

## 6 Aplicações

A partir dos testes de recuperação realizados nos ensaios de validação, a capacidade seletiva dos métodos SS RTP foi indicada, mostrando, em princípio, que a correta dos parâmetros experimentais foi correta. Assim, a etapa seguinte do trabalho foi a de concentrar esforços na viabilização da aplicação desses métodos nas amostras de bÍlis de peixe e de aguardente de cana (cachaça). No caso específico do pireno, uma reavaliação da condição experimental a ser empregada foi feita. Esse ajuste consistiu na eliminação do tratamento prévio com UV do procedimento experimental, motivada pelo receio de que esse processo em meio básico pudesse comprometer o procedimento pela falta de controle na geração de foto-derivados de componentes da matriz da bÍlis. A exclusão do tratamento UV reduz sinal fosforescente do pireno medido no papel (redução em torno de 50%), no entanto, como já mencionado, os comprimentos de onda máximos de excitação e de emissão assim como os formatos das bandas do pireno não são alterados. Esse tipo de comportamento leva a crer que o ganho de sinal observado em papel não seria proveniente de uma alteração química da estrutura do HPA, mas sim proveniente de uma alteração da propriedade do solvente etanólico em meio básico que favoreceu o sinal do pireno na presença de Pb(II) quando da deposição no substrato sólido. Essa teoria foi corroborada por resultados de um estudo que mostrou que eliminação do tratamento UV não provoca maiores alterações no ajuste das outras condições experimentais para indução de fosforescência do pireno.

## 6.1. Bílis de peixe

### 6.1.1. Determinação de criseno e de pireno em bílis fortificada

Estudos foram realizados em amostras de bílis de peixes provenientes, em princípio, de uma área livre de contaminação e por isso denominada “área de controle”. Nesse estudo foram usadas amostras de bílis fresca, e amostras de bílis armazenadas em congelador. Para tal, as amostras viscosas de bílis foram dissolvidas em etanol para em seguida serem fortificadas com quantidades conhecidas de criseno e de pireno (concentração final de  $5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ). O primeiro procedimento testado foi a diluição da bílis em um fator de 1:10 com etanol/água 50:50 v/v (1 mL de bílis para 10 mL de solução). Nesse caso, um efeito de matriz eliminou o sinal fosforescente dos HPA. Esse efeito de matriz pode ser explicado pela ligeira contribuição da bílis na região de absorção do criseno e do pireno (Figuras 59 e 60 respectivamente).



Figura 59 : Espectro de absorção do pireno na ausência e na presença de bílis.

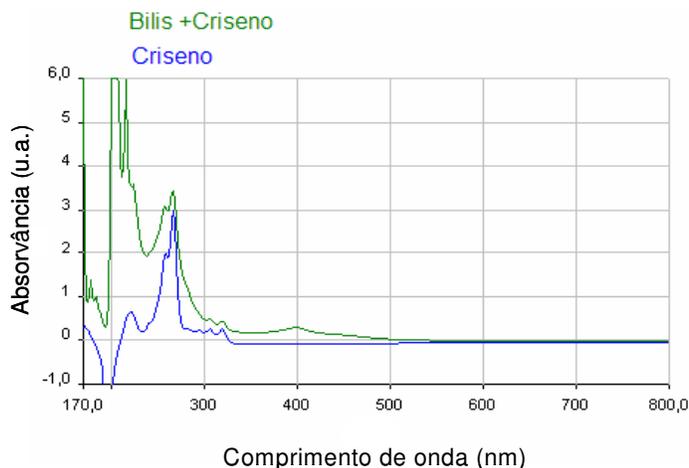


Figura 60 : Espectro de absorção do criseno na ausência e presença de bÍlis.

