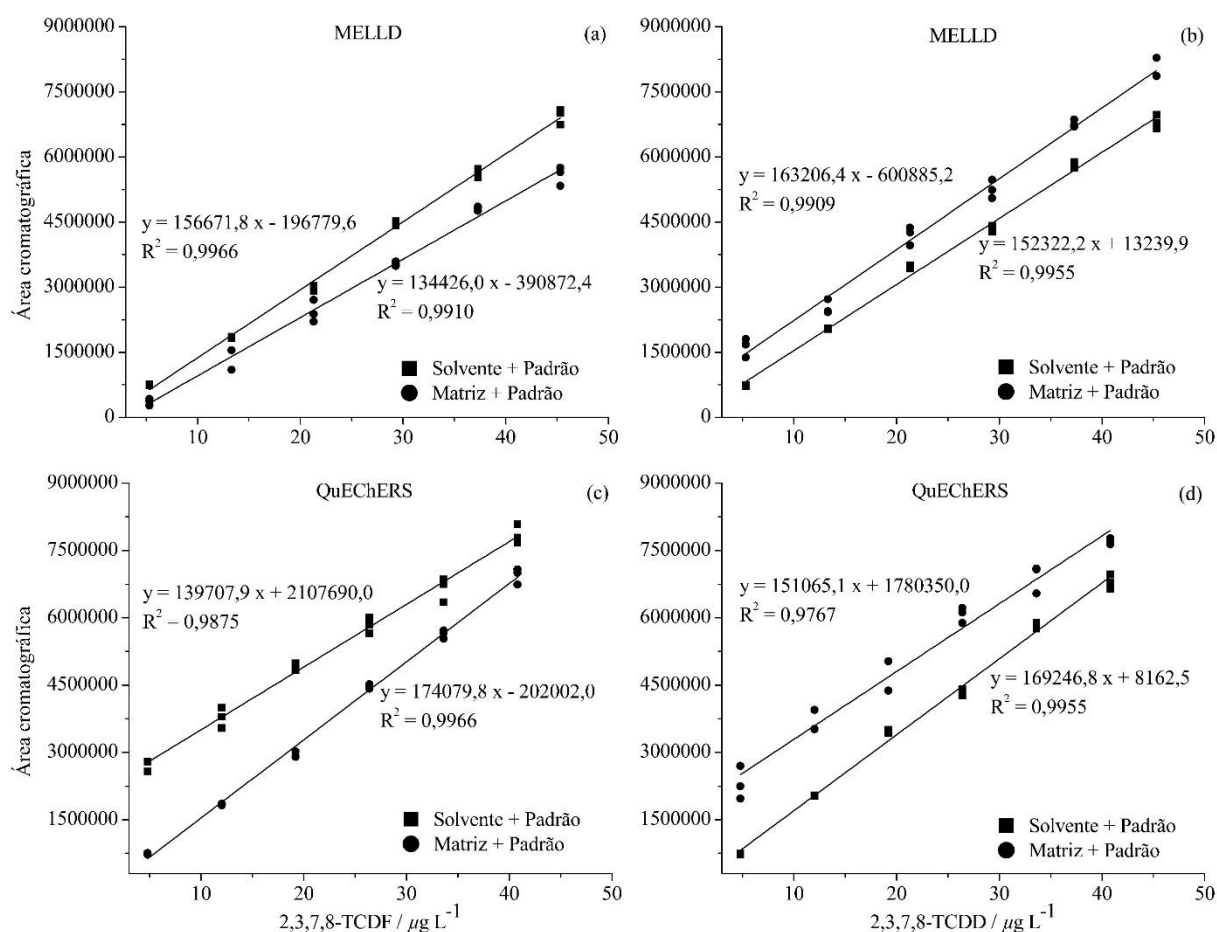
n: número de observações; F_{crit}: F crítico; F: razão entre variâncias.

Os resultados dos testes de normalidade, homocedasticidade, independência e análise de variância (ANOVA) para significância da regressão e do desvio da linearidade confirmaram a adequação do MMQO para estimativa dos parâmetros da regressão dos dados estudados.

3.3.2. Efeito de matriz

O efeito de matriz foi avaliado pela relação entre os coeficientes angulares obtidos de cada analito no extrato da matriz e no solvente, multiplicado por 100 (Figura 3.14). Os resultados mostraram uma redução da área cromatográfica do sinal do 2,3,7,8-TCDF nas duas metodologias estudadas, 85,8% para MELLD e 80,3% para QuEChERS, portanto, efeito de matriz negativo. Similarmente, o 2,3,7,8-TCDD apresentou um efeito de matriz negativo para QuEChERS (89,3%). Entretanto, ocorreu um aumento da área cromatográfica do sinal do 2,3,7,8-TCDD para MELLD (107,1%), ou seja, efeito de matriz positivo. Do mesmo modo, um estudo prévio mostrou efeito de matriz negativo para 2,3,7,8-TCDF e positivo para 2,3,7,8-TCDD em matrizes aquosas utilizando o mesmo sistema de detecção, CLAE-DAD (SICUPIRA *et al.*, 2019).

Figura 3.14. Gráficos representando as curvas analíticas de 2,3,7,8-TCDF (a e c) e 2,3,7,8-TCDD (b e d) em extrato da matriz e solvente.



