AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA
DETERMINAÇÃO DE HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS
(HPAS) EM SEDIMENTOS. AVALIAÇÃO DA REPRESA DO PARQUE
PEDROSO, SANTO ANDRÉ, SP**

CARLOS FERNANDO DE BRITO

**Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do
Grau de Mestre em Ciências na Área
de Tecnologia Nuclear – Materiais.**

**Orientadora:
Dra. Elaine Arantes Jardim Martins**

São Paulo

2009

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA
DETERMINAÇÃO DE HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS
(HPAS) EM SEDIMENTOS. AVALIAÇÃO DA REPRESA DO PARQUE
PEDROSO, SANTO ANDRÉ, SP**

CARLOS FERNANDO DE BRITO

**Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do
Grau de Mestre em Ciências na Área
de Tecnologia Nuclear – Materiais.
Orientadora:
Dra. Elaine Arantes Jardim Martins**

São Paulo

2009

À você, Nessa.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela oportunidade concedida, pela força e saúde.

À minha família, especialmente minhas duas Mães, Maria e Elizabete e o irmão Enéas.

À Dra Elâine Arantes Jardim Martins, pela valiosa orientação, cumplicidade, amizade e estímulo no desenvolvimento do trabalho.

Ao Dr. Helio Akira Furusawa, pelas preciosas contribuições e sugestões quanto à validação do método.

À Dra Maria Aparecida Faustino Pires e à Dra. Marycel E.B. Cotrim, pelo apoio e sugestões que enriqueceram o trabalho.

Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN/SP e ao Centro de Química e Meio Ambiente, CQMA, pela oportunidade de desenvolver este trabalho.

À CNEN pela bolsa de estudo concedida e à FAPESP pelo apoio financeiro.

À SEMASA – Serviço Municipal de Saneamento Ambiental de Santo André pela parceria e colaboração no projeto de pesquisa, aos funcionários Dorival Leite Fernandes, Osmar Camilo de Souza e especialmente ao André Alves Madeira pela amizade e apoio nos dias de coleta.

Aos Amigos do CQMA, Davi Zacarias de Souza, Elias Santana, Edson Reis, Luciana Pavanelli, Marta Maekawa e Maria Nogueira Marques, pelo apoio, amizade e companheirismo em todos os momentos.

As amigas, Danubia Fernandes, Juliana Ikebe Otomo e Renata Rodrigues de Souza, pela oportunidade de trabalho em conjunto e grande colaboração nos ensaios.

*"Ninguém nasce odiando
outra pessoa pela cor de sua
pele, por sua origem ou
ainda por sua religião. Para
odiar, as pessoas precisam
aprender e, se podem
aprender a odiar, podem ser
ensinadas a amar."*

Nelson Mandela

RESUMO

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DE HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS (HPAS) EM SEDIMENTOS. AVALIAÇÃO DA REPRESA DO PARQUE PEDROSO, SANTO ANDRÉ, SP

CARLOS FERNANDO DE BRITO

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) por serem considerados contaminantes persistentes, pela sua ubiquidade no meio ambiente e pelo reconhecimento de sua genotoxicidade, têm estimulado atividades de pesquisa com o objetivo de determinar e avaliar as origens, transporte, transformação, efeitos biológicos e a acumulação em compartimentos de ecossistemas aquático e terrestre. Nesta dissertação, a matriz estudada foi o sedimento coletado na represa do Parque Pedroso em Santo André, SP. A técnica analítica empregada foi a cromatografia líquida em fase reversa com detector UV/Vis. O tratamento dos dados foi estabelecido durante o processo de desenvolvimento da metodologia para que houvesse confiabilidade nos resultados. As etapas envolvidas foram avaliadas usando o conceito da Validação de Ensaios Químicos. Os parâmetros selecionados para a validação analítica foram Seletividade, Linearidade, Intervalo de Trabalho, Sensibilidade, Exatidão, Precisão, Limite de Detecção, Limite de Quantificação e Robustez. Esses parâmetros apresentaram resultados satisfatórios, o que permite a aplicação da metodologia desenvolvida, sendo ainda um método simples que permite a minimização da contaminação e da perda de compostos por excesso de manipulação. Para os HPAs estudados não foram encontrados resultados positivos, acima do limite de detecção, em nenhuma das amostras coletadas na primeira fase. Já na segunda coleta foram encontradas pequenas alterações principalmente em acenaftileno, fluoreno e benzo[a]antraceno. Embora a área se encontre preservada, já se notam pequenos sinais de contaminação.

ABSTRACT

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF ANALYTICAL METHODOLOGY FOR DETERMINATION OF POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS (PAHS) IN SEDIMENTS. ASSESSMENT OF PEDROSO PARK DAM, SANTO ANDRÉ, SP

CARLOS FERNANDO DE BRITO

The polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), by being considered persistent contaminants, by their ubiquity in the environment and by the recognition of their genotoxicity, have stimulated research activities in order to determine and evaluate their sources, transport, processing, biological effects and accumulation in compartments of aquatic and terrestrial ecosystems. In this work, the matrix studied was sediment collected at Pedroso Park's dam at Santo André, SP. The analytical technique employed was liquid chromatography in reverse phase with a UV/Vis detector. Statistics treatment of the data was established during the process of developing the methodology for which there was reliable results. The steps involved were evaluated using the concept of Validation of Chemical Testing. The parameters selected for the analytical validation were selectivity, linearity, Working Range, Sensitivity, Accuracy, Precision, Limit of Detection, Limit of quantification and robustness. These parameters showed satisfactory results, allowing the application of the methodology, and is a simple method that allows the minimization of contamination and loss of compounds by over-handling. For the PAHs tested were no found positive results, above the limit of detection, in any of the samples collected in the first phase. But, at the second collection, were found small changes mainly acenaphthylene, fluorene and benzo[a]anthracene. Although the area is preserved, it is possible to realize little signs of contamination.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVOS	9
2.1	Objetivo geral	9
2.2	Objetivos específicos.....	9
3	Considerações Gerais	10
3.1	Breve histórico dos HPAs	10
3.2	Estrutura dos HPAs	11
3.3	Propriedades físico-químicas dos HPAs.....	12
3.4	Genotoxicidade dos HPAs.....	15
3.5	Geoquímica dos HPAs	19
3.6	Destino dos HPAs	21
4	Revisão bibliográfica.....	24
5	Área de estudo	30
5.1	Caracterização Geral do Município - Perfil Territorial e Divisão Distrital.....	32
5.2	Rodoanel	38
6	Técnica Analítica	41
6.1	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	41
6.2	O Processo Cromatográfico em HPLC	41
6.3	Natureza da Fase Móvel.....	42
6.4	Natureza da Fase Estacionária.....	43
6.5	Extração em Fase Sólida (SPE)	44
7	Validação de metodologia analítica	48
7.1	Seletividade/Especificidade	48
7.2	Faixa linear e faixa linear de trabalho	49
7.3	Linearidade.....	49
7.4	Limite de detecção e quantificação.....	51
7.5	Exatidão	52

7.6	Precisão	52
7.7	Robustez	53
7.8	Recuperação	54
7.9	Incerteza da medição	54
7.9.1	Diagrama de Causa e Efeito (Espinha de Peixe ou Ishikawa)	55
7.9.2	Incerteza associada à massa de sedimento e ao volume final.....	57
7.9.3	Incerteza associada à recuperação	57
7.9.4	Incerteza associada à curva analítica	58
7.9.5	Incerteza combinada e expandida	60
8	Parte experimental	62
8.1	Equipamentos, Materiais e Métodos.....	62
8.1.1	Ultra-som e sistema de purificação de extratos.	62
8.1.2	Cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC).	62
8.1.3	Outros equipamentos.	62
8.2	Reagentes e Soluções.....	63
8.3	Amostragem	64
8.4	Preparo das Amostras	65
8.5	Purificação e Concentração das Amostras Pelo Método SPE	66
8.6	Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).....	67
8.7	Ensaio para validação da metodologia.....	67
8.7.1	Seletividade	68
8.7.2	Faixa de trabalho e Linearidade	71
8.7.3	Limite de detecção (LD).....	72
8.7.4	Limite de quantificação (LQ)	72
8.7.5	Exatidão	73
8.7.6	Precisão	73
8.7.7	Robustez	73
8.8	Recuperação	75

8.9	Análise granulométrica	75
8.10	Determinação do Potencial hidrogeniônico (pH)	76
8.11	Determinação dos HPAs em água.....	76
9	Resultados e discussão	77
9.1	Otimização da extração	77
9.1.1	Resultados do estudo para seleção do solvente.....	77
9.1.2	Resultados do estudo para determinação do volume de solvente	79
9.1.3	Resultados do estudo para determinação do tempo de extração	79
9.1.4	Resultados do estudo para a concentração e purificação do extrato por SPE.....	80
9.1.5	Resultados do estudo para otimização da preparação da amostra para injeção no HPLC	81
9.1.6	Observações sobre fatores de influência na recuperação dos HPAs.....	82
9.2	Resultados da validação do método desenvolvido	82
9.2.1	Seletividade	82
9.3	Linearidade.....	92
9.4	Exatidão	100
9.5	Limites de Detecção e Quantificação.....	101
9.6	Robustez	103
9.7	Recuperação	117
9.8	Cálculo de incertezas	119
9.9	Potencial hidrogeniônico (pH).....	120
9.10	Análise granulométrica	121
9.11	Resultados da avaliação das amostras de sedimento da represa do Parque do Pedroso.....	123
10	CONCLUSÃO.....	125
11	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	127
ANEXO 1		142
ANEXO 2		148

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Nomenclatura, segundo a IUPAC, e estrutura química dos 16 HPAs classificados pela USEPA como poluentes prioritários.....	12
TABELA 2: Propriedades físico-químicas dos HPAs estudados.....	14
TABELA 3: Potencial de genotoxicidade, carcinogenicidade e mutagenicidade de alguns dos HPAs estudados	18
TABELA 4: Critérios da origem dos HPAs no meio ambiente segundo as razões	20
TABELA 5: Tempo de meia-vida de alguns HPAs.....	23
TABELA 6: Parâmetros selecionados para os testes de robustez	74
TABELA 7: Planejamento fracionário saturado para avaliação da estimativa do erro da distribuição dos efeitos utilizando-se o algoritmo de <i>Dong</i> (pequenos experimentos)	75
TABELA 8: Dados e resultados para o teste de seletividade (teste F, $n = 7$) dos 14 HPAs estudados. Adição de padrão na matriz e no solvente somente, somente os valores calculados	84
TABELA 09: Valores obtidos para o Teste t <i>Student</i> para a verificação da inclinação e paralelismo e do intercepto na análise de seletividade. O valor 2,179 é o valor crítico para 8 ($n-1$) graus de liberdade com 95% de confiança	91
TABELA 10: Valores obtidos para o Teste t <i>Student</i> para a verificação do desvio da linearidade de cada ponto da curva para cada um dos compostos em estudo sem matriz. O valor 2,365 é o valor crítico para 8 ($n-1$) graus de liberdade com 95% de confiança	92
TABELA 11: Valores obtidos para o Teste t <i>Student</i> para a verificação do desvio da linearidade de cada ponto da curva para cada um dos compostos em estudo com matriz. O valor 2,365 é o valor crítico para 8 ($n-1$) graus de liberdade com 95% de confiança	93
TABELA 12: Valores obtidos para os coeficientes de correlação (r) e de determinação (r^2) para os compostos HPAs estudados com e sem matriz.	95
TABELA 13: Resumo dos resultados da análise de variância (ANOVA) para os compostos estudados na matriz. Intervalo de concentração: 10 a 700 ng.mL ⁻¹	101

TABELA 14: Limites de detecção e de quantificação para os compostos 14 HPAs estudados para 0,5g de amostra.....	102
TABELA 15: Teste de recuperação dos 14 HPAs estudados	118
TABELA 16: Resultados do cálculo das incertezas envolvidas na análise de HPAs em amostras de sedimento da represa do Parque do Pedroso para os compostos que apresentaram recuperação acima de 80%, para o ponto 0,1 da curva, considerando uma massa de sedimento=0,5g, para 95% de confiança e k=2.....	119
TABELA 17: Resultados da análise química da determinação do pH nas amostras de sedimento... ..	120
TABELA 18: Frações Granulométricas, em mm, nos sistemas de classificação Norte-americano (USDA) e Internacional (ISSS).....	121
TABELA 19: Resultados da análise granulométrica das amostras de sedimento	122
TABELA 20: Resultados da análise dos HPAs nas amostras de sedimento (0,5g) da represa do Parque do Pedroso, referentes às duas coletas de 2008	124
TABELA 21: Análise de variância (ANOVA) para o naftaleno na matriz. Intervalo de concentração: 10 a 700 ng.mL ⁻¹ . Modelo linear adotado $y = 22,117x - 40,318$	142
TABELA 22: Análise de variância (ANOVA) para o acenaftileno na matriz. Intervalo de concentração: 10 a 700 ng.mL ⁻¹ . Modelo linear adotado $y = 14,835x - 0,538$	143
TABELA 23: Análise de variância (ANOVA) para o fluoreno na matriz. Intervalo de concentração: 10 a 700 ng.mL ⁻¹ . Modelo linear adotado $y = 101,66x + 153,39$	143
TABELA 24: Análise de variância (ANOVA) para o fenantreno na matriz. Intervalo de concentração: 10 a 700 ng.mL ⁻¹ . Modelo linear adotado $y = 284,69x + 1823,6$	143
TABELA 25: Análise de variância (ANOVA) para o antraceno na matriz. Intervalo de concentração: 10 a 700 ng.mL ⁻¹ . Modelo linear adotado $y = 759,643x - 2977,173$	144
TABELA 26: Análise de variância (ANOVA) para o fluoranteno na matriz. Intervalo de concentração: 10 a 700 ng.mL ⁻¹ . Modelo linear adotado $y = 91,470x + 778,445$	144

TABELA 27: Análise de variância (ANOVA) para o pireno na matriz. Intervalo de concentração: 10 a 700 ng.mL ⁻¹ . Modelo linear adotado $y = 50,178x + 400,951$	144
TABELA 28: Análise de variância (ANOVA) para o benzo(a)antraceno na matriz. Intervalo de concentração: 10 a 700 ng.mL ⁻¹ . Modelo linear adotado $y = 54,651x + 1345,050$	145
TABELA 29: Análise de variância (ANOVA) para o criseno na matriz. Intervalo de concentração: 10 a 700 ng.mL ⁻¹ . Modelo linear adotado $y = 235,667x + 1787,716$	145
TABELA 30: Análise de variância (ANOVA) para o benzo(e)acenaftileno na matriz. Intervalo de concentração: 10 a 700 ng.mL ⁻¹ . Modelo linear adotado $y = 161,921x + 1860,659$	145
TABELA 31: Análise de variância (ANOVA) para o benzo(k)fluoranteno na matriz. Intervalo de concentração: 10 a 700 ng.mL ⁻¹ . Modelo linear adotado $y = 134,351x + 574,650$	146
TABELA 32: Análise de variância (ANOVA) para o benzo(a)pireno na matriz. Intervalo de concentração: 10 a 700 ng.mL ⁻¹ . Modelo linear adotado $y = 131,626x + 437,894$	146
TABELA 33: Análise de variância (ANOVA) para o benzo(a,h)antraceno na matriz. Intervalo de concentração: 10 a 700 ng.mL ⁻¹ . Modelo linear adotado $y = 41,636x - 554,687$	146
TABELA 34: Análise de variância (ANOVA) para o indeno(1,2,3-cd)pireno na matriz. Intervalo de concentração: 10 a 700 ng.mL ⁻¹ . Modelo linear adotado $y = 130,404x - 831,106$	147

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Conversão Enzimática do Benzo(a)pireno no Carcinogênico Efetivo	16
FIGURA 2: Reações dos HPAs no organismo humano.....	17
FIGURA 3: Esquema do mecanismo da reação	19
FIGURA 4: Localização do município de Santo André na área metropolitana de São Paulo– RMSP	31
FIGURA 5: Distribuição do Município de Santo André.....	32
FIGURA 6: Foto de satélite evidenciando o avanço da RMSP na direção das Represas Guarapiranga e Billings, e das áreas de mata atlântica.....	34
FIGURA 7: Mapa da Bacia Hidrográfica da Billings evidenciando as sub-regiões e os limites da bacia.....	35
FIGURA 8: Mapa representando a produção hídrica da Bacia hidrográfica da Billings, e sua contribuição por sub-bacia	37
FIGURA 9: Foto Aérea da localização da Represa do Parque do Pedroso e a área da obra do Rodoanel no município de Santo André, SP, com demarcação da abrangência da Pintassilgo	39
FIGURA 10: Desenho esquemático da extração em cartuchos SPE.....	46
FIGURA 11: Diagrama de Causa e Efeito para a metodologia de analítica para determinação de HPAs em sedimentos	56
FIGURA 12: Localização dos pontos de coleta do sedimento na Represa do Parque Pedroso (SEMASA, 2009).....	64
FIGURA 13: Draga sendo lançada para coleta do sedimento e, no detalhe a draga Ekman-Birge	65
FIGURA 14: Eficiência na recuperação dos compostos HPAs em sistema ultra-som para os solventes estudados nas mesmas condições.....	77
FIGURA 15: Cromatograma com concentração de 0,2µg.mL ⁻¹ de cada composto na solução mista	83
FIGURA 16: Representação gráfica da seletividade, segundo a equação da reta de regressão linear para os 14 HPAs (a e b) com matriz e somente com solvente	89

FIGURA 17: Representação gráfica da Faixa de Trabalho e Linearidade para os 14 HPAs estudados	94
FIGURA 18: Gráfico de resíduos absoluto e normalizado para os compostos: (a) naftaleno; (b) fluoreno; (c) acenaftileno.....	96
FIGURA 19: Gráfico de resíduos absoluto e normalizado para os compostos: (a) fenantreno; (b) antraceno; (c) fluoranteno; (d) pireno	97
FIGURA 20: Gráfico de resíduos absoluto e normalizado para os compostos: (a) benzo[a]antraceno; (b) criseno; (c) Benzo[e]Acenaftileno	98
FIGURA 21: Gráfico de resíduos absoluto e normalizado para os compostos: (a) Benzo[k]Fluoranteno; (b) Benzo[a]Pireno; (c); Dibenzo[a,h]Antraceno; (d) Indeno.....	99
FIGURA 22: Gráficos para o Naftaleno representando (a) teste de verificação de significância dos efeitos; (b) probabilidade normal; (c) meia-normal.....	104
FIGURA 23: Gráficos para o Acenaftileno representando (a) teste de verificação de significância dos efeitos; (b) probabilidade normal; (c) meia-normal.....	105
FIGURA 24: Gráficos para o Fluoreno representando (a) teste de verificação de significância dos efeitos; (b) probabilidade normal; (c) meia-normal.....	106
FIGURA 25: Gráficos para o Fenantreno representando (a) teste de verificação de significância dos efeitos; (b) probabilidade normal; (c) meia-normal.....	107
FIGURA 26: Gráficos para o Antraceno representando (a) teste de verificação de significância dos efeitos; (b) probabilidade normal; (c) meia-normal.....	108
FIGURA 27: Gráficos para o Fluoranteno representando (a) teste de verificação de significância dos efeitos; (b) probabilidade normal; (c) meia-normal.....	109
FIGURA 28: Gráficos para o Pireno representando (a) teste de verificação de significância dos efeitos; (b) probabilidade normal; (c) meia-normal.....	110
FIGURA 29: Gráficos para o Benzo[a]antraceno representando (a) teste de verificação de significância dos efeitos; (b) probabilidade normal; (c) meia-normal.....	111
FIGURA 30: Gráficos para o Criseno representando (a) teste de verificação de significância dos efeitos; (b) probabilidade normal; (c) meia-normal.....	112

FIGURA 31: Gráficos para o Benzo[e]Acenaftileno representando (a) teste de verificação de significância dos efeitos; (b) probabilidade normal; (c) meia-normal.....	113
FIGURA 32: Gráficos para o Benzo[k]fluoranteno representando (a) teste de verificação de significância dos efeitos; (b) probabilidade normal; (c) meia-normal.....	114
FIGURA 33: Gráficos para o Benzo[a]Pireno representando (a) teste de verificação de significância dos efeitos; (b) probabilidade normal; (c) meia-normal.....	115
FIGURA 34: Gráficos para o Dibenzo[a,h]Antraceno representando (a) teste de verificação de significância dos efeitos; (b) probabilidade normal; (c) meia-normal.....	116
FIGURA 35: Gráficos para o Indeno[1,2,3-c,d]Pireno representando (a) teste de verificação de significância dos efeitos; (b) probabilidade normal; (c) meia-normal.....	117
FIGURA 36: Variação dos valores de pH das amostras de sedimento (no eixo da Abscissa -x) em função dos pontos de coleta (no eixo da Ordenada -y)	121
FIGURA 37: Classificação textual do sedimento (a) e do sedimento da Represa do Parque Pedroso (b).....	122
FIGURA 38: Contribuição das incertezas para determinação de Fenantreno em amostra fortificada com aproximadamente 0,4µg/g.....	149
FIGURA 39 Contribuição das incertezas para determinação de Antraceno em amostra fortificada com aproximadamente 0,4µg/g.....	150
FIGURA 40: Contribuição das incertezas para determinação de Fluoranteno em amostra fortificada com aproximadamente 0,4µg/g.....	151
FIGURA 41: Contribuição das incertezas para determinação de Pireno em amostra fortificada com aproximadamente 0,4µg/g.....	152
FIGURA 42: Contribuição das incertezas para determinação de Benzo[a]antraceno em amostra fortificada com aproximadamente 0,4µg/g	153
FIGURA 43: Contribuição das incertezas para determinação de Criseno em amostra fortificada com aproximadamente 0,4µg/g.....	154
FIGURA 44: Contribuição das incertezas para determinação de Benzo[e]acenaftileno em amostra fortificada com aproximadamente 0,4µg/g	155

FIGURA 45: Contribuição das incertezas para determinação de Benzo[k]fluoranteno em amostra fortificada com aproximadamente 0,4µg/g	156
FIGURA 46: Contribuição das incertezas para determinação de Benzo[a]pireno em amostra fortificada com aproximadamente 0,4µg/g.....	157
FIGURA 47: Contribuição das incertezas para determinação de Dibenzo[a,h]antraceno em amostra fortificada com aproximadamente 0,4µg/g	158

LISTA DE ABREVIATURAS

ABNT: Associação Brasileira de Normas Técnicas

Acet: Acetona

ACN: Acetonitrila

Acy: Acenaftileno

An: Antraceno

ANA: Agência Nacional de Águas

ANOVA: (*Analysis of variance*) - Análise de Variância

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

B[a,h]An: Dibenzo[a,h]Antraceno

B[a]An: Benzo[a]Antraceno

B[a]Py: Benzo[a]Pireno

B[e]Acy: Benzo[e]Acenaftaleno

B[k]Fl: Benzo[k]fluoranteno

CETEC: Centro Tecnológico da Fundação Paulista de Tecnologia e Educação

CETESB: Companhia Ambiental do Estado de São Paulo

CG: Cromatografia gasosa

CG-MS: Cromatografia gasosa acoplado com espectrofotômetro de massas

Chry: Criseno

CONAMA: Conselho Nacional do Meio Ambiente

CQMA: Centro de Química e Meio Ambiente (IPEN)

DCM: Diclorometano

DNA: Ácido desoxirribonucléico

EEA: (*European Environmental Agency*) - Agência Européia de Meio Ambiente

EIA-RIMA: Estudo de impacto ambiental - Relatório de impacto ambiental

EPA: (*United States Environmental Protection Agency*) - Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos

F: Fluoreno

FAPESP: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

FID: (*Flame Ionization Detector*) - Detector por ionização de chama

FI: Fluoranteno

FLD: (*Fluorescence Detector*) - Detector de Fluorescência

HPAs: Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos

HPLC: (*High Performance Liquid Chromatography*) - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

I[1,2,3-c,d]Py: Indeno[1,2,3-c,d]Pireno

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

ICH: *International Conference on Harmonization*

INMETRO: Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial

IPEN: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares

IUPAC: *International Union of Pure and Applied Chemistry*

K_H: constante de Henry

LC: (*Liquid Chromatography*) - Cromatografia Líquida

LC–DAD–APCI–MS: (*Liquid Chromatography Coupled with Diode – Array Detection and Mass Spectrometry*) - Cromatografia líquida acoplada à detetor de arranjo de diodos e espectrômetro de massas

LD: Limite de Detecção

LQ: Limite de Quantificação

ME: (*Margin of error*) - Margem de erro

MeOH: Metanol

MSD: (*Mass Spectroscopy Detector*) - Detector por Espectrometria de Massas

NBR: Normas Brasileiras (ABNT)

Np: Naftaleno

ONU: Organização das Nações Unidas

PACs: (*Polycyclic Aromatic Compounds*) - Compostos policíclicos aromáticos

Ph: Fenantreno

POPs: Poluentes Orgânicos Persistentes

Py: Pireno

RMSP: Região Metropolitana de São Paulo

SABESP: Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo

SEMASA: Serviço Municipal de Saneamento Ambiental de Santo André

SFC: Cromatografia com Fluido Supercritico

SI: Sistema Internacional

SME: (*Simultaneous Margin of error*) - Margem de erro simultânea

SPE: (*Solid Phase Extraction*) - Extração em fase sólida

THF: Tetrahidrofurano

TOC: (*Total Organic Carbon*) - Carbono Orgânico Total

UGRHI: Unidade de Gerenciamento de Recursos Hídricos

USDA: (*United States Department of Agriculture*) - Departamento de Agricultura dos Estados Unidos

USEPA: (*United States Environmental Protection Agency*) - Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos

UVD: (*UltraViolet Detector*) - Detectores com Ultravioleta

VMP: Valor Máximo Permitido

1 INTRODUÇÃO

Atualmente é de grande importância o conhecimento sobre os processos de geração, transporte e transformação, efeitos e destino de uma diversidade de contaminantes químicos, orgânicos e inorgânicos, que são incorporados no ambiente aquático. Efeitos adversos desses poluentes refletem no equilíbrio, estrutura e funcionamento do ecossistema aquático podendo causar significativo decréscimo da qualidade das águas, especialmente aquelas utilizadas para o consumo humano (Zagato & Bertoletti, 2006; Rebouças et al., 2008).

A qualidade da água em um reservatório está associada em grande parte à somatória das atividades que ocorrem sobre a superfície da bacia hidrográfica. A poluição por cargas pontuais que são claramente detectáveis no espaço e no tempo, como os esgotos domésticos e os efluentes industriais e a poluição por cargas não pontuais ou difusas de difícil detecção, como exemplos, locais em áreas urbanas que não possuem saneamento básico onde ocorre o transporte de contaminantes por escoamento superficial das águas da chuva e em áreas agrícolas, com o arraste de defensivos agrícolas pelo escoamento superficial em regiões de plantio (Rand, 1995; Porto, 2002; Straškraba & Tundisi, 2000).

Evidencia-se, então, que as atividades humanas são as que causam maior impacto sobre as bacias hidrográficas e determinam a qualidade das águas que fluem para o reservatório. Atualmente, o grande desafio é a busca de soluções para o crescimento constante e diversificado da poluição hídrica, que ocorre em intervalos de tempo cada vez menores, ou seja, antes mesmo que uma situação seja resolvida, depara-se com outra nova de maior complexidade (Novotny & Olem, 1993; Von Sperling, 1995).

Nesse contexto, o interesse no estudo das questões ambientais tem aumentado nas últimas décadas, em razão, sobretudo, das ocorrências de

acidentes com repercussão mundial, onde há contaminação por substâncias químicas nocivas lançadas inadvertidamente no ambiente aquático. O monitoramento ambiental e as pesquisas para avaliação do nível de contaminação por estes efluentes gerados é de suma importância para o funcionamento auto-sustentável de um reservatório que atenda às necessidades presentes e não comprometa as carências das futuras gerações em usufruir do recurso. Agir preventivamente é importante para evitar problemas que empobrecam a qualidade da água no reservatório e evitar o surgimento de alguma contaminação pela realização de um diagnóstico imediato (ONU, 1998; Philippi Jr, 2005).

Quando se trata de reservatórios para o fornecimento de água potável para o consumo humano existe um perigo potencial à saúde humana em decorrência dos seus múltiplos usos, tais como: local para lazer, abastecimento de indústrias, população e irrigação, incluindo: água de chuva proveniente de regiões com alto índice de poluição atmosférica, efluentes de esgotos domésticos, compostos orgânicos persistentes (POPs), traços de produtos farmacêuticos oriundos de fontes desconhecidas e rejeitos hospitalares. Esses reservatórios apresentam requisitos maiores em termos de qualidade da água, além disso, nos países em desenvolvimento, estão normalmente localizados em regiões com alta densidade populacional com grandes fontes poluidoras (Wells, 1995; Manahan, 2004).

Diante de todos esses fatores que levam à degradação da qualidade da água, a saúde ambiental de um reservatório é afetada em um todo, ou seja, o corpo d'água, a biota (flora e fauna de um ecossistema) e o sedimento. Todavia, dos três compartimentos citados, em razão de sua natureza química e biológica, o sedimento possui uma importância significativa no que concerne ao estudo da intensidade e a forma que os agentes impactantes estão ou estiveram atuando no ecossistema aquático (Baker, 1994; ANA, 2005).

O sedimento tem uma grande capacidade de integrar os processos biogeoquímicos que controlam o acúmulo e a redistribuição da matéria orgânica e inorgânica com a coluna d'água, como: reações físico-químicas, fluxo de energia

e transformações biológicas. Em virtude disso, o sedimento é reconhecido como o resultado da integração de todos os processos que ocorrem em um sistema aquático e pode ser usado para identificar a presença de contaminantes químicos que não solubilizam ou possuem pouca solubilidade, quando difundidos em águas superficiais (Bevilacqua, 1996; Esteves, 1998; Martins, 2005).

No Brasil, a Resolução 344/04 (Brasil, 2004), procedida pelo CONAMA é o único documento legal que se refere à contaminação de sedimentos. Na realidade, esta resolução foi elaborada para estabelecer diretrizes gerais e procedimentos para a avaliação do material a ser dragado (sedimento) visando ao gerenciamento de sua disposição em águas jurisdicionais brasileiras. Porém, nas considerações introdutórias dessa resolução, menciona-se a necessidade de medidas eficazes para impedir a contaminação marinha, bem como a atuação dos órgãos ambientais no que diz respeito ao processo de licenciamento ambiental de dragagens. Os padrões de qualidade estabelecidos na Resolução 344/04 são apropriados na ausência de um instrumento legal específico que estabelece a qualidade aceitável dos sedimentos. Dessa forma, podem-se utilizar valores orientadores descritos em publicações internacionais referentes à qualidade dos sedimentos para adequação desses padrões. Os critérios de qualidade para sedimentos, descritos na Resolução CONAMA 344/04 para 13 HPAs variam entre 6,71 a 53 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ (limiar abaixo do qual se prevê baixa probabilidade de efeitos adversos à biota) e, entre 88,9 a 2355 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ (limiar acima do qual se prevê provável efeito adverso à biota), ambos para água doce (BRASIL, 2004).

