

1 Introdução

1.1. Contextualização

Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) estão entre os mais importantes poluentes ambientais. Grande parte deles é carcinogênico e/ou mutagênico. A maioria dos HPA emitidos para o ambiente provém de combustão incompleta e de processos pirolíticos envolvendo combustíveis fósseis. Para sistemas aquáticos, em geral, as liberações pontuais, como derramamentos de óleo e escapamentos de esgoto são a fonte principal de HPA (Kotzick, 1996). A Figura 1 exemplifica a estrutura de alguns HPA.

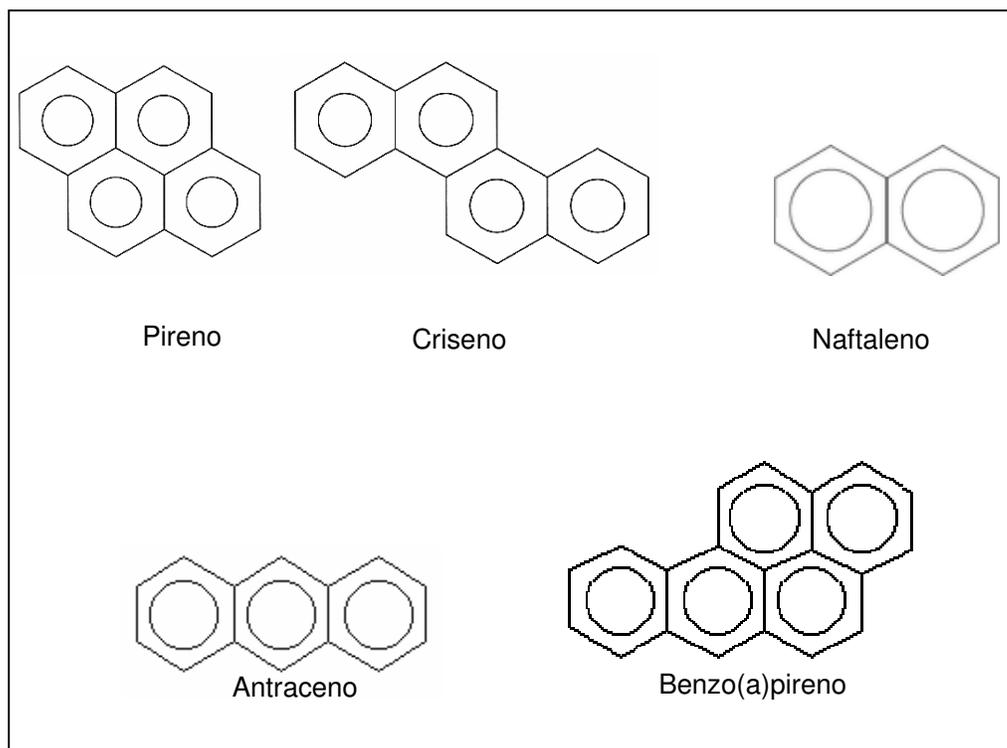


Figura 1-Estrutura de alguns HPA.

No ambiente aquático, os HPA mais carcinogênicos geralmente não estão presentes na fase dissolvida, como resultado de suas baixas solubilidades.

Estes compostos estão ligados ao sedimento ou à matéria suspensa, ou acumulados em animais do início da cadeia alimentar, tais como mexilhões (Ariese *et al*, 1997). Por isso, alguns organismos vêm sendo utilizados no biomonitoramento. Os peixes destacam-se por possuírem um papel fundamental na cadeia alimentar e representarem uma importante fonte de alimentação para a população. A presença dos produtos da metabolização dos HPA na bÍlis de peixes pode ser um bom indicador de contaminação, uma vez que a metabolização destes compostos é eficiente, sendo a bÍlis seu principal meio de excreção (Neves, 2006).

Os peixes têm um sistema de enzimas oxidase bem desenvolvido que pode rapidamente metabolizar os HPA originais em produtos hidrofÍlicos que são mais facilmente excretados. Consequentemente, apenas concentrações menores dos compostos originais são usualmente detectadas em tecidos de peixes (Ruddock, 2003). Assim, a análise dos nÍveis de acumulação de HPA no tecido dos peixes geralmente não é praticável devido à transformação rápida (metabolismo) em formas mais polares e mais facilmente excretáveis (Ariese *et al*, 1997). Apesar disso, dependendo da estrutura química e nÍvel de exposição, os HPA e seus metabÓlitos têm potencial de produzir efeitos tÓxicos, mutagênicos e/ou carcinogênicos em peixes e outros vertebrados, incluindo humanos. Por esta razão, o aumento nos nÍveis de contaminação de HPA em sistemas aquáticos é causa de preocupação (Ruddock, 2003). O aumento no número de lesões no fÍgado, incluindo tumores, foi observado em diversas populações de peixes em Águas européias e norte-americanas, e foi ligado à poluição por HPA (Ariese, 1997).

A fim de quantificar a ingestão de HPA pelos peixes, produtos da biotransformação (metabÓlitos) podem ser determinados no líquido biliar. Um dos principais metabÓlitos é o 1-hidroxipireno, cuja estrutura está representada na Figura 2.

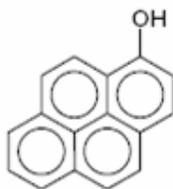


Figura 2-Estrutura do 1-hidroxipireno.

Diversas técnicas analíticas estão disponíveis para a determinação de metabÓlitos de HPA na bÍlis de peixes. Estes metabÓlitos encontram-se

geralmente conjugados, ligados ao glucuronídeo ou a outros grupos. A análise direta de metabólitos conjugados ou a análise dos metabólitos depois da hidrólise pode ser empregada. Uma das técnicas mais utilizadas é a cromatografia a líquido de alta eficiência (HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*) em fase reversa com detector de fluorescência para separação e identificação dos metabólitos de HPA em bÍlis de peixe (Ariese, 1997).

A análise de metabólitos de HPA em bÍlis de peixes é um método conveniente e relativamente rápido para o monitoramento da contaminação por HPA em peixes e em sistemas aquáticos, sendo bastante abordada na Literatura (Ruddock, 2003). Esta análise tem contribuição e aplicação na elaboração de diagnósticos ambientais sobre a contaminação por petróleo e derivados nos sistemas aquáticos.

1.2. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos são um grupo especial de constituintes do petróleo. São constituídos por múltiplos anéis de benzeno e são mais resistentes à degradação microbiológica e bastante persistentes no ambiente. São adsorvidos fortemente aos sedimentos, e persistem por muitos anos no ambiente. Os HPA são especialmente tóxicos e potencialmente carcinogênicos ao homem e aos organismos marinhos. Há fortes evidências de que os HPA são capazes de causar câncer em peixes e moluscos (Vuorinen, 2006).

Os HPA são um grupo de compostos orgânicos hidrofóbicos poluentes derivados principalmente de fontes pirogênicas e petrogênicas (Vuorinen, 2006). A temperatura ambiente, os HPA são sólidos e, em geral, suas características mais marcantes são os altos pontos de fusão e ebulição, a baixa pressão de vapor e a baixíssima solubilidade em água, que tende a diminuir com o aumento da massa molar do composto (Silva, 2004). A solubilidade em água é um dos parâmetros físico-químicos mais importantes, já que afeta diretamente o destino e o transporte destes compostos no ambiente (Reza, 2002).

Na Tabela 1 estão representadas algumas propriedades físico-químicas importantes de alguns HPA.

Tabela 1-Propriedades físico-químicas de alguns HPA.