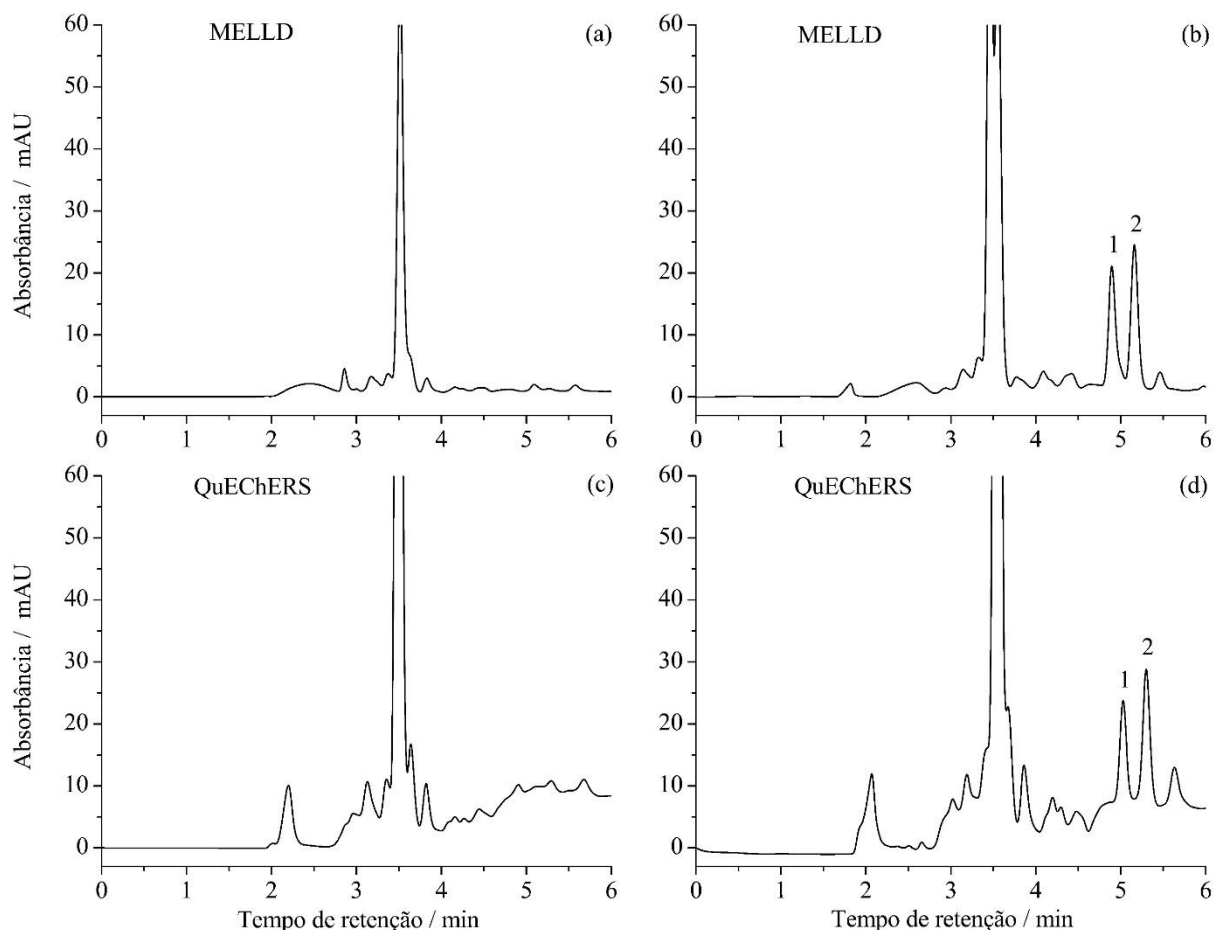
R^2 : coeficiente de determinação.

Contudo, é importante ressaltar que a escolha da metodologia de extração pode interferir na limpeza (composição) dos extratos e, conseqüentemente, alterar o efeito de matriz (HAIMOVICI *et al.*, 2016). Neste estudo, esta interferência ficou evidente na determinação do 2,3,7,8-TCDD que apresentou efeito de matriz negativo para QuEChERS e positivo para MELLD e ELL-PBT (SICUPIRA *et al.* 2019).

3.3.3. Seletividade

Todas as amostras do extrato da matriz livre dos analitos alvos não apresentaram sinais cromatográficos de interferentes no tempo de retenção do 2,3,7,8-TCDF e 2,3,7,8-TCDD, como pode ser observado na Figura 3.15. Portanto, pode-se afirmar que as metodologias MELLD e QuEChERS foram seletivas para os compostos analisados.

Figura 3.15. Representação dos cromatogramas do extrato de matriz livre dos analitos alvos (a e c) e extrato da matriz fortificadas com 2,3,7,8-TCDF (composto 1) e 2,3,7,8-TCDD (composto 2) (b e d).



3.3.4. Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados pela relação sinal/ruído de 3:1 e 10:1, respectivamente (ICH, 2010; US EPA, 2016). O LD para MELLD e QuEChERS foi 2,7 e 2,4 $\mu\text{g L}^{-1}$ para ambos os analitos alvos, respectivamente. Enquanto o LQ foi 5,3 $\mu\text{g L}^{-1}$ para MELLD e 4,8 $\mu\text{g L}^{-1}$ para QuEChERS para os dois compostos de interesse (Tabela 3.1 (pg 127)).

Estudo prévio utilizando ELL-PBT e CLAE-DAD alcançou LQ de 2,4 $\mu\text{g L}^{-1}$, valor próximo ao encontrado nesse estudo (SICUPIRA *et al.*, 2019). Similarmente, trabalho utilizando extração no ponto nuvem e CLAE-DAD conseguiu quantificar até 1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ de 2,3,7,8-TCDD (SANZ *et al.*, 2002).

Enquanto estudos anteriores utilizaram extração líquido-líquido e CLAE-DAD para determinar 2,3,7,8-TCDF e 2,3,7,8-TCDD em amostra de leite, alcançando LD de 0,1 e 0,2 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente, e LQ de 0,3 $\mu\text{g L}^{-1}$ para ambos compostos (NAKISA *et al.*, 2015; REZAEI *et al.*, 2015). Estes valores foram inferiores ao encontrado nesse estudo.

