# 4 Resultados e discussão

# 4.1. Espectroscopia de fluorescência molecular

# 4.1.1. Determinação dos comprimentos de onda de excitação e emissão

Para determinação do melhor comprimento de onda de excitação ( $\lambda_{exc}$ ) e emissão ( $\lambda_{em}$ ) foram obtidos espectros de excitação mantendo  $\lambda_{em}$  fixo e variando  $\lambda_{exc}$  de 200 a 400 nm.

Os comprimentos de onda de excitação e emissão citados na Literatura para análise do 1-hidroxipireno variam e diversos autores usam valores diferentes para sua análise. Por exemplo, Vuontisjärvi e colaboradores (2004) e Ariese e colaboradores (2005) indicam o par 346/384 nm. Já Richardson e colaboradores (2001) utilizaram o par 243/388 nm. Ariese e colaboradores (1993), em outro trabalho, utilizaram o par 345/395 nm.

Para determinar os comprimentos de onda de excitação e emissão que seriam utilizados neste trabalho, foi feito um espectro de varredura do 1hidroxipireno em espectrofluorímetro e foi determinado o melhor par de comprimentos de onda de excitação/emissão para este HPA. Pode-se observar pelo espectro obtido que os picos de excitação e emissão que têm intensidades correspondentes estão em 345 e 387 nm (Figura 13). Assim, apesar de diferente do descrito na Literatura, utilizou-se esse par de comprimentos de onda de excitação e emissão nas medições no espectrofluorímetro e no HPLC.

Foram utilizadas as bandas espectrais de passagem de excitação e emissão de 10 nm.



Figura 13-Espectro de varredura do 1-hidroxipireno em espectrofluorímetro.

# 4.1.2. Curva analítica no espectrofluorímetro

A Figura 14 mostra os espectros de emissão obtidos das soluções-padrão para uma curva analítica, com intensidade de sinal em unidades arbitrárias (u.a.). Os dados obtidos para as curvas estão listados na Tabela 7. A Figura 15 mostra a curva analítica obtida.



Figura 14-Espectros de fluorescência para os padrões de 1-hidroxipireno.

Concentração	Intensidade (u.a.)	Intensidade (u.a.)	Intensidade (u.a.)
(ng mL⁻¹)	Curva 1	Curva 2	Curva 3
1	110,47	118,16	112,93
2	188,29	212,61	170,57
4	321,26	391,99	332,61
8	632,72	653,75	625,01
12	861,45	834,48	868,77

Tabela 7-Dados obtidos para curva analítica do 1-hidroxipireno em fluorímetro.



Figura 15-Curva analítica do 1-hidroxipireno obtida por fluorescência.

A equação da reta obtida foi y = 68.056x + 61.502, com R<sup>2</sup> = 0.9906.

A Tabela 8 mostra os valores dos coeficientes angular e linear e do coeficiente de correlação para cada curva separadamente.

Curva	Coeficiente angular	Coeficiente linear	R <sup>2</sup>
1	69,166	49,341	0,9967
2	65,093	90,695	0,9823
3	69,909	44,47	0,9977

Tabela 8-Parâmetros das curvas analíticas da fluorescência.

# 4.1.3. Parâmetros de validação do método em fluorescência

# 4.1.3.1. Linearidade

A Tabela 9 mostra o resultado da análise de variância.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F
Regressão	1	1156055	1156055	1365,34
Resíduo	13	11007	847	
Ajuste	3	6105	2035	4,15
Erro puro	10	4902	490	
Total	14	1167063		

Comparando-se o valor de F do ajuste com o tabelado para o nível de significância de 5%, observa-se que F = 4,15 >  $F_{5\% (3,10)}$  = 3,71. Portanto, a relação entre a resposta e a concentração não poderia ser considerada linear. Apesar disto, como o ajuste foi considerado bom ( $R^2$  > 0,99), decidiu-se aceitar a relação da resposta com a concentração como linear.

# 4.1.3.2. Faixa de trabalho

A faixa de trabalho utilizada nesta técnica foi de 1,4 ng mL<sup>-1</sup> a 12 ng mL<sup>-1</sup>.

# 4.1.3.3. Sensibilidade

O resultado da análise de regressão feita no software Microsoft Office Excel 2003 está representado na Tabela 10.

#### Tabela 10-Estatística de regressão.

Estatística de regressão							
R múltiplo	0,995273						
R-Quadrado	0,99056834						
R-quadrado ajustado	0,98984283						
Erro padrão	29,0984288						
Observações	15						
ANOVA							
	gl	SQ	MQ	F	F de significação		
Regressão	1	1156055,5	1156055	1365,34	1,49015E-14		
Resíduo	13	11007,341	846,7186				
Total	14	1167062,8					
	Coeficientes	Erro padrão	Stat t	valor-P	95% inferiores	95% superiores	Inferior 95,0%
Interseção	61,5017388	12,464647	4,934094	0,00027	34,57351099	88,42996658	34,57351099
Variável X 1	68,0560978	1,8418203	36,95046	1,5E-14	64,07708773	72,03510778	64,07708773

Portanto, a sensibilidade do método é 68,06 u.a. mL ng<sup>-1</sup>.

# 4.1.3.4. Limite de detecção

Para cálculo do limite de detecção, também são utilizados os dados obtidos pela análise de regressão, dispostos na Tabela 10. O valor de do limite de detecção foi calculado conforme fórmula do item 3.4.4.4, onde o valor de s é a estimativa do desvio-padrão da equação da linha de regressão, dada pelo valor do erro padrão obtido na estatística de regressão; o valor de S é a inclinação da reta. O valor encontrado para limite de detecção foi 1,41 ng mL<sup>-1</sup>.

# 4.1.3.5. Limite de quantificação

Para cálculo do limite de quantificação, também são utilizados os dados obtidos pela análise de regressão, dispostos na Tabela 10. O valor de do limite de quantificação foi calculado conforme fórmula do item 3.4.4.5, onde o valor de s é a estimativa do desvio-padrão da equação da linha de regressão, dada pelo valor do erro padrão obtido na estatística de regressão; o valor de S é a inclinação da reta. O valor encontrado para limite de guantificação foi 4,27 ng mL<sup>-1</sup>.

Superior

95,0%

88,42996658

72.03510778

65

# 4.1.3.6. Precisão

# 4.1.3.6.1. Repetitividade

A Tabela 11 mostra os resultados obtidos para determinação da repetitividade do método.

Tabela 11-Resultados para avaliação do parâmetro repetitividade.

		Concentração em
		equivalente de 1-
Leitura	Intensidade (ua)	hidroxipireno (ng mL <sup>-1</sup> )
1	521,23	6,76
2	581,00	7,63
3	546,94	7,13
4	584,75	7,69
5	553,77	7,23
6	615,63	8,14
7	593,28	7,81
Média	570,94	7,49
Desvio-padrão	31,96	0,47

Utilizando-se os resultados mostrados na Tabela 11, a repetitividade do método foi calculada e foi obtido o valor de 6,3%.

# 4.1.3.6.2. Reprodutibilidade

A Tabela 12 mostra os resultados obtidos por dois analistas diferentes para cálculo da reprodutibilidade do método e a Tabela 13 mostra a planilha com a memória do cálculo.

	Intensidad	de (ua)	Concentração em equivalente de 1-hidroxipireno (ng mL <sup>-1</sup> )		
Leitura	Analista 1	Analista 2	Analista 1	Analista 2	
1	521,23	563,63	6,76	7,31	
2	581,00	571,05	7,63	7,42	
3	546,94	568,31	7,13	7,38	
4	584,75	587,17	7,69	7,66	
5	553,77	586,27	7,23	7,65	
6	615,63	578,5	8,14	7,53	
7	593,28	579,7	7,81	7,55	
Média	570,94	576,37	7,49	7,50	
Desvio-padrão	31,96	9,00	0,47	0,13	

#### Tabela 12-Resultados para avaliação do parâmetro reprodutibilidade.

Tabela 13-Planilha com memória de cálculo do tratamento estatístico para avaliação da reprodutibidade.

Anova: fator único

#### RESUMO

Grupo	Contagem	Soma	Média	Variância
Analista 1	7	52,3992888	7,485613	0,22058824
Analista 2	7	52,5196239	7,502803	0,01758886

#### ANOVA

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	0,001034323	1	0,001034	0,00868533	0,92728645	4,747221
Dentro dos grupos	1,429062618	12	0,119089			
Total	1,430096941	13				

Com os dados apresentados na tabela acima, o cálculo da reprodutibilidade do método foi feito e os valores obtidos estão na Tabela 14.

Tabela 14-Resultado da reprodutibilidade do método.

s <sup>2</sup> entre	-0,0168649
s <sup>2</sup> r	0,11909
s <sup>2</sup> <sub>R</sub>	0,10222
Repro	0,8952 ng mL⁻¹

Em termos de porcentagem, a reprodutibilidade do método foi de 12%.

# 4.1.3.7. Incerteza de medição

Inicialmente, fez-se o diagrama de causa-efeito, prevendo as principais possíveis fontes de incertezas ligadas à técnica aqui apresentada, conforme mostra a Figura 16.



Figura 16-Diagrama de causa-efeito para a técnica fluorimétrica.

O cálculo da incerteza foi desenvolvido por partes: primeiro, foram feitos os cálculos das incertezas da concentração-estoque e dos fatores de diluição, que foram utilizados para calcular a incerteza das concentrações diluídas; em seguida, foram feitos os cálculos das incertezas da curva analítica, da repetitividade e da reprodutibilidade.