Composto	Massa molar (g mol ⁻¹)	Pressão de vapor (Pa, 25 °C)	Solubilidade em água (mg L ⁻¹ , 25 °C)
Naftaleno	128	36,8	31
Acenaftileno	152	4,14	16,1
Fluoreno	166	0,71	1,9
Fenantreno	178	0,113	1,1
Antraceno	202	0,0778	0,045
Pireno	252	0,0119	0,132
Benzo[a]pireno	276	2,13x10 ⁻⁵	0,0038
Benzo(ghi)perileno	300	2,25x10 ⁻⁵	0,00026

Fonte: Netto, 2000.

1.3. Fontes de contaminação por HPA

Diversas fontes são responsáveis pela contaminação por HPA. Dentre as fontes naturais de contaminação, destacam-se os processos de decomposição de material orgânico, as plantas clorofiladas, os fungos e as bactérias que levam à formação de HPA, incêndios naturais em florestas, percolação natural de óleo e erupções vulcânicas (Neves, 2006).

Apesar de todas as fontes de contaminação naturais, são as fontes antropogênicas as mais significativas, com destaque para a extração, transporte e consumo de óleo, incineração de rejeitos, motores de combustão (principalmente os movidos à óleo diesel), derramamento de óleo, esgoto urbano e industrial e deposição atmosférica (Neves, 2006).

Podem ser citadas ainda outras fontes responsáveis pela contaminação por HPA: queima de carvão, fotocopiadoras, fumaça de cigarro e vários processos industriais, como a produção de alumínio e a gaseificação do coque (Netto, 2000).

Em geral, elevadas concentrações de HPA estão relacionadas com a proximidade de áreas que recebem descargas crônicas de hidrocarbonetos (Varanasi, 1989).

Na Tabela 2 são apresentados os valores típicos de concentrações de HPA de quatro e cinco anéis condensados (pireno, benzo[e]pireno e benzo[a]pireno) encontradas em petróleo e em alguns de seus derivados.

Tabela 2-Concentrações de HPA em petróleo e derivados.

Matriz	Pireno	Benzo[e]pireno	Benzo[a]pireno
Oito óleos brutos de diferentes origens (mg Kg ⁻¹)	1,6 a 10,7	1,2 a 28,9	0,1 a 3,6
Gasolina (mg L ⁻¹)	0,03 a 4,8		0,031-0,95
Sedimento contaminado com óleo de piche (matéria seca) (mg Kg ⁻¹)	1410	270	440
Óleo de motores usado (mg Kg ⁻¹)	86 a 791	37 a 334	31 a 100
Lubrificantes (mg Kg ⁻¹)	5,10 a 99,0	0,70 a 37,3	0,79 a 34,8

Fonte: Kornmüller, 2003.

Devido à grande variedade de fontes de emissão de HPA, eles estão vastamente distribuídos no meio-ambiente e são encontrados no ar, no solo, na água, em plantas e até em alimentos (Angerer, 1997).

1.4. HPA como poluentes ambientais

Os HPA são classificados como poluentes que representam uma ameaça à saúde e à integridade dos ecossistemas marinhos. Por conta disto, a Agência Americana de Proteção ao Meio Ambiente (EPA, do inglês *Environmental Protection Agency*) listou dezesseis HPA como poluentes prioritários (Kornmüller, 2003), a saber, acenafteno, acenaftileno, antraceno, benzo[a]antraceno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, benzo[ghi]perileno, benzo[a]pireno, criseno, dibenzo[a,h]antraceno, fluoranteno, fluoreno, indenol[1,2,3-cd]pireno, naftaleno, fenantreno e pireno.

De uma maneira geral, tanto os HPA quanto seus derivados estão associados ao aumento da incidência de diversos tipos de cânceres no homem. A elevada taxa de mortalidade causada por esta doença e o fato de que os tratamentos são dispendiosos, demorados e normalmente trazem muito sofrimento aos doentes, expõem claramente os benefícios potenciais que o entendimento, a avaliação e o controle da exposição humana a substâncias que possuam atividade carcinogênica/mutagênica podem trazer. Sabe-se que a grande maioria dos cânceres resulta de interações genéticas e ambientais, sendo as causas externas (ambientais), em conjunção com fatores de

suscetibilidade adquirida, as mais importantes. No caso dos HPA e seus derivados, o estudo é feito geralmente através do monitoramento dos níveis ambientais destas substâncias, do conhecimento das suas vias de penetração no organismo, de seu metabolismo, bem como da avaliação precoce de seus efeitos biológicos. Vários componentes deste grupo de compostos são capazes de reagir, diretamente ou após sofrerem transformações metabólicas, com o DNA, tornando-se potenciais carcinógenos e eficientes mutágenos (Netto, 2000).

1.5. HPA nos peixes

Nos peixes, os metabólitos de HPA na bÍlis podem ser usados como biomarcadores para a exposição ambiental recente a HPA. Estes metabólitos na bÍlis resultam de processos hepáticos de biotransformação por meio dos quais o HPA original é transformado, por hidroxilação e subsequente conjugação, em formas mais solúveis, facilitando sua eliminação pelo organismo (Ariese, 2005). A Figura 3 exemplifica a estrutura de alguns metabólitos de HPA.

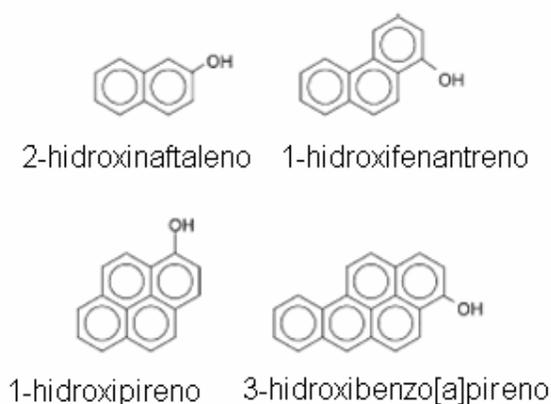


Figura 3-Exemplo da estrutura de alguns HPA hidroxilados.

Fonte: Ariese, 2005b.

Embora a habilidade dos invertebrados de eliminar HPA seja bem documentada, a taxa de biotransformação é altamente dependente da espécie. Estas taxas são consideradas baixas em muitos invertebrados, por exemplo, moluscos. Em contraste, os peixes e outros vertebrados marinhos biotransformam HPA rapidamente para formar derivados epoxi e hidroxil durante o metabolismo de fase I. Subseqüentemente, durante o metabolismo de fase II, os metabólitos da fase I são convertidos em conjugados altamente solúveis em

água (por exemplo, glucuronídeos ou sulfatos) que se acumulam na bÍlis (Figura 4). Conseqüentemente, a determinação de metabólitos de HPA na bÍlis de peixes fornece meios de avaliar a exposição dos organismos por HPA (Ariese *et al*, 2005).

