



**Alessandra Licursi Maia Cerqueira da Cunha**

**Desenvolvimento e validação de método fosforimétrico em  
substrato de celulose para determinação de pireno e  
criseno.**

**Tese de Doutorado**

Tese apresentada como requisito parcial para  
obtenção do título de Doutor pelo Programa de Pós-  
Graduação em Química da PUC-Rio.

Orientadores: Dr. Ricardo Queiroz Aucélio  
Dra. Roberta Lourenço Ziulli

Rio de Janeiro  
março de 2007



**Alessandra Licursi Maia Cerqueira da Cunha**

**Desenvolvimento e validação de método fosforimétrico em  
substrato de celulose para determinação de pireno e  
criseno.**

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Química da PUC-Rio. Aprovada pela Comissão Examinadora abaixo assinada.

**Prof. Ricardo Q. Aucélio**  
Orientador  
PUC-Rio

**Profa. Roberta L. Ziolli**  
Co-orientadora  
PUC-Rio

**Dra. Vanderléa de Souza**  
DQUIM - INMETRO-RJ

**Prof. Ricardo J. Cassela**  
Departamento de Química - UFF

**Prof. Maurício N. Frota**  
Programa de Pós-graduação em Metrologia - PUC-Rio

**Prof. Reinaldo C. de Campos**  
Departamento de Química - PUC-Rio

**Profa. Judith Felcman**  
Departamento de Química - PUC-Rio

**Profa. Isabel M. Moreira**  
Departamento de Química - PUC-Rio

**Prof. José Eugenio Leal**  
Coordenador Setorial do Centro Técnico Científico - PUC-Rio

Rio de Janeiro, 05 de março de 2007

Todos os direitos reservados. É proibida a reprodução total ou parcial do trabalho sem autorização da universidade, da autora e do orientador.

### **Alessandra Licursi Maia Cerqueira da Cunha**

Mestre em Metrologia pela Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro (Jan./2000). Graduada em Química Bacharelado e Licenciatura Plena pela Faculdade de Humanidades Pedro II (1995). Atuou na área industrial de bebidas (AmBev) durante 11 anos gerenciando as áreas Físico-Química e Metrológica de todos os laboratórios e Unidades Fabris. Teve também como responsabilidade a implantação da Metrologia para Qualidade Industrial na empresa, bem como o cumprimento às normas ISO 9001 e 17025.

Ficha Catalográfica

Cunha, Alessandra Licursi Maia Cerqueira da

Desenvolvimento e validação de método fosforimétrico em substrato de celulose para determinação de criseno e pireno / Alessandra Licursi Maia Cerqueira da Cunha; orientador: Ricardo Q. Aucélio; co-orientadora: Roberta L. Ziolli. – 2007.

187 f. : il. ; 30 cm

Tese (Doutorado em Química)–Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.

Inclui bibliografia e anexo

1. Química – Teses. 2. Fosforimetria na temperatura ambiente. 3. Efeito seletivo do átomo pesado. 4. Varredura sincronizada. 5. Pireno. 6. Criseno. 7. Validação e estimativa de incerteza em medições químicas. I. Aucélio, Ricardo Q. II. Ziollo, Roberta L. III. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro. Departamento de Química. III. Título.

CDD: 540

A minha filha **Giulia**, que pouco entendia, mas soube "compreender" os momentos de ausência e ao meu marido **Carlos**, pelo carinho, paciência, companheirismo e parceria, pois sem ele esse trabalho não teria se concretizado. Amo vocês!!

TUDO QUE NÓS VIVIDAMENTE IMAGINAMOS,  
ARDENTEMENTE DESEJAMOS,  
SINCERAMENTE ACREDITAMOS,  
E ENTUSIASTICAMENTE COLOCAMOS AÇÃO,  
INEVITAVELMENTE, TORNAR-SE-Á REALIDADE.

## **Agradecimentos**

A Deus, que me guiou para que eu conseguisse concluir este trabalho.

Ao Professor Ricardo Aucélio, pela orientação efetiva, apoio, incentivo, colaboração, parceria e, sobretudo confiança, que acreditou no meu retorno à PUC. Muito obrigada!

Ao Departamento de Química por ter me dado a oportunidade de retorno ao doutorado.

Ao Dr. Maurício Frota, pela amizade, grande incentivo e apoio, que inúmeras vezes me encaminhou para tomadas de decisões importantes. Muito obrigada!

À amiga Flávia Marquês, pela força e incentivo no meu retorno ao doutorado e amizade e apoio ao longo do trabalho nos momentos difíceis.