## A) Incerteza da concentração-estoque

1. Mensurando: CE

$$CE = \frac{m * P}{V}$$
, onde

- CE é a concentração-estoque
- m é a massa pesada

- P é a pureza do padrão
- V é o volume da solução
- 2. Diagrama causa-efeito



3. Incertezas das grandezas de entrada



$$\mu_{\scriptscriptstyle bal}= {U_{\scriptscriptstyle bal} \over K}$$
 , onde

- µ<sub>bal</sub> é a incerteza do tipo B (certificado) associada à balança

- U<sub>bal</sub> é a incerteza expandida declarada no certificado da balança

- K é o fator de abrangência declarado no certificado da balança

$$\mu_{rep} = \frac{s}{\sqrt{n}}$$
, onde

-  $\mu_{rep}$  é a incerteza do tipo A (repetições) associada à balança

- s é o desvio padrão calculado

- n é o número de replicatas

A incerteza combinada para a grandeza de entrada massa será:

$$\mu_m = \sqrt{(\mu_{bal}^2 + \mu_{rep}^2)}$$

$$\mu_{volume} = \frac{U_{balão}}{K}$$

-  $\mu_{volume}$  é a incerteza do tipo B (certificado) associada ao balão volumétrico

- U<sub>balão</sub> é a incerteza expandida extraída do certificado

- K é o fator de abrangência, igual a 2 para um nível de confiança de 95%

iii) Pureza

$$\mu_{pur} = a/\sqrt{3}$$

-  $\mu_{pur}$  é a incerteza associada à pureza do padrão

- a é a estimativa em relação à declaração do fabricante

#### 4. Coeficientes de sensibilidade

$$\frac{\partial CE}{\partial m} = \frac{P}{V}$$
$$\frac{\partial CE}{\partial V} = \frac{m * P}{V^2}$$
$$\frac{\partial CE}{\partial P} = \frac{m}{V}$$

5. Componentes da incerteza

$$\mu_{CE(m)} = \frac{P}{V} * \mu_m$$

$$\mu_{CE(V)} = \frac{P * m}{V^2} * \mu_V$$

$$\mu_{CE(P)} = \frac{m}{V} * \mu_P$$

6. Combinação das incertezas

$$\mu_{C(CE)} = \sqrt{\mu_{CE(m)}^2 + \mu_{CE(V)}^2 + \mu_{CE(P)}^2}$$

7. Graus de liberdade efetivos

$$v_{eff} = \frac{\mu_c^4(y)}{\sum_{i=1}^{N} \frac{(c_i * \mu(x_i))^4}{V_i}}, \text{ onde}$$

- $\mu_c$  é a incerteza combinada
- ci são os coeficientes de sensibilidade
- µxi são as incertezas das grandezas de entrada
- vi é o número de graus de liberdade das grandezas de entrada
- 8. Fator de abrangência

Tabelado para determinada probabilidade de abrangência e número de graus de liberdade efetivo.

9. Incerteza expandida

$$U = \kappa_{v,p} * \mu_c$$
, onde

- U é a incerteza expandida
- $\kappa_{\nu,p}$ é o fator de abrangência para o número de graus de liberdade efetivo e
- a probabilidade desejados
- $\mu_c$  é a incerteza combinada

A planilha com a memória de cálculo da incerteza associada à concentração-estoque está demonstrada na Tabela 15.

Tabela 15-Planilha com memória de cálculo da incerteza associada à concentração estoque.

							-
1	Mensurando	1.0E+04	ng mL <sup>-1</sup>				
2	Grandezas de	entrada					
	massa	1.0E+06	ng				
	pureza	1	0				
	volume	100	ml				
	volume	100					
3	Fontes de ince	erteza					
	massa						
	repetiçao	51.90	ng	desvio-padrao		n=	10
	balanca	20000	ng	fabricante	P =	95% k= 2	
	pureza		0				
	fabricante	0.04		Inf nobre	Dist Retand	1 732050808	
	volume	0.04			Dist. Hotang	1.702000000	
	fobriogeto	0.050	ml	aartifiaada	K	2.0	
	labricante	0.050	IIIL	centricado	r =	2.0	
4	Incerteza das	grandezas de ei	ntrada				
	massa	10 11107017					
	uim (repe)	16.4113/81/	ng				
	u2m	10000					
	(balança)	10000	ng				
	um (combinado)	10000 01347	na				
	(combinado)	10000.01347	ng				
	pureza	0.0000.001.1					
	up	0.023094011					
	volume						
	uv (fab)	0.025	mL				
5	Coeficientes d	e sensibilidade					
Ũ	oi (m)	0.01	ml <sup>-1</sup>				
		0.01	· · -1				
	сі (р)	10000	ng mL '				
	ci (v)	100	ng mL <sup>-2</sup>				
6	Componentes	de incerteza					
0			1				
	uC(m)	100.00	ng m∟				
	uC(P)	230.94	ng mL <sup>-</sup> '				
	uC(v)	2.50	ng mL <sup>-1</sup>				
_							
7	Incerteza com	binada		_			
	uc(C)	251.67	ng mL <sup>-1</sup>				
~	Output de l'han	de de					
8	Graus de liber	dade					
	v	4.97752E+13					
0	Eatar da abran	aônaia					
9							
	ĸ	1.96					
	the second s	a all'al a					
10	incerteza expa	indida					
	U(1,96;95%)	493.28	ng mL⁻¹				_

Após obtenção dos valores de cada componente de incerteza, é possível construir um gráfico (Figura 17) para comparar as contribuições de cada componente. A partir de sua análise, observa-se que a maior contribuição para a incerteza da concentração estoque é devida à pureza do padrão, sugerindo que em próximos estudos seja utilizado um padrão de maior pureza.



Figura 17-Gráfico de balanço das incertezas associadas à concentração estoque.

#### B) Incerteza dos fatores de diluição

O cálculo da incerteza deverá ser feito para cada um dos fatores de diluição utilizados. Neste trabalho, foram realizadas diluições a partir da solução estoque. Em princípio, foi feita uma solução intermediária diluindo-se a solução estoque na proporção de 1:25. Em seguida, a partir da solução intermediária, foram feitas soluções diluídas nas proporções 1:400, 1:200, 1:100,1:50 e 1:33. As etapas necessárias para o cálculo das incertezas são as mesmas para todos os fatores de diluição e estão demonstradas a seguir.

1. Mensurando: fi

$$f_i = \frac{V_f}{V_i}$$
, onde

- f<sub>i</sub> é o fator de diluição
- Vi é o volume inicial
- $V_{\rm f}$  é o volume final

## 2. Diagrama causa-efeito



3. Incertezas das grandezas de entrada

i) Incerteza do volume inicial

$$\mu_{Vi} = \frac{U_{pipeta}}{K}$$

- $\mu_{Vi}$  é a incerteza do volume inicial
- U<sub>pipeta</sub> é a incerteza expandida extraída do certificado da pipeta
- K é o fator de abrangência extraído do certificado da pipeta

ii) Incerteza do volume final

$$\mu_{vf} = \frac{U_{balão}}{K}$$

- $\mu_{Vf}$  é a incerteza associada ao volume final
- Ubalão é a incerteza expandida extraída do certificado do balão volumétrico
- K é o fator de abrangência extraído do certificado do balão volumétrico

4. Coeficientes de sensibilidade

$$\frac{\partial fi}{\partial Vf} = \frac{1}{Vi}$$
$$\frac{\partial fi}{\partial Vi} = \frac{Vf}{Vi^{-2}}$$

5. Componentes da incerteza

$$\mu_{_{fi(Vf)}} = \frac{1}{Vi} * \mu_{_{Vf}}$$

$$\mu_{fi(Vi)} = \frac{Vf}{Vi^2} * \mu_{Vi}$$

6. Combinação das incertezas

$$\mu_{C(fi)} = \sqrt{\mu_{fi(Vf)}^2 + \mu_{fi(Vi)}^2}$$

7. Graus de liberdade efetivos

$$v_{eff} = \frac{\mu_{c}^{4}(y)}{\sum_{i=1}^{N} \frac{(c_{i} * \mu(x_{i}))^{4}}{v_{i}}}$$
 , onder

-  $\mu_c$  é a incerteza combinada

- ci são os coeficientes de sensibilidade
- $\mu_{xi}$  são as incertezas das grandezas de entrada
- vi é o número de graus de liberdade das grandezas de entrada

# 8. Fator de abrangência

Tabelado para determinada probabilidade de abrangência e número de graus de liberdade efetivo.

### 9. Incerteza expandida

$$U = \kappa_{\nu,p} * \mu_c$$
, onde

- U é a incerteza expandida

-  $\kappa_{\nu,p}$ é o fator de abrangência para o número de graus de liberdade efetivo e

a probabilidade desejados

-  $\mu_c$  é a incerteza combinada

A Tabela 16, Tabela 17, Tabela 18, Tabela 19, Tabela 20 e Tabela 21 mostram os cálculos para determinação da incerteza para cada fator de diluição.

Tabela 16- Planilha com memória de cálculo para determinação da incerteza da diluição 1:25.

1	Mensurando			25	5		
2	Grandezas de e	entrada					
	vol frasco		25	mL			
	voi pipeta		I	m∟			
3	Fontes de incer	teza					
	<b>vol frasco</b> declaraçao do f	abricante			0,012	mL	k = 2,4
	<b>vol pipeta</b> declaraçao do f	abricante			0,002	mL	k = 2,32
4	Incertezas						
	vol frasco u1Vf (dec fab) vol pipeta	0,005	mL				
	u1vp (dec fab)	0,000862069	mL				
5	Coeficientes de	sensibilidade					
	Ci(Vfrasco)	1	mL <sup>-1</sup>				
	Ci(Vpipeta)	25	mL <sup>-1</sup>				
6	Componentes						
	uf25(Vfrasco) uf25(Vpipeta)	0,00500 0,02155	mL mL				
7	Incerteza comb	inada					
	uc(f25)	0,02212	mL				
8	Graus de liberd	ade					
	v	1000		Todas Então	as incerte grau de li	zas são do ti berdade é in	po B finito
9	fator de abrang <i>k</i>	<mark>ência</mark> 1,962339036		Foi es	timado um	valor alto	
10	incerteza expar U(1,96;95%)	n <mark>dida</mark> 0,04341503					

Tabela 17-	Planilha	com memo	ória de ca	álculo para	determinação	da incerteza	da diluição
1.00							

1:33	8.						
1	Mensurando			33,333			
2	Grandezas de e	entrada					
	vol frasco vol pipeta		10 0,3	mL mL			
3	Fontes de incer	teza					
	<b>vol frasco</b> declaraçao do f	abricante			0,005	mL	k = 2,4
	<b>vol pipeta</b> declaraçao do f	abricante			0,001	mL	k = 2,32
4	Incertezas						
	vol frasco u1Vf (dec fab) vol pipeta	0,002083333	mL				
	u1Vp (dec fab)	0,000431034	mL				
5	Coeficientes de	sensibilidade					
	Ci(Vfrasco) Ci(Vpipeta)	3,3333333333 111,1111111	mL⁻¹ mL⁻¹				
6	Componentes						
	uf33(Vfrasco) uf33(Vpipeta)	0,006944444 0,04789272	mL mL				
7	Incerteza comb	inada					
	uc(f33)	0,048393574	mL				
8	Graus de liberd v	<mark>ade</mark> 1000		Todas a	as incerte:	zas são do tir	oo B
9	<ul> <li>fator de abrangência</li> <li>k</li> <li>1,962339036</li> </ul>			Então, ( Foi esti	grau de lik mado um	perdade é inf valor alto	inito
10	incerteza expar U(1,96;95%)	n <mark>dida</mark> 0,094964599					

Tabela 18- Planilha com memória de cálculo para determinação da incerteza da diluição 1:50.