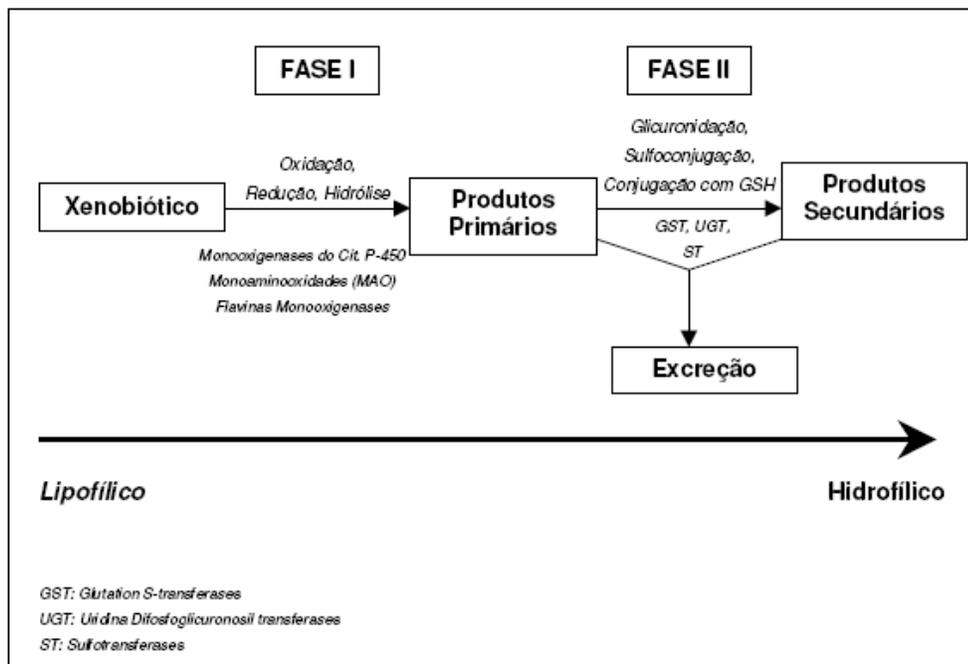


Figura 4-Esquema de biotransformação de xenobióticos.

Fonte: Neves, 2006.

1.6. A escolha do composto de estudo

Neste trabalho, foi utilizado o composto 1-hidroxipireno por ser o metabólito encontrado mais frequentemente e em maior quantidade (Law *et al*, 1994; Ruddock *et al*, 2002 e 2003; Vuontisjrvi *et al*, 2004; Pikkarainen, 2006; Vuorinen *et al*, 2006). Além disso, foi levado em consideração também o fato de este composto estar disponível como padrão comercial para quantificação, ao contrário dos metabólitos conjugados.

1.7. Metodologias para determinaço de metabólitos de HPA em bÍlis de peixe

O primeiro trabalho a descrever o uso de metabólitos de HPA em bÍlis de peixe foi publicado em 1984 por Krahn e colaboradores. Neste trabalho, foi

utilizada a técnica de HPLC com detector de fluorescência para estimar a concentração relativa de metabólitos de HPA em bÍlis de peixe. Além disso, lesões no fÍgado dos peixes foram diagnosticadas histologicamente e sua presença foi estatisticamente relacionada à concentração de metabólitos na bÍlis. A metodologia envolvia a injeção da bÍlis diretamente no HPLC e o uso de água contendo ácido acético e metanol como fase móvel. Os pares de comprimento de onda de excitação/emissão foram 290/335 nm, 256/380 nm e 380/430 nm para medir metabólitos do tipo naftaleno, fenantreno e benzo[a]pireno, respectivamente. No mesmo trabalho, foi empregada uma metodologia de hidrólise enzimática para análise por cromatografia gás-lÍquido com espectrometria de massas. A hidrólise consistiu em adicionar tampão acetato e β -glucuronidase dissolvida em tampão a uma fração coletada após injeção no HPLC. A mistura era agitada por três horas a 40 °C para hidrolisar os conjugados. Tampão citrato foi adicionado e os metabólitos foram extraÍdos e concentrados. O solvente de lavagem foi água e os solventes de extração foram acetona/metanol e cloreto de metileno/álcool isopropÍlico/água. Após redução de volume com fluxo de nitrogênio, a amostra foi analisada. Neste trabalho, foi mostrado que o método utilizando HPLC com detecção por fluorescência foi adequado para a estimativa da exposição de peixes à contaminação ambiental, especialmente por produtos derivados de petróleo. Além disso, foram identificados metabólitos individuais de HPA.

Krahn e colaboradores (1987) determinaram metabólitos individuais de compostos aromáticos em bÍlis de peixe hidrolisada por cromatografia a gás e HPLC com detecção por fluorescência. A hidrólise das amostras de bÍlis de peixe foi feita adicionando-se tampão acetato e β -glucuronidase contendo sulfatase dissolvida em tampão à amostra de bÍlis. A mistura foi agitada por quatro horas a 40 °C para hidrolisar os conjugados. Os metabólitos foram extraÍdos e concentrados. O solvente de lavagem foi água e os solventes de extração foram acetona contendo metanol e cloreto de metileno contendo álcool isopropÍlico e água, seguido de redução de volume com fluxo de nitrogênio. A quantificação por HPLC dos metabólitos de HPA na bÍlis e na bÍlis hidrolisada foi feita conforme descrito por Krahn (1984) e utilizando-se o par de comprimentos de onda de excitação/emissão de 380/430 nm. Diversos metabólitos individuais (metabólitos de fenantreno, fluoranteno, pireno e benzo[a]pireno) foram encontrados na bÍlis hidrolisada de peixes provenientes de locais poluídos. Nenhum dos metabólitos estudados foi encontrado em bÍlis provenientes de locais relativamente limpos.

Ariese e colaboradores (1993) desenvolveram uma metodologia para determinação de 1-hidroxipireno por espectrometria de fluorescência sincronizada. Eles compararam a técnica de HPLC com detecção por fluorescência e a espectroscopia de fluorescência sincronizada. A hidrólise da bÍlis para análise por HPLC consistia na adiço de β -glucuronidase/arilsulfatase à bÍlis, incubaço por duas horas a 37 °C, adiço de etanol para precipitação das enzimas e centrifugaço. O sobrenadante foi injetado diretamente no sistema cromatográfico. A fase móvel consistia de acetonitrila e água e o par de comprimentos de onda de excitaço/emisso utilizado foi 345/395 nm. Neste trabalho, o 1-hidroxipireno foi facilmente detectado e foi observado que uma porção considerável da intensidade fluorescente total poderia ser atribuÍda a este composto.

Law e colaboradores (1994) isolaram e caracterizaram metabólitos de pireno em urina e bÍlis de peixes tanto contaminados em laboratório quanto não-contaminados. O tratamento da bÍlis para hidrólise consistia em incub-la por três horas a 80 °C com ácido sulfúrico 0,5 mol L⁻¹. A bÍlis hidrolisada foi extraÍda três vezes com cloreto de metileno. Os extratos orgânicos foram combinados e evaporados à secura sob fluxo de nitrogênio. Os resÍduos foram redissolvidos em metanol e uma alÍquota da solução foi analisada por HPLC. A fase móvel utilizada consistia de metanol e gua. Neste trabalho, foi concluÍdo que o 1-hidroxipireno foi o metabólito de oxidação do pireno encontrado em maior quantidade tanto na urina quanto na bÍlis dos peixes estudados. Além dele, ainda foram encontradas pequenas quantidades de 1,6-dihidroxipireno e 1,8-dihidroxipireno.

Ariese e colaboradores (1997) compararam metodologias para determinaço de metabólitos de HPA em bÍlis de peixe, incluindo HPLC e espectroscopia de fluorescência. Neste estudo, para análise por HPLC, a hidrólise das amostras de bÍlis foi feita adicionando-se água e β -glucuronidase/arilsulfatase à bÍlis. Aps incubaço por duas horas a 37 °C e adiço de etanol, a mistura foi centrifugada a 3000 rpm por três minutos e injetada em HPLC. A fase móvel consistia de água e acetonitrila e o par de comprimentos de onda de excitaço/emisso indicado para detecço do 1-hidroxipireno era 346/384 nm. Este trabalho concluiu que a análise convencional por HPLC não era adequada para a determinaço de metabólitos conjugados e que o ideal seria uma etapa de hidrólise enzimática da bÍlis antes da análise, para determinaço de metabólitos livres.

