

## 8

### Referências

1. Vo-Dinh, T. Room Temperature Phosphorimetry for Chemical Analysis, Chemical Analysis series Vol 68, John Wiley & Sons, 1984.
2. Arruda A. F. e Campiglia A. D., Phosphorimetric Determination of Indomethacin in Pharmaceutical Formulations, *Analyst*, v.122, p. 559 – 562, 1997.
3. Hagestuen E.D., Campiglia A.D., *Talanta*, 49 (1990) 547-560.
4. Vo-Dinh, T.; Chemical Analysis of Polycyclic Aromatic Compounds, Chemical Analysis series Vol 101, John Wiley & Sons, 1989.
5. Kasha, M., *J. Chem. Phys.*, v. 20, p.71, 1977.
6. Apostoli, P.; Minoia, C.; Alessio, L.; Idrocarbun Policiclici Aromatici negli ambienti di vita e di lavoro: esposizione ed effetti, Gargnano, 27 – 29 marzo, 1996.
7. Hagestuen E.D., Arruda A.F., Campiglia A.D., *Talanta* 52 (2000) 727-737.
8. Hurtubise, R. J., Solid-matrix luminescence analysis: photophysics, physicochemical interactions and applications, *Anal. Chim. Acta*, V 351, p. 1-22, 1997.
9. McGlynn, S. P., Azumi, T. E Kinoshita, M., *Molecular Spectroscopy of the Triplet State*, Pentice-Hall, 1969.
10. Miller, J. N., Room Temperature Phosphorimetry – a promising trace analysis method, *Trends in Anal. Chem.*, v. 1 (1), p. 33, 1981.
11. Costa A., Avaliação de contaminação humana por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs): 1 hidroxipireno urinário, Centro de Estudos de Saúde do Trabalhador e Ecologia humana, Fundação Oswaldo Cruz, Jul. 2001.
12. Finlayson.Pitts, B. J.; Pitts Jr., J. N.; *Science*, 276: 1045 -51, 1997.
13. Ames, B. N.; McLann, J.; Yamashaki, E.; *Mutat. Res.* 31: 347 – 64, 1975.
14. Lee, J. K.; *J. Chromatogr.* 710: 79 – 92, 1995.
15. Lopes, W. A.; Andrade, J. B.; *Quim. Nova* 19, 497, 1996.
16. Netto, D. P.; Determinação de hidrocarboneto policíclicos aromáticos em amostras ambientais; universidade Federal do Rio de Janeiro, 1999.
17. Ariese, F.; Gooner, C.; Velthrost, N. H.; Hofstraat, J. W., *Anal. Chem., Acta*, 232,245, 1990.

18. Guillén, M. D.; Food additives contam., 11 (6): 669 – 684, 1994.
19. Miguel, A. H.; Friedlander, S. K.; Atmos. Envirom. 12: 2407 – 2413, 1978.
20. Nakajima, D.; Kojima, E.; Iwaya, S.; Yoshida, Y.; Susuki, J.; Susuki, S.; Envirom. Health Perspect.; 103:103 – 114, 1996.
21. CETESB; GESAMP, Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Environmental Protection, Acidentes Ambientais, Portal do Governo do Estado de São Paulo.
22. Zioli R. L., Projeto: “Avaliação dos Impactos Ambientais dos Derrames de Óleo sobre o Pescado da Baía da Guanabara, RJ”, Edital PADCT/FAPERJ/Chamada C - Departamento de Química, PUC-RJ.
23. Krone, C. A.; Stein, J. E.; Varanasi, U.; Estimation of levels of metabolitos of aromatic hydrocarbons in fish tissues by HPLC/Fluorescence analysis; Chemosphere 24,4, 497 – 510, 1992.
24. Lyrio R. S. N.; Avaliação da contaminação de óleo no ambiente estuarino da Baía de Guanabara (RJ) pela determinação fluorimétrica de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA) na bÍlis de peixes Mugi liza; Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, 2006.
25. AAS, E.; Beyer, J.; Goksoyr, A.; Fixed Wavelength Fluorescence (FF) of bile as a monitoring tool for polyaromatic exposure in fish: an evaluation of coumpound specificity, inner filter and signal interpretation; Biomarkers, vol. 5, 1, 9 – 23,2000.
26. Escartin, E.; Porte, C.; Assessment of PAH pollutin in coastal areas from the NW Mediterranean through the analysis of fish bile; Mr. Pollut. Bull. 12, 1200 – 1206, 1999.
27. Krahm, M. M.; Meyers, M. S.; Burrows, D. G.; Malins, D. C.; Determination os metabolites of xenobiotics in the bile of fish from polluted waterways; Xenobiotica 14, 633 – 646, 1984.
28. Lin, E. L. C.; Cormier, S. M.; Racine, R. N.; Synchronous fluorimetric measurement of metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in the bile of brown bullhead; Environ. Toxicol. Chem. 13, 5, 707 – 715, 1994.
29. Cresser, M.; Killham, K.; Edwards T. Soil Chemistry and its Applications, Cambridge, New York, 1993, 322p.
30. Trevelin, W R., Otimização da Análise de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em sistemas aquosos. São Carlos, 1992, p.83, Dissertação de Mestrado - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo.
31. VOS, R. H.; DOKKUM, W.; Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in total diet samples. Food Chem. Toxicol., v. 28, p. 263-268, 1990.