O desenvolvimento desordenado nas áreas urbanas e industriais contribui significativamente para a inserção de grandes quantidades de poluentes químicos no meio ambiente, principalmente em águas superficiais. Do aporte desses contaminantes, os hidrocarbonetos que constituem a matéria orgânica de origem vegetal, animal e subprodutos derivados do petróleo, pertencem ao grupo dos compostos químicos que mais colaboram para o empobrecimento da qualidade dos diferentes compartimentos aquáticos. Isso ocorre em virtude de sua estabilidade química estar relacionada à baixa velocidade de degradação, alta persistência e baixa mobilidade, mecanismos pelos quais os hidrocarbonetos são

conduzidos com facilidade para o corpo d'água (Harrison, 1996; Martins, 2001; VanLoon & Duffy, 2005).

Ao alcançarem o corpo d'água por meio de processos de lixiviação dos solos, lavagem de vegetação e escoamento superficial de águas de chuva, ocorre a adsorção dos hidrocarbonetos à matéria orgânica suspensa e dissolvida na coluna d'água, provavelmente em razão de sua baixa solubilidade em água. Estes compostos são precipitados posteriormente, acumulando-se nos sedimentos (Zagato & Bertoletti, 2006; Froehner & Martins, 2008).

Mediante sua capacidade de bioacumulação, os hidrocarbonetos podem acarretar efeitos adversos no ecossistema aquático e representar um risco ecológico significativo, considerando que os maiores riscos à saúde humana estão em grande parte associados à exposição a compostos químicos com alto índice toxicológico e de difícil degradação (persistentes) (Chen et al., 2005; Cordeiro, 2006; Manahan, 2007).

Conhecer o comportamento químico desses potenciais poluidores e suas características é de suma importância para o controle dinâmico da qualidade dos reservatórios. Nesta dissertação, a ênfase é dada a um grupo específico de hidrocarbonetos, cujos atributos são um caso exemplar das questões citadas até o momento, os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos – HPAs.

Os HPAs são classificados como poluentes orgânicos persistentes por não sofrerem transformações facilmente (Chen et al., 2004; Chalmers et al., 2007). Suas origens múltiplas, naturais e antropogênicas, atribuem a esses compostos caráter ubíquo no meio ambiente, e por pertencerem a uma classe de compostos orgânicos conhecidos por apresentarem propriedades tóxicas e cancerígenas têm recebido considerável atenção em virtude dos seus efeitos nocivos ao ambiente e à saúde humana, tornando-os, portanto, uma preocupação mundial (Schwarzenbach et al., 2003; Meire et al., 2008).

Esta classe de poluentes é constituída a partir da fusão de dois ou mais anéis aromáticos que resulta em diferentes compostos de ciclos aromáticos

condensados (Vasconcellos et al., 1998; Chen et al., 2004). Nestas estruturas, dois ou mais anéis fenila compartilham dois ou mais átomos de carbono, fundamentalmente produzidos por decomposição térmica baseada em dois importantes mecanismos: pirólise ou combustão incompleta e processos de carbonização (Vollhardt & Schore, 2004; Christensen, 2007).

Embora haja fontes naturais de HPAs, como atividade vulcânica e biossíntese, as atividades humanas predominam na formação destes poluentes, produzindo quantidades significativas, tendo como principais fontes as emissões industriais, geração de calor, aquecimento residencial, incinerações, queimadas, escapamento de automóvel a gasolina e a diesel, aviões e navios (Manoli et al., 2000; Guo et al., 2007).

Todavia, os HPAs não são apenas formados em alta temperatura, um exemplo são os vários processos de carbonização que ocorrem durante a geração de óleo mineral e carvão. Levam à formação de HPAs por decaimento de material biológico em baixas temperaturas (abaixo de 200°C) e alta pressão em um período de milhões de anos, com reações extremamente lentas por causa da baixa temperatura (Bjørseth & Ramdahl, 1985).

Atualmente, os HPAs são objetos de atividades de pesquisa considerável, testemunhada pelo grande número de publicações, essas, motivadas especialmente pelo reconhecimento de sua genotoxicidade (Bixian et al., 2001; Ko et al., 2007). Logo, justifica-se estudar a origem e o destino destas moléculas que constituem os mais interessantes marcadores biogeoquímicos (Lourenço, 2003).

Importantes técnicas analíticas têm sido desenvolvidas para determinação de HPAs em complexas amostras ambientais. As mais recomendadas são: a cromatografia a gás (CG) associada a detectores com ionização de chama (FID) ou detectores com espectrometria de massas (MSD), a cromatografia líquida (LC) associada a detectores ultravioleta (UVD), fluorimétricos (FLD) ou espectrometria de massas (MSD), além da cromatografia

com fluido supercrítico (SFC) associada a detectores ultravioleta (UVD) e espectrometria de massas (MSD) (Manoli & Samara, 1999).

De acordo com os exemplos citados anteriormente, evidencia-se que a cromatografia representa o mais proeminente conjunto de técnicas analíticas disponíveis no momento para análises de HPAs (Lanças, 2004a). No entanto, nas atividades de pesquisas nas quais as técnicas cromatográficas são largamente empregadas, usualmente torna-se imprescindível a introdução de uma fase de preparação da amostra (pré-cromatográfica) no método analítico, com o intuito de eliminar impurezas ou interferentes que poderão afetar a determinação dos compostos (Lanças, 2004b; Cavalcante et al., 2007). Nessa etapa são empregados diferentes procedimentos, entre os quais a extração líquido/sólido ou extração em fase sólida (*SPE – solid-phase extraction*), utilizada neste trabalho.

O grande desafio está associado à necessidade de minimizar os problemas com perdas durante o processo de coleta, armazenamento e preparo da amostra para análise. São necessários estudos para a pré-concentração e eliminação de interferentes (*clean-up*), além das técnicas analíticas já citadas que tenham alta eficiência na separação e seletividade na detecção dos compostos (Ciola, 2006; Leite, 2008).

Com a finalidade de garantir a qualidade necessária aos resultados analíticos e obter confiabilidade nas análises qualitativas e quantitativas, os métodos que aplicam técnicas cromatográficas também devem ser validados, assegurando que o sistema funcione adequadamente dentro das condições de análise para as quais foi validado (Lanças, 2004a; Ribani et al., 2004).

Em análises químicas, validar um método é dar confiança e credibilidade analítica ao laboratório e ao método escolhido ou desenvolvido (Lanças, 2004a), por meio da utilização de ferramentas estatísticas para comprovar e garantir que os resultados estejam próximos do valor verdadeiro (Leite, 2008). Vale ressaltar que não existe modelo pronto para validação, todo sistema apresenta limitações. Contudo, o importante na validação é conhecer essas limitações e assegurar que o sistema analítico tenha um bom desempenho,

dentro dos parâmetros determinados na metodologia selecionada para a validação (Lanças, 2004a; Harris, 2005).

Neste trabalho, utilizou-se a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (*High Performance Liquid Chromatography, HPLC*), associada ao detector espectrofotométrico *UV/vis*, por ser uma das mais indicadas para análises de compostos termolábeis, característica dos HPAs, e apresentar rapidez, baixo custo, excelente sensibilidade e seletividade permitindo boa separação e reprodutibilidade dos compostos estudados (Sun et al., 1998; Ying et al. 2007). O principal objetivo foi desenvolver e validar uma metodologia analítica para determinação de 14 HPAs em amostras de sedimento. A metodologia desenvolvida foi aplicada em amostras da Represa do Parque Pedroso, Município de Santo André, identificando possíveis agentes impactantes que estão contribuindo para o empobrecimento da qualidade do sedimento. Este estudo auxiliará no plano de gestão de recursos hídricos do Município, subsidiando ações para melhorar seu gerenciamento.

Os 14 compostos estudados estão na lista da Agencia Americana de Proteção Ambiental (*US-Environmental Protection Agency-EPA*), considerados prioritários para o monitoramento ambiental em razão de sua carcinogenicidade e ocorrência. Os HPAs estudados nesta dissertação foram: Naftaleno, Acenaftileno, Fluoreno, Fenantreno, Antraceno, Fluoranteno, Pireno, Benzo(a)antraceno, Criseno, Benzo(e)acenaftileno, Benzo(k)fluoranteno, Benzo(a)pireno, Dibenzo(a,h)antraceno e Indeno(1,2,3-cd)pireno, (Li et al., 2000; Yang et al., 2008).

Para o pré-tratamento das amostras a técnica selecionada foi a extração líquido/sólido (*SPE – solid-phase extraction*), composta com material semelhante ao da fase estacionária na coluna do cromatógrafo líquido. Essa técnica permite a realização do *clean-up* com baixo volume de amostra e de consumo de solventes orgânicos, rapidez durante todo o processo e excelente seletividade, além de pouco manuseio da amostra evitando contaminações e perdas. Ambas as técnicas, HPLC e SPE, são sugeridas pela US EPA para análise de HPAs em sedimento, (Smith, 2003; Hyötyläinen, 2007).

Este trabalho faz parte dos estudos desenvolvidos no município de Santo André, São Paulo, em parceria com o SEMASA (Serviço Municipal de Saneamento Ambiental de Santo André), e está vinculado diretamente ao Projeto FAPESP-PIPE “Sistema integrado para obtenção de informações georeferenciadas para o controle dinâmico da qualidade da água” (processo nº 2004/02506-0).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O principal objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar uma metodologia analítica para determinação de HPAs em amostras de sedimento utilizando extração em fase sólida (*SPE*) e a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, associada ao detector espectrofotométrico *UV/vis*.

Aplicar a metodologia em amostras da Represa do Parque Pedroso, Município de Santo André, identificando possíveis agentes impactantes que estão contribuindo para o empobrecimento da qualidade do sedimento.

2.2 Objetivos específicos

- a) Desenvolver metodologia analítica para a análise de 14 HPAs: naftaleno, acenaftileno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo[a]antraceno, criseno, benzo[e]acenaftileno, benzo[k]fluoranteno, benzo[a]pireno, dibenzo[a,h]antraceno e Indeno[1,2,3-cd] em matriz de sedimento de água doce utilizando um sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (*HPLC*).
- b) Demonstrar estatisticamente a qualidade dos dados gerados no processo analítico.
- c) Aplicar a metodologia para amostras de sedimento de fundo, identificando e quantificando as substâncias presentes.

3 CONSIDERAÇÕES GERAIS

3.1 Breve histórico dos HPAs

A primeira constatação de que hidrocarbonetos aromáticos poderiam causar câncer foi feita em 1775, por Sir Percival Pott, um cirurgião do hospital St. Bartholomew, em Londres, Inglaterra, ao observar que freqüentemente limpadores de chaminés desenvolviam câncer de escroto. Consciente dos efeitos nocivos à saúde associou a fuligem das chaminés ao câncer de bolsa escrotal. (Vollhardt & Schore, 2004).

O início da química dos HPAs foi considerado a partir de 1931 quando um composto do alcatrão de hulha foi isolado e identificado como benzo(a)pireno. Após dois anos constatou-se que este era um composto com elevada ação cancerígena em animais (Lopes & Andrade, 1996).

Entre 1942 e 1952, estudos realizados com extratos de material particulado ambiental coletado de fuligem doméstica e do fenômeno fotoquímico *smog* em cidades como Los Angeles, também demonstraram atividade cancerígena em animais (Lopes & Andrade, 1996).

Motivados pelo reconhecimento de sua atividade cancerígena, os trabalhos realizados nos anos de 1960 a 1970 foram marcantes na elucidação dos mecanismos da ação carcinogênica destes compostos. Dessa forma, um primeiro domínio de estudos se desenvolveu fortemente a partir dos anos 1960, o da genotoxicidade dos HPAs. (Bouchez et al., 1996a)

Nos anos 70, mais de 30 compostos de HPAs e mais de 100 derivados foram apresentados e foi reconhecido seu efeito de carcinogenicidade, tornando-os uma das maiores classes de substâncias químicas nocivas a saúde conhecidas atualmente. Nesta mesma época foi introduzido um método eficiente e de grande sensibilidade para determinação da mutagenicidade de compostos

químicos, o qual utiliza bactérias do gênero *Salmonella*. Em homenagem aos autores Ames e colaboradores, ficou conhecido como ensaio de mutagenicidade *Ames-Salmonella* (Vasconcellos, 1996).

No início dos anos 90, havia preocupações acerca dos problemas de solos industriais contaminados com HPAs, fundamentalmente no nível de seu impacto sobre águas subterrâneas e superficiais. Tornou-se importante conhecer a biodegradabilidade dos HPAs nas condições aeróbicas e anaeróbicas. Tal conhecimento foi necessário para avaliar as possibilidades de recuperação, por degradação microbiológica, destes solos poluídos (Bouchez et al., 1996b).

3.2 Estrutura dos HPAs

Os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) são constituídos da condensação de pelo menos dois ciclos aromáticos, estritamente de materiais que contêm átomos de carbono e hidrogênio (Grimmer, 1983; Vasconcellos, 1998), unidos em número crescente desde dois ciclos (naftaleno) até seis ciclos (benzo(ghi)perileno e coroneno). A fusão dos ciclos resulta em compostos com estruturas: lineares (antraceno), angulares (fluoranteno) ou agrupados (pireno) (Bouchez et al., 1996a).

As reações químicas que envolvem determinados HPAs podem ser classificadas como de substituição (um átomo de hidrogênio é trocado por outro elemento ou grupo) e adição (uma dupla ligação é rompida) seguida ou não de eliminação (regeneração da dupla ligação). O processo de adição seguido de eliminação resulta em reação de substituição na sua estrutura. Neste tipo de reação, moléculas de O_2 , HNO_3 , NO_x , H_2SO_4 , SO_2 , O_3 e radicais livres, podem se associar aos HPAs convertendo-os em seus derivados, nitro e oxi-HPAs. Após transformação química seus derivados NHPAs e OXI-HPAs tornam-se agentes mutagênicos diretos, sendo estes os principais campos de investigação de suas atividades biológicas (Lopes & Andrade, 1996). Na **TAB. 1** são apresentadas as estruturas dos 16 HPAs estabelecidos como poluentes prioritários pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos, (Manoli e Samara, 1999).

Estes HPAs pertencem a uma lista de 129 poluentes de origem e natureza diversificada, tomados em conta, fundamentalmente, pela sua ocorrência nas águas e sedimento (Bouchez et al., 1996a).

TABELA 1 – Nomenclatura, segundo a IUPAC, e estrutura química dos 16 HPAs classificados pela USEPA como poluentes prioritários.

Nomenclatura	Estrutura		Nomenclatura	Estrutura
<i>Naftaleno</i> *			<i>Benzo[a]antraceno</i> *
<i>Acenafteno</i>			<i>Criseno</i> *
<i>Acenaftileno</i> *			<i>Benzo[a]pireno</i> *
<i>Fluoreno</i> *			<i>Benzo[k]fluoranteno</i> *
<i>Antraceno</i> *			<i>Benzo[e]acenaftileno</i> *
<i>Fenantreno</i> *			<i>Indeno[1,2,3-c,d]pireno</i> *
<i>Fluoranteno</i> *			<i>Benzo[g,h,i]perileno</i>
<i>Pireno</i> *			<i>Dibenzo[a,h]antraceno</i> *

(*) Estudados neste trabalho

Fontes: Manoli e Samara, 1999; Netto et al., 2000; Zacarias, 2006.

3.3 Propriedades físico-químicas dos HPAs

O estudo das propriedades químicas e físicas dos poluentes orgânicos é necessário para se obter conhecimento do comportamento desses compostos e realizar previsões acerca da possibilidade de ocorrência de maiores concentração

desses contaminantes orgânicos. Esse conhecimento, aliado aos dados ecotoxicológicos, contribui significativamente para a compreensão das diferentes concentrações encontradas em diversos compartimentos do ecossistema (Zagatto & Bertolotti, 2006).

O comportamento e destino dos HPAs ao adentrarem no ambiente aquático dependem de suas propriedades físico-químicas que determinam a distribuição no ambiente aquático, deposição e partição nos sedimentos (Manoli & Samara, 1999). Desse modo os HPAs ficam sujeitos a processos de volatilização, dissolução, adsorção, espalhamento, degradação biótica e abiótica e foto oxidação (Fronza, 2006).

A pressão de vapor é uma importante propriedade que determina a distribuição dos HPAs no meio ambiente. HPAs com pesos moleculares mais altos são menos voláteis, apresentam menores pressões de vapor e maiores temperatura de ebulição que os mais leves. Essas características atribuem aos HPAs a capacidade de adsorção e espalhamento no solo, sedimento e material particulado presente na fase gasosa. Desta forma, HPAs de 5 ou mais anéis aromáticos, por exemplo, apresentam baixa pressão de vapor (da ordem de 10^{-7} mmHg) sofrendo predominantemente processos de adsorção (Lopes & Andrade, 1996).

A solubilidade dos HPAs no meio aquoso geralmente é muito baixa e está diretamente relacionada com sua massa molecular e sua forma estrutural. Quanto maior a massa molecular menor será sua solubilidade. Entretanto, HPAs de mesma massa e forma estrutural diferente apresentam valores diferentes de solubilidade. As espécies de HPAs que possuem anéis condensados de forma estrutural angular são mais solúveis que os compostos que apresentam estrutura linear, como o caso da solubilidade do fenantreno ($1,29 \text{ mg.L}^{-1}$) comparada a do antraceno ($7,0.10^{-2} \text{ mg.L}^{-1}$), (Veiga, 2003; Fronza, 2006).

Em temperatura ambiente, aproximadamente 25°C , os HPAs podem ser encontrados condensados ou adsorvidos sobre partículas sólidas, em fase gasosa ou distribuídos entre as fases, gasosa e particulada. A solubilidade em

meio aquoso dos HPAs que estão em fase gasosa é determinada pela *constante de Henry*, que depende da pressão parcial do gás, do solvente e da temperatura (Atkins, 2001). O naftaleno, por exemplo, existe potencialmente na fase gasosa com constante de Henry $K_H = 4,89 \cdot 10^{-2}$, sua solubilidade em meio aquoso é de 30 mg.L^{-1} , enquanto o Benzo(a)pireno, $K_H = 3,4 \cdot 10^{-5}$, se encontra preponderantemente adsorvido sobre partículas sólidas com solubilidade igual a $3,8 \cdot 10^{-3} \text{ mg.L}^{-1}$ (Lopes & Andrade, 1996). Na **TAB. 2** podem ser observadas as informações referentes as propriedades físico-químicas dos HPAs percorridas acima.

TABELA 2. Propriedades físico-químicas dos HPAs estudados

HPAs	Massa molecular g.mol^{-1}	Ponto de fusão $^{\circ}\text{C}$	Ponto de ebulição $^{\circ}\text{C}$	Pressão de Vapor Pa a 25°C	Constante de Henry $\text{kPa.m}^3 \text{mol}^{-1}$ a 25°C	Solubilidade em água 25°C mg.L^{-1}	Coefficiente de Partição octanol-água $\log K_{ow}$	Coefficiente de Partição carbono-água $\log K_{oc}$
Naftaleno	128	81	217	10,4	$4,89 \cdot 10^{-2}$	30	3,37	3,1
Acenaftileno	152	93	265-275	$8,9 \cdot 10^{-1}$	$1,14 \cdot 10^{-3}$	3,93	4,1	1,4
Fluoreno	166	116	295	$8,0 \cdot 10^{-2}$	$1,01 \cdot 10^{-2}$	1,98	4,2	3,9
Antraceno	178	216	342	$8,0 \cdot 10^{-4}$	$7,3 \cdot 10^{-2}$	$7,0 \cdot 10^{-2}$	4,5	4,1
Fenantreno	178	100	340	$1,6 \cdot 10^{-2}$	$3,98 \cdot 10^{-3}$	1,29	4,6	4,1
Pireno	202	109	375	$1,2 \cdot 10^{-3}$	$6,5 \cdot 10^{-4}$	$2,6 \cdot 10^{-1}$	5,2	4,6
Fluoranteno	202	150	393	$6,0 \cdot 10^{-4}$	$1,1 \cdot 10^{-3}$	$1,4 \cdot 10^{-1}$	5,2	4,6
Benzo(a) antraceno	228	161	400	$2,8 \cdot 10^{-5}$	$1,0 \cdot 10^{-4}$	$1,4 \cdot 10^{-2}$	5,6	5,3
Criseno	228	254	448	$8,4 \cdot 10^{-5*}$	$1,1 \cdot 10^{-4}$	$2,0 \cdot 10^{-3}$	5,9	5,3
Benzo(a) pireno	252	178	496	$7,3 \cdot 10^{-7*}$	$3,4 \cdot 10^{-5}$	$3,8 \cdot 10^{-3}$	6,5	6,7
Benzo(e) acenaftileno	252	168	481	$6,7 \cdot 10^{-5*}$	$5,1 \cdot 10^{-5}$	$1,2 \cdot 10^{-3}$	6,1	5,7
Benzo(k) fluoranteno	252	216	480	$1,3 \cdot 10^{-8*}$	$4,4 \cdot 10^{-5*}$	$5,5 \cdot 10^{-4}$	6,8	5,7
Indeno(1,2,3-cd) pireno	276	164	536	$1,3 \cdot 10^{-8*}$	$2,9 \cdot 10^{-5*}$	$6,2 \cdot 10^{-2}$	6,6	6,2
Dibenzo(a,h) antraceno	278	267	524	$1,3 \cdot 10^{-8*}$	$7,0 \cdot 10^{-6}$	$5,0 \cdot 10^{-3}$	6,5	6,5

Fontes: Grimmer, 1983; Lopes e Andrade, 1996; Manoli e Samara, 1999; Netto et al., 2000; Zacarias 2006; Yamada, 2006; Cordeiro, 2006 (* 20°C).

À medida que a solubilidade dos HPAs diminui em água, aumenta em solventes orgânicos. Esse fator compreende a partição de equilíbrio dos compostos orgânicos não polares (HPAs) entre duas fases termodinamicamente em equilíbrio. Na sua forma mais simples, trata-se da distribuição diferenciada

dos HPAs entre o octanol e a água (K_{ow}), que indica o grau de hidrofobicidade dos HPAs, calculada pela razão entre as concentrações dos mesmos nessas duas fases. Inclui também na forma mais completa e complexa, a partição entre a água e os particulados suspensos nos ambientes aquáticos. Neste caso, o coeficiente de partição se baseia no teor de carbono orgânico, ou seja, o coeficiente de partição entre as partículas suspensas e a água (K_{oc}) (Netto et al. 2000; Zagatto & Bertolotti, 2006).

Dessa forma, os HPAs ao apresentarem coeficientes de partição superiores a 1000 para K_{ow} demonstram grande afinidade lipofílica e para K_{oc} indicam forte tendência de associar-se ao carbono orgânico do sedimento por processos de adsorção. Ambos os valores de coeficientes de partição aumentam com o número de anéis aromáticos na molécula e, preferencialmente são encontrados no ecossistema aquático adsorvidos aos particulados suspensos preexistente na coluna d'água que tendem a se precipitar, passando a fazer parte dos sedimentos (Netto et al. 2000).

3.4 Genotoxicidade dos HPAs

O grande avanço nos estudos da genotoxicidade desses compostos se deu pelo reconhecimento do poder cancerígeno do alcatrão e da fuligem após observações relativas ao câncer de pele causado pelo alcatrão, em decorrência da maximização no uso do carvão. Esses estudos contribuíram para o progresso da bioquímica e da biologia molecular, possibilitando o reconhecimento da similaridade profunda dos mecanismos da carcinogênese e mutagênese dos HPAs e o desenvolvimento dos testes de genotoxicidade (Bouchez et al. 1996b).

Existem mais de 100 testes, empregando variedades de células de bactérias, para determinar o poder mutagênico e potencialmente cancerígeno das substâncias químicas. Porém o teste bacteriano mais empregado é o de Ames e colaboradores, utilizando cepas especiais de *Salmonella typhimurium* para detectar atividades mutagênicas (Vasconcellos, 1996).

Os HPAs não são compostos químicos propriamente mutagênicos. Sua transformação ocorre no organismo que os absorveram, por meio de oxidação enzimática (uma monooxigenase), determinada pelo citocromo P-450, presente nos tecidos animais. Fisiologicamente o citocromo P-450 atua com a desintoxicação dos agentes tóxicos orgânicos (xenobióticos) ingeridos, convertendo-os em derivados hidrossolúveis, suscetíveis a serem eliminados pelo organismo (Vollhardt & Schore, 2004).

Esta proteína executa as reações de epoxidação nos HPAs, no caso do benzo(a)pireno ocasiona a formação de um benzo(a)pireno-diolepoxido (oxa-ciclo-propano). Os diolepoxido formados a partir dos HPAs são moléculas reativas, tanto quanto os epóxidos. Eles se adsorvem, por mecanismos complexos sobre o DNA, e produzem transformações no material genético que estão na base do processo de carcinogênese, conforme representado na **FIG. 1**.

FIGURA 1: Conversão Enzimática do Benzo(a)pireno no Carcinogênico Efetivo (Lopes & Andrade, 1996; Vollhardt & Schore, 2004)

Alguns estudos levam a crer que a atuação do carcinogênico efetivo derive do ataque nucleofílico do nitrogênio do grupo amina da guanina, uma das

bases do DNA, ao oxa-ciclo-propano (Vollhardt & Schore, 2004). A guanina alterada afeta a hélice dupla do DNA, levando à replicação defeituosa da molécula, representada na figura **FIG. 2**.

FIGURA 2: Reações dos HPAs no organismo humano (Vollhardt & Schore, 2004).

A bio-acumulação dos HPAs e seu metabolismo pelo citocromo P-450 foi estudada em diversos organismos, abrangendo os marinhos. Esses estudos foram realizados por meio de testes enzimáticos baseados na indução e na atividade do citocromo P-450 em presença dos HPAs, sendo utilizados como indicadores da ocorrência desses poluentes no ambiente aquático (Bouchez et al. 1996b; Netto et al. 2000; Vollhardt & Schore, 2004).

O potencial mutagênico e cancerígeno dos HPAs estão reportados na **TAB. 3** baseados nos dados publicados pela Agência Internacional de Pesquisa do Câncer (*International Agency for Research on Cancer - IARC*) e pela Agência

Americana de Proteção Ambiental (*Environmental Protection Agency-EPA*). Na **TAB. 3** é possível observar que as potencialidades mutagênicas e cancerígenas aparecem para os HPAs a partir de quatro ciclos aromáticos.

TABELA 3. Potencial de genotoxicidade, carcinogenicidade e mutagenicidade de alguns dos HPAs estudados.

HPA	Genotoxicidade	Carcinogenicidade	Mutagenicidade
Acenaftileno	N	N	-
Fluoreno	L	I	-
Fenantreno	L	I	+
Pireno	L	N	+
Benzo[a]antraceno	S	S	+
Criseno	L	L	+
Benzo[k]fluoranteno	I	S	+
Benzo[a]pireno	S	S	+
Indeno[1,2,3-cd]pireno	I	S	+
Dibenzo[a]antraceno	S	S	+

Fonte: Netto et al., 2000

Dados disponíveis para a comprovação do efeito: **S** = suficientes; **I** = insuficientes; **L** = limitados; **N** = não apresenta atividade
Mutagenicidade (teste de Ames): positivo (+); negativo (-).

A presença destes compostos no meio ambiente implica na exposição dos indivíduos. Conseqüentemente surge o problema da dificuldade na avaliação dos riscos incorridos de acordo com formas de assimilação no organismo humano (Bouchez et al. 1996b). A ocorrência da absorção por inalação está diretamente relacionada com as emissões atmosféricas que dependem da urbanização, da circulação dos veículos e dos processos de industrialização de cada região. A absorção pela derme em algumas atividades industriais pode contribuir em até 90% da quantidade assimilada no organismo, também os alimentos são considerados outra fonte de contaminação humana por meio de HPAs oriundos da atmosfera os quais se depositam sobre legumes, grãos, frutas e vegetais (Netto et al. 2000).

3.5 Geoquímica dos HPAs

Os HPAs de origem pirolítica são formados, especialmente, durante a combustão incompleta da matéria orgânica, recente ou fossilizada, conforme **FIG. 3** que demonstra o mecanismo da reação de pirólise até a formação de núcleos aromáticos condensados (Lopes & Andrade, 1996). As atividades humanas industriais, emissões veiculares e aquecimento residencial, bem como a pirólise natural (incêndio de florestas e erupções vulcânicas) contribuem da mesma forma para a produção desta classe de compostos (Bjørseth & Ramdahl, 1985).

FIGURA 3. Esquema do mecanismo da reação de pirólise para a formação dos HPAs (Lopes e Andrade, 1996).

A formação de misturas complexas de HPAs, em que predominam os derivados alquilados ocorre durante o processo de formação do petróleo por catagênese, que se produz em temperaturas relativamente baixas (59-150 °C), pelo soterramento das bacias sedimentares da matéria orgânica e sua lenta maturação, permitindo a conservação dos grupos alquila. Estes compostos de

origem petrolífera são utilizados como indicadores de contaminação dos sedimentos e da biota aquática (Bouchez et al., 1996a).

A biossíntese por microorganismo ou vegetais é outro modo de formação dos HPAs, bem como a diagênese que por meio de estruturas moleculares policíclicas, como as quinonas ou os esteróides gerados por organismos vivos, atuam como precursores biológicos de HPAs formados nos sedimentos por diagênese precoce. De tais compostos obtêm-se valiosos dados sobre a origem e o desenvolvimento da matéria orgânica sedimentar (Bouchez et al. 1996a; Wang et al., 2004).

Os critérios para caracterização da origem dos HPAs nos sedimentos foram estabelecidos mediante estudos que objetivaram relacionar os teores em certos HPAs, traduzidos sob a forma de relação entre estas substâncias e a origem da matéria correspondente (Bouchez et al. 1996a; Chen et al., 2007). Na **TAB. 4** podem ser observados alguns dos critérios utilizados.

TABELA 4. Critérios da origem dos HPAs no meio ambiente segundo as razões.

Origem	Critério de Origem
Pirolítica	HPAs alquila / HPAs originais < 1
	Ph / An < 10
	B[e]Py / B[a]Py > 10
	Fl / Py < 1 (solos urbanos) ou > 1 (aerossóis)
Petrogênica	HPAs alquila / HPAs originais > 1
	Ph / Ant > 25
	B[e]Py / B[a]Py ~ 2
Biogênese (Diagenético)	HPAs de estruturas próximas de precursores biossintéticos:
	Perileno (B[a]Py / Pe < 1)

Fonte: Bouchez et al. 1996a; Chen et al., 2007

De acordo com os dados citados na **TAB. 4**, nota-se a importância da relação dos HPAs alquilados e dos originais, para distinguir entre as duas origens fundamentais, pirolítica e petrolífera. Outra importante relação é a razão fenantreno / antraceno inferior a 10 nos produtos de origem pirolítica, e superior a 25 nos petrogênicos, assinalando a maior estabilidade do isômero angular

fenantreno e uma evolução em direção a um equilíbrio termodinâmico durante a maturação térmica.