Willett e colaboradores (2000) estudaram metabólitos de benzo[a]pireno em bÍlis de peixe. O tratamento enzimático incluía a utilização das enzimas β -glucuronidase, sulfatase ou γ -glutamiltanspeptidase e incubação por seis horas a 37°C. A extração foi feita com acetato de etila e acetona. A fase móvel consistia de água e metanol e a análise foi feita em HPLC com detecção por espectrometria de massas.

Richardson e colaboradores (2001) estudaram a concentração de três metabólitos individuais (1-hidroxipireno, 2-hidroxinaftaleno e 1-hidroxifenantreno) em bÍlis de peixe. As amostras de bÍlis de peixe foram hidrolisadas misturando-se bÍlis e água contendo ácido ascórbico e β -glucuronidase/arilsulfatase. A solução foi incubada por uma hora a 37 °C em agitação. Os metabólitos hidrolisados foram diluídos com etanol/água contendo ácido ascórbico. A solução final foi centrifugada (10000 g) a 4 °C por cinco minutos e analisada por HPLC com detecção por fluorescência. A fase móvel utilizada foi acetonitrila e água e os pares de comprimentos de onda utilizados foram 222/370 nm, 246/370 nm e 243/388 nm para 2-hidroxinaftaleno, 1-hidroxifenantreno e 1-hidroxipireno, respectivamente. Neste trabalho, os três metabólitos estudados foram detectados nos líquidos biliares dos indivíduos coletados em áreas contaminadas. O metabólito encontrado em maior quantidade foi o 1-hidroxipireno.

Schanke e colaboradores (2001) analisaram metabólitos de benzo[a]pireno em bÍlis usando metodologia modificada de Krahn (1984). Eles adicionaram β -glucuronidase/arilsulfatase e água à bÍlis. A mistura foi incubada por uma hora a 37 °C. Após adição de metanol gelado, a mistura foi centrifugada por cinco minutos a 16000 g e analisada por HPLC, utilizando água e metanol como fase móvel.

Ruddock e colaboradores (2002 e 2003) estudaram seis metabólitos de HPA em bÍlis de peixe. A hidrólise da bÍlis foi feita adicionando-se água e solução da enzima β -glucuronidase/arilsulfatase. A mistura foi incubada a 37 °C em agitação por quarenta e cinco minutos. Após adição de metanol e centrifugação (16000 g) por dez minutos, a análise foi feita por HPLC com detector de fluorescência. A fase móvel utilizada foi metanol/água. Eles reportaram que o metabólito presente em maior quantidade foi o 1-hidroxipireno, seguido de 1-hidroxicriseno, 1-hidroxifenantreno e três derivados de benzo[a]pireno, em pequenas quantidades.

Jonsson e colaboradores (2003) analisaram 2-hidroxinaftaleno, 1-hidroxifenantreno, 1-hidroxipireno e 3-hidroxibenzo[a]pireno em materiais de

referência certificados de bÍlis de peixe por duas tÉcnicas analÍticas: cromatografia a gÁs acoplada a espectrÔmetro de massas e HPLC com detecçÕo por fluorescÊncia. As amostras de bÍlis foram hidrolisadas por tratamento com tampÕo acetato contendo β -glucuronidase/sulfatase. ApÕs incubaçÕo por duas horas a 40 °C, adiçÕo de acetonitrila e centrifugaçÕo, o sobrenadante foi injetado em HPLC. A fase mÓvel consistia de acetonitrila 5 % em tampÕo de acetato de amônio (pH=4) e acetonitrila 90 % contendo acetato de amônio. Os pares de comprimentos de onda de excitaçÕo/emissÕo utilizados foram 274/356 nm, 300/384 nm, 380/430 nm, 300/360 nm para 2-hidroxinaftaleno, 1-hidroxifenantreno, 1-hidroxipireno e 3-hidroxibenzo[a]pireno, respectivamente. Segundo este trabalho, a determinaçÕo do 1-hidroxipireno foi realizada com sucesso por ambos os mÉtodos, mas a anÁlise por HPLC-F apresenta a vantagem de a preparaçÕo da amostra ser mais simples e rÁpida.

VuontisjÁrvi e colaboradores (2004) fizeram um estudo comparando as tÉcnicas de fluorescÊncia e HPLC com detecçÕo por fluorescÊncia com comprimentos de onda fixos para determinaçÕo de metabÓlitos de HPA em bÍlis de peixe. Para hidrÓlise das bÍlis, as amostras foram tratadas conforme metodologia descrita por Ariese (1997) com modificaçÕes. Adicionou-se Água e β -glucuronidase/arilsulfatase à bÍlis. ApÕs incubaçÕo por duas horas a 37 °C e adiçÕo de metanol, a mistura foi centrifugada a 3000 rpm por cinco minutos a 4 °C e injetada em HPLC. A fase mÓvel consistia de Água e acetonitrila e os pares de comprimentos de onda de excitaçÕo/emissÕo indicados para detecçÕo de 1-hidroxipireno, 2-hidroxinaftaleno, criseno-1,2-diol, 1-hidroxifenantreno e 3-hidroxibenzo[a]pireno foram 346/384 nm, 290/335 nm, 268/384 nm, 256/380 nm e 380/430 nm, respectivamente. Neste estudo, mais uma vez, o metabÓlito encontrado em maior concentraçÕo foi o 1-hidroxipireno, seguido do 1-hidroxifenantreno. Os demais metabÓlitos nÕo foram detectados em nenhum dos peixes coletados. A correlaçÕo entre os dois mÉtodos estudados foi considerada satisfatÓria.

Jonsson e colaboradores (2004) avaliaram dois mÉtodos analÍticos para determinaçÕo quantitativa de metabÓlitos de criseno em bÍlis de peixe: HPLC com detecçÕo por fluorescÊncia e cromatografia a gÁs acoplada a espectrÔmetro de massas. A metodologia para hidrÓlise das bÍlis dos peixes e as condiçÕes experimentais da injeçÕo em HPLC foram as mesmas relatadas por Jonsson (2003).

Pikkarainen (2006) estudou os metabÓlitos de HPA em bÍlis de peixe como indicadores de contaminaçÕo no Mar Báltico. O procedimento de hidrÓlise

das amostras de bÍlis foi baseado em Ariese (1997), com algumas modificações. Adicionou-se água e β -glucoronidase/arilsulfatase à bÍlis. Após incubação por uma hora a 37 °C e adição de etanol, a mistura foi centrifugada a 3000 rpm por cinco minutos e injetada em HPLC. A fase móvel consistia de água e acetonitrila e o par de comprimentos de onda de excitação/emissão indicado para detecção de metabólitos do tipo pireno foi 275/393 nm. Neste trabalho, mais uma vez, o 1-hidroxipireno foi o metabólito encontrado em maior quantidade, estando de acordo com o que já havia sido reportado em outros trabalhos.