32. Bettin, S. M.; Franco, W.; Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) em aguardentes, Ciênc. Tecnol. Aliment. Vol.25, n° 2, abril – jun.2005.
33. Moret, S., Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Water and Water-based alcoholic Beverages. Zeischrift fur Lebensmittel, v. 201, n.4, p.322-326, 1995.
34. Moret, S.; Conte, L.; Polycyclic aromatic hydrocarbons in edible fats and oils: occurrence and analytical methods. J. Chromatogr. A., v. 882, p.245-253, 2000.
35. Dennis, M.J.; Massey, R.C; Analysis of polycyclic hydrocarbons in UK total diets. Food Chem. Toxicol., v. 21, p. 569-574, 1983.
36. Zamperlini, C.M.G., Silva-Santiago, M., Vilegas, W. Solid-phase extration of sugar cane soot extract for analysis by gas chromatography with flame ionization and mass spectrometric detection, J. of Chromatogr. A, v. 889, p. 281-289, 2000.
37. Camargo, M. S.; Toledo, M. C.; Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos em Margarina, Creme Vegetal e Maionese, Ciênc. Tecnol. Aliment. n° 20, p. 51-55, 2000.
38. Akhlaq, M.S.; Gotze, P.; Detailed Analysis of crude oil group types using reversed-phase high-performance liquid chromatography, J. of Chromatogr. A, v. 677 (2),p. 265-272, 1994.
39. Vo-Dinh, T.; Hooyman, J. R.; Anal. Chem., 1979, 51, 1915.
40. Cardoso C.E., Aucélio R.Q., J. Bras. Chem. Soc., 2006, 17, 1323-1328.
41. Castillo A.S., Segura-Carretero A., Costa-Fernandez J.M., Jin W.J., Fernandez-Gutierrez A., Anal. Chim. Acta. 516 (2004) 213-220.
42. Laser-Induced Solid-Surface Room-Temperature Phosphorimetry of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, Appl. Spectroc., 50 (1996) 252-256.
43. Cardoso, C.; Utilização da fosforimetria na temperatura ambiente suportada em substrato sólido para a determinação seletiva de compostos policíclicos aromáticos nitrogenados e sulfurados em gasolina e em sedimento, Dep. De Químia, PUC-RJ, fev.2007.
44. Campiglia A. D. E Gioia, S. M. C.; Room temperature phosphorescence of biogenic índoles in background paper enhanced by heavy atom salts and sodium dodecyl sulfate, Anal. Chim. Acta, v. 287, p. 89-94, 1994.
45. Marquês, F. F. C., Fosforimetria na temperatura ambiente e em substrato sólido (SSRTP) para determinação da  $\beta$ -carbonila (harmane e harmine), Dep. de Química, PUC-RJ, fev. 2005.
46. Montgomery, D. C.; Introduction to Statistical Quality Control, 3<sup>rd</sup> ed., Arizona State University, 1996.
47. Montgomery, D. C.; Costa, V.; Analytical Designs Experiments, 2003.

48. Arruda, A. F.; Aucélio R. Q.; Room temperature phosphorimetry for the selective determination of Yohimbine in presence of Reserpine – like indolic alkaloids. *Anal. Sci.*, 18, 831 – 834, 2002.
49. ANVISA, Guia para Qualidade em Química Analítica, vol. 1, Brasília, 2004.
50. CITAC/EURACHEM, Guide to Quality in Analytical Chemistry, 2002.
51. ABNT, Norma NBR/IEC 17025:2005.
52. INMETRO, DOQ – CGCRE- 008; Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos, Rev.01, mar. 2003.
53. INMETRO, Vocabulário Internacional de termos fundamentais e gerais de Metrologia (VIM), Rio de Janeiro, 2003.
54. Thompson, M.; Ellison, S. L.R.; Fajgely, A.; Willets, P.; Wood, R; *Pure Appl. Chem.* 71, 337, 2002.
55. Burns, D. T.; Danzer, K.; Townshend, A.; *Pure Appl. Chem.*, 74, 2001, 2002.
56. GARP, Associação grupo de analistas de resíduos de pesticidas; Manual de resíduos de pesticidas em alimentos, 1999.
57. CITAC/EURACHEM, Determinando a incerteza na medição analítica; 1ª. ed. Brasileira, 2002.
58. Couto, P.; Oliveira, J. S.; Cinelli, L. R., Algumas considerações sobre as Metodologias de Cálculo da Estimativa da Incerteza de Medição citadas no ISO GUM 95, Metrosul 2002, Curitiba –PR.
59. Herrador, A.M.; González, G. A., Evaluation of Measurement Uncertainty in analytical assays by means of Monte Carlo simulation, abril 2004 - *Talanta* 64 (2004) 415-422.
60. Couto, P.; Introdução a Metrologia Química, módulo da Incerteza de Medição; nov. 2006.
61. Jornada, D. H.; Pizzolato, M.; Uso de planilhas eletrônicas para implementação do método de Monte Carlo para estimativa da incerteza de medição, ENQUALAB, 2005.
62. NBR/ISO-Guide 35, Certification of Reference Materials - General and Statistical Principles, 2006.