A relação benzo(e)pireno / benzo(a)pireno entre o HPA cancerígeno mais conhecido, BaP, e seu homólogo muito menos mutagênico, BeP, também é outra maneira de assinalar entre as origens pirolítica e petrolífera. A relação fluoranteno / pireno inferior a 1 caracteriza como fonte de origem os escapamentos de motor a diesel e superior a 1 nos aerossóis atmosféricos, sendo esses dois compostos característicos de pirólise. Os baixos valores da razão entre o benzo(a)pireno / perileno caracterizam a origem terrestre em razão do alto teor de perileno.

A questão primordial entre as diversas fontes de HPAs está em assinalar as contribuições singulares de cada fonte. Logo, o acesso a dados quantitativos, referentes a estas fontes, globais ou a um setor geográfico específico, pode fornecer valorosas indicações, parciais ou específicas, sobre os níveis destes poluentes.

3.6 Destino dos HPAs

Fundamentalmente o modo de transporte, dispersão e transformações dos HPAs são elementos preciosos na compreensão do destino, bem como na avaliação da poluição gerada por estes compostos quando lançados no meio ambiente. As duas formas de transporte mais importantes são via atmosférica e aquática (Bouchez et al. 1996a; Lopes & Andrade, 1996).

O transporte dos HPAs referente às emissões atmosféricas ocorre em fase vapor ou sob a forma de material associado a partículas e, seu tempo de residência depende das condições atmosféricas e da quantidade de aerossol formado. Os principais processos de remoção dos HPAs na atmosfera são as precipitações secas e úmidas, que podem se estabelecer a grande distância de seu ponto de emissão, o que explica a persistência e ubiquidade desses compostos no meio ambiente (Lopes & Andrade, 1996).

O transporte pela via aquática ocorre com o escoamento superficial das águas de chuva, que lavam solos e estradas, carregando os HPAs que precipitaram da atmosfera. Igualmente para HPAs derivados de produtos petrolíferos derramados no solo e esgotos, promovendo significativo arraste destes compostos para o corpo d'água. A contribuição petrolífera direta em ambiente aquático de origem antrópica como, dragagem, acidentes marítimos, exploração petrolífera ou natural como vazamento de jazidas são, também, importantes formas de contaminação (Bouchez et al. 1996a).

Determinados HPAs, ao serem transportados, são acompanhados pelo fenômeno de degradação. Durante sua permanência na atmosfera, os HPAs adsorvidos ao material particulado dão origem aos derivados nitrados pela reação com os óxidos de nitrogênio, assim como as quinonas, as cetonas e os ácidos por foto-oxidação. A foto-oxidação e a transformação dos HPAs na atmosfera estabelecem as diferenças de composição destes hidrocarbonetos encontradas no solo, no corpo d'água e no sedimento em razão do afastamento da fonte emissora (Lopes & Andrade, 1996).

As velocidades de foto-decomposição podem ser elevadas, com ocorrência entre 0,3 e 20 horas, assim como o tempo de meia-vida. **(TAB. 5).**

Segundo Wild et al. (1991) as diferenças significativas dos tempos de meia-vida dos HPAs nos solos e os determinados em laboratório é atribuída às condições favoráveis a perdas abióticas nos estudos em laboratório.

TABELA 5. Tempo de meia-vida de alguns HPAs

HPAs	Solo	Laboratório
	Ano	Semana/Ano
Naftaleno	< 2,1	< 46 ^s
Acenaftileno/ Fluoreno	< 3,2	< 6 ^s
Fenantreno	5,7	< 26 ^s
Antraceno	7,9	< 26 ^s
Fluoranteno	7,8	-
Pireno	8,5	< 90 ^s
Benzo(a)antraceno/Criseno	8,1	< 157 ^s
Benzo(k)fluoranteno	8,7	-
Benzo(b)fluoranteno	8,7	42
Benzo(a)pireno	8,2	< 6 ^a

a= ano s = semana. Fonte: Bouchez et al., 1996a

Estes fenômenos de transformação têm influência sobre a distribuição dos HPAs no meio ambiente. Uma vez depositado na camada superficial do solo, alguns HPAs são suscetíveis de serem afetados por fenômenos, tais como volatilização, dissolução seletiva, adsorção das partículas de matéria orgânica, migração, bioacumulação, adsorção pelas plantas ou a degradação microbiológica. As incertezas são grandes quanto aos diferentes fatores de segregação, mobilidades e solubilidades (Bouchez et al. 1996a).

De maneira geral, pode-se dizer que o destino dos HPAs está associado às suas propriedades físico-químicas, mas também com as características intrínsecas do solo, corpo d'água e sedimento, por exemplo, pH e porcentual de matéria orgânica.

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A cromatografia constitui-se atualmente em um conjunto de técnicas de separação com forte caráter interdisciplinar para utilização no desenvolvimento de métodos em química analítica. Segundo Lanças (2004a) tem-se encontrado aplicações da cromatografia, em suas diferentes formas (gasosa, líquida e com fluído supercrítico), em praticamente todas as áreas do conhecimento, nas quais a análise qualitativa e quantitativa de substâncias químicas deva ser realizada. Como exemplos as aplicações em: Química (analítica, orgânica, inorgânica e físico-química); Bioquímica (proteínas, carboidratos, aminoácidos e DNA); Meio Ambiente (análise de poluentes em ar, água e solo) entre outras áreas distintas.

Segundo Ciola (2006) na cromatografia a líquido, as espécies que estão sendo analisadas sofrem grande influência da fase estacionária, e ao mesmo tempo as propriedades destas são continuamente influenciadas pela fase móvel. Dessa forma, a escolha das fases móveis no desenvolvimento do método analítico constitui a parte mais importante do desenvolvimento do método cromatográfico.

Lanças (2004b) também orientou que em situações concretas do dia-a-dia, nas quais a cromatografia é amplamente empregada, usualmente há a necessidade da introdução de uma etapa pré-cromatográfica no método analítico. Ele sugere o uso da extração em fase sólida (SPE) em análises de matrizes complexas, por considerar a extração e o isolamento (*clean-up*) dos analitos de interesse na matriz, uma das etapas mais críticas envolvidas no método analítico.

Harris (2005) recomendou que para uma cromatografia bem sucedida de uma amostra complexa é preciso sempre purificá-la antes que chegue à coluna. Métodos como a extração líquida, a extração com fluído super crítico e a extração em fase sólida isolam os constituintes desejados das substâncias interferentes, e podem concentrar constituintes diluídos até níveis detectáveis.

De Luca et al. (2005) desenvolveram um método (CG-MS) para determinação de HPAs em amostras de sedimento, no qual obtiveram boa quantificação dos analitos, além de recuperação adequada para a maioria dos compostos entre 70% e 90% com exceção do naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno e benzo[a]pireno com valores entre 56% e 64% e, todos com um desvio padrão relativo (DPR) de 10%.

Ying et al. (2007) determinaram traços de 16 HPAs (prioritários pela EPA) em sedimento utilizando HPLC. Durante o processo de determinação dos HPAs observaram a necessidade do enriquecimento dos compostos (concentração dos analitos), em razão de suas baixas concentrações. A técnica demonstrou boa resposta e baixa interferência com comprimento de onda fixo em 254 nm e em concentrações na faixa de 50 a 500 $\mu\text{g.L}^{-1}$ exibiu boa linearidade e coeficientes de correlação acima de 0,996.

Bixian et al. (2001) analisaram 16 HPAs (prioritários pela EPA) utilizando a técnica de CG-MS em amostras de sedimento, observaram que os compostos naftaleno, acenaftileno e acenafteno apresentaram baixas concentrações no sedimento comparado aos outros HPAs. Tal ocorrência foi atribuída à baixa massa molecular dos três compostos que durante o transporte e posterior deposição no sedimento são suscetíveis a processos de desorção e biodegradação.

Torres et al. (2002), utilizando a técnica de cromatografia líquida (HPLC/UV), desenvolveram um método analítico para determinação de 12 HPAs, (fenantreno; Antraceno; Fluoranteno; Pireno; Criseno; Benzo(a)antraceno; Benzo(b)fluoranteno; Benzo(k)fluoranteno; Benzo(a)pireno; Dibenzo(a,h)antraceno; Indeno(1,2,3-cd)pireno; Benzo(ghi)perileno), em amostras de sedimento no rio Paraíba do Sul no estado do Rio de Janeiro. O método foi aplicado com sucesso e os resultados indicaram a contaminação por HPAs na água e no sedimento do rio, bem como alcance destes poluentes nos principais reservatórios de água para o consumo humano.

Fang et al. (2007) estudaram a dispersão dos HPAs em sedimento no rio Kaoping em Taiwan, correlacionando a concentração dos HPAs versus o tamanho das partículas e a quantidade de carbono orgânico total (TOC). Com os resultados sugeriram que a dispersão dos HPAs no sedimento é controlada pelo tamanho da área superficial das partículas por processo de adsorção, independentemente da grande quantidade de TOC em áreas com poluição excessiva.

Song et al. (2002) realizaram um estudo comparativo utilizando três métodos de extração (*shaking*, *soxhlet* e *ultrassom*) para determinação de HPAs em solos e sedimentos contaminados. Cada método foi avaliado por teste de recuperação seguido de quantificação pela técnica de HPLC, os resultados classificaram o método de extração por *ultrassom* como o mais eficiente.

Em amostras de solos e sedimentos Sun et al. (1998) também desenvolveram um método para determinação de 16 HPAs, combinando as técnicas de extração por *ultrassom* e SPE como etapas de preparação das amostras e a técnica de cromatografia líquida em fase reversa com detector UV-VIs para a determinação dos compostos. O método apresentou baixo limite de detecção, em concentrações entre 0,4 e 1,0 $\mu\text{g.g}^{-1}$, boa linearidade com coeficientes de regressão variando de 0,9918 a 0,9988 e precisão de 5,5 e 17,6%.

No estudo de técnicas analíticas para determinação de HPAs em amostras de água, Manoli e Samara (1999) concluíram que as técnicas LLE e SPE para recuperação e pré-concentração dos HPAs e, as técnicas de HPLC acoplada a UV/VIs ou FLD e CG-MS para determinação dos HPAs são as técnicas mais utilizadas e adequadas para determinação destes compostos em água, inclusive recomendadas pela US EPA.

Em análises químicas, o desenvolvimento de um método analítico definirá os rumos a serem tomados para a determinação qualitativa e quantitativa de uma ou várias espécies presentes na matriz. No entanto, para garantir a qualidade necessária aos resultados analíticos, os métodos devem ser validados de acordo com procedimentos muito bem definidos.

Ribani et al. (2004) concluíram que as técnicas cromatográficas e eletroforéticas são alvos primordiais dos procedimentos de validação, visto que envolvem monitoramentos de áreas como saúde pública, ambiental, entre outras e de fundamental importância para implementação de um sistema de controle de qualidade em laboratórios de análise. Além disso, evidenciaram várias nuances e diferentes interpretações na legislação que orienta à validação de métodos analíticos, características que permite a adaptação para cada tipo de problema. No caso da legislação brasileira observaram seu aperfeiçoamento nos últimos anos, conduzido por resoluções e recomendações do INMETRO e ANVISA, pautadas em diretrizes da ICH e do grupo EURACHEM.

Manoli e Samara (1999) também sugeriram a validação de métodos de análise em estudos de amostras ambientais complexas e com concentrações muito baixas, uma vez que a validação do método gera confiança nas medidas, segurança nos resultados e clareza para decisões adequadas, quanto ao melhoramento da qualidade de ambientes poluídos com traços de compostos orgânicos.

Purcaro et al. (2007) validaram um método para análise do benzo(a)pireno em óleos vegetais aplicando a técnica de microextração em fase sólida (*Solid phase micro extraction* – SPME) e determinação por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC–MS). O procedimento de validação apresentou resultados satisfatórios para os parâmetros linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão e exatidão de acordo com os critérios de análises estabelecidos para o benzo(a)pireno.

Piñuela et al. (2006) analisaram e também validaram um método para determinação de 20 compostos policíclicos aromáticos utilizando a técnica LC–DAD–APCI–MS em sedimento marinho. Para validação do método utilizaram um material de referencia certificado para PACs em sedimento, (*Standard reference material, SRM 1944, from the US National Institute of Standards*). O método apresentou desempenho adequado em termos de precisão, linearidade, limites de quantificação abaixo de 100 ng.g^{-1} , repetibilidade satisfatória com desvio padrão relativo de 13% e recuperação variando entre 47% e 102%.

A maioria das análises que envolvem matrizes complexas (amostras ambientais) requer etapas pré-cromatográficas, ou seja, o preparo da amostra para posterior determinação qualitativa e quantitativa por meio de uma técnica analítica adequada. Diferentes procedimentos são empregados nestas etapas, os mais comuns são a extração, eliminação de interferentes (*clean-up*), isolamento dos analitos de interesse, ajuste de concentração/volume e outros. Estas etapas se não bem controlados podem introduzir erros críticos no método analítico. Como exemplo, a etapa de *clean-up* é fundamental para eliminar substâncias naturais da matriz presentes no extrato que podem interferir na análise. Em razão destes fatores, vários estudos analíticos que envolvem etapas pré-cromatográficas são encontrados atualmente nas literaturas.

Cavalcante et al. (2007) otimizaram a técnica de SPE utilizando 8 HPAs dos 16 HPAs prioritários pela US-EPA em amostras de água. Para cada estudo 100 mL (10 ngHPAs/mL) de amostras em duplicatas foram preparadas com percentagens de 10, 20, 30 e 40%. O efeito da velocidade de fluxo sobre a recuperação dos HPAs com fluxos de 5, 10 e 15 mL/min, o condicionamento dos cartuchos de SPE utilizando 10 mL de água e, em seguida, 10 mL de água mais co-solvente nas percentagens 10, 20, 30 e 40%, também foram estudados, bem como o estudo da eluição dos HPAs nos cartuchos de SPE utilizando os volumes de 2 x 1 mL e 4 x 1 mL de Acetona, ACN, MeOH, THF/Acet e Acet/DCM. A adição de solventes orgânicos (MeOH e Acetona) chamados também de co-solventes ou modificantes orgânicos é uma ferramenta que contribui para o aumento da solubilidade dos HPAs, diminuindo a adsorção nas paredes dos recipientes de amostragem. Porém, a concentração do co-solvente é um parâmetro crítico e deve ser avaliada com cuidado. Como exemplo, se adicionado em baixa concentração pode não dissolver completamente os compostos de maiores massas moleculares, mas adicionando em alta concentração compromete a adsorção das substâncias com menores massas moleculares. A otimização da técnica de SPE para análise de HPAs em matrizes aquosas ambientais apresentou melhor recuperação (entre 74,4 e 95,8%) quando se utilizou acetona 30% como co-solvente, fluxo de percolação entre 10 e 15 mL.min⁻¹ e 2 mL de THF/Acet como mistura de eluição.

Sun et al. (1998) também estudaram os processos de extração, pré-concentração e *clean-up* dos 16 HPAs prioritários pela US-EPA em amostras de solos. Na comparação de duas técnicas (*ultrassom* e *soxhlet*) para extração dos 16 HPAs em solo, verificaram que o método de extração por *ultrassom* foi melhor que o *soxhlet*, não apenas pela alta eficiência de extração, mas também pela economia de solvente e fácil operação. Entre os 6 solventes testados para extração dos HPAs no solo, os resultados indicaram a acetona como o mais eficaz, seguindo a ordem de eficácia: acetona > metanol > diclorometano = acetonitrila > 2- propanol. No estudo de pré-concentração/*clean-up* dos extratos (técnica SPE) o cartucho LC – 18 de 6 mL foi o mais apropriado. Também foram testadas soluções (THF/Acet = 1:1, Acetona e Diclorometano) para eluição dos HPAs adsorvidos nos cartuchos de SPE, a solução 1: 1 THF/Acet apresentou melhor recuperação comparada às outras duas soluções. O método analítico desenvolvido apresentou êxito na determinação e recuperação dos compostos, os autores propuseram que essa metodologia também poderia ser aplicada com ligeiras modificações, em sedimento, particulados do ar, em outras amostras ambientais, tal como água de rios, lagos e mar.

Werres et al. (2009) também em estudos realizados recentemente, determinaram a concentração dos 16 HPAs prioritários pela US-EPA em amostras de água natural contendo grandes quantidades de sólidos suspensos. Os resultados demonstraram que a aplicação da técnica de extração em fase sólida (SPE) no preparo das amostras aquosas para determinação dos HPAs contribuiu significativamente no método analítico desenvolvido com excelente reprodutibilidade e recuperação atingindo os limites de 74 e 94%.

5 **ÁREA DE ESTUDO**

O estado de São Paulo é a unidade da federação mais populosa do Brasil. Mesmo reunindo 22% da população do país, está contemplado com somente 1,64% do potencial hídrico nacional. Esse fato se agrava na Região Metropolitana de São Paulo (RMSP), composta por 39 Municípios, que abriga 47% da população do estado, porém tem à disposição apenas 4% da água doce de São Paulo (CETESB, 2006).

Esse quadro crítico da RMSP pode ser observado pela escassez de recursos hídricos, haja vista que 51% dos recursos hídricos presentes na área estariam comprometidos pela poluição e aproximadamente 35% da água é considerada de qualidade ruim ou péssima, especialmente em virtude da concentração de fósforo. Embora a região apresente rede hídrica densa, trata-se de sub-bacias de cabeceira, determinando uma vazão baixa de águas superficiais. A disponibilidade hídrica por habitante na Bacia do Alto Tietê, 201m³/hab./ano, está abaixo do índice de 1.500m³/hab./ano, considerado necessário por vários organismos internacionais. Em razão do uso intensivo das águas superficiais, maiores volumes da água subterrânea têm sido utilizados como recurso complementar (CETESB, 2006).

Dessa forma, os mananciais do Sistema Billings constituem a maior reserva de água doce da RMSP, estendendo-se por seis dos sete municípios do Grande ABC (CETESB, 2006).

Implantado no início do século passado com a função de fornecer água e energia para a metrópole paulista, este sistema é um vasto reservatório com 127 km² de área, formando uma bacia hidrográfica com 582,8 km² e armazenando um bilhão e duzentos milhões de m³ de água potabilizável (Billings, 2003).

A região do Grande ABC, formada por sete Municípios (Santo André, São Bernardo, São Caetano, Diadema, Mauá, Ribeirão Pires e Rio Grande da

Serra), **FIG. 4**, é o conglomerado urbano mais importante após a Capital, sendo o terceiro pólo de consumo do país (2,18% do total nacional), superado apenas pela Capital (11,09%) e pelo Rio de Janeiro (5,82%) (SEMASA, 2009).

A escolha da Represa do Parque do Pedroso, no município de Santo André, como área de estudo justifica-se por abranger uma região de área florestada, ainda com baixa densidade urbana e industrial, porém com grande potencial de avanço populacional, próximo a Favela Pintassilgo (**FIG. 5**), e por ser uma reserva regional situada às margens da represa Billings, principal corpo aquático potabilizável pertencente à RMSP. Além disso, 6,6% da água do Município (aproximadamente 54.304 m³) são captadas na represa do Parque Pedroso e tratadas na Estação de Tratamento de Água do Guarará, também no município de Santo André.

FIGURA 4. Localização do Município de Santo André na área metropolitana de São Paulo-RMSP (SEMASA, 2009).

FIGURA 5. Distribuição do Município de Santo André (SEMASA, 2009).

5.1 Caracterização Geral do Município - Perfil Territorial e Divisão Distrital

O município está Localizado entre as coordenadas geográficas 23° 36' a 23° 58'S e 46° 17' a 46° 37'W, a 18 km da capital do Estado de São Paulo, o município de Santo André possui uma área total de 174,38 km², 55,13 % das quais estão inseridos em áreas de Proteção aos Mananciais e no Parque Estadual da Serra do Mar. A população do município é de 667.891 habitantes (IBGE, 2007). O município está subdividido em 3 grandes unidades territoriais: Distrito Sede (subdividido em 1º e 2º Sub-distritos), distrito de Capuava e distrito de Paranapiacaba.

A população atendida pela rede de distribuição de água é de 98% e pela rede coletora de esgoto é de 96%. A extensão da rede de distribuição de água em 2001 era de 1.723.765 m e de esgoto 1.039.612 m. O Município compra água tratada da SABESP (93,4%) e o SEMASA trata 6,6% de toda água distribuída ao Município; da SABESP são 51.044.172 m³ e 54.304 m³ do Sistema Pedroso, que faz a captação da água na represa do Parque Pedroso e o

tratamento na Estação de Tratamento de Água do Guarará, no município de Santo André (Copat, 2006, SEMASA, 2009).

A água distribuída na rede do município de Santo André é proveniente de três sistemas (SEMASA, 2009).

I – Sistema Rio Claro, operado pela SABESP, compreende a 74,2% do abastecimento (610.517 milhões de litros de água), faz a captação da água na represa Ribeirão do Campo e o tratamento na Estação de Tratamento de Água Casa Grande, no município de Biritiba Mirim.

II – Sistema Rio Grande, operado pela Sabesp, representa 19,2% do abastecimento (157.978 milhões de litros de água). Faz a captação da água na represa Billings e o tratamento na Estação de Tratamento de Água Riacho Grande, no município de São Bernardo do Campo.

III – Sistema Guarará, sob responsabilidade do SEMASA, representa 6,6% da água do município (54.304 milhões de litros de água) do Sistema Pedroso, que faz a captação da água na represa do Parque Pedroso e o tratamento na Estação de Tratamento de Água do Guarará, no município de Santo André.

Ao longo das últimas décadas, o ABC tem sido sazonalmente castigado pelo racionamento de água, impondo em maior ou menor grau o impopular sistema de rodízio. Os $4 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ captados do compartimento Rio Grande da Billings para atender a demanda em São Bernardo do Campo, Santo André e São Caetano do Sul, são indispensáveis para evitar um colapso no abastecimento regional de água. Nas **FIG. 6 e 7** são apresentados o mapa da Bacia hidrográfica da Billings e a divisão por sub-regiões da bacia (Billings, 2003).

O município de Santo André conservou um serviço próprio de abastecimento, o Serviço Municipal de Água e Saneamento de Santo André - SEMASA - que opera a Estação de Tratamento de Água de Guarará, explorando o manancial do Pedroso. Embora de pequena capacidade, é imprescindível face à escassez de água.

Quanto à Billings, visando preservar o braço do Rio Grande, que abastece o ABC, o Governo do Estado construiu em 1982 a Barragem Anchieta (à altura da Via Anchieta) criando o Compartimento Rio Grande e o Compartimento Pedreira. A barragem tinha o objetivo de impedir a penetração de águas provenientes do bombeamento (de esgoto) no setor que a Sabesp capta água para o abastecimento (SEMASA, 2009).

FIGURA 6. Foto de satélite evidenciando o avanço da RMSP na direção das Represas Guarapiranga e Billings, e das áreas de mata atlântica (Google Earth, 2009).

FIGURA 7. Mapa da Bacia Hidrográfica da Billings evidenciando as sub-regiões e os limites da bacia (Billings, 2003).

O município de Santo André pertence ao Comitê de Bacias da Unidade de Gerenciamento de Recursos Hídricos 06 - Alto Tietê (UGRH 06-ALTO TIETÊ). Esta Unidade é composta por 34 municípios e abrange a parte superior do Rio Tietê, desde as suas cabeceiras até a barragem do reservatório, com uma extensão de 133 km, correspondendo a 6.657 km² de área.

A UGRHI 6 abrange uma área de 5.650 km² dividida em 34 municípios, concentrando a metade da população do Estado com uma densidade em torno de 3000 hab/km². É o maior pólo industrial do Brasil, com diversas atividades como químicas, metalúrgicas, laticínios, mecânica, farmacêutica, alimentícia e têxtil. Essas indústrias estão instaladas principalmente nos domínios das sub-bacias hidrográficas dos rios Pinheiros, Tamanduateí e Tietê, nas Cidades de São Paulo, Osasco São Bernardo, Santo André, Diadema, Guarulhos, Mogi das Cruzes e Suzano. A produção de gêneros de horticultura e fruticultura na URGHI 6 também é grande, além de ser a principal região produtora de água mineral do País (Billings, 2003; CETESB, 2006).

A coleta de esgoto é insuficiente, assim como é baixo o índice de seu tratamento. Há necessidade de adequação da disposição dos resíduos e também dos passivos ambientais existentes. O suprimento para as demandas por águas superficiais também é crítico (CETESB, 2006).

Na UGRHI 6 são monitorados pela CETESB, vinte e sete pontos distribuídos entre poços de abastecimento público, uso para serviço e produção de águas minerais, além de nascentes. Estes se encontram localizados nos municípios de São Paulo, Embu, Santana do Parnaíba, Guarulhos, Cotia, Embu-Guaçu; São Bernardo do Campo, Rio Grande da Serra, Santo André e Cajamar.

Apesar de não terem sido detectadas substâncias orgânicas voláteis nos poços monitorados, segundo o cadastro da CETESB, das 1822 áreas contaminadas do Estado, 961 estão localizadas na UGRHI 6, sendo que a água subterrânea é o recurso ambiental contaminado em 885 delas, ou seja em 92% dos casos de contaminação. Os principais contaminantes reportados têm sido solventes halogenados, combustíveis líquidos, metais e hidrocarbonetos poliaromáticos. Fato este que resulta na necessidade da realização de monitoramento freqüente das águas subterrâneas de regiões metropolitanas para esse tipo de substâncias, de forma a minimizar os riscos à saúde humana (CETESB, 2006).

Visando uma análise compartimentada, a CETESB adotou a subdivisão por bacias hidrográficas para a avaliação da qualidade de suas águas. Dessa forma a área piloto de estudo pertence à Bacia do Rio Grande, como pode ser observado na **FIG. 8**, com uma área de drenagem de 3.327 km². Três dos pontos monitorados no sistema Billings são no Rio Grande (CETESB, 2005). Segundo esse monitoramento, o ambiente apresenta-se hipereutrofizado, não atende aos padrões de qualidade para a classe vigente para matéria orgânica biodegradável (classe 2, segundo CONAMA-357/05), nutrientes e metais, dado pela influência das águas do Rio Grande/Jurubatuba e/ou Ribeirão Pires (CETESB, 2006; Billings, 2003).

FIGURA 8. Mapa representando a produção hídrica da Bacia hidrográfica da Billings, e sua contribuição por sub-bacia (Billings, 2003).

Segundo o “Relatório de Qualidade das Águas Subterrâneas” (CETESB, 2006), a geomorfologia da área estudada é de Planalto Atlântico, predominando Aquíferos Aflorantes Pré-Cambriano e São Paulo.

O embasamento pré-Cambriano (Cristalino) no Estado de São Paulo é composto por rochas ígneas e metamórficas, mais antigas do que 542 milhões de anos. Eventos tectônicos e climáticos afetaram esses maciços ao longo do tempo, formando sistemas de falhas, fraturas e horizontes de alteração da rocha, propiciando condições de percolação e acúmulo de água subterrânea. O potencial hídrico destas rochas é limitado à ocorrência dessas zonas favoráveis, resultando em grande variação das condições de produção, com valores extremos entre 0 a 50 m³/h, com média de 7 m³/h. O fluxo da água subterrânea não se dá em escala regional mas constitui o escoamento básico de rios e riachos que drenam unidades independentes em cada vale (CETESB, 2006).

Aquífero São Paulo, que ocorre na Bacia de São Paulo, onde está localizada a maior parte da Região Metropolitana– RMSP, é constituído por um pacote de rochas sedimentares com litologia variada, com predominância de camadas argilosas, intercaladas por lentes de areia distribuídas irregularmente na

porção central da Bacia Hidrográfica do Alto Tietê, o que lhe confere vazões explotáveis que variam de 10m a 40m³/h. É um aquífero livre a semi-confinado, de porosidade primária e espessura média de 100m, atingindo até 250m em algumas áreas. Apesar de abranger apenas 25% da área da Bacia do Alto Tietê, é o mais intensamente explorado (CETESB, 2006).

5.2 Rodoanel

A construção do trecho sul do Rodoanel passará pelo município de Santo André cortando áreas protegidas e de grande importância ambiental, incluindo uma de proteção integral, o Parque Natural Municipal do Pedroso **FIG. 9.** Os impactos locais do Rodoanel são de competência municipal e fazem parte das atribuições e responsabilidades dos órgãos gestores de meio ambiente municipais. O parecer técnico ambiental, coordenado pelo SEMASA (Serviço Municipal de Saneamento Ambiental), órgão gestor da política ambiental em Santo André, aponta que o EIA-RIMA (relatório de impacto ambiental elaborado pelo Dersa) subdimensiona o número de imóveis que serão desapropriados, bem como os impactos ambientais (SEMASA, 2009).

Os bairros afetados pela obra do rodoanel em Santo André são Recreio da Borda do Campo, Parques Miami e Riviera e Núcleo Pintassilgo, sendo este último localizado na área ambientalmente mais sensível, de proteção aos mananciais, onde vivem hoje cerca de 1.200 famílias.

FIGURA 9. Foto Aérea da localização da Represa do Parque do Pedroso e a área da obra do Rodoanel no município de Santo André, SP, com demarcação da abrangência da Pintassilgo (SEMASA, 2009; Google Earth, 2009).

A forma de avaliação dos impactos no EIA – RIMA foi elaborada para o trecho sul como um todo e não individualizada por município, o que no caso particular de Santo André, resultou em um subdimensionamento desses impactos, bem como das medidas compensatórias e mitigadoras cabíveis, principalmente considerando o fato de o município abrigar a única unidade de conservação afetada diretamente pela obra. Com relação aos impactos ambientais, o traçado considerado viável atinge pequenos trechos do Parque do Pedroso, na sua periferia, no limite com a represa Billings, estabelecendo-se a rodovia como barreira entre os fragmentos remanescentes e as demais áreas da unidade. De acordo com a proposta apresentada no EIA sugere uma compensação na proporção de 1 para 2 de área a ser replantada. Como o município não dispõe de área para replantio, perde-se um total de 141 hectares de área florestada por

compensação ambiental de supressão de vegetação em área de unidade de conservação e entorno imediato (SEMASA, 2009).

As obras para a implantação do trecho sul do Rodoanel podem trazer melhorias para as quatro cidades do ABC por onde o anel viário estadual passará. Porém, o futuro aumento no trânsito da região também poderá trazer danos à saúde da Represa do Parque Pedroso.

6 TÉCNICA ANALÍTICA

6.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Cromatografia pode ser conceituada como um método físico-químico de separação, em que os componentes da amostra a serem separados são particionados entre duas fases: a fase estacionária, fixa e de grande área superficial; e a fase móvel, um fluido insolúvel que elui através da fase estacionária.