Ao Mestre Paulo Couto, pelo seu pronto atendimento e ensinamentos. Obrigada pelas "incertezas"!

À equipe do LEEA, aos amigos Selma, Sonia, Wagner, Carlos, Ilfran, Flavia Figueiredo, Elaine e Eliane pelo apoio durante esse trabalho.

À Roberta Lyrio, pelas coletas realizadas em conjunto e auxílios ao longo do trabalho.

À professora Roberta Ziolli e equipe do LEA, pelo apoio e parceria nas coletas.

À professora Angela Wagener, a equipe do LABMAN e em especial a Cassia, por ceder o laboratório para pesagem e extração.

Ao Anselmo, pelo pronto atendimento na utilização do espectrofotômetro.

À equipe do INMETRO, em especial Janaína e Marcus, pela colaboração e padrões cedidos.

Ao Laboratório de Caracterização de Fluidos, LCF – PUC-Rio, em especial ao Paulo Roberto e Tatiana, pela colaboração na calibração dos balões e micropipetas.

À Ana Cristina, pelas dúvidas de estatística esclarecidas.

Ao Sr. Irani, pelo auxílio nas coletas.

Aos meus pais, avó, irmãos, enfim todos da minha família e amigos que souberam compreender os momentos ausentes e que deram atenção e carinho a Giulia.

E a todos que de alguma forma colaboraram para a execução deste trabalho.

## Resumo

Cunha, Alessandra Licursi Maia Cerqueira; Aucélio, Ricardo Queiroz. **Desenvolvimento e validação de método fosforimétrico em substrato de celulose para determinação de pireno e criseno.** Rio de Janeiro, 2007. 187p. Tese de Doutorado – Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

Neste trabalho, a fosforimetria em temperatura ambiente em substrato sólido (SSRTP) foi utilizada para o desenvolvimento de método para determinação ultra-traço e seletiva de criseno e de pireno em amostras complexas contendo diversos outros hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA). O criseno e o pireno foram selecionados por serem classificados pela Agência Americana de Proteção ao Meio Ambiente (U.S. Environmental Protection Agency – EPA) como dois dos dezesseis HPA poluentes prioritários e por serem conhecidos como uma ameaça à saúde pública e à integridade dos ecossistemas marinhos. A capacidade seletiva da SSRTP foi explorada por meio do efeito externo seletivo do átomo pesado e do ajuste de pH da solução carreadora de solução de analito para o substrato de celulose. O efeito da modificação da celulose com o surfactante SDS também foi investigado, assim como o uso da varredura de modo sincronizado para melhoria da resolução espectral. O nitrato de prata em substratos contendo SDS foi identificado como indutor seletivo de fosforescência do criseno em relação ao pireno e demais HPA em estudo (antraceno, benzo[a]pireno, 1-hidroxipireno, fluoranteno, fenantreno, benzo[ghj]perileno e 1,2 benzoantraceno). Já o pireno foi determinado seletivamente com varredura convencional e sincronizada de fosforescência em substratos contendo nitrato de chumbo como indutor seletivo e soluções carreadoras de analito em meio básico (pH 12). Essa seletividade foi em relação aos HPA citados, e ao 1-hidroxipireno, mesmo este tendo uma estrutura molecular muito semelhante a do pireno. O



planejamento fatorial foi usado, principalmente visando verificar as interações mútuas entre os efeitos das diferentes variáveis do método desenvolvido, e, conseqüentemente, a escolha da melhor condição experimental. Neste estudo, foram enfatizados: (i) a análise experimental estatística (testou-se a significância dos efeitos dos fatores usando a análise de variância, teste F e teste t), (ii) o uso do método gráfico (gráfico de Pareto) para a interpretação das interações (entre as variáveis) e dos resultados obtidos, assim como o refinamento do modelo, se necessário, excluindo variáveis irrelevantes. As características de desempenho foram obtidas, a fim de se validar o método proposto, obtendo assim a credibilidade técnica das medições. Testes estatísticos (testes de hipótese) com o uso de material de referência certificado (SRM NIST 1647d) e método de referência alternativo (HPLC com detecção por fluorescência) também foram incluídos no processo de validação e os resultados encontrados estão dentro do nível de 95% de confiança. Os limites de detecção do criseno e do pireno em termos de massa efetiva do analito depositada no substrato (limite de detecção absoluto - LDA) encontram-se na ordem do ng. A quantificação das fontes de variação associadas à medição, a incerteza da medição, foi estimada pelo ISO GUM e método de simulação de Monte-Carlo. Testes de seletividade com criseno e pireno na presença de outros HPA também foram realizados e os resultados obtidos permitiram que a técnica fosse utilizada para determinações seletivas. A aplicação do método em diferentes tipos de matrizes (bólis de peixe e aguardente de cana) também foi realizada e os percentuais de recuperação encontrados foram  $109 \pm 18\%$  (criseno) e  $108 \pm 20\%$  (pireno). Esses resultados são comparáveis com os obtidos por HPLC-fluorescência:  $104 \pm 13\%$  (criseno) e  $102 \pm 15\%$  (pireno). Estudos de caracterização, homogeneidade e estabilidade do criseno em matriz biológica, bólis de peixe da espécie *Mugil liza*, e a estimativa da incerteza da medição do material analisado também foram realizados. A incerteza da medição encontra-se na ordem do ng (referente à massa efetiva depositada no substrato de celulose).