## 9

### Anexos

- I. Certificado do CRM (SRM 1647d – Priority Pollutant Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Acetonitrile).
- II. Tabela estatística de t Student.
- III. Certificado da calibração da vidraria – balão volumétrico de 10 mL.
- IV. Certificado da calibração da vidraria – micropipeta 100 - 1000 µL.
- V. Certificado da calibração da vidraria – micropipeta de 10 µL.
- VI. Certificado da calibração da balança analítica de 0,01 mg.
- VII. Planejamento e programação dos testes iniciais de homogeneidade e estabilidade em béis de peixe.

Anexo I - Certificado do SRM 1647d – Priority Pollutant Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (in Acetonitrile) – pág.1



National Institute of Standards & Technology

## Certificate of Analysis

Standard Reference Material® 1647d

Priority Pollutant Polycyclic Aromatic Hydrocarbons  
(in Acetonitrile)

This Standard Reference Material (SRM) is intended primarily as a calibration solution for use in chromatographic methods for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). One unit consists of five 2 mL ampoules, each containing approximately 1.2 mL of an acetonitrile solution of 16 PAHs. The PAHs are the 16 identified by the U.S. Environmental Protection Agency as priority pollutants. This SRM may also be useful in recovery studies for the addition of known amounts of these PAHs to a sample; because the solution is miscible with water, it can be used to fortify aqueous samples with known concentrations of PAHs.

**Certified Values and Uncertainties:** The certified values of the 16 PAHs are given in Table 1. Values are listed in units of mg/kg (mass fraction) and for user convenience µg/mL (concentration). The µg/mL values were calculated from the mass fraction values using the density of acetonitrile at 23 °C (0.7789 g/mL). An allowance for the change in this density over the range 23 °C ± 2 °C is included in the uncertainty. The uncertainties are expanded uncertainties at the 95 % level of confidence, calculated according to the International Committee for Weights and Measures CIPM method [1]. They include uncertainty due to the calibration, measurement of the unknown samples, and purity of the materials used to prepare the material. Each certified value and expanded uncertainty define a range of values within which the true concentration is expected to lie with 95 % confidence.

**Expiration of Certification:** This certification is valid until **31 December 2008**, within the measurement uncertainties specified, provided the SRM is handled and stored in accordance with the instructions given in the certificate (see "Storage and Use"). However, the certification will be nullified if the SRM is damaged, contaminated, or modified. Should any of the certified values change before the expiration of certification, purchasers will be notified by NIST. Return of the attached registration card will facilitate notification.

The coordination of the technical measurements leading to certification was under the direction of L.C. Sander and S.A. Wise of the NIST Analytical Chemistry Division.

Analytical determinations were performed by L.C. Sander of the NIST Analytical Chemistry Division.

Preparation and ampouling of SRM 1647d were carried out by Radian Corporation (now Cerilliant Corporation)<sup>1</sup>, Austin, TX.

Statistical design of the experimental work and evaluation of the data were provided by S.B. Schiller of the NIST Statistical Engineering Division.

The support aspects involved in the preparation, certification, and issuance of this SRM were coordinated through the Standard Reference Materials Program by B.S. MacDonald of the NIST Measurement Services Division.

Willie E. May, Chief  
Analytical Chemistry Division

John Rumble, Jr., Chief  
Measurement Services Division

Gaithersburg, MD 20899  
Certificate Issue Date: 03 December 2003  
*See Certificate Revision History on Last Page*

<sup>1</sup>Certain commercial equipment, instrumentation, or materials are identified in this certificate to specify adequately the experimental procedure. Such identification does not imply recommendation or endorsement by the NIST, nor does it imply that the materials or equipment identified are necessarily the best available for the purpose.

Anexo I - Certificado do SRM 1647d – Priority Pollutant Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (in Acetonitrile) – pág.2