Vuorinen e colaboradores (2006) estudaram a correlação entre os métodos de fluorescência com comprimento de onda fixo e HPLC com detecção por fluorescência na análise de bÍlis de peixe. Os metabólitos de HPA nas amostras de bÍlis foram analisados por fluorescência no par de comprimentos de onda de excitação/emissão de 341/383 nm, ideal para HPA/metabólitos de quatro anéis. Para análise por HPLC a metodologia utilizada foi a mesma descrita em Vuontisjärvi e colaboradores (2004). O trabalho mostrou que o 1-hidroxipireno foi encontrado em todos os indivíduos das três espécies de peixe estudadas, enquanto 1-hidroxifenantreno foi detectado em apenas alguns indivíduos e os demais metabólitos monitorados não foram detectados. Foi encontrada uma boa correlação entre a fluorescência e a concentração de 1-hidroxipireno medida por HPLC.

No Brasil, Silva e colaboradores (2006) utilizaram metabólitos de HPA em bÍlis de peixes como biomarcadores para exposição de ambientes marinhos (Canal de São Sebastião, São Paulo, SP) a estes compostos. A metodologia usada neste trabalho foi a mesma descrita por Krahn e colaboradores (1984), para análise de bÍlis só diluída, sendo utilizada a técnica HPLC-F, na quantificação de metabólitos de naftaleno, fenantreno e benzo[a]pireno. Este trabalho sugeriu que as altas concentrações de metabólitos de naftaleno e fenantreno encontradas denunciavam a presença de contaminação por fontes petrogênicas.

Também no Brasil, Neves e colaboradores (2007) analisaram HPA em bÍlis de peixes para monitoramento ambiental em áreas contaminadas. A técnica analítica utilizada foi a espectroscopia de fluorescência fixa e as amostras foram analisadas, em termos de equivalentes de pireno, no par de comprimentos de onda de 332/383 nm. As amostras também foram analisadas nos comprimentos de onda 290/335 nm (para HPA de dois ou três anéis aromáticos) e 380/430 nm (para HPA de cinco anéis aromáticos). Este trabalho demonstrou que a

determinação de HPA na bÍlis de peixes da espécie *Mugil liza* é um procedimento conveniente para o monitoramento ambiental.

1.8. Técnicas analíticas

A Figura 5 esquematiza algumas técnicas analíticas quantitativas e semi-quantitativas utilizadas para a determinação de metabólitos de HPA em bÍlis de peixe, mostrando pireno como exemplo de contaminante.

Este trabalho focou as discussões em torno de duas das técnicas apresentadas: HPLC com detecção por fluorescência e espectroscopia de fluorescência molecular.

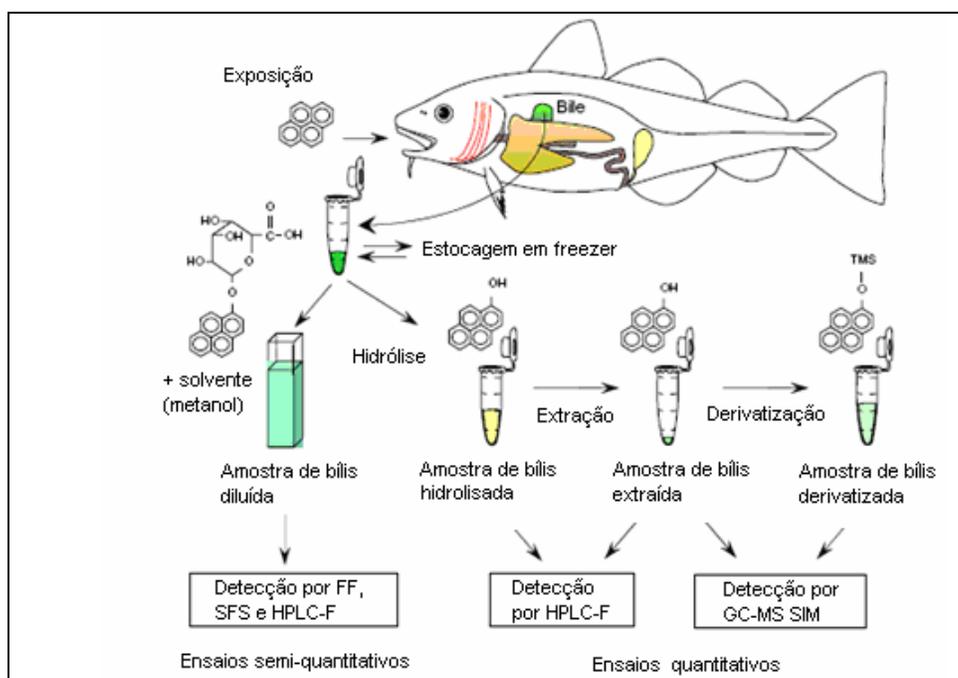


Figura 5-Métodos para determinação de HPA em bÍlis de peixe (Fonte: Ariese *et al*, 2005a).

1.8.1. Espectroscopia de fluorescência molecular

A emissão de luz por moléculas eletronicamente excitadas é a base da espectroscopia de luminescência molecular, que é amplamente empregada em análises quantitativas de grande variedade de compostos orgânicos e inorgânicos, já que fotodetetores convencionais respondem com alta

sensibilidade à luz visível e ultravioleta. As técnicas de luminescência são baseadas na relação entre a concentração do analito e a intensidade luminescente (Schulman, 1985).

Muitos sistemas químicos podem ser excitados pela radiação eletromagnética e reemitir ao mesmo ou a outro comprimento de onda. Estes sistemas denominam-se fotoluminescentes, dentro dos quais se encontram os fluorescentes e os fosforescentes (Gonçalves, 2001).

Após a absorção de radiação de comprimento de onda característico, a população de moléculas é promovida para um estado excitado singleto. Esta absorção é seguida por processos rápidos e não-radiativos de relaxamento, chamados relaxamento vibracional, quando a molécula perde energia vibracional num determinado estado eletrônico, e conversão interna, quando a molécula sofre uma transição não-radiativa de um estado eletrônico de maior energia para um de menor energia, que levam a população para o primeiro nível vibracional do estado excitado singleto de menor energia. A partir daí, se a diferença entre o estado fundamental e o primeiro estado excitado não for muito grande, podendo ocorrer sobreposição de níveis vibracionais, a população pode sofrer um processo chamado de cruzamento intersistemas. Se a diferença energética entre o estado fundamental e o primeiro estado excitado for grande, a desativação para o estado fundamental ocorrerá com emissão de radiação na forma de fluorescência (Schulman, 1985).

Na fluorescência, a transferência não envolve variação de spin eletrônico, ao contrário do que ocorre com as emissões por fosforescência (Gonçalves, 2001).

A fluorescência ocorre em sistemas químicos gasosos, líquidos ou sólidos, tanto simples quanto complexos, onde moléculas do analito são excitadas para resultar em uma espécie cujo espectro de emissão fornece informação para análise quantitativa ou qualitativa. Esta excitação é feita por absorção de fótons. A fluorescência mais intensa e mais útil é encontrada em compostos contendo grupos funcionais aromáticos. Compostos contendo estruturas alifáticas, alicíclicas carbonílicas ou estrutura de ligações duplas altamente conjugadas também podem apresentar fluorescência, mas em menor número se comparado aos sistemas aromáticos. A fluorescência é favorecida ainda em moléculas que possuem estruturas rígidas (Skoog, 2002), já que a falta de rigidez causa um aumento na taxa de conversão interna, o que diminui a taxa de fluorescência.

1.8.1.1.