3.3.5. Exatidão e precisão

A exatidão foi avaliada em três níveis de concentração, 5,3, 21,3 e 40,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para MELLD e 4,8, 19,2 e 36,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para QuEChERS, em três replicatas para cada nível. Enquanto a precisão foi avaliada em um nível, 21,3 $\mu\text{g L}^{-1}$ para MELLD e 19,2 $\mu\text{g L}^{-1}$ para QuEChERS, em sete replicatas. As taxas médias de recuperação dos compostos alvos da matriz e desvios padrão relativos (DPR) para as duas metodologias validadas estão apresentadas na Tabela 3.4.

Tabela 3.4. Taxas de recuperação médias dos analitos alvos e desvios padrão relativos para experimentos de fortificação/recuperação

	MELLD			QuEChERS		
	Recuperação \pm DPR (%)			Recuperação \pm DPR (%)		
	5,3 $\mu\text{g L}^{-1}$ ^a	21,3 $\mu\text{g L}^{-1}$ ^b	40,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ ^a	4,8 $\mu\text{g L}^{-1}$ ^a	19,2 $\mu\text{g L}^{-1}$ ^b	36,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ ^a
2,3,7,8-TCDF	99,9 \pm 9,2	103,6 \pm 7,0	105,5 \pm 4,5	108,2 \pm 3,5	97,4 \pm 4,7	99,1 \pm 8,0
2,3,7,8-TCDD	113,2 \pm 9,7	106,6 \pm 11,3	105,5 \pm 10,8	98,1 \pm 3,6	101,6 \pm 7,3	99,2 \pm 2,4

^aMédia das três replicatas; ^bMédia das sete replicatas; DPR: desvio padrão relativo.

As metodologias MELLD e QuEChERS foram exatas e precisas, uma vez que as taxas de recuperação dos analitos alvos entre 97,4 a 113,2% estão dentro da faixa de 70 a 120 % recomendada pela Comissão Europeia (EC, sigla do inglês *European Commission*) e DPR entre 2,4 e 11,3% são inferiores aos 20%, valores também recomendados pela Comissão Europeia (EC, 2017).

3.4. Amostras reais

As metodologias validadas foram aplicadas para analisar quatro amostras de água diferentes. Entretanto, não foram encontradas 2,3,7,8-TCDD e 2,3,7,8-TCDF nas amostras analisadas. Diversos fatores como metodologia de extração, sistema de detecção, tipo de matriz, concentração dos analitos de interesse e período de coleta da amostra podem influenciar na detecção dos compostos alvos em amostras reais. Por esses motivos, estudos prévios também

não encontraram dioxinas e furanos policlorados em amostras reais de água (SIRIMANNE *et al.*, 1996; FERNÁNDEZ *et al.*, 1999; SANZ *et al.*, 2002; YANG *et al.*, 2003; SIKITI *et al.*, 2012; ANDRADE *et al.*, 2017).

3.5. Comparação entre as quatro metodologias estudadas neste trabalho

As quatro metodologias foram comparadas através do tempo de preparo de amostra, volume de solvente orgânico, seletividade, taxas de recuperação, desvio padrão relativo (DPR), limite de quantificação (LQ) e linearidade. Todos os parâmetros avaliados estão apresentados na Tabela 3.5.

Tabela 3.5. Parâmetros utilizados para comparar as metodologias MELLD, QuEChERS, ELL-PBT e ELL

Parâmetros avaliados	MELLD ^a	QuEChERS ^a	ELL-PBT ^b	ELL ^c
Tempos de preparo de amostra	10 min	60 min	90 min	95 min
Volume de solvente orgânico	1,05 mL	4,0 mL	8,0 mL	48,0 mL
Seletividade	Sim	Sim	Sim	Não
Taxas de recuperação (%)	105,5 ^d e 105,4 ^e	99,1 ^d e 99,2 ^e	97,5 ^d e 97,1 ^e	97,9 ^d e 93,5 ^e
DPR (%)	4,6 ^d e 10,8 ^e	8,1 ^d e 2,4 ^e	7,5 ^d e 2,9 ^e	7,8 ^d e 2,3 ^e
LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	5,3 ^{d, e}	4,8 ^{d, e}	2,4 ^{d, e}	-
Linearidade ($\mu\text{g L}^{-1}$)	5,3 – 45,3 ^{d, e}	4,8 – 40,8 ^{d, e}	2,4 – 5,4 ^{d, e}	-

^aMetodologia proposta; ^bSICUPIRA *et al.*, 2019; ^cAdaptado de US EPA, 1994^a; ^d2,3,7,8-TCDF; ^e2,3,7,8-TCDD. DPR: desvio padrão relativo; LQ: limite de quantificação.

É importante destacar que somente MELLD e QuEChERS foram otimizadas e validadas no presente estudo. Para as metodologias ELL-PBT e ELL foi realizada apenas a extração dos analitos alvos a partir da amostra de água. Sendo que a ELL-PBT foi realizada seguindo o procedimento proposto por Sicupira *et al.* (2019) e ELL foi adaptada da US EPA (1994). A adaptação da ELL consistiu em diminuir o volume do diclorometano e da amostra de água por cinco. Estudo anterior também utilizou volumes menores que os descritos na US EPA (1994) e alcançou taxas de recuperação semelhantes as encontradas no presente estudo, aproximadamente 100% (Tabela 3.5) (SANZ *et al.*, 2002).

3.5.1. Tempo de preparo de amostra

Os tempos de preparo de amostra para as quatro metodologias avaliadas estão apresentados na Tabela 3.5 (pg 137). Estes tempos incluem as etapas de extração, secagem e evaporação do extrato. Como o sistema de detecção utilizado foi o mesmo para todas as metodologias, CLAE-DAD, não foi necessário comparar o tempo dessa etapa.