Table 1. Certified Values for PAHs in SRM 1647d

| Compound               | Mass Fraction<br>(mg/kg) | Concentration<br>(µg/mL) (at 23 °C ± 2 °C) |
|------------------------|--------------------------|--------------------------------------------|
| Naphthalene            | 25.84 ± 0.33             | 20.13 ± 0.32                               |
| Acenaphthylene         | 19.89 ± 0.32             | 15.49 ± 0.29                               |
| Acenaphthene           | 26.67 ± 0.54             | 20.77 ± 0.48                               |
| Fluorene               | 6.09 ± 0.06              | 4.75 ± 0.06                                |
| Phenanthrene           | 4.40 ± 0.07              | 3.42 ± 0.06                                |
| Anthracene             | 1.02 ± 0.02              | 0.79 ± 0.02                                |
| Fluoranthene           | 9.81 ± 0.11              | 7.64 ± 0.10                                |
| Pyrene                 | 10.88 ± 0.11             | 8.47 ± 0.11                                |
| Benzo[a]anthracene     | 5.25 ± 0.04              | 4.09 ± 0.04                                |
| Chrysene               | 4.71 ± 0.04              | 3.67 ± 0.04                                |
| Benzo[b]fluoranthene   | 5.36 ± 0.05              | 4.17 ± 0.05                                |
| Benzo[k]fluoranthene   | 6.06 ± 0.07              | 4.72 ± 0.07                                |
| Benzo[a]pyrene         | 6.31 ± 0.09              | 4.91 ± 0.08                                |
| Dibenzo[a,h]anthracene | 4.54 ± 0.27              | 3.54 ± 0.22                                |
| Benzo[ghi]perylene     | 4.73 ± 0.15              | 3.68 ± 0.13                                |
| Indeno[1,2,3-cd]pyrene | 5.49 ± 0.10              | 4.28 ± 0.09                                |

NOTICE AND WARNING TO USER

**Toxicity:** This SRM contains acetonitrile. Acute and chronic health hazards have been documented from exposure through inhalation, ingestion, and skin absorption. This SRM also contains small amounts of PAHs, some of which have been reported to have mutagenic and/or carcinogenic properties; therefore, care should be exercised during handling and use. Use proper methods for disposal of waste.

INSTRUCTIONS FOR USE

**Storage and Use:** Sealed ampoules, as received, should be stored in the dark at temperatures between 19 °C and 30 °C. Samples of the SRM for analysis should be withdrawn from ampoules and used without delay. The certified values listed in Table 1 apply only to aliquots removed at 23 °C ± 2 °C. Certified values are not valid for ampoules which have been stored after opening, even if resealed.

**Preparation and Analysis:** The acetonitrile solution of the 16 PAHs was prepared gravimetrically from individual compounds. Six of the compounds (naphthalene, acenaphthylene, acenaphthene, fluorene, phenanthrene, and anthracene), were obtained from Radian Corporation<sup>1</sup>. The other ten were Certified Reference Materials (CRMs) produced by the Community Bureau of Reference (BCR) Brussels, Belgium and obtained from the Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM) Geel, Belgium. The purities of all PAHs used to make this SRM were ≥ 99 %. Purities of the compounds obtained from the Radian Corporation were determined at Radian by a combination of techniques including differential scanning calorimetry (DSC), gas chromatography with flame ionization detection (GC-FID), reversed-phase liquid chromatography with ultraviolet detection (LC-UV), nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR), and elemental analysis. Purities of CRMs were certified by BCR. The SRM solution was aliquoted into silanized 2-mL amber glass ampoules, which were purged with argon prior to addition of the solution. Samples representing early, middle, and final stages of ampouling were analyzed by LC. No evidence of sample inhomogeneity was observed.

Randomly selected ampoules were analyzed for all 16 PAHs by LC using an acetonitrile-water mobile phase. Concentrations for the 16 PAHs were determined from a single line calibration, which used gravimetric values and instrumental responses for four calibration standards and three previous issues of this SRM (1647a, b, and c). An internal standard calibration approach was used in the certification. A representative chromatogram and the separation conditions are shown in Figure 1.

## Anexo II – Tabela t Student

| GL | $t_{0,975}$ | GL | $t_{0,975}$ | GL       | $t_{0,975}$ |
|----|-------------|----|-------------|----------|-------------|
| 1  | 12,706      | 11 | 2,201       | 25       | 2,060       |
| 2  | 4,303       | 12 | 2,179       | 30       | 2,042       |
| 3  | 3,182       | 13 | 2,160       | 40       | 2,021       |
| 4  | 2,776       | 14 | 2,145       | 60       | 2,000       |
| 5  | 2,571       | 15 | 2,131       | $\infty$ | 1,960       |
| 6  | 2,447       | 16 | 2,120       |          |             |
| 7  | 2,365       | 17 | 2,110       |          |             |
| 8  | 2,306       | 18 | 2,101       |          |             |
| 9  | 2,262       | 19 | 2,093       |          |             |
| 10 | 2,228       | 20 | 2,086       |          |             |

Extraída do appendix IV - Montgomery, Douglas C., Introduction to Statistical Quality Control - John Wiley & Sons, Inc.

## Anexo III – Certificado da calibração da vidraria – balão volumétrico 10 mL

**Calibração de Vidraria**  
NBR 12704

**Laboratório de Caracterização de Fluidos LCF**  
Rua Marquês de São Vicente 225 - Gávea  
Rio de Janeiro, RJ 22453-900  
DEM/PUC-RIO

Tel: (21) 3527-1173  
Fax: (21) 3527-1163  
e-mail: lcf@mc.puc-rio.br  
http://www.mc.puc-rio.br/prof/pmedes/pageweb/lcf.html

**CERTIFICADO DE CALIBRAÇÃO nº VOL-005/07**

**DADOS DO CLIENTE**  
Nome: LEEA/Departamento de Química/PUC-Rio  
Endereço: Rua Marquês de São Vicente 225 - Gávea  
Rio de Janeiro, RJ 22451-900