Com aproximadamente 95 anos de existência, a cromatografia tem se mostrado uma técnica de suma importância para análise de compostos com as mais variadas estruturas e propriedades físicas. Dentre os diversos métodos cromatográficos, a cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE ou HPLC (*High performance liquid chromatography*) se desenvolveu e evoluiu rapidamente desde a década de 70. Esta técnica analítica é utilizada em diversas aplicações, especialmente na determinação de compostos orgânicos em amostras ambientais. Por meio da técnica HPLC é possível realizar separações e análises quantitativas de uma grande quantidade de compostos em poucos minutos, com alta resolução, eficiência e sensibilidade (Collins & Braga, 1997; Lebre, 2000).

6.2 O Processo Cromatográfico em HPLC

O princípio da determinação de compostos por HPLC consiste, basicamente, em diluir a mistura, contendo os compostos a serem analisados, em um solvente apropriado e introduzi-los, através de válvulas injetoras, na entrada da coluna cromatográfica. Esta mistura é distribuída na coluna (fase estacionária) por um fluxo contínuo da fase móvel (também chamada de eluente), que é bombeada por meio de bombas peristálticas. A separação dos compostos é realizada por pequenas partículas adsorventes (que confere a alta resolução) de grande área superficial (fase estacionária) contidas na coluna. Os compostos da amostra ficam retidos na fase estacionária, e conforme a escolha adequada do

eluente e da coluna, terão diferentes velocidades de migração por esta. O mecanismo de separação efetua-se de acordo com a natureza da fase móvel, fase estacionária e a natureza dos constituintes analisados. A fase móvel sai da coluna e passa por um sistema de detecção, proporcionando um registro contínuo da composição do eluente. A este registro contínuo do eluente é obtido um gráfico, chamado cromatograma, que relaciona o tempo de retenção e o sinal do detector, registrando um pico que indica a presença, ou não de um composto. A quantificação dos cromatogramas é feita de acordo com a intensidade do pico registrado e sua área, o software calcula a concentração do composto na amostra, levando em consideração o volume injetado e a curva analítica (Collins & Braga, 1997; Lebre, 2000).

6.3 Natureza da Fase Móvel

A separação perfeita de misturas, empregando a cromatografia líquida dependerá de uma fase móvel correta acoplada a uma fase estacionária conveniente. A escolha da composição da fase móvel (solventes) leva em conta um número considerável de fatores que satisfaçam os requisitos necessários para o manuseio seguro, eficiente e econômico.

Os fatores essenciais que a fase móvel necessita apresentar são os seguintes: (a) propriedades físico-químicas que não comprometam a solubilidade, a adsorção e a partição, afetando a separação; (b) propriedades físicas que não afetem a capacidade de detecção; (c) propriedades físicas que não dificultem o manuseio das bombas, dos detectores e das colunas; (d) propriedades que não impliquem na segurança como a toxicidade e inflamabilidade; (e) alto grau de pureza ou de fácil purificação; (f) capacidade de dissolver a amostra, porém sem decompor os seus componentes, para que ela possa ser transportada através da coluna; (g) não decompor ou dissolver a fase estacionária; (h) ter baixa viscosidade, visto que esta influi no efeito de transferência de massa entre a fase estacionária e a fase móvel e na intensidade da vazão; (i) ser compatível com o tipo de detector utilizado; e (j) ter polaridade adequada para permitir uma separação conveniente dos componentes da amostra (Ciola, 2006).

Neste trabalho o processo de eluição foi realizado por gradiente, no qual a composição da fase móvel é variada progressivamente para aumentar a força eluente do solvente. A fase móvel utilizada para separação adequada dos 14 HPAs foi a combinação dos solventes acetonitrila e água, uma vez que atende a todos os critérios mencionados acima, além de proporcionar uma gama de interações dipolares ou de ligações de hidrogênio com solutos suficientes para separar um amplo número de compostos na cromatografia em fase reversa.

6.4 Natureza da Fase Estacionária

A escolha da fase estacionária se faz em virtude da natureza dos compostos a serem analisados. Há cinco tipos diferentes de fases estacionárias, que implicam em cinco mecanismos diferentes de separação por cromatografia líquida de alta eficiência e, apenas com a troca de coluna e de fase móvel é possível utilizar cada um deles. Ao utilizar uma fase móvel orgânica é recomendável a cromatografia líquido-sólido ou por adsorção e a cromatografia por exclusão. Na opção da fase móvel aquosa ou hidroorgânica é aconselhável o uso da cromatografia de troca íons e a cromatografia líquida com fase ligada (fase reversa). No caso da cromatografia líquido-líquido ou por partição a alternativa pode ser para ambas as fases (Collins & Braga, 1997; Leite, 2008).

O material mais empregado como fase estacionária na cromatografia líquida são as partículas microporosas de sílica da ordem de 0,5 a 0,6 cm³/g, altamente puras e esféricas, que são permeáveis ao solvente e possuem uma área superficial com variação entre 1 a 800 m²/g. A sílica gel, comumente classificada como um óxido de silício é um sólido amorfo (não apresenta estrutura cristalina). Sua estrutura contém grupos siloxonas (OSiO) e grupos silanol (SiOH). Sob o ponto de vista cromatográfico, os grupos silanol são os mais importantes, em razão de sua polaridade, facilidade de fazer ligações de hidrogênio e capacidade de induzir dipolos em outras moléculas (Ciola, 2006).

As fases estacionárias não polares são, as mais importantes na atualidade em HPLC. Os principais grupos não polares ou pouco polares ligados à sílica são: Octila (-C₈H₁₇), Octadecila (-C₁₈H₃₇) e Fenila (-C₆H₅-Ø). Nesta

dissertação o processo de eluição foi realizado por cromatografia com fase reversa e a fase estacionária octadecisilano (ODS) recomendada para materiais não polares ou moderadamente polares, tais como ácidos graxos, glicerídeos, ésteres, esteróides, aminoácidos e HPAs (Ciola, 2006).

A cromatografia com fase reversa é o método mais comum em HPLC, na qual a fase estacionária é apolar ou fracamente polar e o solvente (fase móvel) é mais polar. Nesta técnica as moléculas do solvente competem com as moléculas do soluto para se ligarem aos sítios presentes na fase estacionária. Quanto maior a força do eluente, mais facilmente ele deslocará o soluto. Este processo elimina os picos com cauda, porque a fase estacionária possui poucos sítios que podem adsorver fortemente um soluto que causa a cauda (Harris, 2005).

6.5 Extração em Fase Sólida (SPE)

Um grande número de análises cromatográficas que envolvem amostras ambientais complexas requer várias etapas antes da medida da concentração do analito de interesse em um instrumento. Por exemplo: extração; eliminação de impurezas (*clean-up*); concentração; ajuste das condições (pH); ajuste da concentração e volume.

A etapa de eliminação de impurezas (*clean-up*) é primordial para eliminar substâncias procedentes da matriz presente no extrato, as quais podem interferir no método analítico. O fato é se caso a impureza não for eliminada, o resultado obtido será falso, uma vez que expressará a soma da absorção do analito de interesse com a absorção do interferente. No caso de análises cromatográficas o *clean-up* previne a ação de contaminantes da matriz que possam co-eluir com o analito, garante a longevidade das colunas e evita constantes limpezas no sistema de injeção.

Há pouco tempo a extração líquido-líquido (LLE) era a técnica analítica mais empregada no preparo de amostras complexas para análise. Mas pelos grandes volumes de solventes orgânicos utilizados, custo elevado, difícil

automação, baixa repetitividade e reprodutibilidade e em decorrência as várias etapas envolvendo o analito de interesse se tornou um procedimento tedioso. Em meados da década de 1970, visando eliminar essas dificuldades a extração em fase sólida (SPE) foi introduzida (Lanças, 2004b).

A SPE é uma técnica de separação líquido-sólido fundamentada nos mecanismos de separação da cromatografia líquida de baixa pressão. Na prática emprega-se uma pequena coluna aberta, denominada cartucho de extração com fase estacionária. A solução contendo o analito de interesse é colocada no topo do cartucho e aspirada com pequeno vácuo de forma a percolar pelo cartucho. Após a eluição do extrato o analito de interesse é retido no cartucho e eluído com um pequeno volume de solvente, de modo a coletar o analito em concentração já apropriada para análise.

Dentre os principais modos de operação em SPE destacam-se:

- a) Concentração do(s) analito(s):** Passa-se através do cartucho um grande volume de amostra a fim de aprisionar exclusivamente o analito, deixando passar o solvente e os interferentes. Posteriormente, elui-se o analito de interesse com pequena quantidade de solvente, já bem mais concentrado que na amostra original. Um exemplo da aplicação deste procedimento é em amostras ambientais, em que o analito encontra-se extremamente diluído.
- b) Isolamento do(s) analito(s):** O objetivo principal é isolar o analito de interesse dos interferentes da matriz. A amostra original pode já ser concentrada o suficiente para a análise por uma técnica apropriada, mas os constituintes da matriz poderão interferir no processo de análise. Por exemplo, em análises com matriz muito complexa, na qual se deseja isolar apenas uma substância dentro de vários compostos químicos presentes. Vale ressaltar que os procedimentos a e b podem ser efetuados em um mesmo procedimento de extração em SPE.
- c) Isolamento da Matriz:** Neste procedimento o analito de interesse é coletado em um frasco para a análise livre dos interferentes que são retidos no

cartucho. Este procedimento não é utilizado para concentração de amostras, mas apenas para *clean-up*.

d) Armazenamento da amostra: Empregado para análise de amostras localizadas a grandes distâncias do laboratório. Neste caso os cartuchos são levados até o local de estudo e utiliza-se o procedimento de concentração do analitos descrita acima. Após essa etapa, o cartucho contendo o analito de interesse é armazenado a aproximadamente 4°C e transportado ao laboratório. A vantagem deste procedimento é evitar o transporte de grandes volumes de amostra quando há necessidade de várias análises, bem como na análise de compostos voláteis e preservação do(s) analito(s) de interesse (Lanças, 2004b).

A **FIG.10** apresenta as principais etapas envolvidas na SPE para isolar um ou mais compostos presentes em uma amostra complexa.

FIGURA 10. Desenho esquemático da extração em cartuchos SPE.

Etapas da extração por SPE:

- 1. Condicionamento do Cartucho:** esta etapa destina-se a ativar o material existente dentro do cartucho com solvente apropriado de acordo com o material a ser ativado. O cuidado é não deixar que o material contido no cartucho seque, a secagem do cartucho pode formar caminhos preferenciais comprometendo a separação.
- 2. Percolação:** nesta etapa o extrato ou amostra de interesse é percolado através do cartucho com volume definido para que os resultados obtidos

sejam reprodutíveis. Idealmente a velocidade de aplicação deve ser lenta, com fluxo inferior a $2\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Para pequenos volumes de amostras o processo pode ser realizado somente com o auxílio da gravidade.

3. **Clean-up:** esta etapa visa eliminar os interferentes cujo solvente não tenha força suficiente para extrair o analito de interesse da fase estacionária. O solvente ideal é o que pertence à própria amostra, desde que ele não remova também o analito de interesse.
4. **Dessorção:** nesta etapa a escolha do eluente é fundamental, uma vez que ele deve eluir um ou mais analitos de interesse, mas não permitir a eluição de interferentes que por estarem muito retidos na fase estacionária não foi eliminado na etapa de *clean-up*. O solvente de eluição deverá ter maior força de eluição que o solvente usado para *clean-up*.

Mecanismos de separação envolvidos:

As fases sólidas aplicadas em SPE são similares as utilizadas em cromatografia líquida em coluna, bem como os mecanismos de separação. A escolha da fase estacionária apropriada depende da natureza do analito de interesse e da matriz na qual ele se encontra. Os principais mecanismos atualmente utilizados em SPE são: a) adsorção; b) partição (fase normal e reversa); c) troca iônica; d) exclusão por tamanho. Esses mecanismos estão ligados a processos físico-químicos que agem durante a separação, tais como: forças iônicas, ligações de hidrogênio e as interações do tipo dipolos.

7 VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA

Sempre que em análises químicas os resultados são baseados em dados quantitativos, é importante verificar a qualidade dos resultados, ou seja, o quanto há de confiabilidade neles para cada propósito pretendido. Na química instrumental, tem-se dado grande ênfase na precisão de resultados obtidos por meio de um método específico, mais do que por sua rastreabilidade a um padrão definido ou unidade do sistema internacional (SI). Contudo, existe atualmente uma exigência formal para se estabelecer confiança nos resultados, é fundamental que o resultado de uma análise química seja rastreável a uma referência definida tal como uma unidade do SI, um material de referência ou, quando aplicável, um método definido ou empírico (Lanças, 2004a; Leite, 2008; INMETRO, 2003;2008). Assim é necessário que a qualidade das medições químicas seja demonstrada por meios rastreáveis e comparáveis. Isso permite que, ao final de uma análise química, os resultados possam atender, por exemplo, às exigências das regulamentações nacionais e internacionais em que a premissa seja valores de análises confiáveis. Dessa forma, para garantir informações seguras e confiáveis, neste trabalho foi realizada uma avaliação denominada validação de ensaio químico (Furusawa, 2007).

Todo e qualquer processo de validação consiste em realizar uma série de ensaios analíticos e estudos estatísticos e comparar o resultados com critérios pré-estabelecidos. No presente estudo, o procedimento de validação foi dirigido conforme o documento do INMETRO DOQ-CGCRE-008 de 2003 e incluiu os seguintes parâmetros de desempenho: Especificidade/Seletividade, Faixa de Trabalho e Faixa Linear de Trabalho, Linearidade, Sensibilidade, Limite de Detecção, Limite de Quantificação, Exatidão, Precisão e Robustez.

7.1 Seletividade/Especificidade

A seletividade corresponde à capacidade de um método em determinar o analito de modo inequívoco na presença de outras substâncias capazes de

interferirem na determinação. O termo seletividade às vezes é empregado como sinônimo de especificidade, causando confusão desnecessária, tal situação pode ser evitada utilizando apenas o termo seletividade, como sugerido pela IUPAC (Ribani, 2004). O termo *específico* refere-se a um método instrumental de separação que produz uma resposta para um único analito, enquanto o termo *seletivo* refere-se a um método que fornece resposta para vários compostos químicos.

7.2 Faixa linear e faixa linear de trabalho

Para qualquer método quantitativo há um intervalo de concentrações do analito ou valores de propriedade no qual o método pode ser aplicado, denominada faixa de trabalho. Dentro da faixa de trabalho pode existir uma faixa de resposta com comportamento linear, desse modo a resposta do sinal terá uma relação linear com o analito ou valor da propriedade dentro. Mas é importante ressaltar que dentro da faixa de trabalho o limite inferior e superior são duas condições que exigem atenção, no caso do limite inferior, os fatores limitantes são os valores de limites de detecção e quantificação. No limite superior, os fatores limitantes dependem do sistema de resposta do equipamento de medição.

A faixa linear de trabalho de um método é o intervalo entre os níveis de menor e maior concentração do analito no qual, submetido as condições estabelecidas para o ensaio inclusive linearidade, é realizada a medição com precisão e exatidão. Esse intervalo deve compreender a faixa de aplicação para o qual o ensaio vai ser realizado (efeitos toxicológicos, atendimento à legislação, condições de segurança do trabalho, impacto ambiental, entre outros). Em casos que as concentrações de interesse e determinadas são muito baixas, é necessário demonstrar que os valores medidos próximos ao limite inferior sejam diferentes dos valores dos brancos analisados (INMETRO, 2003).

7.3 Linearidade

A Linearidade representa a capacidade de um método analítico responder com sinais analíticos diretamente proporcionais a menor e a maior

concentração do analito em um intervalo de concentração apropriado. Na prática, a linearidade é determinada por meio de gráficos que expressam a correlação linear entre o sinal medido e a concentração da espécie. Esses gráficos são denominados “curva analítica” em que o eixo horizontal representa as concentrações do analito e o eixo vertical, ao sinal do detector para cada concentração. O número mínimo de pontos geralmente aceito na curva analítica é 5 pontos. Essas concentrações devem ser selecionadas de forma a contemplar uma faixa desde 50% até 150% do valor que se espera encontrar na amostra de estudo.

A relação matemática utilizada para o cálculo da concentração dos analitos pode ser obtida usando o modelo conhecido como regressão linear, determinada pelo método dos mínimos quadrados, e é descrita pela equação da reta (equação 1).

$$y = ax + b \quad (\text{equação 1})$$

onde:

y = resposta medida ou sinal analítico (altura ou área do pico), variável dependente

x = concentração do analito, variável independente

a = inclinação da curva analítica (coeficiente angular)

b = interseção da curva com a ordenada, quando $x = 0$ (coeficiente linear)

O princípio do ajustamento linear pelo método dos mínimos quadrados é obter matematicamente uma curva em que a soma dos quadrados dos resíduos seja mínima. Esses resíduos são obtidos pela diferença entre os dados originais e a curva proposta.

Uma vez que as medições estão sujeitas a variações, é possível realizar estimativas em relação aos pontos duvidosos, por meio do cálculo de t, utilizando a equação 2:

$$t_{\text{calculado}} = \frac{\text{resíduo}}{s_r / \sqrt{n}} \quad (\text{equação 2})$$

onde:

resíduo = $|x_{\text{medido}} - x_{\text{calculado}}|$

S_r = desvio padrão dos resíduos

n = número de pontos da curva

Para cada ponto da curva ou somente para os duvidosos, o valor de $t_{\text{calculado}}$ sendo menor ou igual ao valor de $t_{\text{unilateral}}$ com $(n - 1)$ graus de liberdade, considera-se que o ponto faz parte da curva, no intervalo de confiança desejado, e a faixa até ele é linear (INMETRO, 2003).

Uma boa estimativa da qualidade da curva é a avaliação do coeficiente de determinação (r^2), que quanto mais próximo do valor 1, indica menor dispersão dos valores da curva analítica em relação aos valores esperados do comportamento linear. A recomendação do INMETRO para o coeficiente de determinação é de valores acima de 0,90, já a ANVISA recomenda valores, no mínimo, superiores a 0,99 (Ribani et al., 2004; INMETRO, 2003).

A escolha da regressão pelo modelo linear e a verificação do ajuste em virtude dos valores experimentais da curva podem ser avaliados pela análise da variância (*Analysis Of Variance*, ANOVA). Calcula-se a porcentagem máxima de variação explicável para os dados experimentais e a porcentagem de variação explicada (r^2). A partir do teste F, verifica-se se a regressão é significativa e se há evidência de falta de ajuste ao modelo linear obtido (Barros Neto et al., 1996).

7.4 Limite de detecção e quantificação

O limite de detecção (LD) é a menor concentração do analito que pode ser detectada com certo limite de confiabilidade utilizando um determinado procedimento experimental. É o resultado único e simples que, associado a uma probabilidade, pode ser distinguido do valor de um branco adequado. Essa informação fornece base para a confiabilidade em relação aos resultados falso

positivo ou falso negativo. Para fins práticos, o limite de detecção com 95% ou 99% de confiança atende à maior parte das aplicações.

O limite de quantificação (LQ) representa a quantidade mínima do analito que pode ser quantificada com um nível aceitável de exatidão e precisão utilizando um determinado experimento. Na maioria das vezes, o LQ é determinado como sendo o ponto de menor concentração da curva analítica, excluindo-se o branco.

7.5 Exatidão

A exatidão expressa a concordância entre o resultado encontrado e o valor aceito como verdadeiro. A exatidão está relacionada com a veracidade das medidas e pode ser verificada por processos distintos como a utilização de material certificado, técnicas adequadas de calibração, comparação entre métodos analíticos, adição padrão, e o processo mais utilizado que é o ensaio de recuperação.

7.6 Precisão

A precisão é a expressão da dispersão dos resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões sob condições determinadas (INMETRO, 2003). Normalmente, a precisão é avaliada em termos de desvio – padrão (DP) e desvio padrão relativo (DPR), conhecido como coeficiente de variação, e expressa pela equação 3.

$$CV\% = \left(\frac{s}{\bar{x}} \right) \times 100 \quad (\text{equação 3})$$

onde:

$\bar{x}$ = média aritmética das medições;

s = desvio padrão das medições;

Nos processos de validação de métodos analíticos de resíduos e impurezas a taxa aceitável de DPR é de até 20%, dependendo da complexidade da amostra (Ribani et al., 2004).

Os valores de precisão podem ser determinados levando-se em consideração procedimentos como a repetitividade, precisão intermediária e a reprodutibilidade.

Repetitividade: representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas de uma mesma amostra sob as mesmas condições de medição: mesmo procedimento, mesmo analista, mesmo local, mesmo instrumento sob as mesmas condições e repetições sob curto espaço de tempo.

Precisão intermediária: representa a precisão sobre a mesma amostra quando um método é aplicado várias vezes pelo mesmo laboratório, porém variando condições como analistas, equipamento e tempos diferentes.

Reprodutibilidade: representa a concordância entre os resultados interlaboratoriais de uma mesma amostra sob condições variadas, além do local, analista, equipamento, etc.

7.7 Robustez

A robustez é a medida da capacidade de um método de não sofrer alterações em efeitos de pequenas variações realizadas nos parâmetros do método como: composição da fase móvel, colunas de diferentes fabricantes, alteração de temperatura, entre outros. A robustez deve ser incluída em um procedimento de validação uma vez que ela mede a confiabilidade do método em condições normais de operação, permitindo fixar as tolerâncias dos fatores do método. A influência dos fatores na resposta da análise pode ser verificada individual ou simultaneamente.

Para determinação de robustez podem ser aplicados testes, como o de *Youden*, sugerido pelo INMETRO (2003), que permite avaliar a robustez do método e também ordenar a influência de cada variação no resultado final.

7.8 Recuperação

Para realizar o estudo de recuperação pode-se fazer uma na fortificação (*spike*) da amostra com concentração conhecida da solução padrão dos compostos estudados. Normalmente é feito em três níveis diferentes, próximo ao limite de detecção, próximo à concentração máxima permissível e em uma concentração intermediária ao intervalo estimado. A limitação deste procedimento é a de que o analito adicionado não está necessariamente na mesma forma que na amostra. A presença de analitos adicionados em uma forma mais facilmente detectável pode ocasionar avaliações excessivamente otimistas da recuperação (INMETRO, 2003). O cálculo da recuperação do analito foi realizado de acordo com a equação 4.

$$R(\%) = \left(\frac{C_1 - C_2}{C_3} \right) \times 100 \quad (\text{equação 4})$$

onde:

C_1 é a concentração determinada na amostra com adição de padrão;

C_2 é a concentração determinada na amostra;

C_3 é a concentração do padrão adicionado;

Na maior parte dos procedimentos analíticos de validação, recuperações dentro da faixa 70% a 120% são aceitas (Lanças, 2004a).

7.9 Incerteza da medição

Na química analítica, minimizar os erros peculiares às medições por meio da declaração da estimativa de incerteza é pré-requisito fundamental à qualidade laboratorial, uma vez que são inúmeros os fatores que podem afetar o resultado de uma medição.

A incerteza de medição, segundo a definição do Guia Eurachem é: “*Um parâmetro associado ao resultado de uma medição, caracteriza a dispersão que poderiam ser razoavelmente atribuídas ao mensurando*” (Guia Eurachem, 2002).

O parâmetro pode ser um desvio padrão ou um múltiplo dele proveniente de várias fontes possíveis como: pureza de padrões, amostragem, efeito matriz, interferentes, condições ambientais, incertezas das massas e equipamentos volumétricos, valores de referência, aproximações atribuídas ao método ou à medição e variação aleatória (Guia Eurachem, 2002; Eurachem, 2000).

Na estimativa da incerteza total quando o componente de incerteza é expresso como desvio padrão, ele é designado de **Incerteza Padronizada - $u(x_i)$** . Para o resultado de y de uma medição, que é obtido por meio de outros valores de outras grandezas, a incerteza total é denominada **Incerteza Padronizada Combinada - $u_c(y)$** , que é um desvio padrão estimado igual à raiz quadrada positiva da variância total, obtida pela combinação de todos os componentes da incerteza. **A Incerteza Expandida – U** é o componente que fornece um intervalo mais provável, com alto nível de confiança, que esteja o valor do mensurando. **U** é obtido multiplicando-se $u_c(y)$ por um **Fator de Abrangência – k** , que é baseado no nível de confiança desejado, por exemplo, 2 se o nível de confiança for de 95% (Guia Eurachem, 2002).

7.9.1 Diagrama de Causa e Efeito (Espinha de Peixe ou Ishikawa)

O diagrama de causa e efeito é utilizado para identificar as principais fontes de incertezas e, por meio de sua avaliação, é possível simplificar esses cálculos, agrupando as incertezas de forma a considerar que todas as fontes sejam envolvidas no cálculo (INMETRO, 2000).

Na **FIG.11** é apresentado o Diagrama de Causa e Efeito para a metodologia proposta.

FIGURA 11. Diagrama de Causa e Efeito da metodologia analítica para determinação de HPAs em sedimentos.

As fontes de incerteza identificadas foram as associadas à curva analítica, ao fator de recuperação do analito, à massa inicial da amostra e ao volume final da solução. Sendo que as fontes envolvidas no cálculo da incerteza da curva analítica são a preparação da solução padrão e as diluições das soluções e as incertezas associadas à área de resposta de cada analito.

7.9.2 Incerteza associada à massa de sedimento e ao volume final

Associado à massa de sedimento inicialmente pesada, $\mu(m_{amostra})$, temos a incerteza da balança, do peso padrão e de repetitividade na faixa estabelecida (0,5000g), de acordo com a equação 5.

$$\mu_{\text{Massa}} \sqrt{(\mu_{\text{repe}})^2 + (\mu_{\text{peso_padrão}})^2 + (\mu_{\Delta t})^2 + (\mu_{\text{calibração_bal.}})^2} \quad (\text{equação 5})$$

Em relação ao volume final da amostra, $\mu(v_{amostra})$, consideram-se as incertezas referentes ao balão volumétrico de 2mL, isto é, as incertezas associadas à informação do fabricante, repetições, variação de temperatura e coeficiente de dilatação do vidro de acordo com a equação 6.

$$\mu_{\text{Volume}} \sqrt{(\mu_{\text{repe}})^2 + (\mu_{\text{declaração_fabric}})^2 + (\mu_{\Delta t})^2 + (\mu_{\text{coef._dilatação}})^2} \quad (\text{equação 6})$$

7.9.3 Incerteza associada à recuperação

A incerteza associada à recuperação, $\mu(R)$, para os estudos de acordo com o procedimento estabelecido é calculada de acordo com a equação 7.

$$\mu(R) = R \sqrt{\left(\frac{\mu(C_{\text{Real}})}{C_{\text{Real}}}\right)^2 + \left(\frac{\mu(C_{\text{obtida}})}{C_{\text{obtida}}}\right)^2} \quad (\text{equação 7})$$

onde:

R = valor de recuperação;

$\mu(C_{\text{real}})$ = incerteza da solução padrão adicionada;

C_{real} = concentração real adicionada;

$\mu(C_{\text{obtida}})$ = incerteza da concentração obtida;

C_{obtida} = concentração obtida;

A incerteza da concentração obtida, $\mu(C_{\text{obtida}})$, é calculada pela equação 8.

$$\mu(C_{\text{obtida}}) = \frac{S_{\text{rec}}}{\sqrt{n}} \quad (\text{equação 8})$$

onde:

S_{rec} = desvio padrão dos ensaios de recuperação;

n = numero de ensaios de recuperação;

7.9.4 Incerteza associada à curva analítica

Para a o cálculo das incertezas associadas à da curva analítica, (μ_{curva}), deve-se considerar as incertezas associadas à preparação da solução padrão, diluições para preparação das soluções de trabalho e as incertezas associadas às respostas do equipamento (áreas).

São muitas as formas para estimar a incerteza padrão da curva analítica em um ponto determinado. A rede metrológica indica que a forma mais adequada de estimar a incerteza padrão da curva de regressão em determinado ponto é considerando a correlação entre os coeficientes a e b da reta (RM 68, 2009).

Nesta dissertação, a incerteza associada à curva de calibração foi estimada utilizando uma planilha de cálculos adaptada do ISO GUM Uncertainty in Chemistry (2009).

7.9.4.1. Incertezas associadas à solução padrão

As fontes de incerteza envolvidas no cálculo da incerteza para preparação da solução padrão são a massa, pureza do padrão e volume do balão, conforme diagrama da **FIG. 11**.

Associado à massa, temos a incerteza da balança, do peso padrão e de repetitividade, de acordo com a equação 9.

$$\mu_{\text{MassaPadrão}} \sqrt{(\mu_{\text{repe}})^2 + (\mu_{\text{peso_padrão}})^2 + (\mu_{\Delta})^2 + (\mu_{\text{calibração_bal.}})^2} \text{ (equação 9)}$$

Em relação ao volume do balão volumétrico, são consideradas as incertezas associadas à informação do fabricante, repetições, variação de temperatura e coeficiente de dilatação do vidro, de acordo com a equação 10.

$$\mu_{\text{Vol.Balão}} \sqrt{(\mu_{\text{repe}})^2 + (\mu_{\text{fabricante}})^2 + (\mu_{\Delta t})^2 + (\mu_{\text{coef.dilatação}})^2} \text{ (equação 10)}$$

Para a incerteza combinada da preparação da solução padrão teremos a equação 11.

$$\mu_{\text{Padrão}} \sqrt{(\mu_{\text{Massa do Padrão}})^2 + (\mu_{\text{Volume do Balão}})^2 + (\mu_{\text{Pureza do Padrão}})^2} \text{ (equação 11)}$$

7.9.4.2. Incertezas associadas à preparação das soluções de trabalho

Para a o cálculo das incertezas associadas à diluição para preparação das soluções de trabalho, as fontes de incerteza envolvidas são o volume da pipeta e o volume dos balões. Em ambos é necessário considerar informação do fabricante, repetições, variação de temperatura e coeficiente de dilatação.

Para a incerteza combinada da preparação das soluções de trabalho é necessário considerar as incertezas de cada uma das diluições.

7.9.4.3. Incerteza associada à resposta do equipamento (área)

No cálculo da incerteza da área (resposta) dos cromatogramas, $\mu_{\text{área}}$, foi considerada a combinação das incertezas da repetitividade e as incertezas associadas ao equipamento. O cálculo foi realizado considerando-se 95% e uma distribuição retangular. Neste cálculo, subentende-se que estão considerados os erros do analista e do equipamento. Para o cálculo de propagação de incertezas associadas ao HPLC, foi considerada uma incerteza de 0,5% de acordo com o proposto por Hibbert et al. (2001).