Para tentar minimizar essa interferência, dois procedimentos foram testados: (i) clarificação de amostra com adição de 1 g de sulfato de amônio para precipitar parte do conteúdo protéico; e (ii) passagem da amostra por coluna C18. Nenhum dos casos resultou em sucesso. A partir desses testes, testou-se a diluição da amostra de modo a minimizar a contribuição da matriz no substrato. Esse procedimento tem o inconveniente de reduzir a quantidade de analito a ser mensurado no substrato, porém a capacidade de detecção do método pode compensar isso. Dos vários fatores de diluição testados (fatores de 1:50; 1:100; 1:250 e 1:1000), verificou-se ainda efeito de matriz. As amostras de bÍlis apresentaram uma variedade muito grande de cores e de turvação, trazendo a tona à possibilidade desse material estar causando problemas nas medições em papel, pois após a secagem, o substrato mantinha a coloração original da bÍlis no local onde a amostra era adicionada. Por causa disso, as amostras de bÍlis foram passadas por um cartucho de sílica, que reteve a parte colorida da matriz, resultando em amostras mais límpidas e homogêneas independente da coloração original da bÍlis. Testes preliminares indicaram que os dois HPA não eram retidos na coluna.

O resultado desse processo foi à viabilização da quantificação do criseno e do pireno, sendo que o procedimento considerado mais satisfatório foi o de diluição da bÍlis por um fator de 1:50 (0,2 mL de bÍlis

para 10 mL de solução) seguida da passagem desse material em cartucho de sílica (tamanho médio de partícula de 0,45  $\mu\text{m}$ ). Nesse caso, um efeito de matriz ainda foi observado com a diminuição relativa do sinal dos HPA em relação ao obtido a partir de um padrão aquoso de mesma concentração (diminuição de 45%), logo o procedimento de adição de analito foi adotado. Assim, toda a curva de adição teve que ser passada nas colunas de sílica.

Espectros de varredura sincronizada de criseno e de pireno em bÍlis com os respectivos brancos de encontra-se na Figura 61. O sinal de fundo da bÍlis no caso do criseno é caracterÍstico da amostra e relativamente constante para todas as amostras de bÍlis testadas.

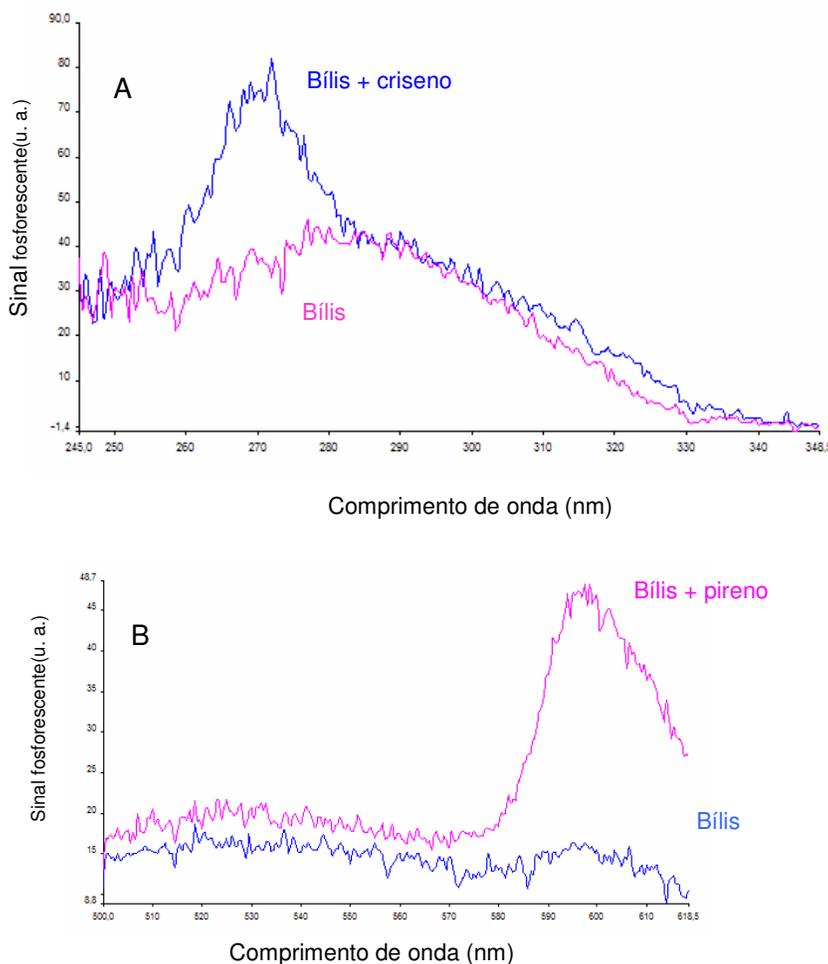


Figura 61: Varredura sincronizada de bÍlis e bÍlis fortificada (A) criseno (53 ng) na presença de SDS e  $\text{AgNO}_3$  e (B) pireno (53 ng) na presença de  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  e solução carreadora em meio básico.