Nº O.S.: 001/07

Objeto: balão  
Tipo do objeto: volumétrico  
Fabricante: -  
Nº identificação: 5  
Código Cliente: -  
Temp. de referência: 20°C  
Capacidade nominal: 10 mL  
Valor da uma divisão: -

**DADOS DA CALIBRAÇÃO**

Método: Segundo o Procedimento Interno PR-003 revisto 03, baseado na norma ABNT MB-3119, que consiste em determinar o peso do volume de água desionizada, contido ou transferido.

| Dados Ambientais | Temp.     | 20.1°C                    | Unidade  | 50%           | Pressão         | 762 mmHg |
|------------------|-----------|---------------------------|----------|---------------|-----------------|----------|
| Picnômetro:      | nº ident. | F525                      | nº cert. | VOL-073/06    | LCF/DEM/PUC-Rio |          |
| Termômetro:      | nº ident. | M1507/P000271 - Sensor 01 | nº cert. | 11-217/2006   | ITN             |          |
| Balança 1:       | nº ident. | O2411118700137            | nº cert. | DND 0674/2006 | INMETRO         |          |
| Balança 2:       | nº ident. | -                         | nº cert. | -             | -               |          |
| Higrômetro:      | nº ident. | 21815                     | nº cert. | LTR 1702/03   | VISONES         |          |
| Barômetro:       | nº ident. | 0221                      | nº cert. | DND 0163/2005 | INMETRO         |          |

**RESULTADOS OBTIDOS**

| voluma nominal (mL) | voluma a 20°C (mL) | U (mL) | k    |
|---------------------|--------------------|--------|------|
| 10                  | 10.002             | 0.003  | 2.18 |

U representa a incerteza expandida, e k o fator de abrangência.

Data da calibração: 09/01/07  
Data da emissão: 18/01/07

Assinatura Autorizada: Paulo Roberto de Souza Mendes  
Gerente Técnico

Obs: • Original e/ ou cópia. • Este certificado atende aos requisitos de aferição do Ozevômetro, que avaliou a competência de medição do laboratório e comprovou sua rastreabilidade a padrões nacionais de medida. • Esses resultados se referem exclusivamente ao objeto descrito acima sob as condições especificadas, não sendo extensivos a quaisquer lotes. • Não é permitida sua reprodução parcial. • A incerteza expandida relatada corresponde a um nível de confiança de aproximadamente 95%.

Folha nº1/1

## Anexo IV – Certificado da calibração da vidraria – micropipeta 100 – 1000 µL

**Calibração**  
NATURAL  
LCP

**Laboratório de Caracterização de Fluidos**  
Rua Marquês de São Vicente 225 - Gávea  
Rio de Janeiro, RJ 22451-900

**LCF**  
DEMPUC RIO

Tel: (21) 3527-1175  
Fax: (21) 3527-1165  
e-mail: lcf@lcp.puc-rio.br  
http://www.lcp.puc-rio.br/prof/pmedes/pages/links/f.html

**CERTIFICADO DE CALIBRAÇÃO nº MVO-003/07**

**DADOS DO CLIENTE**

Nome: LEEA/Departamento de Química/PUC-Rio  
Endereço: Rua Marquês de São Vicente 225 - Gávea  
Rio de Janeiro, RJ 22451-900

Nº O.S.: 001/07

Objeto: micropipeta  
Tipo do objeto: deslocamento de ar  
Fabricante: Hirschmann  
Nº identificação: 4061797  
Código Cliente: -  
Temp. de referência: 20°C  
Capacidade nominal: 1000 µL  
Valor uma divisão: 5 µL  
Fabricante das ponteiros: não informado  
Modo de pipetagem: normal

**DADOS DA CALIBRAÇÃO**

Método: Segundo o Procedimento Interno PR-006 revisto 03, baseado na norma ISO 8655, que consiste em determinar o peso do volume de água deslocada contra ou transferida.

| Dados Ambientais: | Temp.     | 20,2°C                  | Umidade  | 68%           | Pressão         | 764 mmHg |
|-------------------|-----------|-------------------------|----------|---------------|-----------------|----------|
| Piômetros:        | nº ident. | 5523                    | nº cert. | VOL 3/2/06    | LCF/DLR/INMETRO |          |
| Termômetro:       | nº ident. | TD520301316 - Sensor 02 | nº cert. | TT-2014/05    | INMETRO         |          |
| Balança 1:        | nº ident. | 1122203587              | nº cert. | DMC 0670/2006 | INMETRO         |          |
| Balança 2:        | nº ident. | 02541118300117          | nº cert. | DMC 0670/2006 | INMETRO         |          |
| Higrômetro:       | nº ident. | 21015                   | nº cert. | LTE 1702/05   | VISONICS        |          |
| Barômetro:        | nº ident. | 0221                    | nº cert. | DMC 0163/2005 | INMETRO         |          |

**RESULTADOS OBTIDOS**

| volume nominal (µL) | volume a 20°C (µL) | U (µL) | k    |
|---------------------|--------------------|--------|------|
| 100                 | 101.7              | 0.2    | 2.32 |
| 500                 | 504                | 1      | 2.32 |
| 1000                | 1006               | 1      | 2.32 |

O/representa a incerteza expandida, a 2 o fator de abrangência.