A avaliação desse parâmetro mostrou uma superioridade significativa da MELLD, uma vez que essa metodologia apresentou tempo de preparo de amostra muito inferior em relação às demais metodologias estudadas, apenas 10 min, enquanto as outras metodologias alcançaram tempos iguais ou superiores a 1 h.

A superioridade apresentada pela MELLD pode ser explicada pela simplicidade e facilidade de execução das suas etapas. Além disso, o tempo de extração nessa metodologia é muito curto, visto que a transferência dos analitos alvos da fase aquosa para a fase de extração ocorre em poucos segundos (REZAEI *et al.*, 2006; SOUZA *et al.*, 2018).

Os maiores tempos de preparo de amostras para QuEChERS, ELL-PBT e ELL estão relacionados com a presença de etapas laboriosas e maiores tempo de extração (até 1 h). Além disso, quanto maior o volume dos extratos dessas metodologias, maior o tempo da etapa de evaporação, principalmente se o solvente de extração não for volátil como a acetonitrila.

As metodologias com maior tempo de preparo de amostra são inadequadas para projetos com grande número de amostras ou com prazo curto para realizar as análises. Situações de contaminação ambiental por 2,3,7,8-TCDD e 2,3,7,8-TCDF, por exemplo, podem requerer tempos de análises curtos para que as tomadas de decisão sejam rápidas e, assim, tenham um efeito de remediação maior. Além disso, metodologias com maior tempo de preparação de amostra geram maior carga de trabalho para o analista e aumentam os custos para o cliente.

3.5.2. Volume de solvente orgânico

Os volumes dos solventes orgânicos utilizados nas quatro metodologias estudadas estão apresentados na Tabela 3.5 (pg 137). O maior consumo de solvente aconteceu na ELL adaptada, onde foram necessários 48,0 mL de diclorometano para cada amostra preparada. QuEChERS e ELL-PBT tiveram um consumo de solvente intermediário, 4,0 e 8,0 mL de acetonitrila por amostra, respectivamente. O menor volume de solvente foi utilizado na MELLD, apenas 1,0 mL de acetonitrila contendo 50 μ L de tetracloreto de carbono foi necessário para extrair os

analitos alvos. Portanto, MELLD, QuEChERS e ELL-PBT reduziram em 98, 92 e 83% o consumo de solvente orgânico em relação a ELL, respectivamente.

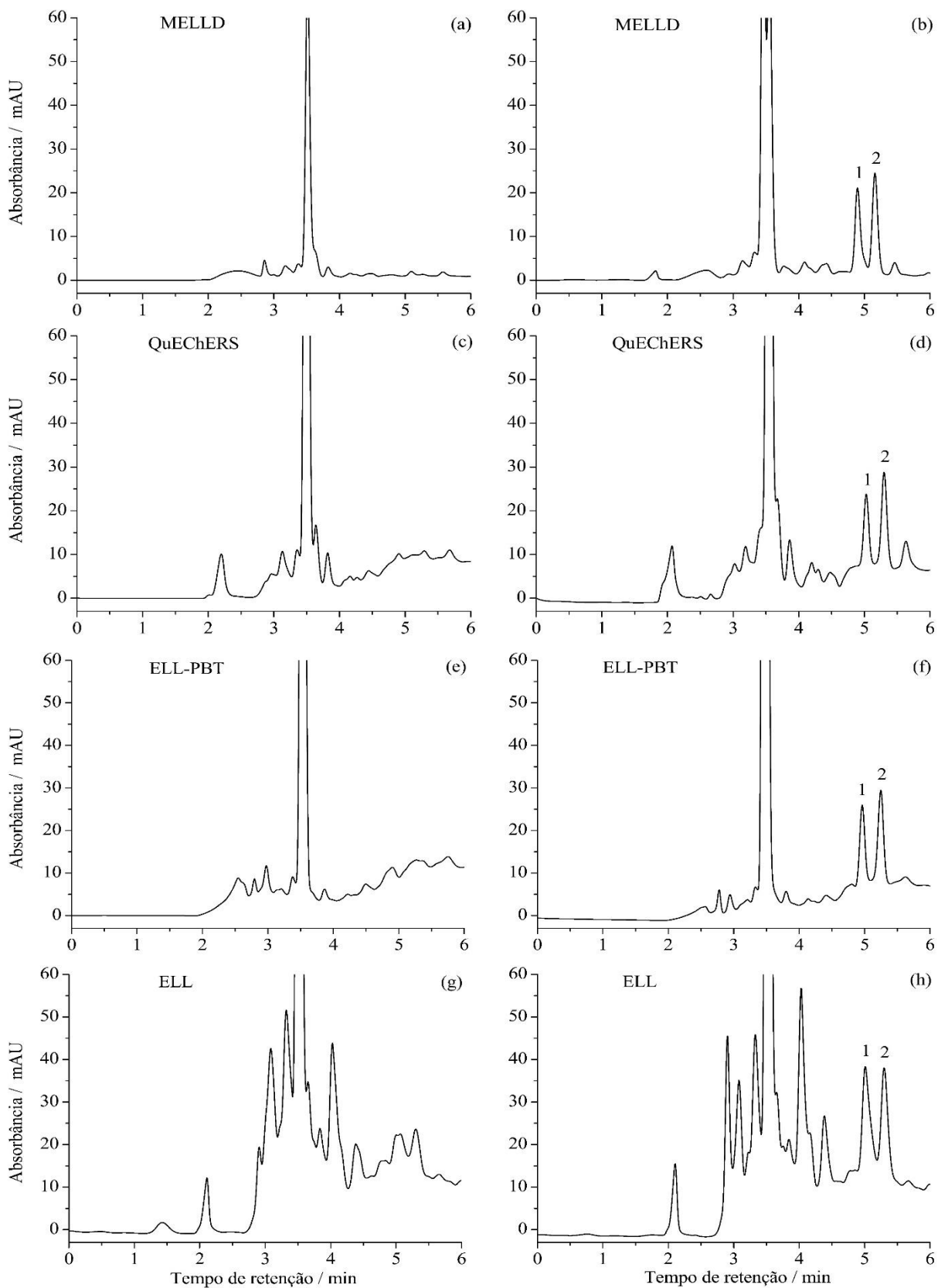
O consumo reduzido de solvente orgânico e, conseqüentemente, menor geração de resíduos tóxicos, tornou MELLD, QuEChERS e ELL-PBT uma alternativa mais sustentável em relação a ELL. Além disso, resultou em um ambiente mais seguro para o analista, gerando menos risco à saúde.