	-						
1	Mensurando			50	)		
2	Grandezas de e	entrada					
	vol frasco vol pipeta		10 0 2	mL ml			
3	Fontes de incer	teza	0,2				
0	T ONLES de moet	1020					
	<b>vol frasco</b> declaraçao do f	abricante			0,005	mL	k = 2,3
	<b>vol pipeta</b> declaraçao do f	abricante			0,00008	mL	k = 2,28
4	Incertezas						
	vol frasco u1Vf (dec fab) vol pipeta	0,002173913	mL				
	u1Vp (dec fab)	3,50877E-05	mL				
5	Coeficientes de	sensibilidade					
	Ci(Vfrasco)	5	mL <sup>-1</sup>				
	Ci(Vpipeta)	250	mL <sup>·</sup>				
6	Componentes						
	uf50(Vfrasco) uf50(Vpipeta)	0,010869565 0,00877193	mL mL				
7	Incerteza comb	inada					
	uc(f50)	0,013967613	mL				
8	Graus de liberd	ade		Todae	as incerto	zae eão do ti	no B
-	v c. l. l	1000		Então	, grau de lik	perdade é inf	inito
9	tator de abrang k	encia 1,962339036		⊦oi es	timado um	valor alto	
10	incerteza expar U(1,96;95%)	n <mark>dida</mark> 0,027409191					

Tabela 19- Planilha com memória de cálculo para determinação da incerteza da diluição 1:100.

1	Mensurando		F1	100				
2	Grandezas de entrada	a						
	vol frasco vol pipeta		10 0,1	mL mL				
3	Fontes de incerteza							
	<b>vol frasco</b> declaraçao do fabrica	nte			0,005	mL	k = 2,3	
	vol pipeta declaraçao do fabrica	nte			0,00008	mL	k = 2,28	
4	Incertezas							
	vol frasco u1Vf (dec fab) 0,002 vol pipeta u1Vp (dec fab) 3,500	2173913 877E-05	mL mL					
5	Coeficientes de sensi	bilidade						
U	Ci(Vfrasco)	10	mL <sup>-1</sup>					
	Ci(Vpipeta)	1000	mL⁻¹					
6	Componentes							
	uf100(Vfrasco) 0,02 uf100(Vpipeta) 0,035	2173913 5087719	mL mL					
7	Incerteza combinada							
	uc(f100)	0,0413	mL					
8	Graus de liberdade v	1000		Todas a	as incertez	zas são do tip	oo B	
9	fator de abrangência k 1,962	2339036		Foi esti	mado um	valor alto	inito	
10	incerteza expandida U(1.96:95%) 0.08(	)998211						

Tabela 20- Planilha com memória de cálculo para determinação da incerteza da diluição 1:200.

-							
1	Mensurando			200			
2	Grandezas de e	entrada					
	vol frasco vol pipeta		10 0.05	mL mL			
3	Fontes de incer	teza					
	<b>vol frasco</b> declaraçao do f	abricante			0.0056	mL	k = 2.5
	<b>vol pipeta</b> declaraçao do f	abricante			0.0001	mL	k = 2.32
4	Incertezas						
	vol frasco u1Vf (dec fab) vol pipeta u1Vp (dec fab)	0.00224 4.31034E-05	mL mL				
5	Coeficientes de	sensibilidade					
	Ci(Vfrasco) Ci(Vpipeta)	20 4000	mL⁻¹ mL⁻¹				
6	Componentes						
	uf200(Vfrasco) uf200(Vpipeta)	0.0448 0.172413793	mL mL				
7	Incerteza comb	inada					
	uc(f200)	0.178	mL				
8	Graus de liberd v	<mark>ade</mark> 1000		Todas a	as incerte	zas são do tipo	В
9	fator de abrang k	ência 1.962339036		Então, ( Foi esti	grau de li mado um	berdade é infini valor alto	to
10	incerteza expar U(1,96;95%)	n <mark>dida</mark> 0.349569404					

Tabela 21- Planilha com memória de cálculo para determinação da incerteza da diluição 1:400.

1	Mensurando		400				
2	Grandezas de entrada						
	vol frasco vol pipeta	10 0.025	mL mL				
3	Fontes de incerteza						
	vol frasco declaraçao do fabricante		(	0.0056	mL	k =	2.5
	vol pipeta declaraçao do fabricante		(	0.00004	mL	k =	2.32
4	Incertezas						
	vol frasco u1Vf (dec fab) 0.00224 vol pipeta u1Vp (dec fab) 1.72414E-05	mL mL					
5	Coeficientes de sensibilidade						
	Ci(Vfrasco) 40 Ci(Vpipeta) 16000	mL⁻¹ mL⁻¹					
6	Componentes						
	uf400(Vfrasco) 0.0896 uf400(Vpipeta) 0.275862069	mL mL					
7	Incerteza combinada						
	uc(f400) 0.290	mL					
8	Graus de liberdade v 1000		Todas as	s incertez	as são do tip	o B	
9	fator de abrangência k 1.962339036		Foi estim	ado um	valor alto	וונט	
10	incerteza expandida U(1.96:95%) 0.569173185						

# C) Incerteza das concentrações diluídas

a) Mensurando: C<sub>dil</sub>

$$C_{dil} = \frac{CE}{f_i}$$
, onde

- C<sub>dil</sub> é a concentração diluída
- CE é a concentração-estoque
- fi é o fator de diluição





c) Incerteza das grandezas de entrada

As incertezas das grandezas de entrada CE e f<sub>i</sub> já foram deduzidas em A e B do item 4.1.3.7, respectivamente, e são dadas por:

$$\mu_{\scriptscriptstyle C(CE)} = \sqrt{\mu_{\scriptscriptstyle CE(m)}^2 + \mu_{\scriptscriptstyle CE(V)}^2 + \mu_{\scriptscriptstyle CE(P)}^2 + \mu_{\scriptscriptstyle CE(PM)}^2} \; , \, \text{onde} \;$$

- µ<sub>C(CE)</sub> é a incerteza combinada associada à concentração-estoque

- µ<sub>CE(m)</sub> é a incerteza associada à concentração-estoque em relação à massa

-  $\mu_{\text{CE}(V)}$  é a incerteza associada à concentração-estoque em relação ao volume

- µ<sub>CE(P)</sub> é a incerteza associada à concentração-estoque em relação à pureza

-  $\mu_{CE(PM)}$  é a incerteza associada à concentração-estoque em relação ao peso molecular

$$\mu_{C(fi)} = \sqrt{\mu_{fi(Vf)}^2 + \mu_{fi(Vi)}^2}$$
, onde

-  $\mu_{C(fi)}$  é a incerteza combinada associada ao fator de diluição

-  $\mu_{fi(Vf)}$  é a incerteza associada ao fator de diluição em relação ao volume final

-  $\mu_{fi(Vi)}$  é a incerteza associada ao fator de diluição em relação ao volume inicial

d) Coeficientes de sensibilidade

$$\frac{\partial Cdil}{\partial CE} = \frac{1}{fi}$$
$$\frac{\partial Cdil}{\partial fi} = \frac{CE}{fi^{2}}$$

e) Componentes da incerteza

$$\mu_{Cdil(CE)} = \frac{1}{fi} * \mu_{CE}$$

$$\mu_{Cdil(fi)} = \frac{CE}{fi^2} * \mu_{fi}$$

f) Combinação das incertezas

$$\mu_{C(dil)} = \sqrt{\mu_{Cdil(CE)}^2 + \mu_{Cdil(fi)}^2}$$

A Tabela 22, Tabela 23, Tabela 24, Tabela 25 e Tabela 26 mostram os cálculos para determinação da incerteza de cada solução diluída.

1	Mensurando		C1	1.0 ng	g mL <sup>-1</sup>		
2	Grandezas de	entrada					C1=CE/(f25*f400)
	Conc estoque	1.0E+04 25	ng mL <sup>-1</sup>				
	f400	400					
3	Fontes de ince	rteza					
	Conc estoque						
	ucCE f25	251.67	ng mL⁻¹		k=	1.96	
	ucf25 f400	0.022124	mL		k=	1.96	
	ucf400	0.290	mL		k=	1.96	
4	Incertezas das	grandezas	de entrada				
	uCE	251.67	ng mL⁻¹				
	ucf25	0.022124	mL				
	ucf400	0.290	mL				
5	Coeficientes de	e sensibilida	ide				
	ci (CE)	0.0001					
	ci (f25)	0.04	ng mL⁻¹				
	ci (f400)	0.0025	ng mL <sup>-1</sup>				
6	Componentes						
	uC1 (CE)	0.025167	ng mL⁻¹				
	uC1 (f25)	0.000885	ng mL⁻¹				
	uC1 (f400)	0.000725	ng mL⁻¹				
7	incerteza comb	inada					
	uc(C1)	0.025193	ng mL <sup>-1</sup>				
8	Graus de libero	lade		Todas as ince	rtezas são	o do tip	юВ
	V	1000		Então, grau de Foi estimado	e liberdade um valor a	e é infi lto	nito
9	fator de abrang	lência		-			
	k	1.962339					
10	incerteza expai	ndida					
	U(1,96;95%)	0.049438					

Tabela 22- Planilha com memória de cálculo para determinação da incerteza da concentração diluída C1.

	-						
1	Mensurando		C2	2.0	ng mL⁻¹		
2	Grandezas de	entrada					C2=CE/(f25*f200)
	Conc estoque f25 f200	1.0E+04 25 200	ng mL <sup>-1</sup>				
3	Fontes de ince	rteza					
	Conc estoque						
	ucCE f25	251.67	ng mL <sup>-1</sup>		k=	1.96	
	ucf25 f200	0.022124	mL		k=	1.96	
	ucf200	0.178	mL		k=	1.96	
4	Incertezas das	grandezas	de entrada				
	uCE	251.67	ng mL <sup>-1</sup>				
	ucf25	0.022124	mL				
	ucf200	0.178	mL				
5	Coeficientes de	e sensibilida	ade				
	ci (CE)	0.0002					
	ci (f25)	0.08	ng mL⁻¹				
	ci (f200)	0.01	ng mL⁻¹				
6	Componentes						
	uC2 (CE)	0.050335	ng mL⁻¹				
	uC2 (f25)	0 00177	na ml <sup>-1</sup>				
	uC2 (f200)	0.001781	ng ml <sup>-1</sup>				
	002 (1200)	0.001701	ng me				
7	incerteza comb	oinada					
	uc(C2)	0.050397	ng mL <sup>-1</sup>				
8	Graus de libero	lade		Todas as i	ncertezas sã	o do tin	ю В
-	V	1000		Então, grai	u de liberdac	le é infi	nito
~	fatas da d	<b>A</b>		Foi estima	do um valor a	alto	
9	tator de abrang	jencia					
	К	1.962339					
10	incerteza expa	ndida					
	U(1,96;95%)	0.098897					

Tabela 23-Planilha com memória de cálculo para determinação da incerteza da concentração diluída C2.