Uso da espectroscopia de fluorescência molecular para determinação de HPA em bÍlis de peixe

Diversos HPA na bÍlis são fluoróforos fortes e podem assim ser medidos semi-quantitativamente e muito facilmente por meio de técnicas diretas de deteco da fluorescência. Por exemplo, deteco de fluorescência fixa e fluorescência sincronizada podem ser usadas para esta finalidade. Estas técnicas são excelentes para a deteco rápida de nÍveis de exposição totais de HPA, porém são menos apropriadas para a determinao de compostos individuais. As propriedades fluorescentes de moléculas de HPA se devem à estrutura aromática rÍgida, com elétrons π deslocalizados, que são distribuídos por toda a molécula. Quando uma molécula de HPA absorve um fóton com determinada energia, um de seus elétrons π é levado a um nÍvel de energia mais elevado, e a molécula é dita estar em um estado excitado singleto. Quando este elétron retorna ao estado fundamental, um fóton com a mesma energia é emitido e este processo é conhecido como fluorescência (fotoluminescência). Os comprimentos de onda nos quais a molécula pode ser excitada e nos quais ela emite são caracterÍsticos para o composto e podem ser usados para identificação e quantificação (Ariese *et al*, 2005).

1.8.2.

Cromatografia a lÍquido de alta eficiência

Inicialmente, a cromatografia a lÍquido era realizada em colunas de vidro com 1 a 5 cm de diâmetro e 50 a 500 cm de comprimento. O diâmetro das partÍculas da fase sólida variava entre 150 e 200 μm . O processo de separação era muito lento. Para aumentar a eficiência da coluna, percebeu-se que era necessário diminuir o tamanho das partÍculas da fase estacionária e introduzir a fase móvel sob pressão. No final dos anos 1960, a tecnologia permitiu o uso de colunas empacotadas com partÍculas de diâmetro de 3 a 10 μm . Aparelhos sofisticados que trabalham a altas pressões foram fabricados, contrastando com as colunas de vidro simples da cromatografia lÍquida clássica, dependentes apenas da ação da gravidade. O nome cromatografia a lÍquido de alta eficiência começou a ser então usado para diferenciar esta nova técnica dos métodos básicos.

Na cromatografia a lÍquido de alta eficiência pode-se usar um só solvente de composição constante ou fazer-se uma eluição com gradiente, o que permite,

em geral, uma separação mais eficiente, diminuindo o tempo de separação, sem prejuízo da resolução dos picos (Gonçalves, 2001).

Na cromatografia, uma amostra líquida é injetada em uma coluna cheia com material de suporte. O solvente é bombeado através da coluna, arrastando a amostra pela coluna e pelo detector. São as diferentes interações dos diversos componentes presentes na amostra com a fase estacionária que permitem a separação.

Um cromatograma é um gráfico bidimensional de moléculas eluindo através da coluna. Medidas de absorvância ou outra propriedade definida são plotadas contra o tempo de eluição ou volume.

O objetivo da cromatografia é a separação de múltiplos picos. Embora a resolução de dois picos possa ser calculada, a separação também pode ser avaliada visualmente, sem necessidade de cálculo de resolução. A resolução é mais difícil de ser alcançada se dois picos diferem amplamente em suas concentrações ou em sua habilidade de ser detectados (Cunico, 1998).

Em cromatografia a líquido, não existem detectores universais. Eles são divididos em dois grupos: os que respondem a uma propriedade da fase móvel (como o de índice de refração) e os que respondem a uma propriedade do soluto (como os de absorvância, fluorescência e eletroquímicos). Utilizando detectores de fluorescência, a fluorescência é observada por um detector fotoelétrico localizado a 90° do feixe de excitação. Os detectores mais simples utilizam uma fonte de excitação de mercúrio, enquanto equipamentos mais sofisticados empregam fonte de xenônio. A grande vantagem dos métodos fluorescentes é sua alta sensibilidade (Skoog, 2002).

1.8.2.1.

Uso do HPLC para determinação de HPA em bÍlis de peixe

Diversos trabalhos demonstram o uso de HPLC para determinação de metabólitos de HPA em bÍlis de peixe.

Krahn e colaboradores (1984) desenvolveram uma metodologia para análise de bÍlis de peixe diretamente por cromatografia a líquido utilizando água e metanol como fase móvel e detecção por fluorescência nos pares de comprimento de onda de excitação/emissão de naftalenos (290/335 nm), fenantrenos (256/380 nm) e benzo[a]pirenos (380/430 nm).

Em 1986, Krahn e colaboradores utilizaram a metodologia desenvolvida por eles em 1984 para estimar a exposição de peixes aos HPA pela medição da

concentração de metabólitos desses compostos na bÍlis, durante um derrame de Óleo ocorrido no rio Columbia.

Entretanto, a análise convencional por HPLC de fase reversa não é muito adequada para a determinação de metabólitos conjugados, já que estes compostos são muito polares e não apresentam praticamente nenhuma retenção em colunas típicas de fase reversa. Assim, essa técnica não fornece uma boa separação das espécies conjugadas e muitos conjugados vão coeluir no início do cromatograma, impedindo a quantificação. Uma alternativa para contornar esta limitação é promover uma hidrólise, após a qual, os metabólitos de fase I menos polares podem ser bem separados por esta técnica. A hidrólise enzimática apresenta resultados melhores que a hidrólise ácida ou a saponificação (Ariese *et al*, 1997).

Um outro problema na análise convencional por HPLC de fase reversa é que padrões de metabólitos conjugados não estão disponíveis comercialmente para quantificação direta. Assim, a técnica mais satisfatória para o monitoramento da exposição do ambiente marinho a HPA parece ser HPLC de fase reversa com detecção por fluorescência da bÍlis hidrolisada. Com este método, os metabólitos de fase I podem ser determinados conjuntamente. A vantagem é que grande parte dos metabólitos de fase I podem ser obtidos comercialmente como padrões de calibração. Além disso, métodos utilizando HPLC mostram excelente sensibilidade (1-hidroxipireno pode ser detectado a níveis de 4 ng mL⁻¹) (Ariese *et al*, 1997).

1.9. Validação de métodos

Atualmente, diferentes setores da indústria, saúde, meio ambiente, entre outros, utilizam os resultados de análises em laboratórios químicos para a tomada de decisões. Com base nestes resultados, matérias-primas são aceitas ou rejeitadas, diferencia-se o desempenho de diferentes fornecedores, processos produtivos são modificados, atua-se sobre a saúde de pessoas e animais (Chui, 2001).

A necessidade de se demonstrar a qualidade de medições químicas, através de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade, está sendo cada vez mais reconhecida e exigida. Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve sofrer uma avaliação denominada de validação (Ribani, 2004). Assim, uma vez

desenvolvido um novo método analítico, é importante se fazer a validação do mesmo para concluir se ele fornece resultados confiáveis, de forma a poder ser aplicado rotineiramente, produzindo resultados compatíveis com precisão e exatidão consideradas satisfatórias (Prestes, 2007).

Como muitos aspectos atuais de nossa sociedade são suportados por algum tipo de medição analítica e o custo da realização destas medições muitas vezes é elevado, decisões sobre falsos resultados podem causar custos adicionais. É imprescindível alcançar resultados analíticos corretos. É a utilização de procedimentos analíticos validados que permite a obtenção de resultados confiáveis. Portanto, validar é confirmar que os requisitos necessários para determinada utilização de um método foram atingidos.

A validação de um método analítico deve ser realizada sempre que for necessário verificar se o desempenho dos parâmetros do método em estudo é adequado para utilização em uma determinada aplicação. Mesmo métodos já reconhecidos, quando são realizados pela primeira vez em um laboratório, precisam ser validados para verificar se o laboratório consegue alcançar os parâmetros estabelecidos pelo método.