As quatro metodologias estudadas utilizaram solventes orgânicos grau CLAE que têm custos elevados. Portanto, o volume desses solventes também interferiu nos custos dessas metodologias. Assim, a ELL teve maior custo, pois utilizou o maior volume, 48,0 mL de diclorometano. Por outro lado, a MELLD utilizou o menor volume, apenas 1,0 mL de acetonitrila contendo 50 μ L de tetracloreto de carbono e, conseqüentemente, apresentou menor custo.

3.5.3. Seletividade

Os cromatogramas das amostras preparadas por MELLD apresentaram menos sinais de interferentes e menor elevação da linha de base em relação às demais metodologias, como pode ser observado na Figura 3.16 (a e b). Enquanto os cromatogramas das amostras preparadas por ELL apresentaram linhas de base elevadas e diversos sinais de interferentes (Figura 3.16 (g e h)).

Figura 3.16. Representação dos cromatogramas do extrato de matriz livre dos analitos alvos (a, c, e, g) e extrato da matriz fortificadas com 2,3,7,8-TCDF (composto 1) e 2,3,7,8-TCDD (composto 2) (b, d, f, h).



É importante ressaltar que as matrizes aquosas geralmente são limpas e, por essa razão, não foi necessário utilizar uma etapa de limpeza dos extratos. Entretanto, a ELL extraiu uma maior quantidade de co-extrativos e não foi seletiva para os compostos alvos (Figura 3.16 (g e h) (pg 140)) e, portanto, a adição de uma etapa de limpeza dos extratos será necessária para diminuir a quantidade desses interferentes para essa metodologia.

Apesar da pequena diferença entre os cromatogramas das amostras preparadas por MELLD, QuEChERS e ELL-PBT, é possível destacar a MELLD como a metodologia que apresentou cromatogramas com menos sinais de co-extrativos e esses foram menos intensos (Figura 3.16 (pg 140)).

3.5.4. Taxas de recuperação e desvio padrão relativo

As taxas de recuperação dos analitos alvos nas quatro metodologias de extração avaliadas estão apresentadas na Tabela 3.5 (pg 137). Todas as metodologias mostraram resultados semelhantes, sendo que as taxas de recuperação médias variaram de 93,5 a 105,5%. Esses resultados mostram que todas as metodologias estudadas foram eficientes para extração do 2,3,7,8-TCDF e 2,3,7,8-TCDD a partir de matrizes aquosas.

Os desvios padrões relativos (DPR) das quatro metodologias estudadas variaram 2,3 a 10,8% (Tabela 3.5 (pg 137)), confirmando que todas elas foram precisas. No entanto, os menores DPR para 2,3,7,8-TCDD foram obtidos utilizando MELLD (4,6%), enquanto ELL, QuEChERS e ELL-PBT alcançaram os menores DPR para 2,3,7,8-TCDF, 2,3, 2,4 e 2,9, respectivamente.

3.5.5. Limite de quantificação

As metodologias MELLD, QuEChERS e ELL-PBT apresentaram LQ na faixa de 2,4 a 5,3 $\mu\text{g L}^{-1}$ para ambos os compostos (Tabela 3.5 (pg 137)), portanto, os seus resultados foram semelhantes. A diferença entre os limites de quantificação pode estar associada à eficiência de extração dos analitos alvos (HAIMOVICI *et al.*, 2016). Entretanto, as taxas de recuperação das três metodologias foram similares, todas próximas a 100% (Tabela 3.5 (pg 137)).

O sistema de detecção também influencia os valores desse parâmetro. Técnicas mais sensíveis como cromatografia em fase gasosa de alta resolução com espectrometria de massas de alta resolução possibilitam menor LQ (TITATO & LANÇAS, 2006). Contudo, nessa

comparação todas as metodologias utilizaram a mesma técnica de detecção, CLAE-DAD. Portanto, a interferência dessa variável foi descartada.

3.5.6. Linearidade

A linearidade foi avaliada para todas as metodologias estudadas, exceto ELL. MELLD, QuEChERS e ELL-PBT foram lineares nas faixas de 5,3 a 45,3, 4,8 a 40,8 e 2,4 a 5,4 $\mu\text{g L}^{-1}$ (SICUPIRA *et al.*, 2019) para os dois analitos alvos, respectivamente (Tabela 3.5 (pg 137)). Em todas as metodologias o coeficiente de determinação foi superior a 0,97.