Testes de recuperação analítica foram feitos em amostras de bÍlis da área de controle fortificadas com criseno e com pireno. Os resultados de tendência foram expressos em percentual (valor medido, normalmente a média de cinco replicatas dividida pelo valor esperado x 100). Os resultados obtidos foram de  $94 \pm 19\%$  para criseno e de  $103 \pm 18\%$  para o pireno.

As Figuras 62 e 63 ilustram as últimas curvas de adição de criseno e pireno, respectivamente em bÍlis com interpolação dos seis valores do teste de recuperação realizado.

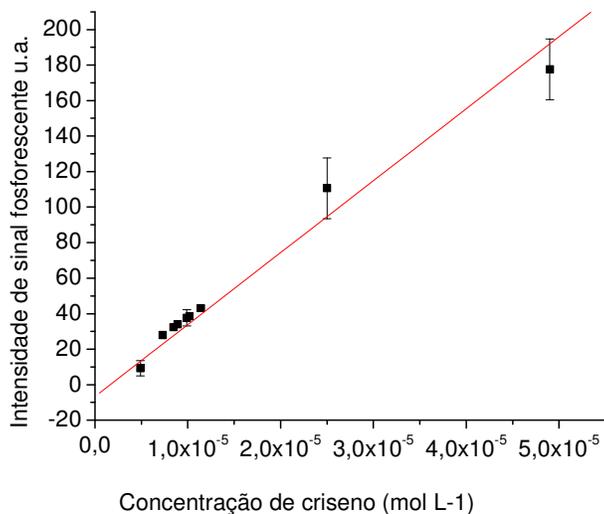


Figura 62: Percentual de criseno recuperado na curva de adição de analito.

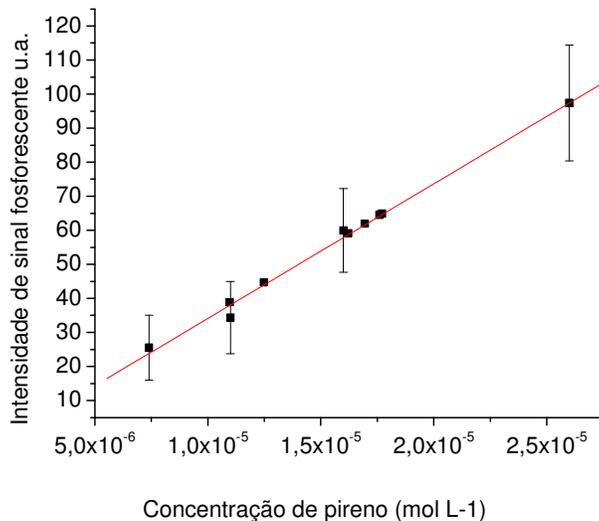


Figura 63: Percentual de pireno recuperado na curva de adição de analito.

### 6.1.2.

#### Aplicação do método SS RTP em estudo de homogeneidade de um “pool” de bÍlis

O método SS RTP para criseno foi usado em um estudo de homogeneidade de um pool de amostras de bÍlis de peixe. Em geral, um conjunto de bÍlis, de vários peixes coletados, em uma região específica pode ser misturada para servir de amostra para caracterização da contaminação ou não da região. Para tal, se faz necessária à certificação de lotes coletados de bÍlis de peixe, extraída da Tainha, espécie *Mugi liza*, para demonstrar que as unidades deste lote são suficientemente homogêneas entre si (conforme descrição da ISO GUIDE 35:2006).<sup>62</sup>

Em teoria, um material é perfeitamente homogêneo em relação a uma determinada propriedade, se não existir qualquer diferença significativa entre os valores desta propriedade nas diferentes partes do material. No entanto, na prática, um material é considerado homogêneo em relação a uma determinada propriedade, se a diferença entre os valores desta propriedade entre as diferentes porções do material é desprezível se comparada com uma das componentes de incerteza do material como um todo.