## **Palavras-chave**

Fosforimetria na temperatura ambiente, efeito seletivo do átomo pesado, varredura sincronizada, pireno, criseno, validação e estimativa de incerteza em medições químicas.

## Abstract

Cunha, Alessandra Licursi Maia Cerqueira; Aucélio, Ricardo Queiroz. **Development and validation of the phosphorimetric method in cellulose substrate to determination of pyrene and chrysene.** Rio de Janeiro, 2007. 187p. Tese de Doutorado – Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

In this work, solid surface room-temperature phosphorimetry (SSRTP) was used to develop ultra-trace and selective methods for determination of chrysene and pyrene in complex samples containing several other polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). Both chrysene and pyrene were selected because they are classified by the U.S. Environmental Protection Agency (EPA) as two out of the sixteen major pollutants, affecting public health and marine ecosystems. The selective capability of SSRTP was explored through the selective external heavy atom effect and the adjustment of pH of the analyte solution used to carry out the analyte to the cellulose substrate. Cellulose modification with the use of the surfactant sodium dodecyl sulphate (SDS) has also been evaluated as well as the use of synchronous scanning to improve its spectral resolution. Silver nitrate together with SDS was identified as selective phosphorescence inducer for chrysene in the presence of pyrene and other PAHs which are being studied (anthracene, benzo[a]pyrene, 1-hydroxypyrene, fluoranthene, phenanthrene, benzo[ghi]perylene and 1,2 benzoanthracene). On the other hand, pyrene was selectively determined with synchronous and conventional phosphorescence scanning in substrates treated with lead nitrate as a selective inducer and using analyte carrier solution with pH 12. This selectivity towards pyrene was achieved in the presence of all the other tested PAHs, including the 1-hydroxypyrene, even though they have quite similar molecular structures. A factorial design was applied in order to verify mutual interactions among

factors of the different variables and to find the best experimental conditions. It has been emphasized in this study: (i) statistical experimental analysis (testing the significance of the factors using the analysis of variation, F-test and t-test), (ii) graphic method (Pareto's chart) to the interpretation and evaluation of the interactions among all the variables and obtained results, the model was refined whenever necessary so exclude irrelevant variables. After choosing the best experimental condition, the performance characteristics were obtained validating the proposed method. Statistical tests were applied in order to compare results obtained using a standard reference material analysis (NIST SRM 1647d). The proposed method was also compared with a reference analytical technique (HPLC with fluorescence detection) and the results obtained are within 95% confidence level. Chrysene and pyrene absolute detection limits were found in the ng order. The quantification of the variation sources associated to the measurement (the measurement's uncertainty) was estimated based on ISO GUM and Monte-Carlo simulation method. Selectivity tests for chrysene and pyrene, in presence of the other PAHs were also performed. The methods were applied to different types of samples (fish bilis and spirit drink from sugar cane) and the recoveries were  $109 \pm 18\%$  (chrysene) and  $108 \pm 20\%$  (pyrene) by SS RTP. These results are comparable to ones obtained by HPLC-Fluorescence:  $104 \pm 13\%$  (chrysene) and  $102 \pm 15\%$  (pyrene). Characterization, homogeneity and stability studies in a biological matrix (fish bilis of the type *Mugil liza*) and the estimation of uncertainty of the analysed material were also done. The measurement uncertainty was found in ng order (in terms of the effective mass deposit in the cellulose substrate).

## Key-words

Room-temperature phosphorimetry, selective heavy atom effect, synchronous scanning, chrysene, pyrene, validation and uncertainty estimation chemical measurement.