4. CONCLUSÃO

A utilização da MELLD para a determinação de 2,3,7,8-TCDD e 2,3,7,8-TCDF foi descrita pela primeira vez neste estudo. A MELLD foi mais simples, teve número reduzido de etapas e menor tempo de extração em relação as metodologias QuEChERS, ELL-PBT e ELL. Além disso, apresentou menor consumo de solventes orgânicos, menor tempo de preparo de amostra e cromatogramas com menos sinais de interferentes. Portanto, a MELLD pode ser sugerida como a metodologia mais adequada para preparar amostras de água para determinação simultânea de 2,3,7,8-TCDD e 2,3,7,8-TCDF. A validação das metodologias otimizadas garantiu a qualidade e confiabilidade dos resultados. Foi possível afirmar que as metodologias MELLD, QuEChERS e ELL-PBT possuem taxas de recuperação elevadas, são precisas, exatas, lineares e seletivas para os compostos alvos e possuem LQ similares. A ELL também apresentou taxas de recuperação elevadas, entretanto não foi seletiva para os compostos estudados.

5. REFERÊNCIAS

AIDA-YASUOKA, K. *et al.* The role of prostaglandin E2 receptor EP1 in 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-induced neonatal hydronephrosis in mice. **Toxicology**, v. 415, p. 10–17, mar. 2019.

ANASTASSIADES, M. *et al.* Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. **Journal of AOAC International**, v. 86, n. 2, p. 412–431, apr. 2003.

ANDRADE, V. F. *et al.* Fast extraction of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxin and polychlorinated dibenzofuran in sewage sludge and soil samples. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 52, n. 4, p. 267–273, apr. 2017.

AVINO, P. *et al.* New protocol based on high-volume sampling followed by DLLME-GC-IT/MS for determining PAHs at ultra-trace levels in surface water samples. **Microchemical Journal**, v. 133, p. 251–257, jul. 2017.

BEDASSA, T.; GURE, A.; MEGERSA, N. Low density solvent based dispersive liquid-liquid microextraction and preconcentration of multiresidue pesticides in environmental waters for liquid chromatographic analysis. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 70, n. 10, p. 1199–1206, oct. 2015.

BRAUNE, B. M.; MALLORY, M. L. Declining trends of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins, dibenzofurans and non-ortho PCBs in Canadian Arctic seabirds. **Environmental Pollution**, v. 220, p. 557–566, jan. 2017.

BRONDI, S. H. G. *et al.* Evaluation of the QuEChERS Method and Gas Chromatography–Mass Spectrometry for the Analysis Pesticide Residues in Water and Sediment. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 86, n. 1, p. 18–22, jan. 2011.

CALDAS, S. S.; COSTA, F. P.; PRIMEL, E. G. Validation of method for determination of different classes of pesticides in aqueous samples by dispersive liquid–liquid microextraction with liquid chromatography–tandem mass spectrometric detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 665, n. 1, p. 55–62, apr. 2010.

CHAKRABORTY, P. *et al.* PCBs and PCDD/Fs in soil from informal e-waste recycling sites and open dumpsites in India: Levels, congener profiles and health risk assessment. **Science of The Total Environment**, v. 621, p. 930–938, apr. 2018.

CHAMKASEM, N.; HARMON, T. Direct determination of glyphosate, glufosinate, and AMPA in soybean and corn by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 408, n. 18, p. 4995–5004, jul. 2016.

CUI, S. *et al.* Ultra-Preconcentration and Determination of Multiple Pesticide Residues in Water Samples Using Ultrasound-Assisted Dispersive Liquid–Liquid Microextraction and GC-FID. **Chromatographia**, v. 76, n. 11–12, p. 671–678, jun. 2013.

DE SOUZA, S. V. C.; JUNQUEIRA, R. G. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. **Analytica Chimica Acta**, v. 552, n. 1–2, p. 25–35, nov. 2005.

DELLA-FLORA, A. *et al.* Fast, cheap and easy routine quantification method for atrazine and its transformation products in water matrixes using a DLLME-GC/MS method. **Analytical Methods**, v. 10, n. 45, p. 5447–5452, 2018.

DUARTE, J. DA S.; DORES, E. F. G. DE C.; VILLA, R. D. Microextração líquido-líquido dispersiva assistida por vortex e ultrassom aplicada à determinação de agrotóxicos triazinas, triazinonas e o triazol flutriafol em água. **Química Nova**, v. 39, n. 8, p. 925-931, 2016

EUROPEAN COMMISSION (EC). **Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed**. SANTE/11813, 2017.

FARAJZADEH, M. A.; VARDAST, M. R.; BAHRAM, M. Optimization of Dispersive Liquid–Liquid Microextraction of Irganox 1010 and Irgafos 168 from Polyolefins Before Liquid Chromatographic Analysis. **Chromatographia**, v. 69, n. 5–6, p. 409–419, mar. 2009.

FERNÁNDEZ, A. E.; SOSA FERRERA, Z.; SANTANA RODRÍGUEZ, J. J. Application of cloud-point methodology to the determination of polychlorinated dibenzofurans in sea water by high-performance liquid chromatography. **The Analyst**, v. 124, n. 4, p. 487–491, 1999.

FERREIRA, J. A. *et al.* Determination of pesticides in coconut (*Cocos nucifera* Linn.) water and pulp using modified QuEChERS and LC–MS/MS. **Food Chemistry**, v. 213, p. 616–624, dec. 2016.

GHANI, S. B. A.; HANAFI, A. H. QuEChERS method combined with GC–MS for pesticide residues determination in water. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 71, n. 5, p. 508–512, may 2016.

HADDAD, A.; MOQBEL, S.; ABDELHADI, M. Evaluating the effect of rain on the fate of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins (PCDDs) and polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) accumulated in polluted trees in Amman, Jordan. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 11, p. 10644–10653, apr. 2018.

HAIMOVICI, L. *et al.* A modified QuEChERS approach for the screening of dioxins and furans in sediments. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 408, n. 15, p. 4043–4054, jun. 2016.

HANANO, A. *et al.* The cytochrome P450BM-1 of *Bacillus megaterium* A14K is induced by 2,3,7,8-Tetrachlorinated dibenzo-*p*-dioxin: Biophysical, molecular and biochemical determinants. **Chemosphere**, v. 216, p. 258–270, feb. 2019.