Se a matriz em questão é uma solução ou um material aparentemente puro, o estudo de homogeneidade é necessário para comprovar a homogeneidade e para detectar possíveis falhas no processo de preparação (no caso, a preparação do “pool” de bÍlis). Mas se a matriz em questão for heterogênea, o estudo de homogeneidade é necessário para estimar o grau de não-homogeneidade.

A ISO Guide 35:2006<sup>62</sup> não estabelece um número mínimo de amostras (no caso do pool de bÍlis) para um estudo de homogeneidade. O guia recomenda que este número seja entre 10 e 30, mas não menor do que 10. No entanto, a norma também ressalta que o número de amostras escolhidas para o estudo de homogeneidade depende do tamanho de lote, devendo ser representativo de todo o lote, considerando a abordagem estatística a ser utilizada.

As amostras para este estudo foram coletadas na Baia da Guanabara, em área supostamente contaminada – Magé no estado do Rio de Janeiro. Neste trabalho, foram realizadas 10 medições em bÍlis de peixes distintos e 10 medições em “pool” de bÍlis (totalizando a mistura de bÍlis de 80 peixes). Essa mistura foi realizada seguindo as etapas de extração da bÍlis descrita no Capítulo 2, seguido de transferência do material para tubo plástico de formato cônico com tampa. Esse material foi agitado para homogeneização em aparelho tipo “Vortex” por alguns minutos, e em seguida pequenas porções desse pool foram transferidas, com auxílio de micropipetas, para frascos para posterior análise e/ou armazenamento, conforme descrito na programação dos testes (Anexo 4).

Como tratamento estatístico foi adotado o de comparação de médias, conforme descrito e realizado Capítulo 4. A Tabela 39 mostra o teste estatístico aplicado para determinação de criseno ( $\text{mol L}^{-1}$ ) em bÍlis de peixe em amostras individuais e no pool. Notou-se que os valores encontrados não apresentam diferença significativa para um nível de  $t_{0,975}$ , no entanto é visível que o valor do desvio padrão referente as amostras individuais é maior, o que pode ser justificado pelo uso de amostras biológicas de indivíduos distintos, cujo metabolismo difere de um para outro. Embora o desvio padrão referente ao “pool” tenha sido menor, constatou-se que as replicatas não estavam bem homogêneas

(valores encontrados entre  $0,27 \times 10^{-6}$  e  $2,10 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ), o que pode ter ocorrido devido talvez ao incorreto sistema de homogeneização.

Tabela 39: Teste de comparação de médias entre amostras individuais de bÍlis e do pool de amostras de bÍlis.

[Criseno] mol L <sup>-1</sup> na bÍlis de peixe		
Replicatas	Individual	“Pool”
1	$1,41 \times 10^{-5}$	$2,10 \times 10^{-5}$
2	$0,31 \times 10^{-5}$	$0,87 \times 10^{-5}$
3	$0,56 \times 10^{-5}$	$1,51 \times 10^{-5}$
4	$2,44 \times 10^{-5}$	$1,61 \times 10^{-5}$
5	$0,74 \times 10^{-5}$	$1,53 \times 10^{-5}$
6	$0,60 \times 10^{-5}$	$1,62 \times 10^{-5}$
7	$1,66 \times 10^{-5}$	$0,27 \times 10^{-5}$
8	$2,25 \times 10^{-5}$	$1,20 \times 10^{-5}$
9	$0,03 \times 10^{-5}$	$1,99 \times 10^{-5}$
10	$2,51 \times 10^{-5}$	$0,78 \times 10^{-5}$
Média	$1,25 \times 10^{-5}$	$1,54 \times 10^{-5}$
Desvio padrão	$9,24 \times 10^{-6}$	$3,95 \times 10^{-6}$
<i>n</i> ° de replicatas ( <i>n</i> )	10	10
Desvio padrão combinado	$1,40 \times 10^{-11}$	
<i>S<sub>p</sub></i>	$2,79 \times 10^{-5}$	
<b>t<sub>0</sub></b>	<b>0,250</b>	
t <sub>tabelado</sub> (GL=18)	2,101	