	5									
1	Mensurando		C4	4.0	ng mL <sup>-1</sup>	1				
2	Grandezas de	entrada						C4=CE/(	f25*f10	0)
	Conc estoque f25 f100	1.0E+04 25 100	ng mL <sup>-1</sup>							
3	Fontes de ince	rteza								
	Conc estoque ucCE f25	251.67	ng mL <sup>-1</sup>		k=	=	1.96			
	ucf25 f100	0.022124	mL		k=	=	1.96			
	ucf100	0.041	mL		k=	=	1.96			
4	Incertezas das	grandezas	de entrada							
	uCE	251.67	ng mL⁻¹							
	ucf25	0.022124	ml							
	ucf100	0.041	ml							
		0.041								
5	Coeficientes de	e sensibilida	de							
	ci (CE)	0.0004								
	ci (f25)	0.16	ng mL <sup>-1</sup>							
	ci (f100)	0.04	ng mL <sup>-1</sup>							
6	Componentes									
	uC4 (CE)	0.100669	ng mL⁻¹							
	uC4 (f25)	0.00354	na mL <sup>-1</sup>							
	uC4 (f100)	0.001651	na ml <sup>-1</sup>							
	u04 (1100)	0.001001	ing inc							
7	incerteza comb	inada								
	uc(C4)	0.100745	ng mL <sup>-1</sup>							
8	Graus de libero	lade		Todas as ir	ncerteza	s são	do tip	o B		
	V	1000		Então, grau	u de libei	rdade	é infir	nito		
~	fotos de obresso	âncie		roi estimad	um va	uor al	ιΟ			
9	iator de abrang									
	К	1.962339								
10	incerteza expai	ndida								
	U(1,96;95%)	0.197696								

Tabela 24-Planilha com memória de cálculo para determinação da incerteza da concentração diluída C4.

1	Mensurando		C8	8.0 ng mL <sup>-1</sup>	
2	Grandezas de	entrada			C8=CE/(f25*f50)
	Conc estoque f25 f50	1.0E+04 25 50	ng mL⁻¹		
3	Fontes de incer	rteza			
	Conc estoque				
	ucCE f25	251.67	ng mL <sup>-1</sup>	k=	1.96
	ucf25 f50	0.022124	mL	k=	1.96
	uc(f50)	0.014	mL	k=	1.96
4	Incertezas das	grandezas	de entrada		
	uCE	251.67	ng mL⁻¹		
	ucf25	0.022124	mL		
	ucf50	0.014	mL		
5	Coeficientes de	e sensibilida	ade		
	ci (CE)	0.0008			
	ci (f25)	0.32	ng mL⁻¹		
	ci (f50)	0.16	ng mL <sup>-1</sup>		
6	Componentes				
	uC8 (CE)	0.201339	ng mL⁻¹		
	uC8 (f25)	0.00708	ng mL <sup>-1</sup>		
	uC8 (f50)	0.002235	ng mL⁻¹		
7	incerteza comb	binada	C C		
	uc(C8)	0.201476	ng mL <sup>-1</sup>		
8	Graus de libero	lada		Todas as incertezas s	são do tipo B
0	v	1000		Então, grau de liberda	ade é infinito
				Foi estimado um valo	r alto
9	fator de abrang	jência			
	k	1.962339			
10	incerteza expar	ndida			
	U(1,96;95%)	0.395364			

Tabela 25-Planilha com memória de cálculo para determinação da incerteza da concentração diluída C8.

1	Mensurando		C12	12.0	ng mL⁻¹		
2	Grandezas de	entrada					C12=CE/(f25*f33)
	Conc estoque f25 f33.3	1.0E+04 25 33.33	ng mL <sup>-1</sup>				
З	Fontes de ince	rtoza					
0		1020					
	Conc estoque						
	ucCE f25	251.67	ng mL <sup>-1</sup>		k=	1.96	
	ucf25 f33	0.022124	mL		k=	1.96	
	uc(f33)	0.048394	mL		k=	1.96	
4	Incertezas das	grandezas	de entrada				
		251 67	ng ml <sup>-1</sup>				
	uCE	201.07	ng m∟ ml				
	uci20	0.022124	mL				
	uci33	0.040394					
5	Coeficientes de	e sensibilida	ade				
	ci (CE)	0.0012					
	ci (f25)	0 480048	na ml -1				
	ci (f22)	0.400040	ng mL <sup>-1</sup>				
	0 (100)	0.300072	ng me				
6	Componentes						
	uC12 (CE)	0 302039	na ml -1				
	uC12 (62)	0.010621	ng mL <sup>-1</sup>				
	uC12 (123)	0.010021	ng m∟				
	uC12 (f33)	0.017425	ng mL				
7	incerteza comb	inada					
	uc(C12)	0.302727	ng mL <sup>-1</sup>				
•				<b>-</b>	. ~		5
8	Graus de libero	lade		Todas as il	ncertezas são	o do tip	0 B
	V	1000		Entao, grai	u de liberdade do um valor a	e e infii Ito	nito
q	fator de abrano	iência		i or estimat	ut un valut a		
3	k	1 962330					
	~	1.002009					
10	incerteza expai	ndida					
-	U(1,96;95%)	0.594053					

Tabela 26-Planilha com memória de cálculo para determinação da incerteza da concentração diluída C12.

A Tabela 27 mostra as incertezas associadas às diferentes concentrações diluídas.

Concentração diluída	Incerteza (ng mL <sup>-1</sup> )
C(1)	0,0252
C(2)	0,0504
C(4)	0,1007
C(8)	0,2015
C(12)	0,3027

Tabela 27-Incertezas das concentrações diluídas.

Após cálculo das incertezas de cada concentração diluída, as mesmas são então combinadas, conforme equação abaixo, para obtenção da incerteza combinada associada às concentrações diluídas.

$$U_{CP} = \sqrt{u_{C1}^2 + u_{C2}^2 + u_{C4}^2 + u_{C8}^2 + u_{C12}^2}$$

A incerteza associada às concentrações diluídas foi calculada e vale 0.3815 ng mL<sup>-1</sup>.

# D) Incerteza da curva analítica

Conforme citado no item 4.1.2, as curvas analíticas foram feitas pesandose aproximadamente um grama de padrão de 1-hidroxipireno em balança analítica. Esta massa foi solubilizada em etanol e avolumada a 100 L em balão volumétrico com etanol 48%. A partir das soluções-mãe, foram preparadas soluções diluídas de concentrações na faixa de 1 a 12 ng mL<sup>-1</sup>. Cada solução foi lida em espectrofluorímetro, com excitação em 345 nm e intensidade observada em 387 nm.

A curva analítica pode ser representada pela equação de uma reta:

y = ax + b, onde

- y é a intensidade do sinal observado
- x é a variável independente (que expressa, por exemplo, concentração)
- a é o coeficiente angular
- b é o coeficiente linear

Para calcular a incerteza combinada para o componente curva analítica, utiliza-se a equação abaixo.

$$U_{\textit{curva}} = \sqrt{(C_{ia}^2 * s_a^2) + (C_{i\delta}^2 * s_\delta^2) + (2 * C_{ia} * C_{i\delta} * \mu a * \mu b * r)} , \text{ onde}$$

- $c_{ia}$  é o coeficiente de sensibilidade igual a -1/a
- $c_{ib}$  é o coeficiente de sensibilidade igual a -( $y_{maior} b$ )/ $a^2$
- $u_b$  é a incerteza de b e é igual a  $(s_b^2)^{1/2}$  com  $s_b^2=(s^2 * \Sigma C^2)/D$
- $u_a$  é a incerteza de a e é igual a  $s_a^2$  com  $s_a^2=n*s^2/D$
- D é o desvio-padrão igual a  $n^{*}\Sigma C^{2} (\Sigma C)^{2}$
- C é a concentração em ng mL-1
- r é a razão entre a e b, igual a (-  $\Sigma C$ )/(n  $\Sigma C^2$ )<sup>1/2</sup>

A Tabela 28 mostra a planilha com memória de cálculo para obtenção da incerteza associada è curva analítica.

A incerteza associada à curva analítica apresentou valor de 0,2077 ng mL<sup>-</sup>

1

Leitura	x (ng mL <sup>-1</sup> )	Intensidade de	v calc	desvio (s)	$(s)^2$	conc <sup>2</sup>
	( 3 /	sinal (y, ua)	,	(-)	<u>\</u> -/	
1	1	110,47	1,296E+02	1,909E+01	3,644E+02	1,00E+00
2	1	118,16	1,296E+02	1,140E+01	1,299E+02	1,00E+00
3	1	112,93	1,296E+02	1,663E+01	2,765E+02	1,00E+00
4	2	188,29	1,976E+02	9,324E+00	8,694E+01	4,00E+00
5	2	212,61	1,976E+02	-1,500E+01	2,249E+02	4,00E+00
6	2	170,57	1,976E+02	2,704E+01	7,314E+02	4,00E+00
7	4	321,26	3,337E+02	1,247E+01	1,554E+02	1,60E+01
8	4	391,99	3,337E+02	-5,826E+01	3,395E+03	1,60E+01
9	4	332,61	3,337E+02	1,116E+00	1,245E+00	1,60E+01
10	8	632,72	6,060E+02	-2,677E+01	7,166E+02	6,40E+01
11	8	653,75	6,060E+02	-4,780E+01	2,285E+03	6,40E+01
12	8	625,01	6,060E+02	-1,906E+01	3,633E+02	6,40E+01
13	12	861,45	8,782E+02	1,672E+01	2,797E+02	1,44E+02
14	12	834,48	8,782E+02	4,369E+01	1,909E+03	1,44E+02
15	12	868,77	8,782E+02	9,404E+00	8,844E+01	1,44E+02
soma	8,10E+01				1,10E+04	6,84E+02
					N =	15
intercepção (b)	61,502					
inclinação (a)	68,056					
2						
Σs²	1,10E+04					
s <sup>2</sup>	8,47E+02					
ΣC <sup>2</sup>	6,84E+02					
ΣC	8,10E+01					
(ΣC) <sup>2</sup>	6561					
Determinante (D)	3,70E+03					
Incertezas da curva	a					
Sa <sup>2</sup>	1.57E+02	u <sup>2</sup> :	Ua =	12.51282657		
s <sub>b</sub> <sup>2</sup>	3,43E+00	$\mu_{\rm b}^2$ ;	μ <sub>b</sub> =	1,852989694		
Razão entre a e b						
(r <sub>a,b</sub> )	-8,00E-01					
Coeficientes de ser	nsibilidade					
cia	-0,0146938	y maior		Intensidade de	sinal = 868.7	7
Ci <sub>b</sub>	-0,174295					
Contribuições de in	icerteza					
	-0 1838607					
	-0.3229668					
G (D)	0,0223000					
Incerteza combinad	da	0,2077	ng mL <sup>-1</sup>			

Tabela 28-Planilha com memória de cálculo da incerteza associada à curva analítica.