A incerteza para a repetitividade de injeção no HPLC é calculada de acordo com a equação 12.

$$\mu_{\text{área}} = \frac{S}{\sqrt{n}} \quad (\text{equação 12})$$

onde:

S = desvio padrão das medições;

n = numero de injeções realizadas

7.9.5 Incerteza combinada e expandida

A incerteza combinada de todas as fontes envolvidas é calculada pela equação 13.

$$\mu_{c(C_{HPA})} = \sqrt{(\mu_{m_amostra})^2 + (\mu_{V_amostra})^2 + (\mu_R)^2 + (\mu_{curva})^2} \quad \text{uação 13}$$

onde:

$\mu_{m_amostra}$ = incerteza associada à massa da amostra;

$\mu_{V_amostra}$ = incerteza associada volume final da amostra;

μ_R = incerteza associada à recuperação;

μ_{curva} = incerteza associada à curva analítica;

A incerteza expandida do método, $\mu_{E(CHPA_s)}$, calculada pela equação 14.

$$\mu_{E(CHPA)} = k \cdot \mu_{c(CHPA)} \quad (\text{equação 14})$$

onde:

$\mu_{c(CHPA)}$ = incerteza combinada;

K = fator de abrangência;

8 PARTE EXPERIMENTAL

8.1 Equipamentos, Materiais e Métodos

8.1.1 Ultra-som e sistema de purificação de extratos.

Os hidrocarbonetos policíclicos foram extraídos com auxílio de um banho ultra-som, modelo USC-5000 da *Unique*, de 220V e frequência de 400MHz.

Para purificação dos extratos em colunas SPE foi montado o sistema de pré-concentração a vácuo desenvolvido nos laboratórios do Centro de Química e Meio Ambiente (Lebre, 2000). Foram utilizadas colunas de SPE C₁₈, da marca *Supelco*, com capacidade para 6mL, preenchidas com 500mg de octadecil polimericamente ligado.

8.1.2 Cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC).

Para a quantificação dos HPAs foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC) modelo LC 10Ai da *Shimadzu* com 2 bombas peristálticas de fluxo constante, programador de gradiente para dois solventes (acetonitrila e água purificada), um injetor *Rheodyne* 9725, com “loop” de 20µL, acoplado a um detector UV/visível SPD 10Ai da *Shimadzu* controlado pelo programa CLASS-LC10/M10, também da *Shimadzu*. Foi utilizada uma coluna de fase reversa *Supelcosil* (25cm x 4,6mm ID 5µm) da *Supelco*, recheada com C₁₈ (Octadecil), que resiste a pressões relativamente altas, resultando em maior estabilidade e eficiência para partículas pequenas.

8.1.3 Outros equipamentos.

Foram utilizados ainda os equipamentos descritos a seguir.

- Balança analítica da marca *Mettler*, modelo H16, com capacidade para 80g, de cinco casas decimais;
- Centrífuga microprocessada de bancada, marca Nova Técnica, modelo NT810, 3200rpm;
- Sistema de filtração da marca Sartorius, com capacidade para 100mL utilizando membranas filtrantes durapore PVDF e PTFE 25mm e 0,45µm (Millex™).
- Equipamento de Purificação de Água, modelo *EASypure* RF, marca *Barnstead*, para produção de água tipo 1 acima de 18MΩ;

8.2 Reagentes e Soluções

Foram estudados 14 HPAs: Naftaleno-(Np), Acenaftileno-(Acy), Fluoreno-(F), Fenantreno-(Ph), Antraceno-(Ant), Fluoranteno-(Fl), Pireno-(Py), Benzo[a]Antraceno-(B[a]An), Criseno-(Cry), Benzo[e]Acenaftileno-(B[e]Acy), Benzo[k]Fluoranteno-(B[k]Fl), Benzo[a]Pireno-(B[a]Py), Dibenzo[a,h]Antraceno-(B[a,h]An) e Indeno[1,2,3-c,d]Pireno-(I[1,2,3-c,d]Py), todos com certificado de pureza (>99%) e procedência Aldrich Chemical Co. O Mix de 1,0µg.mL⁻¹, utilizado como solução estoque, foi preparado em acetonitrila e H₂O (1:1) a partir das soluções individuais de 100µg.mL⁻¹, em acetonitrila, dos padrões analíticos dos HPAs estudados.

Todas as soluções padrões foram preparadas a partir da solução estoque e mantidas sob refrigeração e ao abrigo de luz. Os solventes empregados nos estudos de extração dos compostos foram: acetonitrila (ACN), acetona, tetrahidrofurano (THF), metanol e diclorometano (DCM), todos com alto grau de pureza (grau HPLC). A fase móvel utilizada no equipamento foi acetonitrila e água.

Foi utilizada ainda solução nitro sulfônica para descontaminação das vidrarias, e água tipo 1 para enxágüe das vidrarias e preparação das diluições.

8.3 Amostragem

Foram coletadas amostras de sedimento de cinco pontos eqüidistantes na Represa do Pedroso. Estes estão distribuídos de forma a contemplar pontos estratégicos, a jusante e a montante de locais onde existam possíveis riscos de degradação ambiental e áreas não impactadas, além do ponto de captação da SEMASA, para uma avaliação integral da região, de acordo com **FIG. 12**. As coordenadas geográficas desses pontos são:

- Ponto 1: S 23°43.770' ; W 46°29.860'
- Ponto 2: S 23°43.619' ; W 46°29.775'
- Ponto 3: S 23°43.544' ; W 46°29.738'
- Ponto 4: S 23°43.681' ; W 46°29.777'
- Ponto 5: S 23°43.287' ; W 46°29.836'

FIGURA 12: Localização dos pontos de coleta do sedimento na Represa do Parque Pedroso (SEMASA, 2009; Google Earth, 2009).

Em cada ponto selecionado foram coletados cerca de 500g de sedimento de superfície (0-40cm) utilizando-se uma draga do tipo *Ekman-Birge* (**FIG. 13** no detalhe), como pode ser observado na **FIG. 13**. Imediatamente após a coleta, as amostras foram armazenadas em frascos de vidro e mantidas sob a temperatura de 4°C ao abrigo de luz para posterior extração e análise dos hidrocarbonetos.

FIGURA 13: Draga sendo lançada para coleta do sedimento e, no detalhe a draga *Ekman-Birge*.

8.4 Preparo das Amostras

Em laboratório, as amostras foram secas à temperatura ambiente por dez dias, retirada possíveis pedras, fibras vegetais, quarteadas, amostradas, em seguida triturada manualmente em almofariz, homogeneizada e tomadas as alíquotas de 0,5000g cada (Sun et al., 1998).

Procedimento:

1. Pesou-se, com auxílio de balança analítica, uma alíquota de 0,5000g do sedimento, previamente seco (10 dias), em frasco de 100mL.

2. Adicionou-se uma concentração conhecida da mistura de padrões dos 14 HPAs nas amostras de sedimento, este foi armazenado por 24h para completa adsorção dos contaminantes ao sedimento, na ausência de luz.
3. Para a extração dos HPAs foi adicionado à amostra 10mL da mistura de solventes acetona e tetrahidrofurano, na proporção 1:1, em seguida, submetido ao banho de ultra-som por 3 horas;
4. O extrato foi centrifugado por 15 minutos a 2800rpm;
5. Ao sobrenadante adicionou-se H₂O purificada para se obter uma concentração da solução THF/acetona em torno de 40% de solvente em volume;
6. O extrato diluído foi submetido à extração em cartuchos SPE (conforme item 8.5);
7. O eluído foi seco em fluxo suave de N₂ e mantido em *vial* até a análise cromatográfica;
8. O resíduo foi retomado a 2mL da solução 50% ACN/H₂O, filtrado em membranas 0,45µm (Millex™) e injetado no HPLC para identificação e quantificação.

8.5 Purificação e Concentração das Amostras Pelo Método SPE

O detalhamento das etapas do procedimento utilizado para extração dos compostos HPAs em cartuchos SPE é descrito a seguir:

1. Condicionamento com 10mL de H₂O purificada e em seguida com 10mL da solução água purificada/Acetona 30% em volume, ficando cada uma inicialmente em contato com a coluna por cerca de 1 minuto;
2. Percolação do extrato pela coluna com fluxo de aproximadamente 3 a 4mL/min, sendo o eluído descartado;
3. *Clean-up* da coluna com 10mL de H₂O purificada, também deixando inicialmente por 1 minuto em contato com a coluna e depois deixado por 5 minutos secando a vácuo;
4. Centrifugação do cartucho por 25 minutos a 3.000 rpm para auxiliar na secagem;
5. Dessorção (extração) com 4mL (1mL x 4) da solução THF/Acetona (1:1).

8.6 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

Os HPAs foram eluídos em modo gradiente otimizado com fluxo de $1,5\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, utilizando-se como fase móvel uma água purificada como fase A e acetonitrila como fase B.

Gradiente: 0 a 5 minutos - 40% da fase A e 60% da fase B;

5 a 28 minutos - 100% da fase B;

Fluxo da fase móvel: $1,5\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$;

Pressão máxima: $150\text{kgf}\cdot\text{cm}^{-2}$;

Volume de injeção: $20\mu\text{L}$;

Detecção no ultravioleta: 254nm.

As diluições do padrão misto de $0,01\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; $0,03\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; $0,05\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; $0,06\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; $0,1\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; $0,2\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; $0,3\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; $0,4\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; $0,5\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; $0,6\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; $0,7\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; em Acetonitrila/ H_2O 50% foram utilizadas para definição das curvas de calibração em duas faixas de concentração. Para cada ponto da curva, as injeções foram realizadas em triplicata.

8.7 Ensaios para validação da metodologia

A validação da metodologia foi realizada por meio de procedimento baseado nas orientações do INMETRO, (INMETRO, 2003; 2007) utilizando-se uma planilha de validação de ensaios químicos (Furusawa, 2007). Porém, a fundamentação teórica de cada teste não é discutida aprofundadamente nesta dissertação por não ser o foco da mesma. A parte teórica dos mecanismos de validação e teoria dos cálculos estatísticos, na íntegra, poderá ser obtida nas referências apresentadas (Bussab et al., 1988; Bidlingmeyer, 1992; Lough & Wagner., 1995; Barros Neto et al., 1996; Vander Heyden et al., 2001; Zeaiter et al., 2004; Moore e McCabe, 2006; Furusawa, 2007).

A validação foi realizada após a separação e identificação de cada um dos compostos a ser quantificado e estabelecidas todas as condições de análise no equipamento. Pelo fato de não haver um sedimento-padrão, no caso dos

estudos realizados nesta dissertação, foi utilizado o sedimento coletado no ponto 5 por ocasião da primeira coleta em 19/05/2006, por ser considerado o mais limpo e livre da presença de interferentes nos tempos de retenção dos compostos estudados.

O procedimento de validação foi baseado em um programa de análises de soluções padrão e determinações em série de experimentos em número estatisticamente significativo ($n = 7$) com e sem matriz e estudos estatísticos dos resultados utilizando-se critérios pré-estabelecidos de acordo com a bibliografia utilizada (INMETRO, 2003; 2007; Furusawa, 2007).

Foram avaliados os parâmetros: seletividade, faixa de trabalho e faixa linear de trabalho, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão, precisão e robustez.

8.7.1 Seletividade

Para avaliação da seletividade, foram utilizadas diferentes metodologias. Inicialmente foi avaliado o cromatograma para verificação visual da separação dos compostos. Ainda no estudo dos cromatogramas, avaliaram-se os tempos de retenção e sua constância nas diferentes injeções.

Foram preparadas 8 soluções nas concentrações $0,01\mu\text{g.mL}^{-1}$; $0,1\mu\text{g.mL}^{-1}$; $0,2\mu\text{g.mL}^{-1}$; $0,3\mu\text{g.mL}^{-1}$; $0,4\mu\text{g.mL}^{-1}$; $0,5\mu\text{g.mL}^{-1}$; $0,6\mu\text{g.mL}^{-1}$ e $0,7\mu\text{g.mL}^{-1}$, em solvente e na matriz e obtidos os cromatogramas de cada uma das soluções.

Na inexistência de padrões ou materiais certificados como a matriz em questão, as determinações podem ser realizadas a partir de procedimentos de adição–padrão ou mesmo com curva analítica em matriz sintética caso sejam aceitáveis para a aplicação às diferenças obtidas (INMETRO, 2003).

Segundo o INMETRO (2003; 2007), quando a matriz sem o analito não estiver disponível, a seletividade pode ser testada comparando-se as inclinações das curvas de adição padrão. Se as inclinações destas duas curvas de regressão linear forem as mesmas, o único efeito de matriz presente é a interferência natural

causada pelo nível básico do analito. Neste caso, optou-se pela utilização de uma matriz natural, com a mesma composição da matriz a ser analisada, porém livre dos compostos de interesse.

Em seguida foram avaliados os resultados das replicatas, aplicando-se o teste F (*Snedecor*) de homogeneidade das variâncias nas medidas de adição padrão em dois grupos de soluções, sendo um somente com os solventes e o outro com a matriz, onde se calcula a variância. Os resultados para $n = 7$ e 95 % de confiança, foram comparados ao valor crítico $F_{6,6, 95\%} = 4,28$, obtidos pela aplicação da equação 15.

$$F = \frac{S_1^2}{S_2^2} \quad (\text{equação 15})$$

Onde S_1^2 e S_2^2 são as variâncias de cada solução, com a maior variância no numerador

Por esse teste, além de verificar a homogeneidade também se pode avaliar se a matriz interfere consistentemente na precisão das medidas considerando o intervalo de concentrações deste estudo. Se $F_{\text{calculado}} < F_{\text{tabelado}}$, os valores são homogêneos, logo a matriz não tem efeito sobre a precisão do método.

Utilizou-se o teste t, para verificar a significância das diferenças das médias dos dois grupos de soluções, com e sem matriz, comparando-os com o valor crítico $t_{12, 95\%} = 2,179$, obtidos segundo as equações 16 e 17. Para valores abaixo desse valor crítico, considera-se que as médias não apresentam diferenças significativas.

$$t_{\text{calculado}} = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{s^2 \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)}} \quad (\text{equação 16})$$

$$s^2 = \frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{(n_1 + n_2 - 2)} \quad (\text{equação 17})$$

onde:

$\bar{x}_1$ e $\bar{x}_2$ são as médias das respostas dos analitos nas soluções “com matriz e sem matriz na mesma faixa de concentração;

S^2 é a variâncias dos desvios padrão das soluções com e sem matriz;

n_1 e n_2 são os tamanhos das amostras com e sem matriz.

Foi utilizado também o teste de Inclinação e Paralelismo, de acordo com a equação 18, e o teste do Intercepto, de acordo com a equação 19.

No teste de paralelismo e inclinação, $t_{\text{calculado}}$ deve ser $< t_{\text{tabelado}}$ para que as inclinações sejam estatisticamente iguais, o cálculo é feito com auxílio da equação:

$$\bar{S}_{xy} = \sqrt{\frac{(n_1 - 2)S_{y1x1}^2 + (n_2 - 2)S_{y2x2}^2}{n_1 + n_2 - 4}} \quad (\text{equação 18})$$

onde:

$\bar{x}_1$ e $\bar{x}_2$ são as médias das respostas dos analitos nas soluções “com matriz e sem matriz na mesma faixa de concentração;

S^2 é a variâncias dos desvios padrão das soluções com e sem matriz;

n_1 e n_2 são os tamanhos das amostras com e sem matriz.

No teste do Intercepto, onde se verifica o valor de $t_{\text{calculado}}$ na intersecção do eixo y, o $t_{\text{calculado}}$ também deve ser menor que t_{tabelado} para que as curvas com e sem matriz tenham interceptos estatisticamente iguais, é dado pela equação:

$$t = \frac{a_1 - a_2}{\bar{S}_{xy} \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{\bar{x}_1^2}{\sum (x_{1i} - \bar{x}_1)^2} + \frac{1}{n_2} + \frac{\bar{x}_2^2}{\sum (x_{2i} - \bar{x}_2)^2}}} \quad (\text{equação 19})$$

onde:

$\bar{x}_1$ e $\bar{x}_2$ são as médias das respostas dos analitos nas soluções “com matriz e sem matriz na mesma faixa de concentração;

S^2 é a variâncias dos desvios padrão das soluções com e sem matriz;

n_1 e n_2 são os tamanhos das amostras com e sem matriz.

8.7.2 Faixa de trabalho e Linearidade

Para determinar a faixa de trabalho são necessários vários pontos de calibração, de preferência mais que seis. A relação da resposta do instrumento para a concentração não necessita ser perfeitamente linear para um método ser efetivo, embora nesse caso a curva analítica deva ser preparada diariamente.

A faixa de trabalho e a faixa linear podem ser diferentes para cada tipo de amostra, em consequência ao efeito das interferências provenientes da matriz.

No presente trabalho, foram utilizadas as 8 soluções nas concentrações em solvente e na matriz, citadas no item 8.7.1.

Para determinação da Faixa de Trabalho, foram traçadas as retas segundo a equação da reta para cada um dos grupos (com e sem matriz). Foram considerados os resíduos, de acordo com a equação 20 e depois obtido o r^2 .

$$r = \frac{\sum (x - \bar{x})(y - \bar{y})}{\sqrt{\sum (x - \bar{x})^2 \sum (y - \bar{y})^2}} \quad \text{equação 20}$$

onde:

x e y são os valores absolutos das respostas dos analitos nas soluções “com matriz e sem matriz na mesma faixa de concentração;

$\bar{x}$ e $\bar{y}$ são as médias das respostas dos analitos nas soluções “com matriz e sem matriz na mesma faixa de concentração;

A linearidade da curva analítica ou de adição padrão é demonstrada por meio do coeficiente de determinação (r^2), por meio do gráfico dos resíduos, por meio da análise dos resíduos (teste t) e por meio da análise de variância (ANOVA).

Os desvios da linearidade são muitas vezes difíceis de serem detectados visualmente, portanto foi utilizado o cálculo dos resíduos entre os valores medidos e os valores calculados a partir da equação de regressão. A Análise dos Resíduos foi realizada de acordo com a equação 21.

resíduo

$$t_{\text{calculado}} = \frac{\overline{s_r}}{\sqrt{n}} \quad (\text{equação 21})$$

onde:

$$\text{resíduo} = |x_{\text{medido}} - x_{\text{calculado}}|$$

sr = desvio padrão dos resíduos

n = número de pontos

8.7.3 Limite de detecção (LD)

O limite de detecção, menor concentração de cada analito que pode ser detectada com certo limite de confiabilidade, foi determinado pela variância (s^2) e o desvio padrão (s) das medições nas replicatas e calculo do LDM, segundo a equação 22.

$$LD = t_{(n-1, 1-\alpha)} \cdot (s) \quad (\text{equação 22})$$

onde:

LD = limite de detecção do método

$t_{(n-1, 1-\alpha)}$ = valor da abscissa t (*Student*) para $(1 - \alpha) \times 100\%$ nível de confiança e $(n-1)$ graus de liberdade

s = Desvio padrão das replicatas da solução em menor concentração com confiabilidade

8.7.4 Limite de quantificação (LQ)

Para determinação do limite de quantificação, foram realizados ensaios que de soluções branco da amostra com adição de concentrações variadas do analito, próximas ao LD. Com esse procedimento se pode determinar o Limite de Quantificação (LQ), que efetivamente equivale ao limite mais baixo da faixa de trabalho e expressar o LQ como a concentração mais baixa do analito que pode ser determinada com um nível aceitável de incerteza.

Neste trabalho foi considerado o limite de quantificação equivalente a 5 vezes o desvio padrão da concentração mais baixa para sete replicatas.

Esse branco tanto pode ser apenas água e os reagentes, como a matriz da amostra sem o analito de interesse. Para este estudo, foram utilizados ambos os brancos, apenas com os solventes e com a matriz.

8.7.5 Exatidão

A exatidão foi avaliada por meio da recuperação dos analitos, mediante a aplicação da metodologia desenvolvida, pelo Índice z (z score) e pela análise das variâncias.

8.7.6 Precisão

A precisão foi avaliada pela repetitividade com base nos resultados de ensaios realizados sucessivamente, considerando o mesmo procedimento de medição, pelo mesmo analista, utilizando os mesmos equipamentos, nas mesmas condições e realizando medidas em curto espaço de tempo. O grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo mensurando, foram avaliados utilizando a planilha de validação de análise química desenvolvida por Furusawa (2007).

Para gerar os dados, foram realizadas 7 repetições de 3 padrões diferentes em 7 dias diferentes, com e sem matriz, utilizando-se os padrões citados no item 8.2. Foi então realizado o cálculo do desvio padrão ou desvio padrão de repetitividade para cada concentração.

8.7.7 Robustez.

Para determinação de robustez foi aplicado o teste em que a robustez é igual ao planejamento fatorial de 7 variáveis com 8 experimentos (planejamento fracionário saturado) de acordo com a metodologia proposta por Vander Heyden et al. (2001) e utilizando a planilha elaborada por Furusawa (2007) a qual segue o procedimento INMETRO (2003). Neste planejamento os resultados são avaliados pela estimativa do erro da distribuição dos efeitos utilizando-se o algoritmo de *Dong* (pequenos experimentos), (Zeaiter et al., 2004; Vander Heyden et al., 2001).

Os parâmetros escolhidos para os testes de robustez são apresentados na **TAB. 6** e a programação escolhida referente ao planejamento fracionário saturado encontra-se na **TAB. 7**.

TABELA 6. Parâmetros selecionados para os testes de robustez.

Fator	Nominal	Variação
Massa, g	0,5	0,55
Tempo extração, min	180	160
ACN/H₂O, v/v	60/40	70/30
Velocidade de centrifugação (RPM)	2800	2500
Volume da mistura extratora, mL	10	15
Tempo Centrifugação, min	15	20
Diluição do eluente do SPE (% do solvente em H₂O)	40	30

TABELA 7. Planejamento fracionário saturado para avaliação da estimativa do erro da distribuição dos efeitos utilizando-se o algoritmo de *Dong* (pequenos experimentos).

Fator	Combinação de ensaios							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A ou a	A	A	A	A	a	a	a	a
B ou b	B	B	b	b	B	B	b	b
C ou c	C	c	C	c	C	c	C	c
D ou d	D	D	d	d	d	d	D	D
E ou e	E	e	E	e	e	E	e	E
F ou f	F	f	f	F	F	f	f	F
G ou g	G	g	g	G	g	G	G	g
Resultado	s	t	u	v	w	x	y	z

Os ensaios foram realizados de acordo com a programação na **TAB. 7**, considerando os parâmetros escolhidos de acordo com a **TAB. 6**. Cada um dos experimentos é injetado em 7 replicatas, e o cálculo dos efeitos é realizado com base nas médias obtidas nos resultados (s a z).

8.8 Recuperação

O estudo da recuperação foi realizado adicionando-se solução do padrão analítico dos 14 HPAs na matriz isenta do analito denominada testemunho (amostra de sedimento coletada no ponto 5 em 19/05/2006). Foram efetuadas as operações de acordo com o procedimento descrito no item 8.4 e o cálculo da recuperação do analito foi realizado segundo a equação 4 do item 7.8.

8.9 Análise granulométrica

Foram pesados 50g da amostra de sedimento e transferidos para um erlenmeyer de 500mL. Adicionou-se 250mL do dispersante (solução de 4g de NaOH e 10g de hexametáfosfato de sódio em 1L de H₂O) e agitou-se por 16h ininterruptas no *shaker* em 170rpm. Após agitação, a amostra foi transferida para

uma proveta de 1L e o volume completado com água. Com o auxílio de um êmbolo, agitou-se a solução lentamente por 1 minuto a fim de homogeneizá-la. Após 40s da agitação fez-se a primeira leitura com um densímetro de Boyoucos. Depois de 2h em repouso, fez-se a segunda leitura da densidade (EMBRAPA, 1995).

Foram calculadas as porcentagens de silte e argila:

$$\% \text{ argila} = \frac{\text{leitura 2h} - \text{leitura branco}}{50} \quad (\text{equação 23})$$

$$\% \text{ silte} = \frac{\text{leitura 40s} - \text{leitura branco} - (\text{leitura 2h} - \text{leitura branco})}{50} \quad (\text{equação 24})$$

$$\% \text{ areia} = 100\% - \% \text{ argila} - \% \text{ silte} \quad (\text{equação 25})$$

8.10 Determinação do Potencial hidrogeniônico (pH)

Foram pesados 10g de sedimento e transferidos para um tubo de centrífuga de 50mL. Adicionou-se 10mL de solução de KCl 1 molar para agitação no *shaker* por 30 minutos. Após esta agitação, centrifugou-se por 10 minutos a 2500rpm e separou-se o sobrenadante para leitura do pH (EMBRAPA, 1995).

8.11 Determinação dos HPAs em água

Foi medida uma alíquota de 1L de água, previamente filtrada, à qual foi adicionado co-solvente (acetona) na proporção de 40% em volume, em seguida percolada nos cartuchos, previamente condicionados com H₂O ultra-pura e em seguida uma mistura de Acet./H₂O 30/70 (v/v), em fluxo de 3 a 4mL/min, para concentração dos HPAs. Foi feito *clean-up* com água para eliminação de alguma impureza ainda retida do cartucho. Centrifugou-se o cartucho por 25 minutos a 3000rpm. Em seguida os compostos de interesse foram extraídos com uma mistura de THF/Acet. (50/50, v/v). O extrato foi seco em fluxo suave de N₂, retomado em 2mL de solução ACN/H₂O 50/50, filtrado em membrana de 0,45µm e analisado por HPLC, com detetor UV/visível, em λ=240nm, de acordo com o proposto por Brito et al. (2009).

9 RESULTADOS E DISCUSSÃO

9.1 Otimização da extração

9.1.1 Resultados do estudo para seleção do solvente

A escolha do solvente adequado para extração dos compostos HPAs pode ser determinante para uma boa recuperação dos mesmos. Os resultados de recuperação da mistura utilizada na metodologia comparada aos resultados obtidos com o uso do solvente indicado na maioria dos estudos encontrados na literatura (diclorometano) e os resultados com a mistura DCM/MeOH (1:1), mostraram uma maior eficiência na recuperação dos compostos HPAs em sistema ultra-som para a mistura THF/Acet (1:1) (Sun et al., 1998; Cavalcante et al., 2007).

Na **FIG. 14**, são apresentados os resultados de recuperação da mistura utilizada na metodologia comparada aos resultados obtidos com o uso do solvente indicado na maioria dos estudos encontrados na literatura (diclorometano) e os resultados com a mistura DCM/MeOH (1:1).

FIGURA 14: Eficiência na recuperação dos compostos HPAs em sistema ultra-som para os solventes estudados nas mesmas condições.

Os valores de recuperação dos compostos HPAs de baixa massa molecular (LHPAs), do Naftaleno ao Antraceno, variaram entre não detectado para Np a 33,87% para Ph quando a solução de DCM/MeOH (1:1) foi utilizada como solvente extrator. Quanto à solução de THF/Acet (1:1), a recuperação dos LHPAs ficou entre 12% para o Np e 81 % para o Ph. Quando foi utilizado apenas DCM a taxa de recuperação, variou de não detectado para Np a 73% para o An.

A baixa taxa de recuperação dos compostos de 2 ou 3 anéis, como o Naftaleno e o Acenaftileno, pode estar associada à facilidade de volatilização dos mesmos durante o processo de extração ou à perda durante a etapa de evaporação do solvente (Silva, 2006).

Para os compostos de alta massa molecular (HHPAs), do Fluoranteno ao Indeno, os valores de recuperação variaram de 20,59% para I[1,2,3-c]Py a 35,92% para B[a]An quando utilizada a solução de DCM/MeOH (1:1) como solvente extrator. Quando a solução de THF/Acet (1:1) foi utilizada como solvente, a taxa de recuperação dos HPAs de alta massa molecular ficou entre 65% para o I[1,2,3-c]Py e 90% para o Cry. Para o solvente DCM a recuperação dos HHPAS variou de 57% (I[1,2,3-c]Py) a 93% (B[a]An). A solução de DCM/MeOH (1:1) apresentou o menor valor de recuperação, com valores médios variando de 5,97% para Acy a 35,92% o B[a]An e não detectado para Np.

A mistura de solventes THF/acet apresentou melhor resultado com recuperações de até 92,99%, embora o resultado da média tenha sido menor, dependendo do composto estudado. Os valores médios de recuperação para os compostos obtidos para a solução de THF/Acet (1:1) variaram em média de 12% para Np a 90 para Chry, em que a maioria dos compostos apresentou recuperação acima de 70%.

Um fator muito importante foi a recuperação do Naftaleno (Np), a qual, embora baixa, só foi conseguida com a mistura THF/Acet, dentre todos os solventes testados. Este resultado pode estar associado à melhor interação intermolecular da mistura de solventes THF/Acet com os HPAs se comparado ao DCM.

Portanto, pelo exposto acima, a mistura de solventes THF/Acet (1:1) foi selecionada, neste estudo, para a extração dos compostos HPAs nas amostras de sedimento em banho ultra-som.

9.1.2 Resultados do estudo para determinação do volume de solvente

Os diferentes volumes de solvente adicionados à amostra, 10, 20 ou 30mL, conforme o intervalo de tempo, não apresentaram diferença quanto à taxa de recuperação dos compostos, demonstrando não ser necessário a utilização de um grande volume de solvente.

9.1.3 Resultados do estudo para determinação do tempo de extração

De acordo com a literatura consultada, diferentes tempos de extração em banho ultra-som são utilizados para a extração de HPAs em amostras sólidas, variando de 3x 3 minutos (Silva et al., 2006) a períodos maiores, como no estudo de Sisinnio et al. (2003), que realizaram a extração em 4x 20 minutos e de Song et al. (2002) que utilizaram o período de 2 horas.

Neste estudo foram avaliados seis intervalos distintos de tempos de extração dos HPAs em banho ultra-som, variando de 30 minutos a 3 horas. As taxas de recuperação para os compostos estudados foram a base para avaliar a eficiência na recuperação dos HPAs em razão do tempo de extração em banho ultra-som.

Os tempos de extração superiores a 1 hora foram satisfatórios para a extração dos HPAs nas amostras de sedimento. Porém, o período de 3 horas destacou-se entre os demais por ser mais eficiente, apresentando uma média de recuperação superior para 13 HPAs, com exceção do Np. O período de 30 minutos apresentou um rendimento baixo para todos os compostos.

O tempo de extração dos HPAs em sedimento, assim como em solo, pode estar associado às características da matriz, visto que os sedimentos ricos em matéria orgânica podem requerer um maior tempo de extração, uma vez que

os hidrocarbonetos são adsorvidos principalmente na fase orgânica (Baran & Oleszezuk, 2002; Cavalcante, 2007).

O período de 3 horas foi considerado ótimo para a extração dos HPAs em sistema ultra-som nas amostras de sedimento, pois apresentou uma maior taxa de recuperação para praticamente todos os compostos HPAs, exceto para o naftaleno, o que pode estar relacionado à volatilização do composto.

9.1.4 Resultados do estudo para a concentração e purificação do extrato por SPE

No presente estudo utilizou-se H₂O purificada para diluição do extrato cuja solução extratora foi constituída por THF/Acet (1:1), para que a proporção dos solventes ficasse em torno de 30% ou 40%.

Após a extração em banho ultra-som, o extrato foi centrifugado para uma melhor separação da parte sólida para então ser submetido à concentração e purificação em fase sólida (SPE). Também foi testado o procedimento de filtração em membrana porosa resistente aos solventes (PTFE) a fim de melhorar a separação da fase sólida, porém essa filtração reteve parte dos compostos, reduzindo a porcentagem de recuperação dos mesmos.