HU, M. *et al.* Method Development and Validation of Indaziflam and Its Five Metabolites in Soil, Water, and Fruits by Modified QuEChERS and UHPLC-MS/MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, n. 39, p. 10300–10308, oct. 2018.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE (ICH). **Validation of analytical procedures: text and methodology Q₂ (R₁)**. Geneva, Suíça, 2010.

KACHHAWAHA, A. S. *et al.* Optimization of a Modified QuEChERS Method for Multiresidue Analysis of Pharmaceuticals and Personal Care Products in Sewage and Surface Water by LC-MS/MS. **Journal of AOAC International**, v. 100, n. 3, p. 592–597, may 2017.

KAIUM, A. *et al.* Validation of QuEChERS-based UPLC-MS/MS method for determination of quinoid niclosamide (LDS) residue in water, soil and rice samples. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 98, n. 7, p. 644–654, may 2018.

LU, F. *et al.* Levels and profiles of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxin and dibenzofurans in raw and treated water from water treatment plants in Shenzhen, China. **Environmental Pollution**, v. 211, p. 233–240, apr. 2016.

MARTINS, M. L. *et al.* Determination of pesticides and related compounds in water by dispersive liquid–liquid microextraction and gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry. **Analytical Methods**, v. 6, n. 14, p. 5020, 2014.

MCCULLOCH, R. *et al.* A novel atmospheric pressure photoionization – Mass spectrometry (APPI-MS) method for the detection of polychlorinated dibenzo P- dioxins and dibenzofuran homologues in real environmental samples collected within the vicinity of industrial incinerators. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 421, p. 135–143, oct. 2017.

MESQUITA, T. C. R. *et al.* Easy and fast extraction methods to determine organochlorine pesticides in sewage sludge, soil, and water samples based at low temperature. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 53, n. 3, p. 199–206, mar. 2018.

METELKOVA, L. *et al.* Occurrence of PCDD/PCDFs, dioxin-like PCBs, and PBDEs in surface sediments from the Neva River and the Eastern Gulf of Finland (Russia). **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 8, p. 7375–7389, mar. 2019.

NAKISA, A. *et al.* Determination of the most toxic polychlorodibenzofurans in fresh milk from Southwest Iran. **Food and Nutrition Sciences**, v. 06, p. 955, 2015.

NUNES, C. M. *et al.* Reference Material for the Determination of Polychlorodibenzo-*p*-dioxins, Polychlorodibenzo-furans, and Polychlorinated Biphenyls in Fish: Production Process, Homogeneity, and Stability. **Food Analytical Methods**, v. 11, n. 3, p. 808–823, mar. 2018.

PASTOR-BELDA, M. *et al.* Dispersive liquid–liquid microextraction for the determination of new generation pesticides in soils by liquid chromatography and tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1394, p. 1–8, may 2015.

PINTO, E.; SOARES, A. G.; FERREIRA, I. M. P. L. V. O. Quantitative analysis of glyphosate, glufosinate and AMPA in irrigation water by in situ derivatization–dispersive liquid–liquid microextraction combined with UPLC-MS/MS. **Analytical Methods**, v. 10, n. 5, p. 554–561, 2018.

REZAEI, M. *et al.* Determination of organic compounds in water using dispersive liquid–liquid microextraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1116, n. 1–2, p. 1–9, may 2006.

REZAEI, M.; YAMINI, Y.; FARAJI, M. Evolution of dispersive liquid–liquid microextraction method. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 16, p. 2342–2357, apr. 2010.

REZAEI, M. *et al.* Determination of Polychlorinated Dibenzo Dioxin Levels in Fresh Milk from the Dairy Factories of Southwest Iran. **Journal of Environmental & Analytical Toxicology**, v. 5, n. 5, 2015.

ROBLES-MOLINA, J. *et al.* Comparative evaluation of liquid–liquid extraction, solid-phase extraction and solid-phase microextraction for the gas chromatography–mass spectrometry determination of multiclass priority organic contaminants in wastewater. **Talanta**, v. 117, p. 382–391, dec. 2013.

SADEGHI, R. *et al.* Validation of an Analytical Method for Determination of 13 priority polycyclic aromatic hydrocarbons in mineral water using dispersive liquid-liquid microextraction and GC-MS. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 15, p. 157–168, 2016.

SANZ, C. P.; FERREIRA, Z. S.; RODRÍGUEZ, J. J. S. Extraction and preconcentration of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins using the cloud-point methodology: Application to their determination in water samples by high-performance liquid chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v. 470, n. 2, p. 205–214, oct. 2002.

SAPPINGTON, E. N.; BALASUBRAMANI, A.; RIFAI, H. S. Polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and polychlorinated dibenzofurans (PCDD/Fs) in municipal and industrial effluents. **Chemosphere**, v. 133, p. 82–89, aug. 2015.

SCHATOWITZ, B. *et al.* Dioxin emissions from wood combustion. **Chemosphere**, v. 29, n. 9–11, p. 2005–2013, nov. 1994.

SHI, J.-W. *et al.* Development of a screening method for the determination of PCBs in water using QuEChERS extraction and gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry. **Analytical Sciences: The International Journal of the Japan Society for Analytical Chemistry**, v. 28, n. 2, p. 167–173, 2012.

SICUPIRA, L. C. *et al.* Simultaneous Determination of 2,3,7,8-TCDD and 2,3,7,8-TCDF in Water Samples by LLE-LTP and HPLC-DAD. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 30, n. 6, 1284-1292, 2019.