U (curva)

#### E) Incerteza associada à repetitividade

A repetitividade da amostra foi promovida conforme descrito no item 4.1.3.6.1, contaminando-se bílis de peixe com uma concentração conhecida de solução de 1-hidroxipireno. Foram feitas sete diluições da amostra contaminada e todas foram lidas em espectrofluorímetro com excitação em 345 nm e intensidade observada em 387 nm.

A incerteza associada à repetitividade foi calculada, utilizando-se os resultados demonstrados no item 4.1.3.6.1, de acordo com a equação:

$$U_{repe} = \frac{s}{\sqrt{n}}$$
, onde:

- s é o desvio-padrão associado às leituras das repetições

- n é o número de replicatas

A incerteza associada à repetitividade foi calculada e o valor obtido foi  $0,1775 \text{ ng mL}^{-1}$ .

#### F) Incerteza associada à reprodutibilidade

A reprodutibilidade da amostra foi promovida conforme descrito no item 4.1.3.6.2, com dois analistas diferentes contaminando bílis de peixe com uma concentração conhecida de solução de 1-hidroxipireno. Foram feitas sete diluições da amostra contaminada por cada analista e todas foram lidas em espectrofluorímetro com excitação em 345 nm e intensidade observada em 387 nm.

A incerteza associada à reprodutibilidade foi calculada, utilizando-se os resultados demonstrados no item 4.1.3.6.2, de acordo com a equação:

$$U_{repro} = \frac{S_{combinado}}{\sqrt{n}}$$
, onde:

 - s<sub>combinado</sub> é o desvio-padrão combinado associado às leituras dos dois analistas.

- n é o número de replicatas

A incerteza associada à reprodutibilidade foi calculada e o valor obtido foi  $0,3561 \text{ ng mL}^{-1}$ .

# G) Incerteza padrão combinada

De posse das incertezas associadas a cada etapa, foi calculada a incerteza padrão combinada, segundo a equação:

 $U = \sqrt{u_{CP}^2 + u_{curva}^2 + u_{repe}^2 + u_{repro}^2}$ 

A Tabela 29 sumariza as incertezas relacionadas a cada etapa calculadas anteriormente e a incerteza padrão combinada obtida.

Um gráfico (Figura 18) mostrando as fontes de incerteza foi construído e demonstra que as principais fontes de contribuição para a incerteza do método são as soluções-padrão e a reprodutibilidade.

Tabela 29-Incertezas obtidas para cada etapa.

Fontes	Incertezas (ng mL <sup>-1</sup> )		
uc(cp)	0,3815		
uc(curva)	0,2077		
uc(repe)	0,1775		
uc(repro)	0,3561		
u comb	0,5891		
U exp	1,156		



Figura 18-Gráfico comparativo da contribuição das diferentes fontes de incerteza para fluorescência.

# 4.1.4. Análise das amostras de bílis no espectrofluorímetro

A Tabela 30 mostra as concentrações medidas na análise das amostras de bílis e as concentrações calculadas de 1-hidroxipireno nas bílis. Duas das amostras analisadas apresentaram concentrações abaixo do limite de detecção do método.

Estes resultados estão de acordo com o resultado descrito por Neves (2006), em trabalho anterior do Laboratório de Estudos Ambientais, onde monitoramentos ambientais sazonais, utilizando também peixes da espécie *Mugil liza*, demonstraram que as concentrações de HPA em equivalentes de pireno na Baía de Guanabara variavam de 3,6 a 10,4 µg mL<sup>-1</sup>, em coleta de inverno e de 4,0 a 16,8 µg mL<sup>-1</sup>, em coleta de verão.

	Concentração medida (ng mL <sup>-1</sup> ) -	
Amostra	Amostra diluída	Concentração na bílis (µg mL⁻¹)
1	< LD	-
2	4,75	9,12
3	2,54	4,88
4	3,17	6,10
5	< LD	-
6	1,59	3,06
7	4,29	8,26
8	1,81	3,48
9	3,08	5,93
10	1,42	2,72
11	1,99	3,84
12	1,89	3,63
Média	2,66	5,10
DP	1,15	2,21
%CV	43,4	43,4

Tabela 30-Concentrações em equivalentes de 1-hidroxipireno na amostra diluída e na bílis determinadas por fluorescência.

A Figura 19 mostra os espectros obtidos para algumas das amostras analisadas. São exemplificadas três das amostras analisadas, tanto apenas diluídas na proporção de 1:2000 com etanol 48% quanto após sofrer hidrólise enzimática e posterior diluição para que também ficasse na proporção de 1:2000.



Figura 19-Espectros das amostras de bílis diluídas e hidrolisadas.

Pode-se observar que, em todos os casos, as amostras diluídas apresentaram intensidade similar às amostras hidrolisadas, no comprimento de

onda observado (387 nm). Como esta técnica é semiquantitativa, este resultado sugere que não há necessidade de promover a hidrólise enzimática das amostras. Assim, os resultados obtidos corroboram os dados disponíveis na Literatura (Vuontisjärvi, 2004), ou seja, para se promover a comparação entre as técnicas de fluorescência e HPLC-F não há necessidade de se hidrolisar a amostra para medição por fluorescência.

A Tabela 31 compara os dados obtidos neste trabalho com valores obtidos anteriormente em nosso laboratório. Pode-se observar que os valores, em equivalentes de 1-hidroxipireno, ficaram próximos aos encontrados por Neves e colaboradores (2006), em trabalho do Laboratório de Estudos Ambientes onde foram feitos monitoramentos sazonais da concentração de pireno na Baía de Guanabara.

Trabalhos	Concentração em equivalentes
	de 1-hidroxipireno (µg mL <sup>-1</sup> )
Este trabalho	2,72 a 9,12
Neves (2006)	3,6 a 10,4
Coleta de inverno	
Neves (2006)	4,0 a 16,8
Coleta de verão	

Tabela 31-Comparação entre a concentração em equivalentes de 1-hidroxipireno obtida neste trabalho e em trabalho anterios do LEA.

# 4.2. Cromatografia a líquido de alta eficiência

# 4.2.1. Escolha da fase móvel

Foram testados dois conjuntos de solventes mais usualmente descritos na maioria dos trabalhos como fase móvel para análise de metabólitos de HPA por HPLC: acetonitrila/água e metanol/água. Utilizando-se como fase móvel acetonitrila/água, as intensidades dos picos dos padrões de 1-hidroxipireno foram maiores do que quando foi utilizado o par metanol/água. Além disso, o tempo de retenção do composto com utilização de acetonitrila/água foi menor, o que torna a corrida mais rápida, otimizando o tempo de análise.

# 4.2.2. Escolha do solvente para solubilização do padrão

Foram testados também diferentes solventes para solubilização do padrão: etanol, metanol, acetonitrila pura e acetonitrila com adição de ácido ascórbico. Tanto para fase móvel acetonitrila/água quanto para metanol/água, a intensidade do sinal do composto em estudo é maior quando este é solubilizado em ACN com ácido ascórbico. Portanto, foi escolhido preparar-se o padrão solubilizando o HPA em ACN com ácido ascórbico, conforme indica a metodologia utilizada para hidrólise e análise das amostras de bílis de peixe por HPLC (Ariese *et al*, 1997).

Após escolha do solvente a ser utilizado para solubilização do padrão, foi testado se as diluições para obtenção das concentrações a serem utilizadas para confecção da curva analítica deveriam ser feitas com 100% de solvente orgânico ou se poderiam ser feitas utilizando-se uma mistura de solvente orgânico e água, a fim de diminuir os custos e resíduos da análise. Testou-se, então, a diluição da solução-estoque de 1-hidroxipireno com 100% de acetonitrila e com uma mistura de acetonitrila/água, na proporção de 48/52. Os picos obtidos com a diluição utilizando acetonitrila e água apresentaram uma certa deformidade ("ombro"), enquanto os obtidos após diluição em acetonitrila 100% ficaram mais simétricos. Assim, optou-se por fazer as diluições utilizando acetonitrila pura, ao invés da mistura com água, mesmo que esta opção não fosse a mais econômica.

#### 4.2.3.

## Escolha da programação de eluição

Para verificar a seletividade do método proposto, cinco HPA (fenantreno, criseno, naftaleno, pireno e 1-hidroxipireno) foram injetados individualmente e numa mistura contendo os cinco HPA nas diferentes programações, todas utilizando-se como fase móvel o par de solventes acetonitrila/água: programação curta com gradiente de eluição, programação longa com gradiente de eluição e as três programações com eluição isocrática em diferentes proporções de acetonitrila/água (90 /10, 50/50 e 70/30).

Foi observado que, em todas as programações, os compostos 1hidroxipireno e naftaleno saem praticamente no mesmo tempo de retenção. Assim, para que fosse possível determinar todos os compostos em conjunto em uma mesma amostra, foi necessário injetar duas vezes em cada programação. Decidiu-se, então, fazer a identificação, na primeira injeção, de 1-hidroxipireno, pireno e criseno e, na segunda, naftaleno e fenantreno, utilizando-se, em cada programação, o melhor par de comprimentos de onda de excitação/emissão para cada composto.

Foi observado que ambos os métodos com utilização de gradiente foram satisfatórios para separação e detecção dos cinco HPA em duas corridas, porém as programações são relativamente longas, levando de quinze e quarenta minutos.

A programação isocrática na proporção de 90% / 10% acetonitrila/água não foi eficiente na separação dos compostos. Os compostos ficaram muito unidos, logo no início do cromatograma.

A programação isocrática na proporção de 50% / 50% acetonitrila/água foi eficiente na separação dos compostos, porém o tempo de corrida também ficou muito longo (em torno de quarenta minutos).