Data da calibração: 16/01/07  
Data de emissão: 16/01/07

Assinatura Autorizada: Paulo Roberto de Souza Mendes  
Gerente Técnico

Obs: • Original e/ou cópia. • Este certificado atende aos requisitos de acreditação do Cgcre/Inmetro, que avaliou a competência de medição do laboratório e comprovou sua rastreabilidade a padrões nacionais de medida. • Estes resultados se referem exclusivamente ao objeto descrito acima sob as condições especificadas, não sendo extensivos a qualquer outro. • Não é permitida sua reprodução parcial. • A incerteza expandida relatada corresponde a um nível de confiança de aproximadamente 95%.

## Anexo V – Certificado da calibração da vidraria – micropipeta 10 µL

**Calibração**  
Nº 0108

**Laboratório de Caracterização de Fluidos**  
Rua Marquês de São Vicente 225 - Gávea  
Rio de Janeiro, RJ 22451-900

**LCF**  
DEMPUC-RIO

Tel: (21) 3527-1173  
Fax: (21) 3527-1165  
e-mail: lcf@mc.puc-rio.br  
http://www.mc.puc-rio.br/prod/pmandar/pagetransf.html

**CERTIFICADO DE CALIBRAÇÃO nº MVO-001/07**

**DADOS DO CLIENTE**

Nome: LEEA/Departamento de Química/PUC-Rio  
Endereço: Rua Marquês de São Vicente 225 - Gávea  
Rio de Janeiro, RJ 22451-900

Nº O.S.: 001/07

Objeto: micropipeta  
Tipo do objeto: desocamento de ar  
Fabricante: Wheaton  
Nº identificação: 07031569  
Código Cliente: -  
Temp. de referência: 20°C  
Capacidade nominal: 10 µL  
Valor uma divisão: 0,01 µL  
Fabricante das ponteiros: não informado  
Modo de pipetagem: normal

**DADOS DA CALIBRAÇÃO**

Método: Segundo o Procedimento Interno PR-006 revisão 03, baseado na norma ISO 8655, que consiste em determinar o peso do volume de água deionizada transferido ou transferido.

| Dados Ambientais: | Temp.     | 19,8°C                  | Umidade  | 68%           | Pressão         | 764 mmHg |
|-------------------|-----------|-------------------------|----------|---------------|-----------------|----------|
| Picnômetro:       | nº ident. | 2522                    | nº cert. | VOL 813/01    | LCF/DEM/PUC-Rio |          |
| Termômetro:       | nº ident. | TDS20001816 - Sensor 02 | nº cert. | TT-2134/01    | IP4             |          |
| Balança 1:        | nº ident. | 1122200582              | nº cert. | DMO 0078/2006 | INMETRO         |          |
| Balança 2:        | nº ident. | D2641 18500117          | nº cert. | DMO 0674/2006 | INMETRO         |          |
| Higrômetro:       | nº ident. | 21515                   | nº cert. | LTR 170/05    | VISONES         |          |
| Barômetro:        | nº ident. | 0221                    | nº cert. | DMO 0101/2005 | INMETRO         |          |

**RESULTADOS OBTIDOS**

| volume nominal (µL) | volume a 20°C (µL) | U (µL) | k    |
|---------------------|--------------------|--------|------|
| 5                   | 5,02               | 0,05   | 2,32 |

U representa a incerteza expandida a 95% nível de abrangência.

Data da calibração: 16/01/07  
Data de emissão: 10/01/07

Assinatura Autorizada: Paulo Roberto de Souza Mendes  
Gerente Técnico

**NOTAS:** \* Original e/ou cópia. \* Este certificado atende aos requisitos de acreditação do Cetro-Inmetro, que avalia a competência de medição do laboratório e comprova sua rastreabilidade a padrões nacionais de medida. \* Estes resultados se referem exclusivamente ao objeto descrito acima sob as condições especificadas, não sendo extensíveis a qualquer outro. \* Não é permitida sua reprodução parcial. \* A incerteza expandida relatada corresponde a um nível de confiança de aproximadamente 95%.

Folha nº1/1

## Anexo VI – Certificado da calibração da balança de 0,01 mg – pág.1



CONFIABILIDADE TOTAL EM CALIBRAÇÃO



**CERTIFICADO DE CALIBRAÇÃO**  
 Empresa Brasileira de Metrologia Ltda.  
 (Peso Exato Indústria e Comércio de Balanças Ltda.)