**u<sub>homog</sub>**  
(incerteza referente à  
homogeneização)

### 6.1.3.

#### Aplicação do método SS RTP em estudo de estabilidade da bÍlis

Assim como a avaliação de homogeneidade, o estudo de estabilidade é de extrema importância e tem como objetivo determinar o grau de instabilidade de um material candidato a ser um material de referência ou confirmar a estabilidade de um material fresco a ser analisado (conforme

descrito na ISO GUIDE 35:2006).<sup>62</sup> Mesmo um material considerado estável pode apresentar instabilidade para uma ou mais propriedades. Os estudos de estabilidades podem ser de curta e longa duração, também conhecidos como isócrono e clássico, respectivamente. Na Tabela 40 é feita brevemente uma comparação desses dois testes.

Tabela 40: Comparação de características entre os testes de estabilidade isócrono e clássico.

<b>Curta duração (isócrono)</b>	<b>Longa duração (clássico)</b>
Temperatura de referência e em diferentes temperaturas: estima-se o efeito de diferentes condições de temperatura sobre o material.	Temperatura de referência: temperatura na qual o material é considerado estável. A temperatura de armazenamento torna-se fundamental para o bom andamento do teste.
Amostras individuais são preparadas ao mesmo tempo (mesma batelada), sob condições idênticas, e as medições são realizadas no mesmo experimento em “uma única corrida”, ou seja, usando a mesma calibração.	Amostras individuais são preparadas ao mesmo tempo (mesma batelada), sob condições idênticas, sendo medidas em tempos separados.
Medições sob condições de repetitividade.	Medições são realizadas sob condições de reprodutibilidade.
Em geral conduz a incertezas inferiores daquelas do planejamento clássico, pois a instabilidade do sistema não é preponderante para a incerteza.	Incerteza elevada, pois a instabilidade do sistema contribui para o aumento da incerteza.

Neste trabalho foi realizado o estudo de estabilidade isócrono com temperaturas distintas de armazenamento, entre elas: geladeira (6 a 10°C), freezer a -20°C e em freezer a -80°C. Esse estudo teve duração de 15 dias, conforme planejamento com a programação dos testes indicado no Anexo 7.

O tratamento estatístico utilizado foi o de análise de variância (ANOVA) em cada temperatura de armazenamento. Para realizar esse tratamento utilizou-se o programa Excel e seguiram-se as etapas: ferramentas\análise de dados\regressão, inserindo os dados referentes às concentrações de crisenol em função do intervalo de dados referente ao

período de teste (0 a 15 dias), escolhendo, em seguida, o parâmetro “nível de confiança”. Os resultados gerados mostrados na Tabela 41 e na Tabela 42 indicaram duas situações: (i) a primeira situação (condição de armazenamento = geladeira) mostrou que os resultados encontrados ( $1,56 \times 10^{-5}$ ;  $1,58 \times 10^{-5}$ ;  $1,33 \times 10^{-5}$  e  $1,60 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ) encontram-se dentro do intervalo de confiança, com os valores encontrados não possuindo diferenças significativas; e (ii) na segunda situação (condição de armazenamento = freezer a  $-20^\circ\text{C}$ ), os resultados ( $1,42 \times 10^{-5}$ ;  $1,84 \times 10^{-5}$ ;  $1,63 \times 10^{-5}$  e  $1,10 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ) indicaram que a condição não atende ao intervalo de 95% de confiança, o que impõe dúvidas quanto ao uso dessa condição de armazenamento. Vale ressaltar que esse tratamento estatístico é utilizado em estudos de estabilidade de MRC, o que o torna muito rigoroso. No entanto, o resultado obtido por SS RTP encontra-se dentro da faixa de incerteza calculada neste trabalho, o que estabeleceu, no momento, que o processo de armazenamento em congelador fosse reavaliado antes de ser condenado.

Quanto à condição de armazenamento de freezer ( $-80^\circ\text{C}$ ), não foi possível realizar um tratamento de dados, pois, conforme programações, só tinham amostras referentes há dois dias, muito embora os valores ( $1,34 \times 10^{-5}$  e  $1,34 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ) estivessem aparentemente semelhantes.

Tabela 41 Resultados do tratamento estatístico do teste de estabilidade em geladeira.