A programação isocrática na proporção de 70% / 30% acetonitrila/água também foi eficiente na separação dos compostos e o tempo de corrida ficou em torno de dez minutos.

Foi escolhida a programação isocrática na proporção de 70% / 30% acetonitrila/água, já que ela foi eficiente na separação dos compostos e o tempo de corrida não foi muito longo, o que otimiza o tempo das análises e o gasto dos solventes da fase móvel. Esta programação foi eficiente para separar os compostos e o tempo de corrida foi satisfatório.

# 4.2.4. Curva analítica por HPLC

As curvas analíticas foram feitas a partir de soluções-estoque, diluídas nas concentrações de 0,2; 1; 4; 12 e 20 ng mL<sup>-1</sup>. Cada solução foi analisada por cromatografia a líquido, com excitação em 345 nm e emissão em 387 nm.

A Figura 20 mostra os cromatogramas obtidos para uma curva analítica. Os dados obtidos para as curvas estão listados na Tabela 32 e a Figura 21 mostra a curva analítica obtida.



Figura 20-Cromatogramas obtidos para curva analítica do 1-hidroxipireno em HPLC.

Concentração	Área (µV s)	Área (μV s)	Área (µV s)
(ng mL <sup>-1</sup> )	Curva 1	Curva 2	Curva 3
0,2	79642,6	65179,8	72648,1
1	310227,0	271144,8	292674,7
4	1138819,2	1056680,4	1094821,8
12	3710158,4	3335853,6	3498246,0
20	6266529,2	5567094,0	5902648,2

Tabela 32-Dados obtidos para curva analítica do 1-hidroxipireno em HPLC.



Figura 21-Curva analítica em HPLC para 1-hidroxipireno.

A equação da reta obtida foi y = 295875x - 23822, com R<sup>2</sup> = 0.9955.

A Tabela 33 mostra os valores dos coeficientes angular e linear e do coeficiente de correlação para cada curva separadamente.

Tabela 33- Parâmetros das curvas analíticas do HPLC.

Curva	Coeficiente angular	Coeficiente linear	R <sup>2</sup>
1	313552	-31748	0,9996
2	278892	-15765	0,9999
3	295183	-23954	0,9997

# 4.2.5. Parâmetros de validação do método em HPLC

# 4.2.5.1. Linearidade

A Tabela 34 mostra o resultado da análise de variância.

Superior 95,0%

Inferior 95,0%

SQ QM F Fonte de variação GL 7.46575E+13 7.46575E+13 2871.29 Regressão 1 Resíduo 13 3.38018E+11 26001412660 Ajuste 3 18569007301 6189669100 0.19 Erro puro 10 3.19449E+11 31944935727 Total 14 7.49955E+13

Tabela 34-Análise de variância.

Comparando-se o valor de F do ajuste com o tabelado para o nível de significância de 5%, observa-se que F =  $0,19 < F_{5\%}$  (3,10) = 3,71. Portanto, a relação entre a resposta e a concentração é linear.

# 4.2.5.2. Faixa de trabalho

A faixa de trabalho utilizada nesta técnica foi de 0,1 ng mL<sup>-1</sup> a 20 ng mL<sup>-1</sup>.

# 4.2.5.3. Sensibilidade

O resultado da análise de regressão feita no software Microsoft Office Excel 2003 está representado na Tabela 35.

#### Tabela 35-Estatística de regressão.

Estatística de regressão				
R múltiplo	0,997743864			
R-Quadrado	0,995492817			
R-quadrado ajustado	0,995146111			
Erro padrão	161249,5354			
Observações 15				

ANOVA

	gl	SQ	MQ	F	F de significação	
Regressão	1	7,466E+13	7E+13	2871,29	1,22422E-16	
Resíduo	13	3,38E+11	3E+10			
Total	14	7,5E+13				
	Coeficientes	Erro padrão	Stat t	valor-P	95% inferiores	95% superio

58490,147 0,69042 -150182,5568 102537,955 -150182,5568 102537,955 Intersecão -23822.3009 -0.407 5521,6745 1,2E-16 283946,6185 307804,319 283946,6185 307804,319 Variável X 295875.4688 53,584

Portanto, a sensibilidade do método é 295875,5 µV s mL ng<sup>-1</sup>.

# 4.2.5.4. Limite de detecção

O limite de detecção foi analisado injetando-se padrões em concentrações cada vez mais baixas. Foi observado que, ao injetar o padrão de concentração 0,1 ng mL<sup>-1</sup>, o pico referente ao 1-hidroxipireno ainda pôde ser diferenciado do sinal do ruído de fundo, caracterizando este valor, então, como o limite de detecção do método. Quando foi injetada uma solução de concentração menor, o pico relativo ao composto em estudo foi confundido com o sinal do ruído de fundo.

# 4.2.5.5. Limite de quantificação

Para cálculo do limite de quantificação, também são utilizados os dados obtidos pela análise de regressão, dispostos na Tabela 35.

O valor encontrado para limite de quantificação foi 5,45 ng mL<sup>-1</sup>.

# 4.2.5.6. Precisão

4.2.5.6.1. Repetitividade

A Tabela 36 mostra os resultados obtidos para determinação da repetitividade do método.

Tabela 36-Resultados	para	avaliação	do	parâmetro	repetitividade.
----------------------	------	-----------	----	-----------	-----------------

Leitura	Área (uV s)	Conc (ng mL <sup>-1</sup> )
1	1703031,68	5,84
2	1559526,88	5,35
3	1619506,97	5,55
4	1773298,39	6,07
5	1725447,66	5,91
6	1764666,29	6,04
7	1784779,73	6,11
Média	1704322,514	5,84
Desvio-padrão	85127,16	0,29

Utilizando-se os resultados mostrados na Tabela 36, a repetitividade do método foi calculada e foi obtido o valor de 4,9%.

# 4.2.5.6.2. Reprodutibilidade

A Tabela 37 mostra os resultados obtidos por dois analistas diferentes para cálculo da reprodutibilidade do método e a Tabela 38 mostra a planilha com a memória do cálculo.

	Conc (ng mL <sup>-1</sup> )		
Leitura	Analista 1	Analista 2	
1	5,84	6,13	
2	5,35	6,32	
3	5,55	5,39	
4	6,07	5,47	
5	5,91	6,15	
6	6,04	6,21	
7	6,11	5,90	
Média	5,84	5,94	
Desvio-padrão	0,29	0,37	

Tabela 37-Resultados para avaliação do parâmetro reprodutibilidade.

Tabela 38-Planilha com memória de cálculo do tratamento estatístico para avaliação da reprodutibidade.

Anova: fator único

#### RESUMO

Grupo	Contagem	Soma	Média	Variância
Analista 1	7	40.8855483	5.840793	0.08277891
Analista 2	7	41.5734097	5.939059	0.13632891

#### ANOVA

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	0.033796663	1	0.033797	0.30849344	0.588811079	4.747225
Dentro dos grupos	1.314646949	12	0.109554			
Total	1.348443612	13				

Com os dados apresentados na tabela acima, o cálculo da reprodutibilidade do método foi feito e os valores obtidos estão na Tabela 39.

Tabela 39-Resultado da reprodutibilidade do método.

s <sup>2</sup> entre	-0,0108225
s <sup>2</sup> r	0,10955
s <sup>2</sup> <sub>R</sub>	0,09873
Repro	0,8798 ng mL <sup>-1</sup>

Em termos percentuais, a reprodutibilidade do método foi de 15%, o que está satisfatório para técnicas cromatográficas em geral. Acredita-se que este valor seja causado pelas diversas fontes embutidas no procedimento de hidrólise da amostra de bílis, como temperatura do banho, atividade da enzima, centrifugação.

## 4.2.5.7. Recuperação

A Figura 22 mostra os cromatogramas obtidos para uma das amostras analisadas. Os valores de recuperações obtidos para cada amostra estão demonstrados na Tabela 40.



Figura 22-Cromatogramas obtidos nos testes de recuperação de uma amostra de bílis contaminada com 1-hidroxipireno em três diferentes concentrações.

Amostra	Recuperação (%)	Recuperação (%)	Recuperação (%)
	(4,5 ng mL <sup>-1</sup> )	(9 ng mL <sup>-1</sup> )	(18 ng mL <sup>-1</sup> )
1	46,2	75,4	61,3
2	24,6	47,6	57,3
3	53,1	51,9	58,5
4	60,4	54,5	64,3
5	36,5	56,3	61,1
6	29,5	53,8	57,2
Média	41,7	56,6	59,9
Desvio-padrão	13,9	9,68	2,78
CV	33,3	17,1	4,64

Tabela 40-Recuperações obtidas para cada amostra contaminada.

Pode-se observar que os valores de recuperação obtidos foram maiores para a fortificação com a maior concentração e a variação foi maior quando foi promovida fortificação com a concentração mais baixa.

Os valores de recuperação encontrados foram considerados baixos, o que pode estar relacionado a algum tipo de degradação que o 1-hidroxipireno possa ter sofrido durante alguma etapa do procedimento de hidrólise.

## 4.2.5.8. Incerteza de medição

Inicialmente, fez-se o diagrama de causa-efeito (também chamado de espinha de peixe), prevendo as principais possíveis fontes de incertezas ligadas à técnica aqui apresentada, conforme mostra a Figura 23.



Figura 23-Espinha de peixe (diagrama causa-efeito) inicial para o método em HPLC.

Algumas fontes, por exemplo, banho-maria e centrifugação, não puderam ser contempladas porque não houve como calcular a influência que essas fontes causariam no método durante o tempo de desenvolvimento deste trabalho. Estas fontes foram embutidas no item reprodutibilidade.

massa Concentrações diluídas repetições cert Concentração estoque -cert Fator de diluição cert pùreza volume Vi C Variação b Repetições do HPLC Int. da fonte ε Analista Repetitividade Reprodutibilidade Curva analítica

Assim, chegou-se ao diagrama simplificado esquematizado na Figura 24.

Figura 24- Espinha de peixe (diagrama causa-efeito) simplificada para o método em HPLC.

O cálculo da incerteza foi desenvolvido por partes: primeiro, serão feitos os cálculos das incertezas da concentração-estoque e do fator de diluição, que serão utilizados para calcular a incerteza das concentrações diluídas; em seguida, serão feitos os cálculos das incertezas da curva analítica, da repetitividade e da reprodutibilidade.

## A) Incerteza da concentração-estoque

O cálculo da incerteza associada à concentração estoque já foi desenvolvido no item 4.1.3.7 deste capítulo. A incerteza associada à concentração-estoque vale 251,67 ng mL<sup>-1</sup>.