Cert. n°: 906/2006

Página: 1 de 2

Rede Brasileira de Calibração  
 Laboratório de Calibração Acreditado pelo COCER/DNMETRO sob N° 301

**1. IDENTIFICAÇÃO DO CLIENTE**

Cliente: Pontifícia Universidade Católica - PUC  
 Endereço: Rua Marquês de São Vicente, n° 225  
 Gávea - RJ - 22451-900

**2. CONDIÇÕES AMBIENTAIS**

Temperatura Ambiental (°C):  $25 \pm 5$   
 Umidade Relativa do Ar (%):  $61 \pm 10$   
 Pressão Atmosférica (hPa):  $1009 \pm 5$   
 Climatizado: ( ) Não (X) Sim  
 Estável: ( ) Não (X) Sim

**3. PROCEDIMENTO**

Calibração executada através da comparação de pesos-padrão com as indicações do instrumento calibrado, conforme procedimento POT-04-102 (Para balanças mecânicas) e POT-04-103 (Para balanças eletrônicas).

**4. OBJETO CALIBRADO**

|                      |                    |                                                       |                    |
|----------------------|--------------------|-------------------------------------------------------|--------------------|
| Descrição:           | Balança Eletrônica | Fabricante:                                           | Mettler            |
| N° série:            | 1116352403         | Modelo:                                               | A1261              |
| TAG:                 | 1116352403         | Classe:                                               | <b>I</b>           |
| Carga min.:          | 0,0002g            | e:                                                    | 0,001g / 0,001g    |
| Capacidade:          | 62g / 205g         | d:                                                    | 0,00001g / 0,0001g |
| Faixa de utilização: | 0 a 200g           | Data da calibração:                                   | 28/03/06           |
| Local:               | Lahman 576         | Segundo a Portaria 256/94, o instrumento encontra-se: | Aprovado           |

**5. PADRÕES UTILIZADOS / RASTREABILIDADE**

| Padrões                  | Identificação | Marca     | Certificado | Órgão     | Validade |
|--------------------------|---------------|-----------|-------------|-----------|----------|
| Conjunto de Pesos-padrão | PMPF-08       | Rico Lake | M-12311/04  | EN Weagen | 27/05/08 |

Este certificado atende aos requisitos de acreditação do DNMETRO, a qual avaliou a competência do laboratório e comprovou sua rastreabilidade a padrões nacionais de medida.

Rio de Janeiro, 5 de abril de 2005

Assinatura Autorizada  
 Lucas Marinho  
 Técnico Líder

Peso Exato Indústria e Comércio de Balanças Ltda  
 Av. Brasil, 18.610 - Coelho Neto - Rio de Janeiro, RJ - Cep: 21350-000 / Tel: (21) 3371-5656  
 FAX: (21) 2471-2800 www.pesoexato.com.br metrologia@pesoexato.com.br

## Anexo VI – Certificado da calibração da balança de 0,01 mg – pág.2



CONFIABILIDADE TOTAL EM CALIBRAÇÃO



**CERTIFICADO DE CALIBRAÇÃO**  
 Empresa Brasileira de Metrologia Ltda.  
 (Peso Exato Indústria e Comércio de Balanças Ltda.)

Cert. n°: 906/2006  
 Página: 2 de 2

Rede Brasileira de Calibração

Laboratório de Calibração Acreditado pelo CGCRE/INMETRO sob N° 301

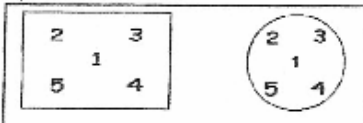
**6. RESULTADOS DA CALIBRAÇÃO**

| VVC do Padrão (g) | Antes do Ajuste (g) | Valor Médio Final* (g) | Erro de Medição (g) | Incerteza Expandida (g) | Fator de Abrangência "k" | Graus de Liberdade Efetivos | Limite de Erro (g) (Port. 236/94) |
|-------------------|---------------------|------------------------|---------------------|-------------------------|--------------------------|-----------------------------|-----------------------------------|
| 0,50002           | 0,50001             | 0,50001                | -0,00001            | 0,00002                 | 2,00                     | infinito                    | 0,00100                           |
| 10,00000          | 10,00002            | 10,00001               | 0,00001             | 0,00004                 | 2,00                     | infinito                    | 0,00100                           |
| 20,00000          | 20,00019            | 20,00003               | 0,00003             | 0,00005                 | 2,00                     | infinito                    | 0,00100                           |
| 49,99986          | 50,00023            | 50,00008               | 0,00022             | 0,00014                 | 2,00                     | infinito                    | 0,00100                           |
| 79,99999          | 80,00004            | 80,00001               | 0,00002             | 0,00002                 | 2,00                     | infinito                    | 0,0020                            |
| 100,00000         | 100,00000           | 100,00001              | 0,00001             | 0,00003                 | 2,00                     | infinito                    | 0,0020                            |
| 120,00000         | 120,00000           | 120,00001              | 0,00001             | 0,00003                 | 2,00                     | infinito                    | 0,0020                            |
| 149,99989         | 150,00000           | 150,00002              | 0,00003             | 0,00004                 | 2,00                     | infinito                    | 0,0020                            |
| 169,99999         | 170,00000           | 170,00002              | 0,00003             | 0,00004                 | 2,00                     | infinito                    | 0,0020                            |
| 199,99999         | 200,00000           | 199,99998              | -0,00001            | 0,00005                 | 2,00                     | infinito                    | 0,0020                            |

OBS: A incerteza expandida de medição relatada é declarada como a incerteza padrão da medição multiplicada pelo fator de abrangência  $k^{**}$ , o qual para uma distribuição  $t$  com determinados graus de liberdade efetivos<sup>\*\*\*</sup>, corresponde a uma probabilidade de abrangência de aproximadamente 95%.