Foi observado que para solução de THF/Acet em torno de 40% em H₂O purificada os valores de recuperação para praticamente todos os compostos foi superior (maioria acima de 80%). Com a solução de solventes em torno de 30% obteve-se uma recuperação média inferior para todos os compostos.

Apenas o composto naftaleno não apresentou recuperação superior com a solução extratora em torno de 40%, o que também pode estar vinculado à sua alta pressão de vapor e solubilidade em água, fato que pode ser confirmado pelo seu valor de partição octanol/água, de 3,37 e carbono orgânico/água, de 3,1 que é mais baixo comparado aos demais HPAs, além de sua solubilidade em água (30 mL.L⁻¹) ser superior a todos os demais HPAs (em torno de 10⁻¹ mL.L⁻¹) (Netto, 2000).

Com base neste resultado foi selecionada a adição de água ao extrato para que a solução de solventes ficasse em torno de 40% para extração e concentração da amostra por SPE.

9.1.5 Resultados do estudo para otimização da preparação da amostra para injeção no HPLC

Após a secagem em fluxo de N₂, o resíduo foi retomado com 2mL da solução 50% ACN/H₂O para injeção no cromatógrafo e percebeu-se a presença de algumas partículas na solução. A fim de proteger a coluna analítica realizou-se a avaliação de dois procedimentos mecânicos para eliminação destas partículas. Pelos resultados da centrifugação, que foi executada por 1 minuto a 3.000rpm, e da filtração em membrana 0,45µm, foi possível observar que a filtração da amostra pode favorecer o decréscimo da recuperação dos compostos HPAs. Neste estudo, após a centrifugação da amostra e cuidadosa retirada da alíquota para análise, obteve-se um maior valor de recuperação para os 14 hidrocarbonetos policíclicos. Após a filtração da mesma amostra, percebeu-se uma pequena diminuição na recuperação dos compostos, sendo esta maior entre os compostos de alta massa molecular, do que nos de baixa massa molecular.

Embora a centrifugação seja um método menos laborioso e de menor custo, como as partículas permanecem no fundo do recipiente, pode ocorrer uma re-adsorção dos HPAs à parte sólida, fato que pode estar relacionado à propriedade hidrofóbica destes compostos, o que levaria a diminuição dos valores de recuperação. Além de poder haver a ressuspensão das partículas (De Luca et al., 2005).

A filtração é um método de maior custo, e pode haver pequena perda dos compostos por estes ficarem retidos no material filtrante, entretanto este processo é mais seguro, uma vez que o material sólido é removido da amostra que será introduzida no equipamento. Portanto, o método de filtração para remoção das partículas foi selecionado para este estudo em virtude da necessidade de preservar a coluna e o equipamento.

9.1.6 Observações sobre fatores de influência na recuperação dos HPAs

A complexidade da matriz sólida e a forma como esses compostos estão ligados são as principais dificuldades na extração dos analitos de interesse, exigindo alta eficiência dos sistemas de solventes e do método de extração (Helaleh, 2005).

Durante a realização dos experimentos comprovou-se que alguns passos são importantes para se obter uma melhor taxa de recuperação dos compostos HPAs. De acordo com os experimentos realizados, foi possível observar que a extração dos hidrocarbonetos deve ser realizada em frasco fechado, ou protegido, para minimizar a perda dos compostos por arraste na volatilização do solvente.

A secagem em N_2 é um fator decisivo para uma boa recuperação dos hidrocarbonetos, uma vez que os compostos de baixa massa molecular como o naftaleno e o acenaftileno, podem ser volatilizados durante esta etapa. Portanto, o fluxo de N_2 deve ser extremamente baixo.

Observou-se também que a agitação periódica durante as 3h de extração em ultra-som favorecem o processo de extração.

9.2 Resultados da validação do método desenvolvido

9.2.1 Seletividade

Inicialmente, a seletividade foi avaliada por meio de observação do cromatograma contendo todos os compostos. Foram identificados cada um dos HPAs, seus respectivos tempos de retenção e a excelente separação dos mesmos durante a corrida cromatográfica.

Na **FIG. 15** é apresentado como exemplo o cromatograma do padrão misto dos compostos estudados, referente ao ponto $0,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ da curva analítica, onde pode ser observada a excelente separação dos compostos estudados.

FIGURA 15: Cromatograma com concentração de $0,2\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de cada composto na solução mista.

Em uma segunda etapa, foi realizado o teste de homogeneidade das variâncias, (*teste F - Snedecor*), nas medidas de adição padrão em dois grupos de soluções, sendo um somente com os solventes e o outro com a matriz. Os resultados do teste F (*Snedecor*) são apresentados na **TAB. 8**, para $n = 7$ e 95% de confiança, e comparados com o valor crítico $F_{6,6, 95\%} = 4,28$.

Na **TAB. 8** pode-se observar que para os compostos estudados existem alguns pontos que estão acima do valor crítico exigido pelo teste. Porém, essa situação pode ser explicada, uma vez que as áreas obtidas são muito próximas, logo se tem uma variação muito pequena das medidas e qualquer resultado um pouco fora desta pequena flutuação causa um valor discrepante nas variâncias calculadas, afetando a relação matriz e solvente. Contudo, mesmo com alguns resultados diferentes, pode-se afirmar que para a maioria dos compostos, a matriz não interfere consistentemente na precisão das medidas considerando o intervalo de concentrações deste estudo.

O efeito das matrizes foi avaliado também pelo teste de significância das diferenças das médias, (*teste t - Student*), dos dois conjuntos de amostras (solvente e matriz).

Os resultados do teste t (*Student*) igualmente são apresentados na **TAB. 8**, e comparados ao valor crítico $t_{12, 95\%} = 2,179$. Para valores abaixo desse valor crítico, considera-se que as médias não apresentam diferenças significativas. A respeito dos HPAs estudados, os ensaios indicaram existir diferenças entre as condições (adição no solvente e adição na matriz) para a maior parte das concentrações avaliadas. Essa avaliação evidencia que resultados obtidos contra uma curva analítica preparada somente com os solventes serão ligeiramente diferentes se obtidos contra uma curva preparada com uma matriz igual ou semelhante à amostra. Na metodologia desenvolvida como a matriz não era certificada (padrão), as determinações foram realizadas a partir da adição de padrões a uma amostra de referência, isenta do analito de interesse (INMETRO, 2008).

TABELA 8: Dados e resultados para o teste de seletividade (teste F, $n = 7$ e $F_{\text{tabelado } 6,6, 95\%} = 4,28$) e teste t (*Student*) ($t_{12, 95\%} = 2,179$) dos 14 HPAs estudados. Adição de padrão na matriz e no solvente - valores calculados.

Naftaleno								
Adição na matriz								
Concentração, ng.mL ⁻¹	10	100	200	300	400	500	600	700
s ²	257	4929	6833	7654	4823	10421	8926	13441
Adição no solvente								
Concentração, ng.mL ⁻¹	10	100	200	300	400	500	600	700
s ²	1119	1210	1002	680	846	5248	8251	11758
Cálculos								
F _{calculado}	4,36	4,07	6,82	11,25	5,70	1,99	1,08	1,14
t _{calculado}	1,12	1,05	1,40	1,59	6,02	2,85	2,54	0,73
Acenaftileno								
Adição na matriz								
Concentração, ng.mL ⁻¹	10	100	200	300	400	500	600	700
s ²	221	2290	5095	6617	17852	10042	7050	9571
Adição no solvente								
Concentração, ng.mL ⁻¹	10	100	200	300	400	500	600	700
s ²	1401	513	558	1783	1514	1498	3672	3447
Cálculos								
F _{calculado}	6,36	5,85	9,14	3,71	11,79	6,71	1,92	2,78
t _{calculado}	0,82	5,57	3,99	0,69	1,05	3,67	0,32	0,66

continuação da TAB. 8

Fluoreno								
Adição na matriz								
Concentração, ng.mL ⁻¹	10	100	200	300	400	500	600	700
s ²	863	111386	40764	78357	181316	54834	144436	316332
Adição no solvente								
Concentração, ng.mL ⁻¹	10	100	200	300	400	500	600	700
s ²	986	10269	2295	14546	21517	100239	57971	201574
Cálculos								
F _{calculado}	0,88	10,99	17,76	5,39	8,43	0,55	2,49	1,57
t _{calculado}	30,62	5,08	4,18	4,02	7,80	6,21	2,67	1,20
Fenantreno								
Adição na matriz								
Concentração, ng.mL ⁻¹	10	100	200	300	400	500	600	700
s ²	2800	491878	259200	934902	1711655	3375966	842106	5799731
Adição no solvente								
Concentração, ng.mL ⁻¹	10	100	200	300	400	500	600	700
s ²	1697	54360	16093	70370	225101	1085891	416444	1251479
Cálculos								
F _{calculado}	1,65	9,05	16,11	13,29	7,60	3,11	2,02	4,63
t _{calculado}	14,79	8,63	12,56	0,02	5,09	4,22	5,78	1,39
Antraceno								
Adição na matriz								
Concentração, ng.mL ⁻¹	10	100	200	300	400	500	600	700
s ²	66681	714444	1125840	11361985	55824940	11199354	8532081	19052590
Adição no solvente								
Concentração, ng.mL ⁻¹	10	100	200	300	400	500	600	700
s ²	11773	445945	106084	3643266	3234591	7438878	5003515	9550459
Cálculos								
F _{calculado}	5,66	1,60	10,61	3,12	25,72	1,51	1,71	1,99
t _{calculado}	1,52	2,11	8,77	3,80	0,47	4,12	2,56	4,38
Fluoranteno								
Adição na matriz								
Concentração, ng.mL ⁻¹	10	100	200	300	400	500	600	700
s ²	2833	81408	22288	44338	200525	297796	39606	337900
Adição no solvente								
Concentração, ng.mL ⁻¹	10	100	200	300	400	500	600	700
s ²	1118	7218	840	18557	68589	182646	24026	160401
Cálculos								
F _{calculado}	2,53	9,37	26,53	2,39	2,92	1,63	1,65	2,11
t _{calculado}	6,04	6,10	3,66	4,41	5,50	4,71	6,04	0,46

continuação da TAB. 8

Pireno								
Adição na matriz								
Concentração, ng.mL ⁻¹	10	100	200	300	400	500	600	700
s ²	1150	20780	21375	29521	57618	88824	91282	58765
Adição no solvente								
Concentração, ng.mL ⁻¹	10	100	200	300	400	500	600	700
s ²	1075	2800	1707	4851	11324	43561	11744	55318
Cálculos								
F _{calculado}	1,07	7,41	12,52	6,09	5,09	2,04	7,77	1,06
t _{calculado}	6,67	4,20	8,89	4,60	4,06	3,53	1,58	1,49
Benzo[a]Antraceno								
Adição na matriz								
Concentração, ng.mL ⁻¹	10	100	200	300	400	500	600	700
s ²	5830	59934	21884	86980	114520	104929	43280	85557
Adição no solvente								
Concentração, ng.mL ⁻¹	10	100	200	300	400	500	600	700
s ²	340	1707	1055	23806	10160	54477	9026	52950
Cálculos								
F _{calculado}	17,13	35,11	20,74	3,65	11,27	1,93	4,79	1,62
t _{calculado}	57,12	21,35	12,34	5,67	5,45	6,74	9,18	3,14
Criseno								
Adição na matriz								
Concentração, ng.mL ⁻¹	10	100	200	300	400	500	600	700
s ²	828	215533	564710	590348	1050069	3659235	293532	4047848
Adição no solvente								
Concentração, ng.mL ⁻¹	10	100	200	300	400	500	600	700
s ²	6678	53241	26061	108182	417354	925246	172639	784812
Cálculos								
F _{calculado}	0,12	4,06	21,67	5,46	2,52	3,95	1,70	5,16
t _{calculado}	24,30	8,36	0,29	2,26	3,82	2,07	3,88	0,35
Benzo[e]acenaftileno								
Adição na matriz								
Concentração, ng.mL ⁻¹	10	100	200	300	400	500	600	700
s ²	1535	99962	167535	224886	511961	3029460	171057	2074330
Adição no solvente								
Concentração, ng.mL ⁻¹	10	100	200	300	400	500	600	700
s ²	1555	21335	5258	50054	118048	462104	158941	444302
Cálculos								
F _{calculado}	0,99	2,56	4,90	4,49	4,34	6,56	1,08	4,67
t _{calculado}	35,78	16,32	30,57	1,39	2,22	0,86	4,71	3,04

continuação da TAB. 8

Benzo[k]fluoranteno								
Adição na matriz								
Concentração, ng.mL ⁻¹	10	100	200	300	400	500	600	700
s ²	2234	275466	44066	128954	318287	1830450	457150	1362124
Adição no solvente								
Concentração, ng.mL ⁻¹	10	100	200	300	400	500	600	700
s ²	2605	13119	1208	33493	70636	351647	126498	304937
Cálculos								
F _{calculado}	0,86	21,0	36,48	3,85	4,51	5,21	3,61	4,47
t _{calculado}	17,65	1,26	4,30	15,04	4,54	2,72	3,37	4,18
Benzo[a]pireno								
Adição na matriz								
Concentração, ng.mL ⁻¹	10	100	200	300	400	500	600	700
s ²	40874	139620	733093	440930	5134428	3466669	2606450	1542397
Adição no solvente								
Concentração, ng.mL ⁻¹	10	100	200	300	400	500	600	700
s ²	6794	11916	60818	279067	257871	247463	356806	285006
Cálculos								
F _{calculado}	6,02	11,72	12,05	1,58	19,91	14,01	7,30	5,41
t _{calculado}	11,39	32,27	22,15	13,58	0,15	15,56	1,19	4,43
Dibenzo[a,h]antraceno								
Adição na matriz								
Concentração, ng.mL ⁻¹	10	100	200	300	400	500	600	700
s ²	1137	16346	53184	18886	38358	181360	45736	112321
Adição no solvente								
Concentração, ng.mL ⁻¹	10	100	200	300	400	500	600	700
s ²	486	8418	6549	6677	11566	29284	19013	35640
Cálculos								
F _{calculado}	2,34	1,94	8,12	2,83	3,32	6,19	2,41	3,15
t _{calculado}	5,59	13,59	11,59	28,58	7,58	5,19	1,87	7,72
Indeno(1,2,3-cd)pireno								
Adição na matriz								
Concentração, ng.mL ⁻¹	10	100	200	300	400	500	600	700
s ²	1479	41064	578541	230094	368734	952381	243409	937732
Adição no solvente								
Concentração, ng.mL ⁻¹	10	100	200	300	400	500	600	700
s ²	9337	32997	55735	313519	136946	137165	150597	471333
Cálculos								
F _{calculado}	0,16	1,24	5,31	0,73	2,69	4,49	1,62	1,99
t _{calculado}	8,57	18,91	11,03	16,89	13,41	16,36	18,71	12,31

Na **FIG. 16** pode ser observado que as inclinações das curvas dos 14 HPAs estudados tanto para os experimentos com matriz como somente com solvente são iguais. Baseado nesse resultado poderia ser aceito a utilização de qualquer uma das curvas para a quantificação.

Também pode ser observada a perfeita linearidade e os coeficientes de determinação para cada uma das retas maiores que 0,90 conforme sugerido pelo INMETRO (2003; 2007).

(a)

FIGURA 16: Representação gráfica da seletividade, segundo a equação da reta de regressão linear para os 14 HPAs (a e b) com matriz e somente com solvente.

TABELA 9: Valores obtidos para o Teste *t Student* para a verificação da inclinação e paralelismo e do intercepto na análise de seletividade. O valor 2,179 é o valor crítico para 8 (n-1) graus de liberdade com 95% de confiança.

HPAs	$t_{\text{calculado}}$	
	Teste Inclinação/Paralelismo	Teste do Intercepto
Naftaleno	0,064	0,220
Acenaftileno	0,017	0,087
Fluoreno	0,114	0,188
Fenantreno	0,177	0,389
Antraceno	0,469	0,451
Fluoranteno	0,031	0,237
Pireno	0,007	0,202
Benzo[a]Antraceno	0,447	1,026
Criseno	0,079	0,353
Benzo[e]acenaftileno	0,534	0,546
Benzo[k]Fluoranteno	0,539	0,063
Benzo[a]Pireno	0,077	1,551
Dibenzo[a,h]Antraceno	0,132	0,477
Indeno[1,2,3-c,d]Pireno	1,194	0,454

Na análise de seletividade, **FIG. 16**, observa-se que os valores com e sem matriz têm pouca diferença e a dispersão nos dados é mínima para praticamente todos os compostos estudados. Pelo teste de paralelismo e inclinação os cálculos foram realizados com o auxílio da equação 17 (item 8.7.1 seletividade) obtiveram-se $t_{\text{calculado}} < t_{\text{tabelado}}$, de acordo com os valores na **TAB. 9**, indicando que as inclinações são estatisticamente iguais. No teste de intercepto (intersecção do eixo y) os cálculos foram realizados com o auxílio da equação 8 (item 8.7.1), os resultados demonstram $t_{\text{calculado}} < t_{\text{tabelado}}$, igualmente apresentados na **TAB.9**, indicando que as curvas com e sem matriz têm intercepto estatisticamente iguais.

9.3 Linearidade

A linearidade da curva analítica foi avaliada por meio do coeficiente de determinação (r^2), do gráfico dos resíduos e da análise dos resíduos (teste t).

A linearidade dos 14 HPAs estudados na faixa de concentração entre 10 e 700 ng.mL⁻¹ é apresentada na **FIG. 17**. Como pode ser observado, os pontos das 8 diferentes soluções se comportam praticamente como uma reta. Os coeficientes de correlação para os compostos estudados foram calculados com auxílio de uma planilha para validação de análise química (Furusawa, 2007), a análise dos resíduos a partir do teste t de *Student* para os compostos estudados é apresentada com resultados individuais nas **TAB. 10** e **TAB. 11**, considerando a razão dos valores das variâncias (S^2) de cada solução com e sem matriz. Os coeficientes de correlação e de determinação são apresentados na **TAB. 12** e representam uma excelente linearidade para todos os compostos.

TABELA 10: Valores obtidos para o Teste t *Student* para a verificação do desvio da linearidade de cada ponto da curva para cada um dos compostos em estudo sem matriz. O valor 2,365 é o valor crítico para 8 (n-1) graus de liberdade com 95% de confiança.

Padrão ng.mL ⁻¹	$t_{\text{calculado no Solvente}}$							
	10	100	200	300	400	500	600	700
Naftaleno	1,001	0,843	4,084	2,1	2,324	4,201	1,478	0,538
Acenaftileno	1,417	0,297	4,11	2,073	2,44	4,065	1,506	0,441
Fluoreno	2,23	2,084	0,954	2,846	4,538	0,57	3,019	1,575
Fenantreno	0,093	0,168	3,799	2,345	2,53	1,517	4,69	4,325
Antraceno	0,523	2,676	1,904	2,448	2,19	0,524	5,165	2,347
Fluoranteno	0,457	0,71	1,44	2,627	1,75	5,691	1,72	0,781
Pireno	1,376	1,344	0,475	1,724	1,996	5,664	2,248	0,202
Benzo[a]Antraceno	2,435	0,386	4,571	1,503	0,873	3,587	2,282	0,679
Criseno	0,687	1,144	3,281	2,876	2,796	3,871	2,131	1,108
Benzo[e]acenaftileno	0,012	2,384	4,035	1,53	0,953	1,109	4,742	2,572
Benzo[k]Fluoranteno	2,195	0,119	3,316	3,821	4,033	1,636	1,784	5,644
Benzo[a]Pireno	0,265	1,181	0,971	3,019	2,993	5,263	0,417	1,555
Dibenzo[a,h]Antraceno	1,795	1,072	2,144	2,464	4,05	3,645	1,954	1,957
Indeno[1,2,3-c,d]Pireno	1,655	1,846	3,502	0,82	3,162	0,123	4,842	5,635

TABELA 11: Valores obtidos para o Teste t *Student* para a verificação do desvio da linearidade de cada ponto da curva para cada um dos compostos em estudo com matriz. O valor 2,365 é o valor crítico para 8 (n-1) graus de liberdade com 95% de confiança.

Padrão ng.mL ⁻¹	t _{calculado na Matriz}							
	10	100	200	300	400	500	600	700
Naftaleno	0,26	0,645	3,869	1,566	4,859	2,672	1,779	2,047
Acenaftileno	2,014	4,643	2,756	2,949	3,608	0,618	0,448	0,703
Fluoreno	3,942	3,544	3,197	3,541	0,309	1,080	1,028	1,676
Fenantreno	2,013	1,819	0,804	2,027	2,960	1,460	3,302	4,698
Antraceno	1,577	2,393	5,157	1,554	1,192	0,259	3,700	1,892
Fluoranteno	2,316	1,743	2,938	1,669	4,633	0,950	1,540	3,381
Pireno	4,546	0,116	3,367	1,839	3,507	1,905	0,226	2,151
Benzo[a]Antraceno	1,959	3,489	5,630	1,403	0,699	0,462	2,332	0,414
Criseno	1,209	2,040	4,367	1,576	3,867	1,006	2,042	2,943
Benzo[e]acenaftileno	1,772	2,016	0,756	0,030	2,282	1,280	5,634	3,102
Benzo[k]Fluoranteno	0,276	1,459	1,886	2,918	2,932	0,719	4,022	4,052
Benzo[a]Pireno	3,279	0,500	2,789	3,551	1,414	2,786	3,850	0,082
Dibenzo[a,h]Antraceno	3,304	0,376	2,165	4,260	1,751	0,987	4,042	1,309
Indeno[1,2,3-c,d]Pireno	3,601	0,121	3,123	3,921	1,63	1,387	3,609	0,530

Os valores para cada composto mostram que vários pontos estão acima do valor crítico = 2,365 nos ensaios com e sem matriz conforme **TAB. 10** e **TAB. 11**, ou seja, não podem ser considerados como pertencentes à reta de regressão. Porém, mesmo que os resultados obtidos para este teste a partir de cálculos estatísticos não estejam exatamente dentro do valor especificado, pela experiência na técnica podemos considerar que estes pontos podem ser utilizados para a quantificação dos compostos em questão. Além disso, o INMETRO (2003) recomenda que o r^2 deva ser superior a 0,90, considerando uma condição em que a quantificação já seja possível, o que pode ser observado na **TAB. 12** para todos os compostos estudados.

FIGURA 17: Representação gráfica da Faixa de Trabalho e Linearidade para os 14 HPAs estudados

TABELA 12: Valores obtidos para os coeficientes de correlação (r) e de determinação (r^2) para os compostos HPAs estudados sem matriz.

Composto	Identificação	Com matriz		Sem matriz	
		r	r²	r	r²
<i>Naftaleno</i>	Np	0,9999	0,9997	0,9998	0,9996
<i>Acenaftileno</i>	Acy	0,9999	0,9999	0,9997	0,9995
<i>Fluoreno</i>	F	0,9999	0,9997	0,9999	0,9997
<i>Fenantreno</i>	Ph	0,9998	0,9996	0,9998	0,9998
<i>Antraceno</i>	Ant	0,9996	0,9992	0,9999	0,9999
<i>Fluoranteno</i>	Fl	0,9998	0,9995	0,9998	0,9997
<i>Pireno</i>	Py	0,9999	0,9998	0,9999	0,9998
<i>Benzo[a]Antraceno</i>	B[a]An	0,9993	0,9996	0,9998	0,9997
<i>Criseno</i>	Cry	0,9997	0,9995	0,9998	0,9997
<i>Benzo[e]Acenaftileno</i>	B[e]Acy	0,9996	0,9993	0,9999	0,9999
<i>Benzo[k]Fluoranteno</i>	B[k]Fl	0,9997	0,9994	0,9998	0,9996
<i>Benzo[a]Pireno</i>	B[a]Py	0,9979	0,9959	0,9979	0,9959
<i>Dibenzo[a,h]Antraceno</i>	B[a,h]An	0,9985	0,9969	0,9999	0,9999
<i>Indeno[1,2,3-c,d]Pireno</i>	I[1,2,3-c,d]Py	0,9995	0,9989	0,9999	0,9999

Os gráficos apresentados nas **FIG. 18 a 21** expõem a distribuição espacial dos resíduos absolutos pela concentração e pela probabilidade normalizada de cada resíduo para todas as soluções, igual a 8 padrões em 7 replicatas.

FIGURA 18: Gráfico de resíduos absoluto e normalizado para os compostos: (a)naftaleno; (b) fluoreno; (c) acenaftileno.

FIGURA 19: Gráfico de resíduos absoluto e normalizado para os compostos: (a) fenantreno; (b) antraceno; (c) fluoranteno; (d) pireno.

FIGURA 20: Gráfico de resíduos absoluto e normalizado para os compostos: (a) benzo[a]antraceno; (b) criseno; (c) Benzo[e]Acenaftileno.

FIGURA 21: Gráfico de resíduos absoluto e normalizado para os compostos: (a) Benzo[k]Fluoranteno ; (b) Benzo[a]Pireno; (c) Dibenzo[a,h] Antraceno; (d) Indeno.

Os gráficos dos HPAs estudados demonstram certa igualdade na distribuição dos resíduos. Pode-se observar que para todos os compostos estudados as flutuações (positiva ou negativa) para algumas concentrações possuem o mesmo comportamento. Entretanto, quando analisamos o gráfico dos resíduos versus a probabilidade normal nota-se uma distribuição que se aproxima muito de uma reta. Não são observadas tendências significativas que depreciem o comportamento linear. Observa-se também que a maior parte dos pontos está

distribuída no intervalo de probabilidade de -2 a +2 o que significa dentro de $\pm 2s$ (dois desvios padrão, ou seja, com 95% de confiança).

A precisão, definida como a dispersão dos resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões sob condições determinadas (INMETRO, 2003) foi avaliada em termos de desvio-padrão (DP) e desvio padrão relativo (DPR), conhecido como coeficiente de variação (CV). Nos processos de validação de métodos analíticos de resíduos e impurezas a taxa aceitável de DPR é de até 20%, dependendo da complexidade da amostra (Ribani et al., 2004). Considerando-se os resultados de repetitividade e reprodutibilidade, todos os DPR foram inferiores a 20%.

9.4 Exatidão

Os resultados da análise de variância (ANOVA) podem ser observados em detalhes no ANEXO 1. Na **TAB. 13**, é apresentado um resumo dos resultados da análise de variância para os compostos estudados os quais indicam que as variações foram explicadas satisfatoriamente pelos modelos lineares adotados, representados pelas equações da reta ($y = ax+b$) dos respectivos compostos. O teste F mostra que a regressão aplicada é significativa ($F_{\text{calculado}} > F_{1,14,95\% \text{ tabelado}} = 4,60$, para todos os 14 compostos). A porcentagem de variação explicada calculada pela tabela ANOVA é outra forma de se avaliar como o modelo linear obtido se ajusta aos dados. O teste F, para ajuste, indica uma falta de ajuste para 13 compostos ($F_{\text{calculado}} > F_{6,8,95\% \text{ tabelado}} = 3,58$), exceto para acenaftileno, 1,96, indicando que não ocorre dispersão dos pontos, porém, para os demais HPAs, os valores calculados estão acima do valor tabelado. Estes resultados indicam certa dispersão dos pontos, entretanto, pela porcentagem explicada (99,70% explicada em 99,97% explicável), essa dispersão absolutamente não compromete o ajuste aplicado e o uso da curva. Pelos resultados das tabelas de ANOVA (**ANEXO 1**) é possível observar que essa falta de ajuste não é significativa, visto que as porcentagens máximas explicadas estão próximas das porcentagens máximas explicáveis para todos os compostos. No **ANEXO 1**, podem ser verificados o fator erro puro (EP) para todos os compostos, que está associado aos erros aleatórios, representando uma fração muito pequena em relação à soma quadrática total

(SQT). Significando, portanto, que as características dos dados avaliados permitem que se possa explicar uma porcentagem muito grande (quase 100%) do comportamento inerente aos dados.

TABELA 13: Resumo dos resultados da análise de variância (ANOVA) para os compostos estudados na matriz. Intervalo de concentração: 10 a 700 ng.mL⁻¹.

Composto	F_{cal} Regressão	F_{cal} Ajuste	% de variação explicada	% máxima de variação explicável
	F1,14,95% tabelado = 4,60	F6,8,95% tab = 3,58		
Naftaleno	40498,29	11,96	99,97	100,00
Acenaftileno	61153,00	1,96	99,98	99,99
Fluoreno	38775,59	6,93	99,96	99,99
Fenantreno	23762,96	5,24	99,94	99,99
Antraceno	9575,64	4,57	99,85	99,97
Fluoranteno	29667,23	9,66	99,95	99,99
Pireno	66567,11	4,11	99,98	99,99
Benzo[a]Antraceno	7880,07	24,21	99,82	99,99
Criseno	23431,18	5,76	99,94	99,99
Benzo[e]Acenaftileno	13729,88	5,96	99,90	99,98
Benzo[k]Fluoranteno	6285,03	53,24	95,53	99,98
Benzo[a]Pireno	15321,60	3,91	95,91	99,98
Dibenzo[a,h]Antraceno	4231,82	23,15	95,67	99,98
Indeno[1,2,3-c,d]Pireno	11264,50	10,64	95,88	99,99

De acordo com o índice *z score*, os resultados dos testes para todos os compostos foram $|z| \leq 2$, portanto podem considerados satisfatórios na faixa de concentração avaliada (0,1 µg.mL⁻¹).

9.5 Limites de Detecção e Quantificação

Os limites de detecção e de quantificação têm diferentes grandezas para cada um dos compostos, uma vez que têm sensibilidade bem diferente e foram determinados individualmente para a metodologia desenvolvida.

O LD, isto é, menor concentração de cada analito que pode ser detectada com certo limite de confiabilidade pode ser observada na **TAB. 14**, utilizando o procedimento experimental desenvolvido.

O LQ, ou seja, a quantidade mínima do analito que pode ser quantificada com um nível aceitável de exatidão e precisão utilizando o procedimento experimental desenvolvido, também pode ser observada na **TAB. 14**.

TABELA 14. Limites de detecção e de quantificação para os compostos 14 HPAs estudados para 0,5g de amostra.

Composto HPA	Identificação	Limite do Método		Limite da Técnica	
		LQ ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	LD ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	LD ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
Naftaleno	<i>Np</i>	0,052	0,009	0,013	0,002
Acenaftileno	<i>Acy</i>	0,060	0,013	0,015	0,003
Fluoreno	<i>F</i>	0,032	0,004	0,008	0,001
Fenantreno	<i>Ph</i>	0,052	0,002	0,013	0,001
Antraceno	<i>An</i>	0,072	0,012	0,018	0,003
Fluoranteno I	<i>F</i>	0,024	0,002	0,006	0,001
Pireno	<i>Py</i>	0,060	0,005	0,015	0,001
Benzo[a]Antraceno	<i>B[a]An</i>	0,024	0,002	0,006	0,001
Criseno	<i>Chry</i>	0,024	0,002	0,006	0,001
Benzo[e]Acenaftaleno	<i>B[e]Acy</i>	0,024	0,003	0,006	0,001
Benzo[k]fluoranteno	<i>B[k]Fl</i>	0,032	0,005	0,008	0,001
Benzo[a]Pireno	<i>B[a]Py</i>	0,024	0,002	0,006	0,001
Dibenzo[a,h]Antraceno	<i>B[a,h]An</i>	0,080	0,008	0,020	0,002
Indeno[1,2,3-c,d]Pireno	<i>I[1,2,3-c,d]Py</i>	0,068	0,004	0,017	0,001

O limite de quantificação (LQ) foi obtido pela média da menor concentração do analito que pode ser avaliada com segurança mais cinco vezes o desvio padrão obtido nas replicatas para essa concentração.