# Sumário

1	Introdução e objetivo	29
1.1.	Fosforescência na temperatura ambiente em substrato sólido	29
1.1.1.	Espectrofotometria luminescente sincronizada	33
1.1.2.	Parâmetros que afetam a intensidade de sinal	33
1.2.	Hidrocarbonetos Poliaromáticos (HPA)	35
1.2.1.	Aspectos Históricos	37
1.2.2.	Principais Fontes Emissoras	38
1.2.3.	HPA e o Meio Ambiente	39
1.2.4.	HPA e a Saúde pública	40
1.2.5.	Monitoramento biológico	42
1.2.6.	Aplicações	43
1.2.6.1.	Bílis de peixes	43
1.2.6.2.	Cachaça	46
1.3.	Fosforimetria na determinação de HPA	49
1.4.	Objetivo	50
2	Materiais e métodos	53
2.1.	Reagentes, materiais e soluções	53
2.1.1.	Reagentes e materiais	53
2.1.2.	Soluções	55
2.2.	Instrumentação	55
2.2.1.	Reator fotoquímico	55
2.2.2.	Espectrofotômetro de luminescência	56
2.2.3.	Espectrofotômetro de absorção UV/VIS/NIR	58
2.2.4.	Cromatógrafo em fase líquida de alta eficiência	58
2.2.5.	Equipamentos auxiliares	59
2.3.	Procedimentos	60
2.3.1.	Coleta, extração e preparo de amostras de bílis	60
2.3.2.	Substratos de celulose	63

2.3.3. Limpeza do material a ser utilizado nas determinações de HPA	64
2.3.4. Procedimento de medição por SS RTP	64
2.3.5. Procedimento de medição por HPLC	66
3 Resultados e Discussão - Características fosforescentes dos HPA, ajuste de condições experimentais e avaliação da seletividade	67
3.1. Características fosforescentes dos HPA	67
3.1.1. Efeito dos diferentes sais de átomos pesados (AP) e do SDS nos sinais fosforescentes dos HPA	67
3.1.1.1. Pireno	68
3.1.1.2. Criseno	70
3.1.1.3. Outros HPA	72
3.1.2. Estudo da influência do tratamento fotoquímico (radiação UV) no pireno e criseno	74
3.1.2.1. Pireno	75
3.1.2.2. Criseno	75
3.1.3. Estudo da influência da variação da acidez e basicidade da solução carreadora de pireno e de criseno	77
3.1.3.1. Pireno	77
3.1.3.2. Criseno	79
3.1.4. Estudo da influência da variação do pH no pireno e criseno irradiados com UV	81
3.2. Ajuste de condições experimentais	81
3.2.1. Otimização da fosforescência do pireno induzida por $TiNO_3$	83
3.2.1.1. Estudo univariado dos parâmetros	83
3.2.1.2. Estudo multivariado (planejamento fatorial) da fosforescência do pireno induzida por $TiNO_3$	86
3.2.2. Otimização da fosforescência do pireno induzida por $Pb(II)$	91
3.2.3. Estudo multivariado (Planejamento Fatorial) da fosforescência do pireno induzida por $Pb(NO_3)_2$	91
3.2.4. Otimização da fosforescência do criseno induzida por $AgNO_3$	99
3.2.4.1. Estudo univariado dos parâmetros	100
3.2.4.2. Estudo multivariado (Planejamento Fatorial) da fosforescência	

do criseno induzida por AgNO <sub>3</sub>	102
3.3. Avaliação de seletividade na determinação do criseno e do pireno	105
4 Resultados e discussão – Validação do método	113
4.1. Linearidade	114
4.1.1. Linearidade do criseno	115
4.1.2. Linearidade do pireno	117
4.2. Capacidade de detecção	119
4.2.1. Limite de detecção	119
4.2.2. Limite de quantificação	120
4.3. Robustez	121
4.4. Precisão	122
4.4.1. Repetitividade	122
4.4.2. Reprodutibilidade	123
4.5. Tendência ou Recuperação (%)	127
4.5.1. Comparação com material de referência certificado	129
4.5.2. Comparação entre métodos	131
5 Resultados e discussão – Confiabilidade Metrológica e Incerteza de Medição	134
5.1. Etapas gerais para a estimativa da Incerteza da medição	138
5.1.1. ISO GUM	138
5.1.2. Método de Simulação de Monte Carlo	143
5.2. Resultados e discussão	144
5.2.1. ISO GUM	144
5.2.2. Método de Monte Carlo	152
6 Aplicações	155
6.1. Bólis de peixe	156
6.1.1. Determinação de criseno e de pireno em bólis fortificada	156
6.1.2. Aplicação do método SSRTP em estudo de homogeneidade de um “pool” de bólis	160
6.1.3. Aplicação do método SSRTP em estudo de estabilidade da bólis	162
6.2. Cachaça	166