\*Média de 3 medições

\*\*definida na tabela

**7. TESTES REALIZADOS****A) EXCENTRICIDADE**

(X) Quadrado

( ) Redondo

|           |   |          |
|-----------|---|----------|
| Indicação | 1 | 50,00013 |
| Média     | 2 | 49,99999 |
|           | 3 | 49,99999 |
|           | 4 | 50,00020 |
|           | 5 | 50,00011 |

**8. OBSERVAÇÕES**

- Este equipamento está em conformidade com os itens 3.5 a 3.7 da portaria 236/94 do INMETRO.
- As atividades de reparo e ajustes porventura realizados neste instrumento não fazem parte do escopo de serviços acreditados pelo CGCRE/INMETRO.
- Este certificado é válido exclusivamente para o equipamento descrito, nas condições especificadas, não sendo extensivo a quaisquer outros, mesmo que similares.
- A calibração efetuada não isenta o objeto do controle metrológico estabelecido pela regulamentação metrológica.
- Os dados deste certificado estão de acordo com o ISO GUM (2ª edição brasileira) e a publicação EA-402:1999.

Rio de Janeiro, 5 de abril de 2006

Assinatura Autorizada

*Lucas Marinho*  
 Lucas Marinho  
 Técnico Líder

Peso Exato Indústria e Comércio de Balanças Ltda

Av. Brasil, 18.610 - Coelho Neto - Rio de Janeiro, RJ - Cep: 21350-000 / Tel: (21) 3371-5656  
 FAX: (21) 2471-2809 www.pesoexato.com.br metrologia@pesoexato.com.br

Anexo VII – Planejamento e programação dos testes iniciais de homogeneidade e estabilidade em bñis de peixe - pág. 1.

Temperaturas utilizadas:

Freezer –80 °C “temperatura de referência no teste”, Freezer – 20 °C,  
Geladeira + 6 - 10 °C

Programação (calendário dez.06 a jan./07)

| Dia da semana  | TER | QUA | QUI | SEX | SAB | DOM | SEG | TER | QUA | QUI | SEX | SAB | DOM | SEG | TER | QUA |
|----------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Dez./Jan.      | 26  | 27  | 28  | 29  | 30  | 31  | 01  | 02  | 03  | 04  | 05  | 06  | 07  | 08  | 09  | 10  |
| Dia de análise | 15  | 14  | 13  | 12  | 11  | 10  | 9   | 8   | 7   | 6   | 5   | 4   | 3   | 2   | 1   | 0   |

26/12 – dia da coleta + análise

27/12 – análise

02/01 – retirar amostras do Freezer –80 °C

05/01 – retirar amostras do Freezer –80 °C

09/01 – retirar amostras do Freezer –80 °C

10/01 – análise de todas as amostras

### **Quantidade de amostras (3 replicatas autênticas para cada temperatura):**

3 replicatas para serem analisadas no dia da coleta (26/12)

3 replicatas no Freezer –80 °C para serem analisadas no dia seguinte (27/12)

3 replicatas no Freezer –20 °C para serem analisadas no dia seguinte (27/12)

3 replicatas na Geladeira +10 °C para serem analisadas no dia seguinte (27/12)

3 amostras para ficar 15 dias no Freezer –80 °C

3 amostras para ficar 15 dias no Freezer –20 °C

3 amostras para ficar 15 dias na Geladeira +10 °C

6 amostras para retirar do Freezer –80 °C dia 09/01

6 amostras para retirar do Freezer –80 °C dia 05/01

6 amostras para retirar do Freezer –80 °C dia 02/01

6 amostras para retirar do Freezer –80 °C dia 29/12

**TOTAL: 45 amostras (acrescentar brancos e padrões)**

Anexo VII – Planejamento e programação dos testes iniciais de homogeneidade e estabilidade em bÍlis de peixe. (cont.)

### **Cálculo para prever quantidade de amostras:**

Considerando:

FTASS – gasto de 0,4 mL (0,2mL para cada substância) para cada análise

Fluorescência – gasto de 0,013 mL

Total de volume amostra/frasco = no mínimo 0,450 mL

Assim,  $0,450 \times 45 = \mathbf{20,25 \text{ mL de bÍlis}}$  no total.

Considerando que cada peixe com 0,5 mL de bÍlis (aproximado) precisaremos de  $20,25 / 0,5 = \mathbf{40,5 \text{ peixes}}$  no total.

Essa quantidade deve ser multiplicada pelo número de amostras fortificadas ( $\times 2$ ), pois as substâncias (criseno e pireno) serão adicionadas juntas no mesmo tubo).

Total de no mínimo **81 peixes** para o teste de estabilidade.

Acrescentar mais **10 peixes** distintos para teste de homogeneidade.

**Total aproximado de peixes (Tainha) a serem coletados = 91**