O limite de detecção é calculado pela média da menor concentração mais o valor da abscissa *t* (*Student*) para (n-1) graus de liberdade com 100% de

confiança multiplicado pelo desvio padrão obtido nas replicatas para essa concentração.

9.6 Robustez

A fim de verificar a sensibilidade do método analítico por efeito de pequenas variações conforme os parâmetros selecionados na **TAB. 6** do item 8.7.7, foram realizados cálculos de robustez pelo planejamento fatorial de 7 variáveis com 8 experimentos (planejamento fracionário saturado). Utilizou-se como ferramenta a planilha “Validação de Ensaio Químico” (Furusawa, 2007) onde os parâmetros são avaliados pela estimativa do erro da distribuição dos efeitos utilizando-se o algoritmo de *Dong* (pequenos experimentos). A verificação gráfica apresentada nas **FIG. 22 a 35**, obtida pelos cálculos estatísticos, possibilita entender se esses efeitos são ou não significativos, avaliar se o método é ou não robusto para as condições escolhidas, bem como ordenar a influência de cada uma das variações nos resultados finais.

FIGURA 22: Gráficos para o Naftaleno representando (a) teste de verificação de significância dos efeitos; (b) probabilidade normal; (c) meia-normal.

De acordo com o gráfico Rankit apresentados na **FIG. 22**, observa-se que os efeitos proporcionados por pequenas variações na metodologia não afetam de forma significativa os resultados, visto que os valores obtidos encontram-se abaixo da margem de erro (ME). No gráfico de probabilidade normal, observa-se que os valores estão entre -2 e +2, ou seja, bem distribuídos, significando que provavelmente não haja *outliers*. Já na representação gráfica dos efeitos de cada parâmetro na robustez do método, para o **naftaleno**, observa-se que o fator de maior influência negativa é o volume extrator, seguido da porcentagem de diluição do eluente para extração no SPE e o fator de maior influência positiva é a composição da fase móvel (fração ACN/H₂O).

FIGURA 23: Gráficos para o Acenafileno representando (a) teste de verificação de significância dos efeitos; (b) probabilidade normal; (c) meia-normal.

De acordo com o gráfico Rankit apresentados na **FIG. 23**, observa-se que os valores obtidos encontram-se abaixo da margem de erro (ME). No gráfico de probabilidade normal, observa-se que os valores estão entre -2 e +2, bem distribuídos, provavelmente sem *outliers*, portanto os efeitos proporcionados por pequenas variações na metodologia não afetam de forma significativa os resultados. Na representação gráfica dos efeitos de cada parâmetro na robustez do método, para o **acenafileno**, observa-se que o fator de maior influência negativa é a composição da fase móvel (fração ACN/H₂O) e o fator de maior influência positiva é a massa.

FIGURA 24: Gráficos para o Fluoreno representando (a) teste de verificação de significância dos efeitos; (b) probabilidade normal; (c) meia-normal.

De acordo com o gráfico Rankit apresentados na **FIG. 24**, observa-se que os valores obtidos encontram-se abaixo de margem de erro (ME). No gráfico de probabilidade normal, observa-se que os valores estão entre -2 e +2, bem distribuídos, provavelmente sem *outliers*, portanto os efeitos proporcionados por pequenas variações na metodologia não afetam de forma significativa os resultados. Na representação gráfica dos efeitos de cada parâmetro na robustez do método, para o **fluoreno**, observa-se que o fator de maior influência negativa é a composição da fase móvel (fração ACN/H₂O) e o fator de maior influência positiva é o volume extrator.

FIGURA 25: Gráficos para o Fenantreno representando (a) teste de verificação de significância dos efeitos; (b) probabilidade normal; (c) meia-normal.

De acordo com o gráfico Rankit apresentados na **FIG. 25**, observa-se que os valores obtidos encontram-se abaixo da margem de erro (ME). No gráfico de probabilidade normal, observa-se que os valores estão entre -2 e +2, bem distribuídos, provavelmente sem *outliers*, portanto os efeitos proporcionados por pequenas variações na metodologia não afetam de forma significativa os resultados. Na representação gráfica dos efeitos de cada parâmetro na robustez do método, para o **fenantreno**, observa-se que o fator de maior influência negativa é a velocidade de centrifugação e o fator de maior influência positiva é a fase móvel (fração ACN/H₂O).

FIGURA 26: Gráficos para o Antraceno representando (a) teste de verificação de significância dos efeitos; (b) probabilidade normal; (c) meia-normal.

De acordo com o gráfico Rankit apresentados na **FIG. 26**, observa-se que os valores obtidos encontram-se abaixo da margem de erro (ME). No gráfico de probabilidade normal, observa-se que os valores estão entre -2 e +2, bem distribuídos, provavelmente sem *outliers*, portanto os efeitos proporcionados por pequenas variações na metodologia não afetam de forma significativa os resultados. Na representação gráfica dos efeitos de cada parâmetro na robustez do método, para o **antraceno**, observa-se que o fator de maior influência negativa é a velocidade de centrifugação e o fator de maior influência positiva é o volume extrator.

FIGURA 27: Gráficos para o Fluoranteno representando (a) teste de verificação de significância dos efeitos; (b) probabilidade normal; (c) meia-normal.

De acordo com o gráfico Rankit apresentados na **FIG. 27**, observa-se que os valores obtidos encontram-se abaixo da margem de erro (ME). No gráfico de probabilidade normal, observa-se que os valores estão entre -2 e +2, bem distribuídos, provavelmente sem *outliers*, portanto os efeitos proporcionados por pequenas variações na metodologia não afetam de forma significativa os resultados. Na representação gráfica dos efeitos de cada parâmetro na robustez do método, para o **fluoranteno**, observa-se que provavelmente todos os fatores têm algum tipo de influência (positiva ou negativa), o que leva a uma necessidade de se ter um maior cuidado no decorrer da análise em relação a todos os fatores envolvidos na metodologia.

FIGURA 28: Gráficos para o Pireno representando (a) teste de verificação de significância dos efeitos; (b) probabilidade normal; (c) meia-normal.

De acordo com o gráfico Rankit apresentados na **FIG. 28**, observa-se que os valores obtidos encontram-se abaixo da margem de erro (ME). No gráfico de probabilidade normal, observa-se que os valores estão entre -2 e +2, bem distribuídos, provavelmente sem *outliers*, portanto os efeitos proporcionados por pequenas variações na metodologia não afetam de forma significativa os resultados. Na representação gráfica dos efeitos de cada parâmetro na robustez do método, para o **pireno**, observa-se que o fator de maior influência negativa é a velocidade de centrifugação e o fator de maior influência positiva é a o volume extrator.

Para as substâncias estudadas, naftaleno, acenaftileno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno e pireno, comentadas anteriormente, evidenciou-se comportamento distinto quanto aos efeitos de cada parâmetro na

robustez do método. Já para as substâncias benzo[a]antraceno, criseno, benzo[e]acenaftileno, benzo[k]fluoranteno, benzo[a]pireno, dibenzo[a,h]antraceno, indeno[1,2,3-c,d]pireno comentadas a seguir, observou-se comportamento semelhante a respeito dos efeitos de cada parâmetro na robustez do método. Essa particularidade entre os dois grupos pode estar relacionada às propriedades físico-químicas consideravelmente diferentes para os 7 primeiros e muito próxima para os outros 7 (discutidas no item 3.3, de acordo com a **TAB. 2**), as quais determinam a forma que esses compostos estão dispostos (ligados e adsorvidos) na matriz ambiental, além da complexidade da matriz (interferentes) que influenciam no processo recuperação.

FIGURA 29: Gráficos para o Benzo[a]Antraceno representando (a) teste de verificação de significância dos efeitos; (b) probabilidade normal; (c) meia-normal.

FIGURA 30: Gráficos para o Criseno representando (a) teste de verificação de significância dos efeitos; (b) probabilidade normal; (c) meia-normal.

FIGURA 31: Gráficos para o Benzo[e]acenaftileno representando (a) teste de verificação de significância dos efeitos; (b) probabilidade normal; (c) meia-normal.

FIGURA 32: Gráficos para o Benzo[k]Fluoranteno representando (a) teste de verificação de significância dos efeitos; (b) probabilidade normal; (c) meia-normal.

FIGURA 33: Gráficos para o Benzo[a]Pireno representando (a) teste de verificação de significância dos efeitos; (b) probabilidade normal; (c) meia-normal.

FIGURA 34: Gráficos para o Dibenzo[a,h]Antraceno representando (a) teste de verificação de significância dos efeitos; (b) probabilidade normal; (c) meia-normal.

FIGURA 35: Gráficos para o Indeno[1,2,3-c,d]Pireno representando (a) teste de verificação de significância dos efeitos; (b) probabilidade normal; (c) meia-normal.

Considerando os sete últimos compostos, **FIG. 29 a 35**, pode-se prever que uma metodologia apenas para estes compostos com os parâmetros modificados resultaria em uma maior sensibilidade, porém como os resultados são coerentes com a metodologia proposta, torna-se mais interessante realizar as determinações em uma só corrida.

9.7 Recuperação

Na maior parte dos procedimentos analíticos de validação, recuperações dentro da faixa 70% a 120% são aceitas (Lanças, 2004a). Para os

14 HPAs estudados o percentual de recuperação é apresentado na **TAB. 15** a seguir.

TABELA 15. Teste de recuperação dos 14 HPAs estudados.

HPA	Recuperação média (%)	Incerteza	Valor máximo obtido de recuperação (%)
Naftaleno	12,1	$\pm 1,13$	17,92
Acenaftileno	46,3	$\pm 4,07$	63,41
Fluoreno	66,2	$\pm 2,7$	81,47
Fenantreno	81,3	$\pm 2,6$	98,13
Antraceno	74,0	$\pm 3,6$	97,12
Fluoranteno	87,8	$\pm 0,5$	89,41
Pireno	85,8	$\pm 0,3$	87,35
Benz(a)Antraceno	89,9	$\pm 0,7$	92,99
Criseno	90,2	$\pm 0,14$	93,82
Benz(e)Acenaftileno	83,4	$\pm 0,84$	88,03
Benz(k)Fluoranteno	75,1	$\pm 2,18$	84,26
Benz(a)Pireno	70,9	$\pm 0,34$	72,05
Benz(a,h)Antraceno	71,8	$\pm 1,58$	79,05
Indeno(123-cd)Pireno	65,2	$\pm 0,65$	69,17

Com relação ao naftaleno, pelo fato de esse composto ser muito volátil, dificulta a recuperação, principalmente em relação ao procedimento de secagem. Na maioria dos estudos encontrados na literatura, os autores têm dificuldade no manuseio deste composto (Aver et al., 1990; Martens et al., 1997). Nos estudos envolvendo concentração por roto-evaporação, a recuperação é ainda menor (Sun et al., 1998). Pretende-se, em um estudo futuro, desenvolver uma metodologia específica para o naftaleno, visando uma melhor recuperação do mesmo. Para a metodologia aqui proposta, os valores de recuperação para os demais compostos estão coerentes com o obtido por outros autores e, em alguns casos, até maiores (Song et al., 2002).

9.8 Cálculo de incertezas

Na **TAB. 16** são apresentados os resultados dos cálculos de incertezas para os compostos estudados, de acordo com a metodologia descrita no item 7.9 desta dissertação. Mais detalhes sobre os cálculos podem ser verificados no ANEXO 2.

TABELA 16. Resultados do cálculo das incertezas envolvidas na análise de HPAs em amostras de sedimento da represa do Parque do Pedroso para os compostos que apresentaram recuperação acima de 70%, para o ponto 0,1 da curva, considerando uma massa de sedimento=0,5g, para 95% de confiança e k=2.

Incertezas associadas ($\mu\text{g.g}^{-1}$)			Incerteza relativa	Incerteza expandida
Composto	Concentração $\pm$ incerteza expandida			
Ph	0,498	$\pm$ 0,047	4,71%	9,40%
An	0,527	$\pm$ 0,067	6,40%	12,79%
Fl	0,454	$\pm$ 0,016	1,76%	3,53%
Py	0,465	$\pm$ 0,015	1,59%	3,18%
B[a]An	0,547	$\pm$ 0,015	1,37%	2,74%
Chry	0,446	$\pm$ 0,025	2,83%	5,67%
B[e]Acy	0,458	$\pm$ 0,017	1,85%	3,70%
B[k]Fl	0,524	$\pm$ 0,042	4,01%	8,02%
B[a]Py	0,524	$\pm$ 0,036	3,41%	6,83%
DiB[a,h]An	0,509	$\pm$ 0,033	3,23%	6,46%

De acordo com os resultados obtidos para os cálculos de incertezas dos compostos estudados (ANEXO 2), pode ser observado que a maior contribuição para a incerteza global está associada à recuperação do analito e à curva analítica. Isso é coerente, visto que ambas estão relacionadas à concentração e à resposta obtida pelo equipamento.

9.9 Potencial hidrogeniônico (pH)

A **TAB. 17** apresenta os resultados da análise química da determinação do pH nas amostras de sedimento.

Na **FIG. 36** são apresentados os perfis da variação do pH das amostras de sedimento em função dos pontos de amostragem.

TABELA 17. Resultados da análise química da determinação do pH nas amostras de sedimento.

pH (em KCl 1mol.L ⁻¹)	
Ponto 1	6,104
Ponto 2	6,075
Ponto 3	5,965
Ponto 4	5,897
Ponto 5	5,465
Média	5,901
Desvio padrão	0,258

Com base nos resultados observa-se que o pH do sedimento da região revela um caráter ácido. As amostras de sedimento analisadas apresentaram-se com valor médio de $5,9 \pm 0,26$. Não foram observadas grandes variações nos valores de pH nos 5 pontos estudados, apenas o ponto 5, nascente do reservatório com mata preservada (pH = 5,465), ligeiramente abaixo dos demais, fato que poderia relacionar a presença ácidos húmicos e fúlvicos no sedimento, formados a partir da decomposição de matéria orgânica como plantas e restos de folhas (Junk & Richard, 1988; Johnson et al. 1991; Pichon et al., 1996; Ferrer et al, 1999; Lebre, 2000; Córdoba et al., 2008).

FIGURA 36 - Variação dos valores de pH das amostras de sedimento (no eixo da Abscissa - x) em razão dos pontos de coleta (no eixo da Ordenada - y).

9.10 Análise granulométrica

A análise granulométrica é utilizada para definir a classe de textura com base nas porcentagens das frações de areia, silte e argila, obtidas por dispersão total (EMBRAPA, 1995).

Na **TAB.18**, podem ser observados os parâmetros de classificação para análise granulométrica e na **TAB. 19**, encontram-se os resultados obtidos para as amostras de sedimento estudadas nesta dissertação.

TABELA 18. Frações Granulométricas, em mm, nos sistemas de classificação Norte-americano (USDA) e Internacional (ISSS). (USDA, 1975).

Frações	Sistemas	
	USDA (%)	ISSS (%)
Areia muito grossa	2-1	-
Areia grossa	1-0,5	2-0,2
Areia média	0,5-0,25	-
Areia fina	0,25-0,10	0,2-0,02
Areia muito fina	0,10-0,05	-
Silte	0,05-0,002	0,02-0,002
Argila	<0,002	<0,002

TABELA 19. Resultados da análise granulométrica das amostras de sedimento.

	Fração Granulométrica (%)		
	silte	argila	areia
Ponto 1	47	48	5
Ponto 2	50	46	4
Ponto 3	28	45	27
Ponto 4	43	32	25
Ponto 5	34	20	46
Média	40,40	38,20	21,40
Desvio padrão	9,18	11,97	17,47

A partir dos resultados da **TAB. 19** podemos observar uma predominância da fração silte e argila, com uma variação entre 20% e 50%.

FIGURA 37 - Classificação textual do sedimento de acordo com a USDA (1975)

(a) e do sedimento da Represa do Parque Pedroso (b).

Comparando os resultados encontrados com o triângulo para determinação das classes textuais **FIG. 37**, identificamos que a região apresenta um sedimento franco-argiloso, fato que propicia a adsorção dos possíveis contaminantes de origem orgânica ou inorgânica, uma vez que esse processo é extremamente ativo em qualquer ambiente onde haja consideráveis quantidades de particulados finos como silte e a argila, sobretudo em reservatórios. A

reatividade desses sólidos, particulados suspensos e de fundo (os sedimentos), está relacionada com a superfície de contato (área superficial), ou seja, quanto mais finas forem, maior será a probabilidade de adsorção do poluente. Pode-se deduzir pela análise do sedimento da Represa do Pedroso que a mesma tem um grande potencial a bioacumulação de contaminantes.

9.11 Resultados da avaliação das amostras de sedimento da represa do Parque do Pedroso

Por meio da aplicação do método desenvolvido nas amostras de cinco pontos diferentes da Represa do Pedroso foi possível verificar que embora a área se encontre preservada, já se notam pequenos sinais de contaminação. Não foram encontrados resultados positivos na primeira coleta, acima do limite de quantificação, em nenhuma das amostras coletadas. Já na segunda coleta foram encontradas pequenas alterações principalmente em acenaftileno, fluoreno e benzo[a]antraceno, que devem continuar sendo monitoradas, a fim de se verificar se é uma alteração normal da região ou se realmente os processos antrópicos já estão interferindo na qualidade da represa. Na **TAB. 20** são apresentados os resultados obtidos para as duas coletas.

Nas amostras de água, as quais foram coletadas nos mesmos pontos dos sedimentos, não foi encontrado resultado positivo em relação aos compostos estudados, porém a região continuará sendo avaliada, por motivo da construção do Rodoanel na região.

Sempre que houve a possibilidade da ocorrência de um valor falso negativo ou falso positivo, foram realizadas adições padrão a fim de confirmar os valores.

TABELA 20. Resultados da análise dos HPAs nas amostras de sedimento (0,5g) da represa do Parque do Pedroso, referentes às duas coletas de 2008.

Concentração de HPAs ($\mu\text{g.g}^{-1}$)						
Composto	n° da coleta	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 4	Ponto 5
Acy	01	<0,06	nd	<0,06	<0,06	nd
	02	0,105±0,04	nd	0,0685±0,02	0,129±0,02	0,061±0,01
F	01	<0,032	<0,032	<0,032	nd	nd
	02	0,085±0,01	<0,032	0,049±0,03	<0,032	<0,032
Ph	01	<0,052	<0,052	<0,052	<0,052	nd
	02	<0,052	<0,052	<0,052	nd	<0,052
An	01	<0,072	<0,072	<0,072	<0,072	nd
	02	nd	<0,072	<0,072	<0,072	<0,072
Fl	01	<0,024	<0,024	<0,024	<0,024	nd
	02	<0,024	<0,024	<0,024	nd	<0,024
Py	01	<0,06	<0,06	<0,06	<0,06	nd
	02	<0,06	<0,06	<0,06	<0,06	<0,06
B[a]An	01	<0,024	<0,024	<0,024	<0,024	nd
	02	<0,024	<0,024	0,088±0,025	nd	<0,024
Chry	01	<0,024	<0,024	<0,024	<0,024	nd
	02	<0,024	<0,024	<0,024	nd	<0,024
B[e]Acy	01	<0,024	<0,024	<0,024	<0,024	nd
	02	<0,024	nd	nd	nd	<0,024
B[k]Fl	01	<0,032	nd	<0,032	<0,032	nd
	02	nd	nd	nd	<0,032	nd
B[a]Py	01	<0,024	nd	<0,024	<0,024	nd
	02	nd	nd	nd	<0,024	nd
B[a,h]An	01	<0,08	nd	<0,08	<0,08	nd
	02	nd	nd	nd	nd	nd
I[1,2,3-c,d]Py	01	<0,068	nd	<0,068	<0,068	nd
	02	nd	nd	nd	nd	nd

10 CONCLUSÃO

1. O processo de validação demonstrou que, para os compostos, Antraceno, Fluoranteno, Pireno, Benzo(a)antraceno, Criseno, Benzo(e)acenaftileno, Benzo(k)fluoranteno, Benzo(a)pireno e Dibenzo(a,h)antraceno, a metodologia desenvolvida é seletiva, robusta, exata, linear e precisa para a análise proposta, sendo ainda um método simples que permite a minimização da contaminação e da perda de compostos por excesso de manipulação. Porém para os compostos, Naftaleno, Acenaftileno, Fluoreno e Indeno(1,2,3-cd)pireno, seria interessante a adaptação da metodologia visando uma melhor recuperação e maior confiabilidade. A validação da metodologia a partir dos parâmetros estudados permite que se assegure a qualidade dos resultados obtidos e que o desempenho tenha sido avaliado conforme indicado em documento de referência (INMETRO, 2003).
2. Para todos os compostos foi possível definir quais são os parâmetros que demonstram maior significância no desempenho da análise. A metodologia se mostrou robusta diante de pequenas variações das condições inicialmente estabelecidas no método para a maioria dos compostos. Porém para os compostos benzo[a]antraceno, criseno, benzo[e]acenaftileno, benzo[k]fluoranteno, benzo[a]pireno, dibenzo[a,h]antraceno, indeno[1,2,3-c,d]pireno, os quais sofrem uma influência positiva frente às alterações, seria interessante uma metodologia apenas para estes compostos com os parâmetros modificados, o que, conforme comentado nos resultados, resultaria em uma maior sensibilidade, embora os resultados sejam coerentes com a metodologia proposta. Fato este que torna mais interessante realizar as determinações em uma só corrida.
3. O método de detecção é sensível e seletivo, visto que os compostos estudados apresentaram boa separação, o que fornece segurança na determinação dos compostos para a metodologia desenvolvida.

4. Durante a validação foi possível observar que a metodologia, além de seletividade e exatidão, possui precisão, visto que as medidas de repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade apresentaram baixa dispersão dos resultados entre ensaios repetidos.
5. A metodologia desenvolvida mostrou ser linear na faixa de trabalho estudada, fornecendo resultados de área diretamente proporcionais à concentração dos analitos dentro de uma variação estatisticamente aceitável.
6. O processo de validação demonstrou que a metodologia desenvolvida pode ser aplicada à análise proposta nas condições dos parâmetros avaliados.
7. O fato de as amostras coletadas na região estudada ter apresentado resultados baixos e terem demonstrado que a qualidade deste permanece estável até o momento indica que a região ainda se mantém preservada, embora já se notem pequenos sinais de contaminação. Porém, em virtude da construção do rodovanel na região, deve-se continuar monitorando a região para certificar que a obra pública não afete a qualidade das águas e sedimentos na Represa do Parque Pedroso.

11 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANA – Agência Nacional de Águas. ***Panorama da qualidade das águas superficiais no Brasil***. Brasília: SPR, 2005.

ATKINS, P. ***Princípios de química: questionando a vida moderna e o meio ambiente***. Porto Alegre: Bookman, 2001.

AVER, W.; MALISSO JR, H.; Determination of trace amounts of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. ***Anal. Quim. A.***, v. 237, p. 451-457. 1990.

BAKER, L. A. ***Environmental Chemistry of Lakes and Reservoir***. Washington D. C: American Chemical society, 1994.

BARAN, S.; OLESZEZUK, P. Chromatographic determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in sewage sludge, soil, and sewage sludge-amended soils. ***Polish Journal of Environmental Studies***. Olsztyn, Poland, v. 11, n. 6, p. 609-615. 2002.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E.; ***Planejamento e otimização de experimentos***. Editora da Unicamp, Campinas 1996.

BEVILACQUA, J. E. ***Estudos sobre a caracterização e estabilidade de amostras de sedimento do rio Tietê***. 1996. Tese de Doutorado – Instituto de Química da Universidade de São Paulo, São Paulo.

BIDLINGMEYER, B.A. ***Practical HPLC Methodology and Applications***. 1. ed. New York, NY: Wiley Interscience Publication, 1992.

BILLINGS. ***Seminário Billings 2002: Avaliação e identificação de áreas e ações prioritárias para conservação, recuperação e uso sustentável da Bacia Hidrográfica da Billings***. Instituto Socioambiental, São Paulo, 2003.

BIXIAN, M.; JIAMO, F.; GANG, Z.; ZHENG, L.; YUSHUN, M.; GUOYING, S.; XINGMIN, W. Polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments from the Pearl river and estuary, China: spatial and temporal distribution and sources. **App. Geochem.**, v. 16, p. 1429-1445, 2001.

BJØRSETH, A.; RAMDAHL, T. **Handbook of polycyclic aromatic hydrocarbons**. v. 2. New York: Marcel Dekker, 1985.

BODNÁR, E.; POLYÁK, K.; HLAVAY, J. Material transport between the atmosphere and sediment of the Lake Balaton. **Microchem. J.**, v. 79, p. 221-230, 2005.

BOUCHEZ M.; BLANCHET D.; HAESELER F. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the environmental – Properties, origins, fate. **Rev. Inst. Franc. Petr.**, v. 51, p. 407-419, 1996a.

BOUCHEZ M.; BLANCHET D.; HAESELER F. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the environmental – Microbial degradation. **Rev. Inst. Franc. Petr.**, v. 51, p. 797-828, 1996b.

BRASIL. MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO URBANO E MEIO AMBIENTE. CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE (CONAMA). **Resolução n. 344, de 25/03/04**, Brasília. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res04/res34404.xml>>. Acesso em 27 abril 2009.

BRASIL. MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO URBANO E MEIO AMBIENTE. CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE (CONAMA). **Resolução n°357 de 17/03/2005**, Brasília, DF, 2005. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>>. Acesso em 27 abril 2009.

BRITO, C.F.; MARTINS, E.A.J., SOUZA, R.R.; OTOMO, J.I.; FURUSAWA, H.A.; FERNANDES, D.; COTRIM, M.E.B.; PIRES, M. A. F. ***Estudo de compostos orgânicos persistentes em águas destinadas ao abastecimento público na região de Santo André, SP. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica.*** In: A. S. Messias; M. R. N. Costa. (Org.). Gestão Integrada de Ambientes Costeiros e Impactos Ambientais. Série Encontro das Águas., n.05 ISBN 978857084177-3, ed. FASA Gráfica. Recife/PE, 2009.

BUSSAB, W.O. ***Análise de variância e de regressão: uma introdução em métodos quantitativos.*** 2.ed. São Paulo: Atual, 1988.

CAVALVANTE, R. M.; FILHO, M. S. N.; VIANA, R. B.; OLIVEIRA, I. R. N.; NASCIMENTO, R. F. Utilização de extração em fase sólida (SPE) na determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em matrizes aquosas ambientais. ***Quim. Nova***, v. 30, n. 3, p. 560-564, 2007.

CETESB – Companhia de Tecnologia de Saneamento de São Paulo. ***Relatório de qualidade de águas interiores do estado de São Paulo de 2005.*** Disponível em:

<<http://www.cetesb.sp.gov.br/Agua/rios/monitoramento.asp>>. Acesso em: 30 jul. 2009.

CETESB – Companhia de Tecnologia de Saneamento de São Paulo. ***Relatório de qualidade de águas interiores do estado de São Paulo de 2006.*** Disponível em:

<<http://www.cetesb.sp.gov.br/Agua/rios/monitoramento.asp>>. Acesso em: 30 jul. 2009.

CHALMERS, A. T.; VAN METRE, P. C.; CALLENDER, E. The chemical response of particle-associated contaminants in aquatic sediments to urbanization in New England, U.S.A. ***J. Contamin. Hidrol.***, v. 91, p. 4-25, 2007.

CHEN, B. XUAN, X.; ZHU, L.; WANG, J.; GAO, Y.; YANG, K.; SHEN, X.; LOU, B. Distributions of polycyclic aromatic hydrocarbons in surface water, sediments and soils of Hangzhou City, China. **Water Res.**, v. 38, p. 3558-3568, 2004.

CHEN, L.; RAN, Y.; XING, B.; MAI, B.; HE, J.; WEI, X.; FU, J.; SHENG, G. Contents and sources of polycyclic aromatic hydrocarbons and organochlorine pesticides in vegetable soils of Guangzhou, China. **Chemosphere**, v. 60, p. 879-890, 2005.

CHEN, Y.; ZHU, L.; ZHOU, R. Characterization and distribution of polycyclic aromatic hydrocarbon in surface water and sediment from Qiantang River, China. **J. Haz. Mat.**, v. 141, n.1, p. 148-155, 2007.

CHRISTENSEN, E. R.; ARORA, S. Source apportionment of PAHs in sediments using factor analysis by time records: Application to lake Michigan, USA. **Water Res.**, v. 41, p. 168-176, 2007.

CIOLA, REMOLO. **Fundamentos da cromatografia a líquido de alto desempenho**. São Paulo: Edgard Blücher, 2006.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L. **Introdução a métodos cromatográficos**. 7. ed. Campinas: Universidade de Campinas, 1997.

COPAT, A. **Avaliação da contaminação da água subterrânea de poços tubulares por combustíveis fósseis no município de Santo André, São Paulo. Uma contribuição à gestão ambiental**. 2006. Tese de Doutorado - Instituto de Pesquisa Energéticas e Nucleares, São Paulo.

CORDEIRO, D. S. **Estudos de aspectos do comportamento fotoquímico e eletroquímico de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos**. 2006. Dissertação de Mestrado – Instituto de Química da Universidade de São Paulo, São Paulo.

CÓRDOBA, P.A.; LIZAMA-VERGARA, J.S.; GOMEZ-JERIA, A.E.; ALIAGA, M.M.; CAMPOS-VALLETTE, E.; CLAVIJO D, J.V.; GARCIA-RAMOS, S. SANCHEZ-CORTES Humic acids as molecular assemblers in the surface-enhanced Raman scattering detection of polycyclic aromatic hydrocarbons P. Leyton, I. **Vibral Spectroscopy**, v. 46, p. 77–81, 2008

DE LUCA, G., FURESI, A., MICERA, G., PANZANELLI, A., PIU, P.C., PILO, M.I., SPANO, N.; SANNIA, G. Nature, distribution and origin of polycyclic aromatic Hydrocarbons (PAHs) in the sediments of Olbia harbor (Northern Sardinia, Italy). **Marine Pollution Bulletin**, Amsterdam, v. 50, p.1223–1232, 2005.

DEL GRANDE, M.; REZENDE, M. O. O.; ROCHA, O. Distribuição de compostos organoclorados nas águas e sedimentos da bacia do rio piracicaba, São Paulo, Brasil. **Quim. Nova**, v. 26, n. 5, p. 678-686, 2003.