Geralmente, os requisitos para validação de métodos analíticos são definidos por publicações orientativas, específicas para cada setor (Castro, 2007)

Segundo o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO), em sua Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos, os parâmetros de validação devem estar claramente declarados no procedimento documentado e devem incluir, sempre que aplicável:

i. Especificidade e seletividade

Um método que produz resposta para apenas um analito é dito específico. Um método que produz resposta para vários analitos, mas distingue a resposta de um analito da de outros é dito seletivo.

ii. Linearidade

Linearidade é a habilidade que um método analítico demonstra em produzir resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito em amostras, em uma dada faixa de concentração. A quantificação

requer que se conheça a dependência entre a resposta medida e a concentração do analito.

A linearidade de um método pode ser observada pelo gráfico dos resultados dos ensaios em função da concentração do analito ou então calculada a partir da equação da regressão linear, determinada pelo método dos mínimos quadrados.

O coeficiente de correlação linear (r) é freqüentemente usado para indicar o quanto a reta obtida pode ser considerada adequada como modelo matemático.

Como os desvios da linearidade são, muitas vezes, difíceis de serem detectados visualmente, pode-se verificar a sua adequação por meio de cálculos.

iii. Faixa de trabalho e faixa linear de trabalho

A faixa de trabalho é uma faixa de concentrações do analito na qual o método pode ser aplicado. Dentro da faixa de trabalho pode existir uma faixa de resposta linear e, dentro desta, a resposta do sinal terá uma relação linear com o analito.

Há possibilidade de serem usados modelos não-lineares, porém, sempre que possível, deve-se optar por modelos lineares.

iv. Sensibilidade

Sensibilidade é um parâmetro que demonstra a variação da resposta em função da concentração do analito. Pode ser expressa pela inclinação da reta de regressão de calibração e é determinada simultaneamente com os testes de linearidade.

v. Limite de detecção

O limite de detecção (LD) é o menor valor de concentração do analito que pode ser detectado pelo método.

Quando são realizadas medições em amostras com baixos níveis do analito, como, por exemplo, na análise de traços, é importante saber qual o menor valor de concentração do analito que pode ser detectado pelo método. Esse parâmetro de mérito tem sido investigado estatisticamente e diversos

critérios de decisão têm sido propostos. Muitas controvérsias são originadas devido ao fato de não haver atualmente uma concordância da terminologia aplicável. O termo “*limite de detecção*” não é aceito por algumas instituições, apesar de ser usado em alguns documentos setoriais. O procedimento de determinação do LD pode ser aplicado a uma grande variedade de amostras, desde a água reagente (branco) até águas residuárias, todas contendo o analito. O LD para um procedimento analítico pode variar em função do tipo da amostra. Por isso, é fundamental assegurar-se de que todas as etapas de processamento do método analítico estejam incluídas na determinação desse parâmetro de validação.

vi. Limite de quantificação

O limite de quantificação (LQ) é a menor concentração do analito que pode ser determinada com um nível aceitável de exatidão e precisão. Algumas vezes é também denominado limite de determinação. Pode ser considerado como sendo a concentração do analito correspondente ao valor da média do branco mais cinco, seis ou dez vezes o valor do desvio-padrão. Na prática, corresponde normalmente ao padrão de calibração de menor concentração, excluindo-se o branco. O limite de quantificação, após ter sido determinado, deve ser testado para averiguar se a exatidão e a precisão conseguidas são satisfatórias.

vii. Exatidão e tendência (*bias*)

A exatidão do método é definida como a concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceito convencionalmente como verdadeiro.

viii. Precisão

Precisão é um termo geral para avaliar a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas. É normalmente determinada para circunstâncias específicas de medição e as duas formas mais comuns de expressá-la são por meio da repetitividade e da reprodutibilidade, sendo usualmente expressas pelo desvio-padrão. A

repetitividade e a reprodutibilidade são, geralmente, dependentes da concentração do analito.

A repetitividade é o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo mensurando, efetuadas sob as mesmas condições de medição, chamadas de condições de repetitividade, que incluem:

- mesmo procedimento de medição;
- mesmo observador;
- mesmo instrumento usado sob as mesmas condições;
- mesmo local;
- repetições em curto espaço de tempo.

A repetitividade pode ser expressa quantitativamente em termos da característica da dispersão dos resultados e pode ser determinada por meio da análise de padrões, material de referência ou adição a branco em várias concentrações na faixa de trabalho. De acordo com recomendação do INMETRO (2007), devem ser feitas sete ou mais repetições para o cálculo do desvio-padrão para cada concentração, chamado desvio-padrão de repetitividade.

Já a reprodutibilidade é o grau de concordância entre os resultados das medições de um mesmo mensurando, efetuadas sob condições variadas de medição.

ix. Robustez

A robustez mede a sensibilidade que um método apresenta frente a pequenas variações. Na prática, algum parâmetro do método em estudo é alterado, por exemplo, o operador, e a variação causada por essa alteração é avaliada.

x. Incerteza de medição

A incerteza de medição é um parâmetro, associado ao resultado de uma medição, que caracteriza a dispersão dos valores que podem ser fundamentalmente atribuídos a um mensurando. Este parâmetro pode ser,

por exemplo, um desvio padrão (ou um múltiplo dele) ou a metade de um intervalo correspondente a um nível da confiança estabelecido (Couto, 2007).

Vale salientar que, neste trabalho, atenção especial será dada a este item, por ser um parâmetro mais recente e, por conta disso, ainda pouco utilizado em Química Analítica, e por sua grande importância na atribuição de um valor o mais próximo possível do valor exato associado ao resultado de uma medição.

A incerteza do resultado de uma medição reflete a falta de conhecimento exato do valor do mensurando. O resultado de uma medição, após correção dos efeitos sistemáticos conhecidos, é, ainda, tão somente uma estimativa do valor do mensurando, por causa da incerteza proveniente dos efeitos aleatórios e da correção imperfeita do resultado para efeitos sistemáticos. Os fenômenos que contribuem para a incerteza do resultado de uma medição e, conseqüentemente, para que o resultado de uma medição não possa ser caracterizado por um único valor são denominados de fontes de incertezas. Existem muitas possíveis fontes de incerteza em uma medição, por exemplo: definição incompleta do mensurando; realização imperfeita da definição do mensurando; amostragem não representativa (a amostra medida pode não representar o mensurando definido); conhecimento inadequado dos efeitos das condições ambientais sobre a medição ou medição imperfeita das condições ambientais; erro de tendência pessoal na leitura de instrumentos analógicos; resolução finita do instrumento ou limiar de mobilidade; valores inexatos dos padrões de medição e dos materiais de referência; valores inexatos de constantes e de outros parâmetros obtidos de fontes externas e usados no algoritmo de redução de dados; aproximações e suposições incorporadas ao método e procedimento de medição; variações nas observações repetidas do mensurando sob condições aparentemente idênticas (INMETRO, 2003).

A avaliação da melhor capacidade de medição deve ser sustentada ou confirmada por evidências experimentais. A incerteza de medição é, portanto, um parâmetro associado ao resultado de uma medição, que caracteriza a dispersão dos valores que podem ser razoavelmente atribuídos ao mensurando (Cunha, 2007).

A incerteza do resultado de uma medição normalmente é decorrente de vários componentes, que podem ser agrupados de acordo com as características do método usado para estimar seus valores numéricos. A incerteza total é a soma das incertezas geradas pelos diversos componentes

do procedimento de medição, expressos como um desvio-padrão. A incerteza padronizada, $u(y)$, associada aos valores de entrada, deve ser estimada a partir do conhecimento das grandezas de entrada, podendo ocorrer duas situações:

- i. um valor é obtido diretamente de um documento, ou lido de um instrumento;
- ii. um valor é obtido a partir de vários valores observados sob condições aparentemente idênticas.