### B) Incerteza dos fatores de diluição

Assim como na metodologia para fluorescência molecular, foram realizadas diluições a partir da solução estoque. Em princípio, foi feita uma solução intermediária diluindo-se a solução estoque na proporção de 1:25. Em seguida, a partir da solução intermediária, foram feitas soluções diluídas nas proporções 1:2000, 1:400, 1:100,1:33 e 1:20.

Como as concentrações diluídas não têm o mesmo valor na metodologia para HPLC e na metodologia para fluorescência molecular, a incerteza de alguns fatores de diluição já foi calculada, enquanto outras serão calculadas neste item. Assim, o cálculo da incerteza associada aos fatores de diluição 1:400, 1:100, 1:33 e 1:25 já foi desenvolvido no item 4.1.3.7 deste capítulo, para cálculo das incertezas dos fatores de diluição na fluorescência. Aqui, serão acrescidas apenas as planilhas com memória de cálculo para incerteza dos fatores de diluição 1:2000 e 1:20.

A Tabela 41 mostra a planilha com memória de cálculo do fator de diluição 1:2000 e a Tabela 42 mostra a planilha com memória de cálculo do fator de diluição 1:20.

					-		
1	Mensurando		2000				
2	Grandezas de entrada						
	vol frasco	50	mL				
	vol pipeta	0.025	mL				
3	Fontes de incerteza						
	val fragos						
	VOLITASCO						_
	declaraçao do fabricante			0.025	mL	k =	2
	vol pipeta						
	declaraçao do fabricante			0.00004	mL	k =	2.32
4	Incertezas						
	vol frasco						
		ΠL					
	vol pipeta						
	u1Vp (dec fab) 1.72414E-05	mL					
5	Coeficientes de sensibilidade						
	Ci(Vfrasco) 40	ml <sup>-1</sup>					
		···∟					
	CI(vpipeta) 80000	m∟					
6	Componentes						
•							
	uf2000(Vfrasco) 0.5	ml					
	uf2000(Vpipeta) 1.379310345	mL					
7	Incerteza combinada						
	((2222))						
	uc(t2000) 1.467	mL					
~	Oreve de liberde de						
8	Graus de liberdade		<b>-</b> .		<i></i>	-	
	v 1000		lodas a	as incertez	zas sao do tip	o B	
~	fotor de obrene êresis		Eniao, (	yrau de llt		πιο	
9	iator de abrangencia		roi esti	mado um	valor alto		
	к 1.962339036						
10							
10	incerteza expandida						
	U(1,96;95%) 2.879024253						

\_

Tabela 42-Planilha com memória de cálculo para o fator de diluição 1:20.

							3	
1	Mensurando				20			
2	Grandezas de e	entrada						
	vol frasco vol pipeta		10 0.5	mL ml				
0		1	0.0					
3	Fontes de Incer	teza						
	<b>vol frasco</b> declaraçao do f	abricante				0.005	mL	k = 2.4
	<b>vol pipeta</b> declaraçao do f	abricante				0.001	mL	k = 2.32
4	Incertezas							
	vol frasco u1Vf (dec fab) vol pipeta	0.002083333	mL					
	u1Vp (dec fab)	0.000431034	mL					
5	Coeficientes de	sensibilidade						
	Ci(Vfrasco)	2	mL <sup>-1</sup>					
	Ci(Vpipeta)	40	mL <sup>-</sup> '					
6	Componentes							
	uf20(Vfrasco) uf20(Vpipeta)	0.004166667 0.017241379	mL mL					
7	Incerteza comb	inada						
	uc(f20)	0.017737708	mL					
8	Graus de liberd	ade						
	v	1000		Tod Enta	las a ão. d	as incerte grau de lil	zas sã perdad	o do tipo B le é infinito
9	fator de abrange k	ência 1.962339036		Foi	esti	mado um	valor	alto
10	incerteza expan							
	0(1,30,30/0)	0.00+00/030						

# H) Incerteza das concentrações diluídas

Assim como no cálculo da incerteza dos fatores de diluição, no cálculo da incerteza das concentrações diluídas também algumas concentrações são as mesmas já calculadas no cálculo da incerteza do método em fluorescência.

Assim, as incertezas relacionadas às concentrações 1, 4 e 12 ng mL<sup>-1</sup> já foram calculadas no item 4.1.3.7 Aqui, serão demonstrados os cálculos referentes apenas às concentrações 0,2 e 20 ng mL<sup>-1</sup>.

A Tabela 43 e a Tabela 44 mostram os cálculos para determinação da incerteza das soluções diluídas de 0,2 e 20 ng mL<sup>-1</sup>, respectivamente.

1	Mensurando		C0,2	0.2	ng mL⁻¹			
2	Grandezas de	entrada					(	C1=CE/(f25*f2000)
	Conc estoque	1.0E+04	ng mL <sup>-1</sup>					
	f2000	2000						
3	Fontes de ince	rteza						
	Conc estoque							
	ucCE f25	251.67	ng mL <sup>-1</sup>		k=	1	.96	
	ucf25 f2000	0.022124	mL		k=	1	.96	
	ucf2000	1.467	mL		k=	1	.96	
4	Incertezas das	grandezas	de entrada					
	uCE	251.67	ng mL⁻¹					
	ucf25	0.022124	mL					
	uct2000	1.467	mL					
5	Coeficientes de	e sensibilida	ade					
	ci (CE)	0.00002						
	ci (f25)	0.008	ng mL⁻¹					
	ci (f2000)	0.0001	ng mL <sup>-1</sup>					
6	Componentes							
	uC0,2 (CE)	0.005033	ng mL⁻¹					
	uC0,2 (f25)	0.000177	ng mL <sup>-1</sup>					
	uC0,2 (f2000)	0.000147	ng mL <sup>-1</sup>					
7	incerteza comb	binada						
	uc(C0,2)	0.005039	ng mL <sup>-1</sup>					
0	Graus de libers	lada		Todoo oo ii	noortoza		la tin	o P
0	V	1000		Então, ora	u de liber	s sau u dade é	io up é infir	nito
	-			Foi estima	do um va	lor alto	)	
9	fator de abrang	gência						
	k	1.962339						
10	incerteza expa	ndida						
	U(1,96;95%)	0.009888						

Tabela 44-Planilha com memória de cálculo associada à incerteza da concentração 20 ng mL $^{-1}$ .

1	Mensurando		C20	20.0 ng mL <sup>-1</sup>		
2	Grandezas de	entrada				C20=CE/(f25*f20)
	Conc estoque f25 f25	1.0E+04 25 20	ng mL⁻¹			
3	Fontes de ince	rteza				
	Conc estoque					
	ucCE f25	251.67	ng mL <sup>-1</sup>	k=	1.96	
	ucf25 f20	0.022124	mL	k=	1.96	
	uc(f20)	0.017738	mL	k=	1.96	
4	Incertezas das	grandezas	de entrada			
	uCE	251.67	ng mL⁻¹			
	ucf25	0.022124	mL			
	ucf20	0.017738	mL			
5	Coeficientes de	e sensibilida	ade			
	ci (CE)	0.002				
	ci (f25)	0.8	ng mL⁻¹			
	ci (f20)	1	ng mL⁻¹			
6	Componentes					
	uC20 (CE)	0.503347	ng mL⁻¹			
	uC20 (f25)	0.017699	ng mL <sup>-1</sup>			
	uC20 (f20)	0.017738	ng mL <sup>-1</sup>			
7	incerteza comb	inada				
	uc(C20)	0.503971	ng mL <sup>-1</sup>			
8	Graus de libero	lade		Tudo é incerteza tipo l	3	
Ū	v	1000		Então, grau de liberda Foi estimado um valor	_ de é inf ∵alto	inito
9	fator de abrang	lência				
	k	1.962339				
10	incerteza expa	ndida				
	U(1,96;95%)	0.988961				

A Tabela 45 mostra as incertezas associadas às diferentes concentrações diluídas.

Concentração diluída	Incerteza (ng mL <sup>-1</sup> )
C(0,2)	0,0050
C(1)	0,0252
C(4)	0,1007
C(12)	0,3027
C(20)	0,5040

Tabela 45-Incertezas das concentrações diluídas.

Após cálculo das incertezas de cada concentração diluída, as mesmas são então combinadas, conforme equação abaixo, para obtenção da incerteza combinada associada às concentrações diluídas.

$$U = \sqrt{u_{C0,2}^2 + u_{C1}^2 + u_{C4}^2 + u_{C12}^2 + u_{C20}^2}$$

A incerteza associada às concentrações diluídas foi calculada e vale 0,5970 ng mL<sup>-1</sup>.

#### D) Incerteza da curva analítica

A incerteza associada à curva analítica foi calculada da mesma forma que na metodologia para fluorescência molecular, no item 4.1.3.7 deste trabalho, e a memória de cálculo está representada na Tabela 46.

A incerteza calculada para o componente curva analítica vale 0,3082 ng  $\rm mL^{\text{-}1}.$ 

114

Tabela 46-Planilha de cálculo da incerteza associada à curva analítica.

Tabela 40-Planina	a de calculo (	ua incerteza ass	sociaua a cur	va anaillica.	1	1
Leitura	x (ng/mL)	Intensidade de sinal (y, uV*s)	y calc	desvio (s)	(s) <sup>2</sup>	conc <sup>2</sup>
1	0,2	79642,6	8,300E+04	3,354E+03	1,125E+07	4,00E-02
2	0,2	65179,8	8,300E+04	1,782E+04	3,175E+08	4,00E-02
3	0,2	72648,1	8,300E+04	1,035E+04	1,071E+08	4,00E-02
4	1	310227	3,197E+05	9,470E+03	8,968E+07	1,00E+00
5	1	271144,8	3,197E+05	4,855E+04	2,357E+09	1,00E+00
6	1	292674,7	3,197E+05	2,702E+04	7,302E+08	1,00E+00
7	4	1138819,2	1,207E+06	6,850E+04	4,693E+09	1,60E+01
8	4	1056680,4	1,207E+06	1,506E+05	2,269E+10	1,60E+01
9	4	1094821,8	1,207E+06	1,125E+05	1,266E+10	1,60E+01
10	12	3710158,4	3,574E+06	-1,358E+05	1,845E+10	1,44E+02
11	12	3335853,6	3,574E+06	2,385E+05	5,687E+10	1,44E+02
12	12	3498246	3,574E+06	7,608E+04	5,788E+09	1,44E+02
13	20	6266529,2	5,941E+06	-3,252E+05	1,058E+11	4,00E+02
14	20	5567094	5,941E+06	3,742E+05	1,400E+11	4,00E+02
15	20	5902648,2	5,941E+06	3,867E+04	1,496E+09	4,00E+02
soma	1,12E+02				3,72E+11	1,68E+03
					N =	15
intercepção (b)	-23822					
inclinação (a)	295875					
- 2	0 705 44					
ΣS <sup>-</sup>	3,72E+11					
<b>S</b> <sup>-</sup>	2,86E+10					
ΣC <sup>2</sup>	1,68E+03					
$\Sigma C$	1,12E+02					
(ΣC) <sup>2</sup>	12454,56					
Determinante (D)	1,28E+04					
Incortozas da curva						
	2 77 - 00	2.		61265 01549		
S <sub>a</sub>	3,77E+09	μ <sub>a</sub> ; 2	$\mu_a =$	61365,01548		
Sb	3,36E+07	μ <sub>b</sub> -;	μ <sub>b</sub> =	5/93,0/2148		
Bazão entre a e b						
	-7 02E.01					
('a,b)	-1,020-01					
Coeficientes de ser	nsibilidade					
Cia	-3.38F-06	v maior		Intensidade de	sinal = 868 7	7
Cİb	-7.186F-05	y maior			cu. = 000.1	
<u>.</u>	,, 00					
Contribuições de in	certeza					
U Co (a)	-0,2074018					
U Co (b)	-0,4162625					
(-)	,					
Incerteza combinac	la	0 3082	na ml <sup>-1</sup>			