SIKITI, P. *et al.* Simultaneous determination of tetrachloro dibenzo-*p*-dioxin and poly-aromatic chlorinated biphenyls in aqueous environment using liquid phase microextraction. **Physics and Chemistry of the Earth, Parts A/B/C**, v. 50–52, p. 98–103, 2012.

SIRIMANNE, S. R. *et al.* Quantification of polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins in human serum by combined micelle-mediated extraction (cloud-point extraction) and HPLC. **Analytical Chemistry**, v. 68, n. 9, p. 1556–1560, may 1996.

SOUZA, D. M.; REICHERT, J. F.; MARTINS, A. F. A simultaneous determination of anti-cancer drugs in hospital effluent by DLLME HPLC-FLD, together with a risk assessment. **Chemosphere**, v. 201, p. 178–188, jun. 2018.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, n. 5, p. 835–855, jan. 2002.

TITATO, G. M.; LANÇAS, F. M. Optimization and Validation of HPLC-UV-DAD and HPLC-APCI-MS Methodologies for the Determination of Selected PAHs in Water Samples. **Journal of Chromatographic Science**, v. 44, n. 1, p. 35–40, jan. 2006.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (US EPA). **Method 1613: tetra-through octa-chlorinated dioxins and furans by isotope dilution HRGC/HRMS**. Engineering and Analysis Division (4303), Washington D.C., USA, 1994.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (US EPA). **National primary drinking water regulations**. May 2009. Disponível em: <https://www.epa.gov/ground-water-and-drinking-water>. Acesso em: junho 2018.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (US EPA). **Definition and procedure for the determination of the method detection limit, revision 2**. Washington D.C., USA, 2016.

VALLEJO, M. *et al.* Overview of the PCDD/Fs degradation potential and formation risk in the application of advanced oxidation processes (AOPs) to wastewater treatment. **Chemosphere**, v. 118, p. 44–56, jan. 2015.

VERBRUGGE, L. A.; KAHN, L.; MORTON, J. M. Pentachlorophenol, polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and polychlorinated dibenzo furans in surface soil surrounding pentachlorophenol-treated utility poles on the Kenai National Wildlife Refuge, Alaska USA. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 19, p. 19187–19195, jul. 2018.

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

WANG, K. D.; CHEN, P.-S.; HUANG, S.-D. Simultaneous derivatization and extraction of chlorophenols in water samples with up-and-down shaker-assisted dispersive liquid–liquid microextraction coupled with gas chromatography/mass spectrometric detection. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 406, n. 8, p. 2123–2131, mar. 2014.

WU, R. N. *et al.* Analysis of patulin in apple products by liquid–liquid extraction, solid phase extraction and matrix solid-phase dispersion methods: a comparative study. **European Food Research and Technology**, v. 228, n. 6, p. 1009–1014, apr. 2009.

WU, X. *et al.* Determination of Herbicide Propisochlor in Soil, Water and Rice by Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe (QuEChERS) Method Using by UPLC-ESI-MS/MS. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, v. 34, n. 3, p. 917–921, mar. 2013.

YANG, J. S.; WOON LEE, D.; LIM, H. Microwave-Assisted Extraction (MAE) of Polychlorinated Biphenyls and Polychlorinated Dibenzo- *p* -Dioxins from Fly Ash and Sea Sediments: Effect of Water and Removal of Interferences. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 26, n. 5, p. 803–818, apr. 2003.

YANG, M. *et al.* Determination of 26 endocrine disrupting chemicals in fish and water using modified QuEChERS combined with solid-phase extraction and UHPLC-MS/MS. **Analytical Methods**, v. 7, n. 19, p. 8418–8431, 2015.

ZHAO, R.S. *et al.* Determination of triclosan and triclocarban in environmental water samples with ionic liquid/ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction prior to HPLC-ESI-MS/MS. **Microchimica Acta**, v. 174, n. 1–2, p. 145–151, jul. 2011.

ZHOU, Q.; PANG, L.; XIAO, J. Trace determination of dichlorodiphenyltrichloroethane and its main metabolites in environmental water samples with dispersive liquid–liquid microextraction in combination with high performance liquid chromatography and ultraviolet detector. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 39, p. 6680–6684, sep. 2009.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A MELLD foi utilizada pela primeira para a determinação de 2,3,7,8-TCDD e 2,3,7,8-TCDF e as metodologias QuEChERS e ELL-PBT foram aplicadas pela primeira vez para recuperar esses compostos a partir de matrizes aquosas. A MELLD apresentou superioridade em relação as metodologias QuEChERS, ELL-PBT e ELL devido a sua simplicidade, menor consumo de solventes orgânicos, menor tempo de preparo de amostra e cromatogramas com menos sinais de interferentes. Foi possível estabelecer as condições ideais para quantificar simultaneamente 2,3,7,8-TCDD e 2,3,7,8-TCDF por CLAE-DAD. Assim como, otimizar e validar as metodologias MELLD, QuEChERS e ELL-PBT para a extração desses compostos em água. A validação das metodologias otimizadas permitiu certificar a qualidade e confiabilidade dos resultados obtidos neste estudo. As principais características apresentadas pelas três metodologias otimizadas e validadas foram taxas de recuperação elevadas, precisão, exatidão, linearidade, seletividade e extratos limpos sem a necessidade da etapa de “limpeza” dos extratos. A ELL também possui taxas de recuperação elevadas, entretanto não foi seletiva para os compostos estudados. Os limites de quantificação encontrados para essas metodologias são similares a outras metodologias que utilizaram os mesmos sistemas de detecção, no entanto, não foi possível quantificar os compostos alvos em amostras reais com os limites de quantificação alcançados.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (420637 / 2016-8 e 308480/2019-8), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) (APQ-01429-16), à Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), à Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM), ao Instituto de Engenharia, Ciência e Tecnologia da UFVJM (Campus Janaúba). O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.