No primeiro caso, se aplica o método de avaliação de incertezas do tipo B e no segundo caso a avaliação é do tipo A.

O método de avaliação da incerteza do tipo B é baseado nas informações disponíveis acerca da variabilidade da grandeza de entrada, com os valores que se enquadram neste perfil podendo ser obtidos de:

- i. dados de medições anteriores;
- ii. experiência ou conhecimento do comportamento e propriedades relevantes de materiais ou instrumentos;
- iii. especificação do fabricante;
- iv. dados fornecidos pelo certificado de calibração;
- v. incertezas fornecidas por referências em manuais ou outros documentos.

Quando várias medições independentes são feitas para uma dada grandeza de entrada, sob as mesmas condições de medição e com ocorrência de variação nos valores observados, a incerteza é do tipo A.

Vale ressaltar que, atualmente, esta classificação entre incerteza do tipo A e tipo B está em discussão e tem sido proposto que esta divisão não seja mais aplicada. Neste trabalho, porém, os cálculos ainda serão feitos considerando-se a divisão, já que esta discussão ainda não está concluída.

Na obtenção da incerteza padronizada, $u(y)$, divide-se o valor de cada contribuição de incerteza pelo desvio-padrão (σ) obtido pela metade do intervalo de confiança (L) da distribuição de probabilidade, correspondente a um nível de confiança declarado. A Figura 6 ilustra L para as distribuições de probabilidade normal, retangular e triangular (Freitas, 2003).

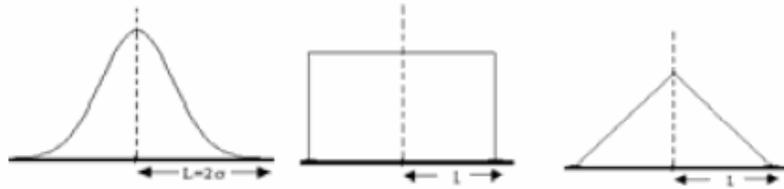


Figura 6-Representação gráfica da metade dos intervalos de confiança (L) para as distribuições de probabilidade normal, retangular e triangular.

Segundo o *Guia para expressão da incerteza de medição* (ISO GUM 95), as seguintes etapas devem ser seguidas para a estimativa da incerteza da medição:

- i. Definição do mensurando – definir o objeto da medição ou grandeza específica submetida à medição, conforme equação:

$$y = f(x_i)$$

- ii. Elaboração do diagrama causa e efeito, esquematizando as entradas de fontes de variação (incertezas) associadas à medição na forma de “espinha de peixe”, conforme representado na Figura 7:

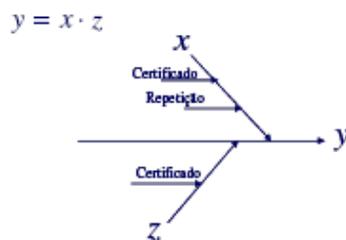


Figura 7- Diagrama causa e efeito.

- iii. Definição das incertezas das grandezas de entrada (incertezas padrão) – definir os tipos de incertezas A e B, calculando-as da seguinte maneira:

Avaliação Tipo A – determinação do desvio-padrão experimental da média, deduzindo a incerteza da medição, conforme a equação:

$$u(x_i) = \frac{s(x_i)}{\sqrt{n}}, \text{ onde}$$

- s é desvio padrão calculado
- n é o número de replicatas

Avaliação Tipo B – dedução da incerteza com base nas distribuições de probabilidade (normal, retangular ou triangular), correspondente a um nível de confiança declarado, conforme representação na Figura 8 e equação abaixo.

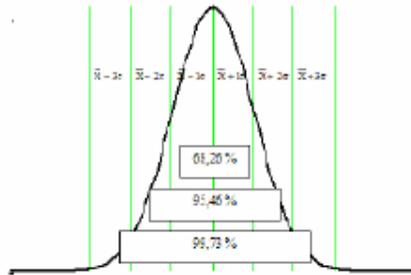


Figura 8-Representação gráfica das distribuições de probabilidade normal.

$$u(x_i) = c$$

$$c = u_{\text{certificado}} = \frac{U_{\text{declarado}}}{k}, \text{ onde}$$

- c é a estimativa do resultado
- $U_{\text{declarada}}$ é a incerteza expandida que deve ser extraída do certificado
- k é o fator de abrangência, normalmente para um nível de confiança de 95%.

Quando a estimativa for considerada uma distribuição simples retangular, $\sqrt{3}$ deve ser utilizada, enquanto $\sqrt{6}$ deve ser utilizada quando a estimativa for considerada uma distribuição triangular, no divisor.

Na Tabela 3, é mostrado um resumo da relação entre o nível de confiança e as distribuições.

Tabela 3-Relação entre o nível de confiança e as distribuições.

Distribuição	Nível de confiança (%)	Divisor na equação $u_{(xi)}$
Normal (certificados)	95	K (~2)
Retangular	100	$\sqrt{3}$
Triangular	100	$\sqrt{6}$

- iv. Definição dos coeficientes de sensibilidade utilizados para transformar grandezas de entrada em incertezas.

O mensurando é sempre a grandeza de saída e as suas fontes de incertezas são as grandezas de entrada. Pode-se visualizar o impacto da incerteza de cada fonte na incerteza do mensurando, uma vez que pode ser calculada a taxa de variação da incerteza do mensurando em relação a cada fonte de entrada. Esta taxa de variação do mensurando em relação a cada fonte de entrada denomina-se coeficiente de sensibilidade e é definida por uma derivada. O conceito da derivada define o caráter pontual da incerteza de medição. Assim, a avaliação da incerteza de medição de um instrumento é realizada ponto a ponto em toda a sua faixa de escala. A aplicação do coeficiente de sensibilidade permite que se converta a unidade da fonte de entrada para a do mensurando, levando-se em conta também o efeito de ponderação.

- v. Definição dos componentes das incertezas sendo que todas as incertezas são relatadas após passagem pelos subitens anteriores.

A contribuição de cada componente de incerteza pode ser avaliada por meio de confecção de gráfico de barras. Assim pode-se realizar uma análise crítica dos componentes, deduzindo as fontes mais relevantes ao processo de medição.

- vi. Avaliação da incerteza padrão combinada (uc) – deduz-se por meio da raiz quadrada da soma quadrática das incertezas estimadas anteriormente.
- vii. Avaliação dos graus de liberdade efetivos (*vefluorescência*), utilizando a distribuição t de Student, conforme a equação abaixo.

$$V_{eff} = \frac{u_c^4(y)}{\sum_{i=1}^N \frac{u_i^4(y)}{V_i}} = \frac{u_c^4(y)}{\sum_{i=1}^N \frac{(c_i \cdot u(x_i))^4}{V_i}}$$

- viii. Dedução da incerteza expandida, estimando-a por meio da multiplicação da incerteza combinada (u_c) pelo fator de abrangência k , conforme equação abaixo.

$$U = \kappa_{v,p} * u_c$$

A Tabela 4 relaciona o fator de abrangência k com o nível de confiança, assumindo uma distribuição normal.

Tabela 4-Relação entre o nível de confiança e o fator de abrangência para distribuição normal.

Nível de confiança (%)	Fator de abrangência (k)
68,27	1,000
90,00	1,645
95,00	1,960
95,45	2,000
99,00	2,576
99,73	3,000