7 Conclusões e recomendações	170
8 Referências	173
9 Anexos	177



## Lista de figuras

Figura 1: Diagrama modificado de Jablonskii (adaptação da fonte Vo-Dinh, John Wiley & Sons, 1984). Absorção (A), relaxamento vibracional (RV), conversão interna (CI), fluorescência (F), cruzamento intersistemas (CIS) e fosforescência (P).	31
Figura 2 Tainhas após coleta em curral	46
Figura 3 : Fluxo da estratégia inicial para desenvolver, otimizar, validar e estimar a incerteza de metodologia baseada na SS RTP para determinação seletiva de criseno e pireno.	52
Figura 4: Sistema de purga com nitrogênio, composta por unidade de desoxigenação e de desumidificação do gás.	54
Figura 5: Reator fotoquímico com seis lâmpadas de mercúrio (potência teórica total de 24 W).	56
Figura 6 : Espectrofotômetro de luminescência Perkin-Elmer LS 55.	57
Figura 7: Esquema óptico do espectrofosforímetro LS 55 – Perkin Elmer (fonte: manual do equipamento).	57
Figura 8: Acessório para realizar a medição - (a) colocação do substrato de papel no suporte que é acoplado ao (b) aparato de medição em superfície sólida.	58
Figura 9: Sistema de secagem a vácuo para substratos de papel.	60
Figura 10: Visão da Baía da Guanabara no local da coleta (Magé).	60
Figura 11: Detalhes do curral de peixes – Baía da Guanabara, Magé.	61
Figura 12: Detalhes do momento da coleta no curral em Magé.	61
Figura 13 : Praia de Itaipu com detalhe do barco pesqueiro utilizado para coleta.	61
Figura 14: Resumo do processo de extração e tratamento da bÍlis do peixe para determinação por SS RTP.	63
Figura 15: Etapas de tratamento do papel de filtro para minimizar o sinal de fundo (1- lavagem; 2- secagem com lâmpada IR; 3- tratamento com irradiação UV e 4- papéis após tratamento).	64
Figura 16: Esquema descrevendo o procedimento geral da técnica	

- SSRTP, onde a ordem a ser seguida é sempre surfactante, átomo pesado e analito. 65
- Figura 17: Estrutura química de nove HPA. 68
- Figura 18: Espectro de excitação e emissão do pireno (51 ng) na presença do nitrato de tálio (indicado acima como o íon de átomo pesado do sal) em substratos de papel contendo ou não 100 µg de SDS. 69
- Figura 19: Espectro de excitação e emissão do pireno (51 ng) na presença de nitrato de chumbo (indicado acima como o íon de átomo pesado do sal) em substratos de papel contendo ou não 100 µg de SDS. 70
- Figura 20 : Espectro de excitação e emissão do criseno (57 ng) na presença de nitrato de tálio (indicado acima como o íon de átomo pesado do sal) em substratos de papel contendo ou não 100 µg de SDS. 71
- Figura 21: Espectro de excitação e emissão do criseno (57 ng) na presença de nitrato de prata (indicado acima como o íon de átomo pesado do sal) em substratos de papel contendo ou não 100 µg de SDS. 71
- Figura 22: Espectro de excitação e emissão do criseno (57 ng) na presença de nitrato de chumbo (indicado acima como o íon de átomo pesado do sal) em substratos de papel contendo ou não 100 µg de SDS. 72
- Figura 23: Espectro de emissão do criseno (57 ng) irradiado (30 min UV) na presença de nitrato de chumbo (indicado acima como o íon de átomo pesado do sal) em substratos de papel contendo ou não 100 µg de SDS. (Espectro indicado é atenuado para 25% do valor original). 76
- Figura 24: Gráfico de barras do pireno (51 ng) na presença de nitrato de tálio (indicado acima como o íon de átomo pesado do sal) em substratos de papel na presença e ausência de SDS e em função da concentração hidrogeniônica da solução carreadora de analito. 78