RESUMO DOS RESULTADOS - Geladeira

<i>Estatística de regressão</i>	
R múltiplo	0,06358246
R-Quadrado	0,004042729
R-quadrado ajustado	-0,493935906
Erro padrão	1,52234E-06
Observações	4

ANOVA					
	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>
Regressão	1	1,88143E-14	1,88143E-14	0,008118279	0,93641754
Resíduo	2	4,63505E-12	2,31753E-12		
Total	3	4,65387E-12			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>	<i>95% inferiores</i>	<i>95% superiores</i>	<i>Inferior 95,0%</i>	<i>Superior 95,0%</i>
Interseção	1,5259E-05	1,07277E-06	14,22393809	0,004906309	1,06432E-05	1,98747E-05	1,06432E-05	1,98747E-05
Variável X 1	-1,13519E-08	1,2599E-07	-0,09010149	0,93641754	-5,53443E-07	5,30739E-07	-5,53443E-07	5,30739E-07

U<sub>estab.</sub> 1,89E-06 mmol L-1

Tabela 42: Resultados do tratamento estatístico do teste de estabilidade em freezer - 20 °C

RESUMO DOS RESULTADOS - Freezer -20°C

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,686662384
R-Quadrado	0,47150523
R-quadrado ajustado	0,207257844
Erro padrão	2,81232E-06
Observações	4

ANOVA					
	gl	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	1,41126E-11	1,41126E-11	1,784332621	0,313337615
Resíduo	2	1,58183E-11	7,90916E-12		
Total	3	2,99309E-11			

	Coefficientes	Erro padrão	Stat t	valor-P	95% inferiores	95% superiores	Inferior 95,0%	Superior 95,0%
Interseção	1,68427E-05	1,98179E-06	8,498752419	0,01356385	8,31578E-06	2,53697E-05	8,31578E-06	2,53697E-05
Variável X 1	-3,10904E-07	2,32749E-07	-1,335789138	0,313337615	-1,31235E-06	6,90537E-07	-1,31235E-06	6,90537E-07

Uestab.	3,49E-06
---------	----------

Da mesma forma, conforme ISO GUIDE 35:2006, a incerteza de medição de um material (ou MRC) é estimada a partir da combinação das fontes de incerteza inerentes à caracterização, à homogeneidade, ao armazenamento e ao transporte do material, como pode ser visualizado na equação 20:

$$U = k \times u_c$$

$$U = k \sqrt{u_{carac.}^2 \oplus u_{homog.}^2 \oplus u_{transp.}^2 \oplus u_{armaz.}^2} \quad (20)$$

“U” é a incerteza expandida; “K”, fator de abrangência; “u<sub>c</sub>”, incerteza padrão combinada da propriedade certificada; “u<sup>2</sup><sub>carac.</sub>”, incerteza inerente à caracterização; “u<sup>2</sup><sub>homog.</sub>”, incerteza inerente à homogeneidade; “u<sup>2</sup><sub>transp.</sub>”, incerteza inerente ao transporte (estabilidade) e “u<sup>2</sup><sub>armaz.</sub>”, incerteza inerente ao armazenamento (estabilidade).

A incerteza inerente à estabilidade foi estimada considerando o erro padrão (1,27 x 10<sup>-7</sup> mol L<sup>-1</sup>) multiplicado pelo tempo de teste (15 dias).

Para as fontes inerentes à caracterização, homogeneidade e estabilidade (armazenamento) foram encontradas as incertezas: u<sub>caract.</sub> de 3,95 x 10<sup>-6</sup> mol L<sup>-1</sup> (desvio padrão referente ao “pool” de dez amostras de bÍlis no estudo de homogeneidade), u<sub>homog.</sub> de 2,79 x 10<sup>-5</sup> e u<sub>armaz.</sub> de 1,89 x 10<sup>-6</sup> mol L<sup>-1</sup>. A incerteza expandida (U) calculada foi de 5,64 x 10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup>, equivalente a 64 ng de criseno (incerteza referente a massa efetiva depositada no papel (5µL)).

Verificou-se com os resultados obtidos que a incerteza referente à homogeneidade é a mais relevante do processo. Testes futuros de homogeneização das amostras estão previstos para otimizar e minimizar o valor de  $u_{\text{homog}}$  encontrado. Provavelmente o tempo e/ou procedimento utilizados não foram suficientes para uma completa homogeneização.