U (curva)

#### E) Incerteza associada à repetitividade

A incerteza associada à repetitividade foi calculada, utilizando-se os resultados demonstrados no item 4.2.5.6.1, de acordo com a equação:

$$U_{repe} = \frac{s}{\sqrt{n}}$$
, onde:

- s é o desvio-padrão associado às leituras das repetições

- n é o número de replicatas

A incerteza associada à repetitividade foi calculada e o valor obtido foi  $0,1087 \text{ ng mL}^{-1}$ .

## F) Incerteza associada à reprodutibilidade

A incerteza associada à reprodutibilidade foi calculada conforme a equação abaixo, utilizando-se os dados demonstrados no item 4.2.5.6.2.

$$U_{repro} = \frac{S_{combinado}}{\sqrt{n}}$$
, onde

- s<sub>combinado</sub> é o desvio-padrão combinado associado às leituras dos dois analistas

- n é o número de replicatas

O valor da incerteza associada à reprodutibilidade foi 0,1509 ng mL<sup>-1</sup>.

## G) Incerteza padrão combinada

De posse das incertezas associadas a cada etapa, foi calculada a incerteza padrão combinada, segundo a equação:

$$U = \sqrt{u_{CP}^{2} + u_{curva}^{2} + u_{repe}^{2} + u_{repro}^{2}}$$

A Tabela 47 sumariza as incertezas relacionadas a cada etapa calculadas anteriormente e a incerteza padrão combinada obtida.

Um gráfico (Figura 25) mostrando as fontes de incerteza foi construído e demonstra que as principais fontes de contribuição para a incerteza do método foram as concentrações-padrão.

Fontes	Incertezas (ng mL <sup>-1</sup> )
uc(cp)	0,5970
uc(curva)	0,3082
uc(repe)	0,1087
uc(repro)	0,1509
u comb	0,6972
U exp	1,368

Tabela 47-Incertezas obtidas para cada etapa.



Figura 25-Gráfico de balanço das incertezas associadas ao método em HPLC.

# 4.2.6. Análise das amostras de bílis por HPLC

As amostras de bílis foram submetidas ao tratamento enzimático conforme descrito no item 3.4.2.3 e foram injetadas diretamente no cromatógrafo a líquido.

A Tabela 48 mostra as concentrações medidas na análise das amostras de bílis diluídas e as concentrações calculadas de 1-hidroxipireno nas bílis.

	Concentração	Concentração na
Amostra	medida (ng mL <sup>-1</sup> )	bílis (µg mL⁻¹)
1	1,30	0,130
2	6,02	0,602
3	4,48	0,448
4	2,14	0,213
5	1,61	0,161
6	2,38	0,238
7	5,67	0,568
8	2,90	0,290
9	2,75	0,275
10	2,13	0,213
11	2,17	0,217
12	3,04	0,304
Média	3,05	0,305
DP	1,53	0,153
%CV	50%	50%

Tabela 48- Concentrações de 1-hidroxipireno na amostra diluída e na bílis por HPLC.

A Figura 26 mostra o cromatograma de algumas das amostras injetadas. Pode-se observar um primeiro pico, característico da bílis (compostos muito polares presentes na matriz) e o pico referente ao 1-hidroxipireno.

Com o objetivo de concluir se a hidrólise enzimática era mesmo necessária, todas as amostras foram também injetadas apenas diluídas, tanto na proporção de 1:2000 com etanol 48% (utilizada no método em fluorescência) quanto na proporção de 1:100 novamente com etanol 48% (utilizada no método em HPLC-F com hidrólise, onde 10 µL de bílis são diluídos até 1 mL de volume final). A Figura 27 representa os cromatogramas obtidos com a diluição 1:2000 e a Figura 28 mostra os crormatogramas obtidos com a diluição 1:100. Pode-se observar que, nas amostras apenas diluídas, não se observa nenhum pico no tempo de retenção referente ao composto em estudo. Apenas quando é analisada amostra hidrolisada pode-se observar o pico característico do 1-hidroxipireno.

Assim, pode-se concluir que a etapa da hidrólise enzimática, no método em HPLC-F, é um passo extremamente importante na correta quantificação do metabólito em estudo.



Figura 26-Cromatogramas de algumas amostras de bílis hidrolisadas.



Figura 27-Cromatogramas de amostras de bílis diluídas 1:2000 e hidrolisada.



Figura 28- Cromatogramas de amostras de bílis diluídas 1:100 e bílis submetida ao processo de hidrólise.

A Tabela 49 compara os resultados obtidos neste trabalho com resultados disponíveis na Literatura. Pode-se observar que os valores obtidos são compatíveis com os dados disponíveis na Literatura.

Tabela 49-Comparação das concentrações de 1-hidroxipireno obtidas neste trabalho e disponíveis na Literatura.

Trabalhos	Concentração de 1-		
	hidroxipireno (μg mL <sup>-1</sup> ) – HPLC		
Este trabalho	0,21 a 0,60		
Ruddock (2003)	0,12 a 7,6		
Ruddock (2002)	Acima de 0,22		
Richardson (2001)	<ld 1,4<="" a="" td=""></ld>		

# 4.3.

# Comparação entre as duas técnicas estudadas

A Tabela 50 mostra uma comparação de alguns parâmetros discutidos neste trabalho entre as duas técnicas.

Parâmetro	Fluorimetria	HPLC-F
Limite de detecção	1,41 ng mL <sup>-1</sup>	0,1 ng mL⁻¹
Limite de quantificação	4,27 ng mL <sup>-1</sup>	5,45 ng mL⁻¹
Repetitividade	6,3%	4,9%
Reprodutibilidade	12%	15%
Incerteza padrão combinada	0,5891 ng mL⁻¹	0,6972 ng mL <sup>-1</sup>

Tabela 50-Comparação entre os parâmetros avaliados nas duas técnicas.

Pode-se observar que a técnica fluorimétrica apresenta melhores limite de quantificação e reprodutibilidade e menor incerteza. Já a técnica utilizando HPLC-F apresenta menores limite de detecção e repetitividade.

As duas técnicas aqui estudadas apresentam vantagens e desvantagens. A cromatografia a líquido separa alguns dos componentes individuais presentes na matriz e quantifica o composto em estudo, além de apresentar incerteza mais baixa. Já a espectroscopia de fluorescência molecular apresenta menor incerteza e é uma técnica bem mais rápida, simples e de custo mais baixo que a cromatografia. Assim, sugere-se a utilização da espectroscopia de fluorescência como uma técnica inicial, para separar amostras que devem ser analisadas também por alguma outra técnica quantitativa, das amostras que podem ser analisadas apenas semiquantitativamente, evitando desperdício de tempo, reagente e equipamentos.

A Tabela 51 mostra uma comparação entre os dados obtidos para as amostras analisadas por espectroscopia e por cromatografia. Pode-se observar que os valores obtidos por fluorimetria são maiores do que os obtidos por HPLC. Isto se deve ao fato de que a técnica espectrofluorimétrica é semiquantitativa, ou seja, todos os compostos presentes na bílis que fluorescem no mesmo comprimento de onda do composto em estudo serão quantificadas. Já a cromatografia líquida separa alguns compostos presentes na bílis, detectando, no comprimento de onda do 1-hidroxipireno e em seu tempo de retenção, apenas este metabólito.

Foi feito um teste de Pearson para analisar se as duas técnicas estudadas apresentaram correlação. O resultado está demonstrado na Tabela 52. Com P-Valor < 0,05, rejeita-se a hipótese nula, ou seja, há correlação. Pode-se observar que os dois métodos apresentaram uma boa correlação positiva.

Os resultados obtidos corroboram estudo disponível na Literatura (Vuontisjärvi, 2004), onde as duas técnicas aqui discutidas já haviam sido comparadas, também apresentando boa correlação positiva.

Tabela 51-Comparação entre as concentraçõe	s obtidas por fluorescência molecular e
HPLC-F para as amostras de bílis.	

<b>.</b> .	Concentração em equivalentes de 1-OHPy	Concentração de 1- OHPv (ug mL <sup>-1</sup> ) -
Amostra	(µg mL <sup>-1</sup> ) – Fluorimetria	HPLC
1	-	0,130
2	9,12	0,602
3	4,88	0,448
4	6,10	0,213
5	-	0,161
6	3,06	0,238
7	8,26	0,568
8	3,48	0,290
9	5,93	0,275
10	2,72	0,213
11	3,83	0,217
12	3,63	0,304
Média	5,10	0,305
DP	2,21	0,153
%CV	43,4	50%

Tabela 52-Resultado do teste de Pearson para avaliação da correlação entre os dois métodos.

Pearson correlation of fluorescence and HPLC = 0.802		
P-Value = 0.005		

Acredita-se que a alta variação encontrada nas amostras analisadas se deva às diferenças individuais na exposição aos contaminantes e às diferenças de status alimentar, já que os níveis de metabólitos de HPA na bílis tipicamente mostram variabilidade elevada. A vesícula biliar é esvaziada logo após a refeição, após a qual se enche muito rapidamente com água. Ao longo do tempo os níveis de metabólitos de HPA se acumulam até a próxima alimentação. Assim, os níveis reais destes compostos dependem fortemente do status alimentar, que é difícil de ser controlado, no caso de monitoramento ambiental.