- Figura 25: Gráfico de barras do pireno (51 ng) na presença de nitrato de chumbo (indicado acima como o íon de átomo pesado do sal) em substratos de papel e em função da concentração hidrogeniônica da solução carreadora de analito. 79
- Figura 26: Gráfico de barras do criseno (57 ng) na presença de nitrato de tálio (indicado acima como o íon de átomo pesado do sal) em substratos de papel na presença e ausência de 100 µg de SDS e em função da concentração hidrogeniônica da solução carreadora de analito. 80
- Figura 27: Gráfico de barras do criseno (57 ng) na presença de nitrato de prata (indicado acima como o íon de átomo pesado do sal) em substratos de papel na presença e ausência de 100 µg de SDS e em função da concentração hidrogeniônica da solução carreadora de analito. 80
- Figura 28: Gráfico de barras de emissão do criseno (57 ng) na presença de nitrato de chumbo (indicado acima como o íon de átomo pesado do sal) em substratos de papel na presença e ausência de 100 µg de SDS e em função da concentração hidrogeniônica da solução carreadora de analito. 81
- Figura 29: Espectro de emissão de fosforescência de 5 ng de pireno em função da concentração de solução de  $\text{TINO}_3$  depositada no substrato. Excitação em 335 nm. 84
- Figura 30: Estudo da influência da variação da massa de SDS no substrato de papel no sinal fosforescente do pireno induzido por  $\text{TINO}_3$ . 86
- Figura 31: Gráfico de Pareto para fosforescência de pireno induzida por  $\text{TINO}_3$  89
- Figura 32: Ajuste final da massa de  $\text{TINO}_3$  (por meio de adições múltiplas de solução  $0,20 \text{ mol L}^{-1}$ ) no substrato contendo 360 µg de SDS para indução de fosforescência de 5 ng de pireno. 90
- Figura 33: Gráfico de Pareto para fosforescência de pireno induzida por  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ . 92
- Figura 34 : Gráfico de Pareto para fosforescência de pireno induzida

por $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ – Reavaliação I.	95
Figura 35 : Gráfico de Pareto para fosforescência de pireno induzida por $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ – Reavaliação II.	96
Figura 36 : Fosforescência do pireno (5 ng) em função da massa de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ depositada no substrato. Solução previamente irradiada com UV por 30 min. (média das medições $\pm 1$ desvio padrão).	98
Figura 37 : Estudo da fosforescência de 5 ng pireno induzida por $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ em função do tratamento da solução carreadora de analito com radiação UV (média das medições $\pm 1$ desvio padrão).	99
Figura 38 : Estudo da variação da fosforescência de 5 ng de criseno em função da massa de $\text{AgNO}_3$ depositado no substrato de celulose. Solução carreadora usada foi etanol/água 50/50% v/v.	101
Figura 39: Estudo da variação da fosforescência de 5 ng de criseno induzida por 20 $\mu\text{g}$ de $\text{AgNO}_3$ em função da massa de SDS depositado no substrato de celulose. Solução carreadora usada foi etanol/água 50/50% v/v.	102
Figura 40: Gráfico de Pareto para fosforescência de criseno induzida por $\text{AgNO}_3$ .	104
Figura 41: Espectros obtidos pela técnica SS RTP para criseno na presença de $\text{AgNO}_3$ : (a) criseno; (b) criseno em mistura equimolar com 8 HPA.	108
Figura 42: Sinais fosforescentes de criseno induzido por $\text{AgNO}_3$ em substratos de papel onde foram depositadas soluções contendo criseno e pireno em três proporções molares. Varredura sincronizada com $\Delta\lambda$ igual a 244 nm.	109
Figura 43: Espectro de absorção do criseno e pireno.	110
Figura 44: Espectros de absorção do pireno, criseno e demais HPA (antraceno, benzo[a]pireno, 1-OH pireno, fenatreno, fluoranteno, benzo[gh]perileno e 1,2 benzo antraceno).	110
Figura 45: Espectro de absorção do pireno e do 1-OH pireno.	111
Figura 46: Espectro de fosforescência do pireno e do 1-OH pireno na	

presença dos demais HPA usando efeito externo com $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ e solução carreadora em pH 12.	112
Figura 47: Curva analítica para o criseno (em termos de concentração dos 5 $\mu\text{L}$ de solução) utilizando substrato contendo SDS (360 $\mu\text{g}$ ) e $\text{AgNO}_3$ (30 $\mu\text{g}$ ).	117
Figura 48: Curva analítica para o pireno (em termos de concentração dos 5 $\mu\text{L}$ de solução carreadora em meio básico) utilizando substrato contendo $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (993 $\mu\text{g}$ ).	118
Figura 49 diagrama causa e efeito	139
Figura 50 : Representação gráfica das distribuições de probabilidade normal.	140
Figura 51: Gráficos de $f(x)$ da variação do mensurando $y$ em função das grandezas de entrada $x$ e $a$	141
Figura 52 : Curva da distribuição “t Student”	142
Figura 53 : Modelo da planilha do programa “Crystal ball” para simulação de Monte Carlo	144
Figura 54: Espinha de peixe (diagrama de causa efeito) de um método típico SSRTP.	145
Figura 55: Espinha de peixe (diagrama de causa efeito) em fase de ajuste.	146
Figura 56 : Espinha de peixe (diagrama de causa efeito – revisão 01), após avaliação e ajuste das fontes de incertezas.	146
Figura 57: Gráfico de barras mostrando a contribuição de incerteza de cada componente, ou seja, o balanço das incertezas.	152
Figura 58 : Histograma de freqüência da geração de números aleatórios para uma variável com distribuição normal.	154
Figura 59 : Espectro de absorção do pireno na ausência e na presença de bÍlis.	156
Figura 60 : Espectro de absorção do criseno na ausência e presença de bÍlis.	157
Figura 61: Varredura sincronizada de bÍlis e bÍlis fortificada (A) criseno (53 ng) na presença de SDS e $\text{AgNO}_3$ e (B) pireno (53 ng) na presença de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ e solução carreadora em meio	