## **6.2. Cachaça**

Os trabalhos com cachaça se iniciaram com estudos para se verificar as presenças de pireno e de criseno originalmente em amostras comerciais de cinco fabricantes diferentes, sendo quatro delas industriais e uma delas uma “cachaça orgânica”. Nesses casos, as amostras de cachaça foram diretamente adicionados no substrato de papel ou depositadas no substrato após diluição 1:1 v/v com água (no caso do método para o criseno) ou com água e solução de NaOH para se atingir o pH 12 necessário para o uso do método escolhido no caso do pireno. Como resultado, pireno e criseno não foram encontrados em nenhuma das cachaças.

A fim de testar os métodos na matriz de cachaça, por meio de testes de recuperação, amostras simuladas foram então preparadas usando o enriquecimento das cachaças com micro-adições de solução etanólica dos dois HPA. Em um primeiro momento foi preciso verificar se a matriz da amostra de cachaça causava alguma interferência não-espectral, atenuando a fosforescência dos HPA, o que explicaria os resultados obtidos com as amostras originais de cachaça. Curvas analíticas foram feitas a partir de soluções-padrão dos analitos em etanol/água 50/50 v/v (ajustada para pH 12 no caso do pireno) e com amostras de cachaça enriquecidas com concentrações conhecidas dos analitos. O mesmo fator de diluição com água ou com solução de NaOH foram feitas para a cachaça. Depois de traçadas as curvas, ilustradas na Figura 64 no caso do estudo com criseno, um estudo de comparação de médias foi realizado para verificação da equivalência dos resultados obtidos com as duas curvas. Os valores de sinal fosforescente de amostras fortificadas foram

interpolados nas curvas com e sem adição de matriz e os resultados encontrados para um nível de  $t_{0,975}$  foram satisfatórios ( $t_0$  encontrado menor do que  $t_{\text{tabelado}(gl=10)}$ ), como pode ser constatado na Tabela 43, confirmando assim a hipótese de que para esse tipo de matriz não se faz necessário o uso de curvas de adição de analito. Resultados semelhantes foram obtidos para o pireno. Espectros de SS RTP no modo de varredura sincronizada para o criseno e para o pireno obtidos em cachaça são mostrados na Figura 65.

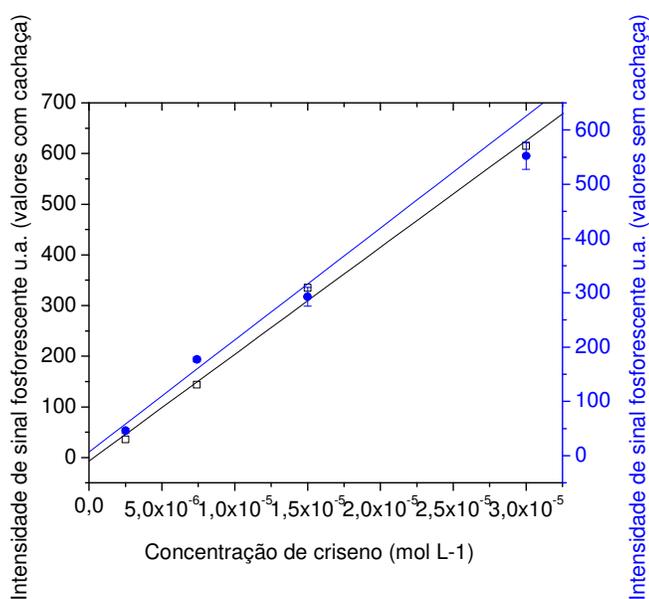


Figura 64: Curvas analíticas de criseno na presença e ausência de cachaça

Tabela 43: Teste de comparação de médias entre duas curvas: com e sem a matriz “cachaça”