básico.	158
Figura 62: Percentual de criseno recuperado na curva de adição de analito.	159
Figura 63: Percentual de pireno recuperado na curva de adição de analito.	160
Figura 64: Curvas analíticas de criseno na presença e ausência de cachaça	167
Figura 65: Espectros SS RTP em modo sincronizado para (A) cachaça fortificada com criseno e (B) cachaça fortificada com pireno. Em ambos os casos a fortificação de HPA em cachaça foi equivalente a $5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ .	169

## Lista de tabelas

Tabela 1: Carcinogenicidade, genotoxicidade e mutagenicidade de alguns HPA. (Bouchez et al., 1996 a partir de dados do IARC, 1986)	36
Tabela 2: Nomes e abreviaturas dos HPA recomendados pela EPA.	38
Tabela 3: Gradiente para determinação de pireno, 1-OH pireno e criseno por HPLC com detecção por fluorescência utilizando coluna com temperatura estabilizada em 35 °C.	66
Tabela 4: Resultados dos estudos preliminares de FTA na presença de AP.	73
Tabela 5: Resultados dos estudos preliminares de FTA na presença de AP e 100 µg de SDS (valores reportados em amplificação de sinal fosforescente comparados com os sinais na ausência de SDS)	74
Tabela 6: Resultados obtidos com os experimentos do planejamento fatorial: 2 <sup>3</sup> usando TiNO <sub>3</sub>	88
Tabela 7: Estatística ANOVA para fosforescência de pireno induzida por TiNO <sub>3</sub> .	89
Tabela 8: Estimativa de efeitos para fosforescência de pireno induzida por TiNO <sub>3</sub> .	90
Tabela 9: Resumo das condições experimentais para indução de fosforescência do pireno na presença de nitrato de tálio.	91
Tabela 10 : Estatística ANOVA para fosforescência de pireno induzida por Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .	92
Tabela 11 : Estimativa de efeitos para fosforescência de pireno induzida por Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .	93
Tabela 12 : Resultados obtidos com os experimentos do planejamento fatorial 2 <sup>3</sup> usando Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> como sal indutor de fosforescência – reavaliação II.	96
Tabela 13 : Estatística ANOVA para fosforescência de pireno induzida por Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> – Reavaliação II.	97

Tabela 14 : Estimativa de efeitos para fosforescência de pireno induzida por $Pb(NO_3)_2$ – Reavaliação II.	97
Tabela 15 : Resumo das condições experimentais para indução de fosforescência do pireno na presença de nitrato de chumbo.	99
Tabela 16: Resultados obtidos com os experimentos do planejamento fatorial $2^3$ usando $AgNO_3$ como sal indutor de fosforescência.	103
Tabela 17: Estatística ANOVA para fosforescência de pireno induzida por $AgNO_3$ .	104
Tabela 18: Estimativa de efeitos para fosforescência de pireno induzida por $AgNO_3$ .	104
Tabela 19 : Resumo das condições experimentais para indução de fosforescência do criseno na presença de nitrato de prata.	105
Tabela 20: Características espectrais dos HPA na presença de $AgNO_3$ .	108
Tabela 21: Resumo dos dados extraídos dos três últimos experimentos (curvas analíticas) para o criseno	117
Tabela 22: Resumo dos dados extraídos dos três últimos experimentos (curvas analíticas) para o pireno	118
Tabela 23 : Parâmetros de capacidade de detecção para pireno e criseno.	121
Tabela 24: Resultados da avaliação da robustez para o pireno e criseno	122
Tabela 25 : Resultados para avaliação do atributo reprodutibilidade para o criseno	125
Tabela 26 : Resultados para avaliação do atributo reprodutibilidade para o pireno	126
Tabela 27: Planilha com memória de cálculo do tratamento estatístico (Microsort Excel) para a avaliação da reprodutibilidade do criseno.	126
Tabela 28 : Planilha com memória de cálculo do tratamento estatístico (Microsort Excel) para a avaliação da reprodutibilidade do pireno	127