Valores medidos em [Criseno] mol L<sup>-1</sup>  
pela interpolação nas curvas

Replicatas	Com cachaça	Sem cachaça
1	$5,98 \times 10^{-6}$	$5,45 \times 10^{-6}$
2	$6,25 \times 10^{-6}$	$5,77 \times 10^{-6}$
3	$4,23 \times 10^{-6}$	$3,38 \times 10^{-6}$
4	$5,16 \times 10^{-6}$	$4,48 \times 10^{-6}$
5	$6,19 \times 10^{-6}$	$5,69 \times 10^{-6}$
6	$5,40 \times 10^{-6}$	$4,76 \times 10^{-6}$
Média	$5,54 \times 10^{-6}$	$4,92 \times 10^{-6}$
Desvpad	$7,74 \times 10^{-7}$	$9,14 \times 10^{-7}$
<i>n</i> ° de replicatas( <i>n</i> )	6	6
Desvpadcomb.	$9,78 \times 10^{-15}$	
$S_p$	$2,0 \times 10^{-6}$	
$t_0$	0,578	
$t_{\text{tabelado}} (GL = 10)$	2,228	

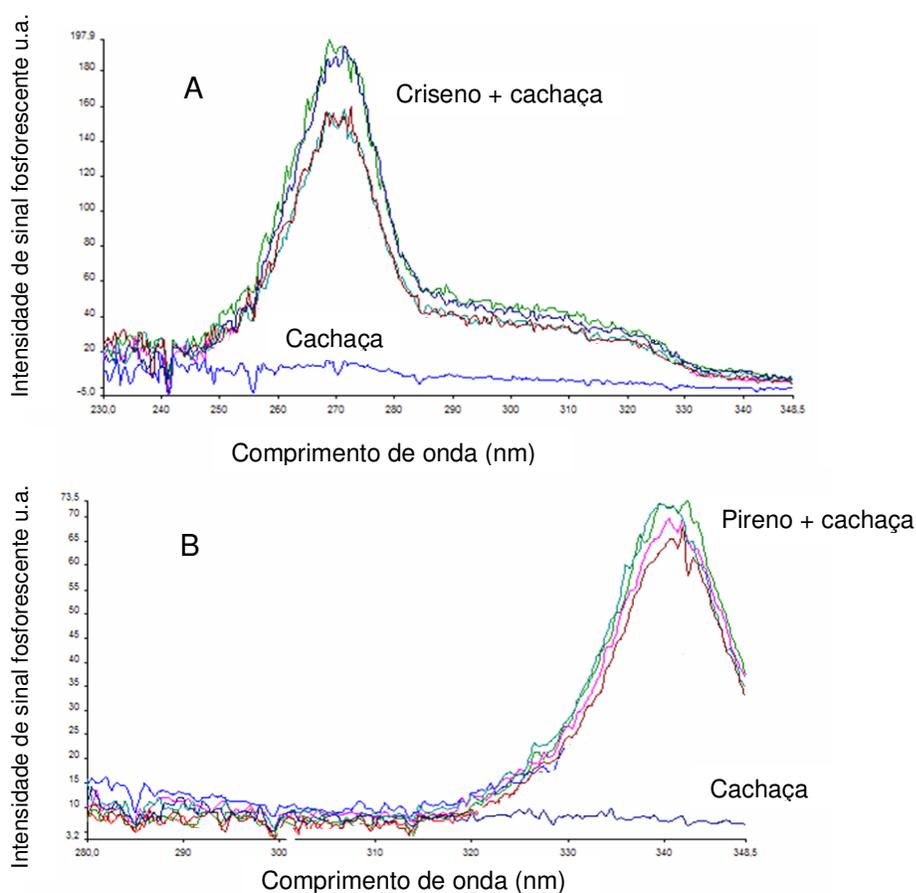


Figura 65: Espectros SSRTF em modo sincronizado para (A) cachaca fortificada com criseno e (B) cachaca fortificada com pireno. Em ambos os casos a fortificação de HPA em cachaca foi equivalente a  $5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ .

Testes de recuperação foram realizados com as amostras fortificadas de cachaca usando SSRTF e HPLC com detecção fluorimétrica. Como recuperação analítica (Tabela 44), os resultados de tendência foram expressos em percentual (média de seis replicatas) tomando como referência a concentração teórica de pireno e de criseno na cachaca ( $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ).

Tabela 44 : Recuperações de criseno e pireno em cachaca enriquecida.

Analito	Técnica analítica	
	SSRTF	HPLC-F
Criseno	$109 \pm 18\%$	$104 \pm 13\%$
Pireno	$108 \pm 20\%$	$102 \pm 15\%$