Tabela 29 : Dados do teste com SRM 1647d para o pireno	130
<i>*Valores extraídos do certificado NIST SRM 1647d</i>	130
Tabela 30 : Dados do teste com SRM 1647d para o criseno	131
Tabela 31 : Resultado do teste da comparação entre SS RTP e HPLC para o pireno	132
Tabela 32 : Resultado do teste da comparação entre SS RTP e HPLC para o criseno	133
Tabela 33 : Divisores para algumas distribuições de probabilidade	140
Tabela 34 : Relação entre “k” e o nível de confiança da distribuição normal.	143
Tabela 35 : planilha de cálculo da incerteza associada à curva analítica, com criseno na presença de SDS e AgNO <sub>3</sub> .	148
Tabela 36: Incertezas combinada e expandida estimadas por SS RTP	149
Tabela 37: Memória de cálculo da incerteza combinada e expandida pelo ISO GUM	150
Tabela 38 : Dados para geração da equação para Simulação de Monte Carlo	153
Tabela 39: Teste de comparação de médias entre amostras individuais de bÍlis e do pool de amostras de bÍlis.	162
Tabela 40: Comparação de características entre os testes de estabilidade isócrono e clássico.	163
Tabela 41 Resultados do tratamento estatístico do teste de estabilidade em geladeira.	164
Tabela 42: Resultados do tratamento estatístico do teste de estabilidade em freezer -20 °C	165
Tabela 43: Teste de comparação de médias entre duas curvas: com e sem a matriz “cachaça”	168
Tabela 44 : Recuperações de criseno e pireno em cachaça enriquecida.	169

## Siglas e abreviações

SSRTP – solid substrate in room temperature phosphorimetric  
(fosforimetria em temperatura ambiente e em substrato sólido)

SDS – sodium dodecyl sulfate (dodecil sulfato de sódio)

MRC – material de referência certificado

LD – limite de detecção

LDA – limite de detecção absoluto

NIST – National Institute of Standards and Technology

ISO GUM – Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement

EPA – U.S. Environmental Protection Agency (Agência Americana de  
Proteção ao Meio Ambiente)

PAC – compostos poliaromáticos

HPLC – cromatógrafo em fase líquida de alta eficiência

RTP – fosforimetria em temperatura ambiente

UV - ultravioleta

IR – infravermelho

NHPA – hidrocarbonetos poliaromáticos nitrogenados

OHPA - hidrocarbonetos poliaromáticos oxigenados

POP – poluentes orgânicos prioritários

N - naftaleno

A - antraceno

Pi - pireno

Cri - criseno

Fe - fenantreno

BaP – benzo[a]pireno

DiBahA – dibenzo[a,h]antraceno

BaA – benzo[a]antraceno

BgP – benzo[g,h,i]perileno

Ac - acenafteno

Ace - acenaftileno

Fl - fluoreno

Fluo - fluoranteno

BkFluo – benzo[k]fluoranteno

BbFluo – benzo[b]fluoranteno

IndP – indeno[1,2,3-c,d]pireno

IPCS – International Programme on Chemical Safety

1-OHP – 1-hidroxi pireno

GESAMP – Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Environmental Protection

PCA – análise de componentes principais

GC – cromatografia gasosa

MS – espectômetro de massa

AP – átomo pesado

u.a. – unidade arbitrária

$\lambda_{em}$  – comprimento de onda de emissão

$\lambda_{exc}$  – comprimento de onda de excitação

PF – planejamento fatorial

LQ – limite de quantificação

LQA – limite de quantificação absoluto

$s_r$  – desvio padrão da repetitividade

$s_R$  – desvio padrão da reprodutibilidade

$MQ_{entre}$  – mínimos quadrados entre analistas

$MQ_{dentro}$  – mínimos quadrados dentro das replicatas

EC – eletroforese capilar

JCGM – Joint Committee for Guides in Metrology

MCS – simulação de Monte Carlo

ANOVA – análise de variância

INMETRO- Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

SI – Sistema Internacional

$u_c$  – incerteza combinada

$u_{caract.}$  – incerteza relacionada à caracterização do MRC

$U_{\text{homog.}}$  – incerteza relacionada à homogeneidade do MRC

$U_{\text{transp.}}$  – incerteza relacionada ao transporte do MRC

$U_{\text{armaz.}}$  – incerteza relacionada ao armazenamento do MRC