EMBRAPA - EMPRESA BRASILEIRA DE AGROPECUÁRIA. **Procedimentos normativos de levantamentos pedológicos**. Centro Nacional de Pesquisa de Solo. Humberto Gonçalves dos Santos, et. al - Brasília. 2ª ed. Rio de Janeiro, 1995.

ESTEVES, F. A. **Fundamentos de Liminologia**. Rio de Janeiro: Interciência, 1998.

EURACHEM-CITAC. **Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement**. 2ª ed., 2000. Disponível em: <http://www.measurementuncertainty.org>
Acesso em 27 abril, 2009.

FANG, M.; HSIEH, P.; KO, F.; BAKER, J. E.; LEE, C. Source and distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in the sediments of Kaoping river and submarine canyon system, Taiwan. **Mar. Pollut. Bull.**, v. 54, p. 1179-1189, 2007.

FROEHNER, S.; MARTINS, R. F. Avaliação do destino e bioacumulação do benzo(a)pireno através de simulação computacional. **Quim. Nova**, v. 31, n. 5, p. 1089-1093, 2008.

FRONZA, L. **Capacidade de liberação de hidrocarbonetos dos sedimentos de áreas contaminadas do estuário da Lagoa dos Patos – RS**. 2006. Dissertação de Mestrado – Fundação Universidade federal de Rio Grande, Rio Grande do Sul.

FURUSAWA, H. A. **Validação de Ensaios Químicos**. IPEN-CNEN/SP, (adaptação eletrônica baseada no documento DOQ-CGCRE-008 de 01/03/2003 do INMETRO). São Paulo, 2007.

GEVÃO, B.; JONES, K. C.; HAMILTON-TAYLOR, J. Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) deposition to and processing in a small rural lake, Cumbria UK. **Sci. Tot. Environ.**, v. 215, p. 231-242, 1998.

GRIMMER, G. **Environmental carcinogens polycyclic aromatic hydrocarbons: chemistry, occurrence, biochemistry, carcinogenicity**. Boca Raton: CRC Press, 1983

GUIA EURACHEM. **Determinando a incerteza na medição analítica**. Versão Brasileira, 2ª ed, 2002

GUO, W.; HE, M.; YANG, Z.; LIN, C.; QUAN, X.; WANG, H. Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in water, suspended particulate matter and sediment from Daliao river watershed, China. **Chemosphere**, v. 68, p. 93-104, 2007.

HARRIS, C. D. **Análise química quantitativa**. 6.ed. Rio de Janeiro: LTC, 2005.

HARRISON, R. M. **Pollution, Causes, Effects and Control**. 3.ed. London: The Royal Society of Chemistry, 1996.

HELALEH, M. I. H.; AL-OMAIR,A.; GEVÃO, N. B. Validation of various extraction techniques for the quantitative analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in sewage sludges using gas chromatography – ion trap mass spectrometry. **J. Chromatogr. A.**, v. 1083, p. 153-160, 2005.

HIBBERT, D.B.; JIANG, J.; MULHOLLAND, M. I.; Propagation of uncertainty in high – performance liquid chromatography with UV – VIS detection. **Anal. Quim. A.**, v. 443 p. 205-214, 2001.

HYÖTYLÄINEN, T.Principles, developments and applications of on-line coupling of extraction with chromatography. **J. Chromatogr. A.**, v. 1153, p. 14-20, 2007.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **População recenseada e estimada, segundo os municípios - São Paulo, 2007.**

Disponível em:

<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/contagem2007/contagem_final/tabela1_1_20.pdf >. Acesso em: 05 de jun. de 2009.

INMETRO - INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA. **Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos.** Rio de Janeiro. DOQ-CGCRE-008. Revisão 02. Jun. 2007.

INMETRO - INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA. **Quality management systems-guidelines for performance improvements.** Rio de Janeiro. NBR ISO 9004:2000. Revisão 01. Mar. 2003.

ISO GUM - **Examples of Uncertainty Budgets for Chemical Analysis.** Disponível em http://www.ut.ee/katsekoda/GUM_examples Acesso em 03 julho 2009.

JOHNSON, W.E.; FENDINGER, N.J.; PLIMMER, J.R. Solid-phase extraction of pesticides from water: possible interferences from dissolved organic material. **Anal. Chem.**, v.63, p. 1510-1513, 1991.

JUNK, G. A.; RICHARD, J. J. Organics in water: solid phase extraction on small scale. ***Anal. Chem.***, v.60, p. 451-454, 1988.

KO, F.; BAKER, J.; FANG, M.; LEE, C. Composition and distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in the surface sediments from the Susquehanna river. ***Chemosphere***, v. 66, p. 277-285, 2007.

LANÇAS, F. M. ***Validação de métodos cromatográficos de análise***. São Carlos: RiMa, 2004a.

LANÇAS, F. M. ***Extração em fase sólida (SPE)***. São Carlos: RiMa, 2004b.

LEBRE, D. T. ***Desenvolvimento de metodologia para a determinação de herbicidas e inseticidas em águas superficiais utilizando extração líquido-sólido e cromatografia líquida de alta eficiência***. 2000. Dissertação de Mestrado – Instituto de Pesquisa Energéticas e Nucleares, São Paulo.

LEITE, F. ***Validação em análise química***. 5.ed. Campinas, SP: Editora Átomo, 2008.

LI, K.; WOODWARD, L. A.; KARU, A. E.; LI, Q. X.; LI, Q. X. Immunochemical detection of polycyclic aromatic hydrocarbons and 1 – hidroxypyrene in water and sediment samples. ***Anal. Chim. Ac.***, v. 419, p. 1-8, 2000.

LOPES, W. A.; ANDRADE, J. B. Fontes, formação, reatividade e quantificação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) na atmosfera. ***Química Nova***, v. 19, n.5, p. 497-515, 1996.

LOUGH W.J.; WAGNER, I. ***Hight Performance Liquid Cromatography Fundamental Principes and Prattice***. 1 ed. London: Blakie Academic & Professional, 1995.

LOURENÇO, R. A. **Metodologia para determinação de biomarcadores geoquímicos orgânicos em sedimento – hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos, esteróides e alquenonas**. 2003. Dissertação de Mestrado – Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, São Paulo.

MANAHAN, S. E. **Environmental chemistry**. 8.ed. London: Boca Raton: CRC Press, 2004.

MANAHAN, S. E. **Environmental science and technology a sustainable approach to green science and technology**. 2.ed. London: Boca Raton: CRC Press, 2007.

MANOLI, E.; SAMARA C.; KONSTANTINOU, I.; ALBANIS, T. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the bulk precipitation and surface waters of northern Greece. **Chemosphere**, v. 41, p. 1845-1855, 2000.

MANOLI, E.; SAMARA. E. Polycyclic aromatic hydrocarbons in natural waters: sources, occurrence and analysis. **Trends Anal. Chem.**, v. 18, n. 6, p. 417-428, 1999.

MARTINS, C. C. **Avaliação da introdução de esteróis fecais e hidrocarbonetos marcadores geoquímicos da baía do Almirantad, Península Antártica**. 2001. Dissertação de Mestrado – Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, São Paulo.

MARTINS, C. C. **Marcadores orgânicos geoquímicos em testemunho de sedimento do sistema estuário de Santos e São Vicente, SP: um registro histórico da introdução de hidrocarbonetos no ambiente marinho**. 2005. Tese de Doutorado – Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, São Paulo.

MARTENS, D.; MAGUHN, J.; SPITZAUER, P.; KETTRUP, A.; Occurrence and distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in an agricultural ecosystem. **J. Anal. Chem.**, v. 359, n. 7-8, p. 546-554.

MEIRE, R. O.; AZEREDO, A.; PEREIRA, M. S.; TORRES, J. P. M.; MALM, O. Polycyclic aromatic hydrocarbons assessment in sediment of national parks in southeast Brazil. **Chemosphere**. v. 73, p. 5180-5185, 2008.

MOORE, D.S.; MCCABE, G.P. **Introduction do the practice of statistics**. 5.ed., New York, 2006.

NETTO, A. D. P.; MOREIRA, J. C.; DIAS, A. E. X. O.; ARBILLA, G.; FERREIRA, L. F. V.; OLIVEIRA, A. S.; BAREK, J. Avaliação da contaminação humana por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) e seus derivados nitrados (NHPA): uma revisão metodológica. **Química Nova**, v. 23, n. 6, p. 765-773, 2000.

NOVOTNY, V.; OLEM, H.; **Water Quality Prevention, Identification, and Management of Diffuse Pollution**. New York: VNR, 1993.

ONU – ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS. **Comissão Mundial para o Meio Ambiente: Nosso futuro comum**. Rio de Janeiro: FGV, 1998.

PHILIPPI JR, A. **Saneamento, Saúde e Meio Ambiente: Fundamentos para um desenvolvimento sustentável**. Barueri, S.P.: Manole, 2005.

PIÑUELA, C. G.; SALCES, R. M. A.; ANDRÉS, A.; ORTIZ, I.; VIGURI, J. R. Validated analytical strategy for the determination of polycyclic aromatic compounds in marine sediments by liquid chromatography coupled with diode – array detection and mass spectrometry. **J. Chromatogr. A.**, v. 1129, p. 189-200, 2006.

PICHON, V.; CAU DIT COUMES, C.; CHEN, L.; GUENU, S.; HENNION. M.-C. Simple removal of humic and fulvic acid interferences using polymeric sorbents for the simultaneous solid-phase extraction of polar acidic, neutral and basic pesticides. **J. Chromatogr. A**, v.737, p. 25-33, 1996

PORTO, M. F. A. **Sistema de gestão da qualidade de água: Uma proposta para o caso brasileiro**. 2002. Tese (Livre-Docência) – Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo.

PORTO, M. F. A.; PORTO, R. L. L. Gestão de bacias hidrográficas. **Estud. av.**, v. 22, n. 63, p. 43-60, 2008.

PURCARO G.; CONTE L. S. Rapid validated method for the analysis of benzo(a)pyrene in vegetable oils by using solid-phase microextraction – gas chromatography – mass spectrometry. **J. Chromatogr. A.**, v. 1176 p. 231-235, 2007.

RACHDAWONG, P.; CHRISTENSEN, E. R.; KARLS, F. J. Historical PAH fluxes to lake Michigan sediments determined by factor analysis. **Water Res.**, v. 32, n. 8, p. 2422-2430, 1998.

RAND, G. M.; **Fundaments of aquatic toxicology**: Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment. Washington D.C: Boca Raton: CRC Press, 1995.

REBOUÇAS, A.C.; BRAGA, B.; TUNDISI, J.G. **Águas Doces no Brasil**. 3. ed. São Paulo: Editora Escrituras, 2008.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quim. Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RM 68 – Rede Metrológica RS. **Incerteza de medição: Guia prático do avaliador de laboratórios**. Revisão 03. Fev.2009.

SCHWARZENBACH, R. P.; GSCHWEND, P. M.; IMBODEN, D. M. **Environmental organic chemistry**. 2.ed. New Jersey: Wiley-Interscience, 2003.

SEMASA. Serviço Municipal de Saneamento Ambiental de Santo André. ***Estudo técnico do Projeto para a vizinhança Pintassilgo - Santo André, Brasil.*** Disponível em:

<<http://www.semasa.com.br/Documentos/Manacial/Mananciais>>. "download"
– Acesso em: 19 jun. 2009.

SILVA, A. A. R.; LOBO, I.; GUEDES, C. L. B.; PINTO, J. P. Análise de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) em solos utilizando agitação ultra-sônica, tubo aquecedor/minicondensador e cromatografia gasosa. ***Seminário: Ciências Exatas e Tecnológicas***, Londrina, v. 27, n. 2, p. 105-112, 2006.

SILVA, M. R. C. ***Estudo do sedimento da bacia hidrografia do Mogi-Guaçu, com ênfase na determinação de metais.*** 2002. Dissertação de Mestrado – Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Paulo.

SISINNO, C. L. S.; NETTO, A. D. P.; REGO, E. C. P.; LIMA, G.S.V. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em resíduos sólidos industriais: uma avaliação preliminar do risco potencial de contaminação ambiental e humana em áreas de disposição de resíduos. ***Caderno de Saúde Pública***, Rio de Janeiro, v.19, n.2, 2003.

SMITH, R. M. Before the injection – modern methods of sample preparation for separation techniques. ***J. Chromatogr. A.***, v. 1000, p. 3-27, 2003.

SONG, Y.; JING X.; FLEISCHMANN.; WILKE, B. M.; Comparative study of extraction methods for the determination of PAHs from contaminated soils and sediments. ***Chemosphere.*** v. 48 p. 993-1001, 2002.

STRAŠKRABA, M.; TUNDISI, J. G. ***Diretrizes para o gerenciamento de lagos: Gerenciamento da qualidade de águas e represas.*** v. 9. São Carlos: Instituto Internacional de Ecologia, 2000.

SUN, F.; LITTLEJOHN, D.; GIBSON, M. D. Ultrasonication extraction and solid phase extraction clean-up for determination of US EPA 16 priority pollutant polycyclic aromatic hydrocarbons in soils by reversed-phase liquid chromatography with ultraviolet absorption detection. **Anal. Chim. A.**, v. 364, p. 1-11, 1998.

TORRES, J. P. M.; MALM, O.; VIEIRA, E. D. R.; JAPENGA, J.; KOOPMANS, G. F. Organic micro pollutants on river sediments from Rio de Janeiro State, Southeast Brazil. **Cad. Saúde Pública**. v. 18, n. 2, p. 477-488, 2002.

USDA – UNITED STATE DEPARTMENT OF AGRICULTURE SOLI STAFF. **Soil Taxonomy: a Basic System of Soil Classification for Making and Interpreting Soil Surveys**. Washington, 1975.

VANDER HEYDEN, Y.; NIJHUS, A.; SMEYERS-VERBEKE, J.; VANDEGINSTE, B.G.M.; MASSART, D.L. Guidance for robustness / ruggedness tests in method validation. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 24, p. 723-753, 2001.

VANLOON, G. W.; DUFFY, S. J. **Environmental chemistry a global perspective**. 2.ed. Oxford: Oxford University Press, 2005.

VASCONCELLOS, P. C. **Um estudo sobre a caracterização de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e seus derivados, e hidrocarbonetos alifáticos saturados em material particulado atmosférico proveniente de sítios urbanos, suburbanos e florestais**. 1996. Tese de Doutorado – Instituto de Química da Universidade de São Paulo, São Paulo.

VASCONCELLOS, P. C.; CICCIOLO, P.; ARTAXO P.; BRANCALEONI E.; CECINATO A.; FRATONI M. Determinação dos hidrocarbonetos saturados e policíclicos aromáticos na atmosfera Amazônica. **Química Nova**, v. 21, n.4, p. 385-293, 1998.

VEIGA, I. G. **Avaliação da origem dos hidrocarbonetos em sedimentos superficiais de manguezais da região norte da Baía de Todos os Santos/ Bahia**. 2003. Dissertação de Mestrado – Centro de Ciência e Tecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense, Rio de Janeiro.

VOLLHARDT, K. P. C.; SCHORE, N. E. **Química orgânica: estrutura e função**. 4.ed. Porto Alegre: Bookman, 2004.

VON SPERLING, M. **Princípios do tratamento biológico de águas residuárias: Introdução a qualidade das águas e ao tratamento de esgotos**. v. 1. Belo Horizonte: UFMG, 1995.

WANG, Q.; ZHAO, Y.; YAN, D.; YANG, L.; LI, Z.; HUANG, B. Historical Records of Airborne Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Analyzing Dated Corks of the Bark Pocket in a Long petiole Beech Tree. **Environ. Sci. Technol.**, v. 38, p. 4739-4744, 2004.

WELLS, P. G.; RAND, G. M. **Introduction to Aquatic Toxicology**. Washington D.C: Boca Raton: CRC Press, 1995.

WERRES, F.; BALSAA, P.; SCHMIDT, T. C. Total concentration analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous samples with high suspended particulate matter content. **J. Chromatogr. A.**, v. 1216, p. 2235-2240, 2009.

WILD, S. R.; BERROW, S. P.; JONES, K.C. The persistence of polynuclear aromatic hydrocarbons (PHAs) in sewage sludge amended agricultural soils. **Environ. Pollut.**, v. 76, p. 25-32, 1991.

YAMADA, T. M. **Determinação de fontes de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e alifáticos em sedimentos de ambientes aquáticos**. 2006. Dissertação de Mestrado – Universidade federal de São Carlos, São Paulo.

YANG, Z.; FENG, J.; NIU, J.; SHEN, Z. Release of polycyclic aromatic hydrocarbons from Yangtze river sediment cores during periods of simulated resuspension. ***Environ. Pollut.***, v. 155, p. 366-374, 2008.

YING, L.; LING, C.; YINJIAN, T.; QINGHUI, H.; JIANFU, Z. Determination of trace polycyclic aromatic in surface sediments of Huangpu river using high performance liquid chromatography. ***Chin. J. Chromatogr.***, v. 25, n. 3, p. 356-361, 2007.

ZACARIAS, D. ***A variação sazonal na concentração de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e material particulado MP10 na atmosfera de São Paulo***. 2006. Dissertação de Mestrado – Instituto de Pesquisa Energéticas e Nucleares, São Paulo.

ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. ***Ecotoxicologia aquática: Princípios e aplicações***. 1.ed. São Carlos: RiMa, 2006.

ZEAITER, M.; ROGER, J.M.; BELLON-MAUREL, V.; RUTLEDGE, D.N.; Robustness of models developed by multivariate calibration. Part I: The assessment of robustness. ***Trends Anal. Chem.***, v. 23, n. 2, 2004.

ANEXO 1

Análise de variância (ANOVA)

Conforme pode ser observado nas tabelas a seguir, a regressão é significativa para todos os compostos, visto que o valor de $F_{1,14,95\%}$ calculado para todos os compostos é maior que o $F_{1,14,95\%}$ tabelado, portanto a equação é adequada para os pares de pontos. Apesar de a equação ser adequada existe pontos fora, pois a falta de ajuste é evidenciada para praticamente todos os compostos exceto para o acenaftileno que apresentou $F_{6,8,95\%}$ calculado menor que o tabelado.

A falta de ajuste não é evidenciada para o composto acenaftileno. Esses dados indicam certa dispersão dos pontos, porém, pela porcentagem explicada (99,98% explicada em 99,99% explicável), essa dispersão não compromete o ajuste aplicado e o uso da curva.

TABELA 21: Análise de variância (ANOVA) para o naftaleno na matriz. Intervalo de concentração: 10 a 700 ng.mL⁻¹. Modelo linear adotado $y = 22,117x - 40,318$.

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F
Regressão	404115079,07	1	404115079,07	$F_{1,14,95\%}$
Resíduos	139699,99	14	9978,57	40498,29
Falta de Ajuste	125688,87	6	20948,15	$F_{6,8,95\%}$
Erro Puro	14011,12	8	1751,39	11,96
Total	404254779,06	15		
% de variação explicada	99,97		$F_{1,14,95\%}$	4,6
% máxima de variação explicável	100,00		$F_{6,8,95\%}$	3,58

TABELA 22: Análise de variância (ANOVA) para o acenaftileno na matriz. Intervalo de concentração: 10 a 700 ng.mL⁻¹. Modelo linear adotado $y = 14,835x - 0,538$.

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F
Regressão	181812458,48	1	181812458,48	$F_{1,14,95\%}$
Resíduos	41623,05	14	2973,08	61153,00
Falta de Ajuste	24774,43	6	4129,07	$F_{6,8,95\%}$
Erro Puro	16848,62	8	2106,08	1,96
Total	181854081,53	15		
% de variação explicada	99,98		$F_{1,14,95\%}$	4,6
% máxima de variação explicável	99,99		$F_{6,8,95\%}$	3,58

TABELA 23: Análise de variância (ANOVA) para o fluoreno na matriz. Intervalo de concentração: 10 a 700 ng.mL⁻¹. Modelo linear adotado $y = 101,66x + 153,39$.

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F
Regressão	8538675427,38	1	8538675427,38	$F_{1,14,95\%}$
Resíduos	3082905,04	14	220207,50	38775,59
Falta de Ajuste	2585344,95	6	430890,82	$F_{6,8,95\%}$
Erro Puro	497560,09	8	62195,01	6,93
Total	8541758332,41	15		
% de variação explicada	99,96		$F_{1,14,95\%}$	4,6
% máxima de variação explicável	99,99		$F_{6,8,95\%}$	3,58

TABELA 24: Análise de variância (ANOVA) para o fenantreno na matriz. Intervalo de concentração: 10 a 700 ng.mL⁻¹. Modelo linear adotado $y = 284,69x + 1823,6$.

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F
Regressão	66961581797,07	1	66961581797,07	$F_{1,14,95\%}$
Resíduos	39450565,25	14	2817897,52	23762,96
Falta de Ajuste	31453687,09	6	5242281,18	$F_{6,8,95\%}$
Erro Puro	7996878,17	8	999609,77	5,24
Total	67001032362,32	15		
% de variação explicada	99,94		$F_{1,14,95\%}$	4,6
% máxima de variação explicável	99,99		$F_{6,8,95\%}$	3,58

TABELA 25: Análise de variância (ANOVA) para o antraceno na matriz. Intervalo de concentração: 10 a 700 ng.mL⁻¹. Modelo linear adotado $y = 759,643x - 2977,173$.

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F
Regressão	476750532515,66	1	476750532515,66	$F_{1,14,95\%}$
Resíduos	697029608,37	14	49787829,17	9575,64
Falta de Ajuste	539623164,59	6	89937194,10	$F_{6,8,95\%}$
Erro Puro	157406443,78	8	19675805,47	4,57
Total	477447562124,03	15		
% de variação explicada	99,85		$F_{1,14,95\%}$	4,6
% máxima de variação explicável	99,97		$F_{6,8,95\%}$	3,58

TABELA 26: Análise de variância (ANOVA) para o fluoranteno na matriz. Intervalo de concentração: 10 a 700 ng.mL⁻¹. Modelo linear adotado $y = 91,470x + 778,445$.

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F
Regressão	6912343007,44	1	6912343007,44	$F_{1,14,95\%}$
Resíduos	3261942,64	14	232995,90	29667,23
Falta de Ajuste	2866186,05	6	477697,67	$F_{6,8,95\%}$
Erro Puro	395756,59	8	49469,57	9,66
Total	6915604950,08	15		
% de variação explicada	99,95		$F_{1,14,95\%}$	4,6
% máxima de variação explicável	99,99		$F_{6,8,95\%}$	3,58

TABELA 27: Análise de variância (ANOVA) para o pireno na matriz. Intervalo de concentração: 10 a 700 ng.mL⁻¹. Modelo linear adotado $y = 50,178x + 400,951$.

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F
Regressão	2080152564,08	1	2080152564,08	$F_{1,14,95\%}$
Resíduos	437485,34	14	31248,95	66567,11
Falta de Ajuste	330237,39	6	55039,56	$F_{6,8,95\%}$
Erro Puro	107247,95	8	13405,99	4,11
Total	2080590049,42	15		
% de variação explicada	99,98		$F_{1,14,95\%}$	4,6
% máxima de variação explicável	99,99		$F_{6,8,95\%}$	3,58

TABELA 28: Análise de variância (ANOVA) para o benzo(a)antraceno na matriz. Intervalo de concentração: 10 a 700 ng.mL⁻¹. Modelo linear adotado $y = 54,651x + 1345,050$.

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F
Regressão	2467543001,37	1	2467543001,37	$F_{1,14,95\%}$
Resíduos	4383920,26	14	313137,16	7880,07
Falta de Ajuste	4155096,46	6	692516,08	$F_{6,8,95\%}$
Erro Puro	228823,80	8	28602,97	24,21
Total	2471926921,64	15		
% de variação explicada	99,82		$F_{1,14,95\%}$	4,6
% máxima de variação explicável	99,99		$F_{6,8,95\%}$	3,58

TABELA 29: Análise de variância (ANOVA) para o criseno na matriz. Intervalo de concentração: 10 a 700 ng.mL⁻¹. Modelo linear adotado $y = 235,667x + 1787,716$.

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F
Regressão	45884885189,89	1	45884885189,89	$F_{1,14,95\%}$
Resíduos	27415962,59	14	1958283,04	23431,18
Falta de Ajuste	22264001,87	6	3710666,98	$F_{6,8,95\%}$
Erro Puro	5151960,72	8	643995,09	5,76
Total	45912301152,48	15		
% de variação explicada	99,94		$F_{1,14,95\%}$	4,6
% máxima de variação explicável	99,99		$F_{6,8,95\%}$	3,58

TABELA 30: Análise de variância (ANOVA) para o benzo(e)acenaftileno na matriz. Intervalo de concentração: 10 a 700 ng.mL⁻¹. Modelo linear adotado $y = 161,921x + 1860,659$.

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F
Regressão	21661111364,58	1	21661111364,58	$F_{1,14,95\%}$
Resíduos	22087274,52	14	1577662,47	13729,88
Falta de Ajuste	18046699,61	6	3007783,27	$F_{6,8,95\%}$
Erro Puro	4040574,92	8	505071,86	5,96
Total	21683198639,10	15		
% de variação explicada	99,90		$F_{1,14,95\%}$	4,6
% máxima de variação explicável	99,98		$F_{6,8,95\%}$	3,58

TABELA 31: Análise de variância (ANOVA) para o benzo(k)fluoranteno na matriz. Intervalo de concentração: 10 a 700 ng.mL⁻¹. Modelo linear adotado $y = 134,351x + 574,650$.

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F
Regressão	14270079214,43	1	14270079214,43	$F_{1,14,95\%}$
Resíduos	31786828,74	14	2270487,77	6285,03
Falta de Ajuste	31010189,37	6	5168364,90	$F_{6,8,95\%}$
Erro Puro	776639,37	8	97079,92	53,24
Total	14937234709,84	15		
% de variação explicada	95,53		$F_{1,14,95\%}$	4,6
% máxima de variação explicável	99,98		$F_{6,8,95\%}$	3,58

TABELA 32: Análise de variância (ANOVA) para o benzo(a)pireno na matriz. Intervalo de concentração: 10 a 700 ng.mL⁻¹. Modelo linear adotado $y = 131,626x + 437,894$.

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F
Regressão	14313815265,36	1	14313815265,36	$F_{1,14,95\%}$
Resíduos	13079143,36	14	934224,53	15321,60
Falta de Ajuste	9752232,79	6	1625372,13	$F_{6,8,95\%}$
Erro Puro	3326910,57	8	415863,82	3,91
Total	14326894408,72	15		
% de variação explicada	95,91		$F_{1,14,95\%}$	4,6
% máxima de variação explicável	99,98		$F_{6,8,95\%}$	3,58

TABELA 33: Análise de variância (ANOVA) para o benzo(a,h)antraceno na matriz. Intervalo de concentração: 10 a 700 ng.mL⁻¹. Modelo linear adotado $y = 41,636x - 554,687$.

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F
Regressão	1432237362,22	1	1432237362,22	$F_{1,14,95\%}$
Resíduos	4738229,81	14	338444,99	4231,82
Falta de Ajuste	4480157,62	6	746692,94	$F_{6,8,95\%}$
Erro Puro	258072,19	8	32259,02	23,15
Total	1436975592,03	15		
% de variação explicada	95,67		$F_{1,14,95\%}$	4,6
% máxima de variação explicável	99,98		$F_{6,8,95\%}$	3,58

TABELA 34: Análise de variância (ANOVA) para o indeno(1,2,3-cd)pireno na matriz. Intervalo de concentração: 10 a 700 ng.mL⁻¹. Modelo linear adotado $y = 130,404x - 831,106$.

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste F
Regressão	14049346219,53	1	14049346219,53	$F_{1,14,95\%}$
Resíduos	17461126,63	14	1247223,33	11264,50
Falta de Ajuste	15516973,74	6	2586162,29	$F_{6,8,95\%}$
Erro Puro	1944152,89	8	243019,11	10,64
Total	14066807346,17	15		
% de variação explicada	95,88		$F_{1,14,95\%}$	4,6
% máxima de variação explicável	99,99		$F_{6,8,95\%}$	3,58

ANEXO 2

Cálculo de Incerteza

Incerteza na preparação da solução padrão

Foram consideradas as incertezas da pureza dos padrões, do volume dos frascos e da massa envolvida.

Incerteza na preparação das soluções de trabalho

Foram consideradas as incertezas do volume dos frascos, volume das pipetas e coeficiente de dilatação.

Incerteza na preparação das soluções da curva analítica

Foram consideradas as incertezas do volume dos frascos, volume das pipetas e coeficiente de dilatação.

Incerteza associadas à curva analítica

Foram consideradas as incertezas das soluções padrão e as incertezas associadas às áreas.

O cálculo da incerteza da curva analítica foi feito pelo método dos mínimos quadrados. Foi considerado um ensaio equivalente ao ponto $0,1\mu\text{g.mL}^{-1}$ da curva analítica e massa de amostra 0,5g.

Utilizou-se a planilha de cálculos em Excel para combinação das áreas da amostra, concentração das soluções padrão dos cinco pontos da curva, inclinação da reta e cruzamento da reta com o eixo y (ISO GUM, 2009).

Incerteza associadas às áreas

Para a medida das áreas das soluções padrão e da amostra equivalente ao ponto $0,1\mu\text{g.mL}^{-1}$ da curva, foi considerado o desvio padrão das respostas obtidas dividido por raiz de n, onde n é o numero de repetições. A incerteza associada ao equipamento foi considerada 0,5% de acordo com estudo realizado por Hibbert (2001).

Incerteza associada à recuperação

Foram consideradas as incertezas associadas à concentração real e à obtida.

Resultados do Cálculo de Incerteza

São apresentados a seguir, os resultados para os compostos para os quais se obteve recuperação acima de 70%.

Resultado das incertezas para o Fenantreno para o ponto 0,1 da curva analítica.

	$u_{rel}(Curva)$	$u_{rel}(Vf)$	$u_{rel}(m_{sedto})$	$u_{rel}(RECUP)$	$U_{r[Ph]}$
[Ph] = 0,4978 $\mu\text{g/g}$	0,0186	0,0029	0,0002	0,0431	0,0234

Resultado:	Fenantreno contido no sedimento:	0,498 $\mu\text{g/g}$
	Incerteza expandida	0,047 $\mu\text{g/g}$

FIGURA 38 Contribuição das incertezas para determinação de Fenantreno em amostra fortificada com aproximadamente 0,4 $\mu\text{g/g}$.

Resultado das incertezas para o Antraceno para o ponto 0,1 da curva analítica.

	$u_{rel}(Curva)$	$u_{rel}(Vf)$	$u_{rel}(m_{sedto})$	$u_{rel}(RECUP)$	$u_{r[An]}$
[An] = 0,5266 $\mu\text{g/g}$	0,0110	0,0029	0,0002	0,0630	0,0337

Resultado:	Antraceno contido no sedimento:	0,527 $\mu\text{g/g}$
	Incerteza expandida	0,067 $\mu\text{g/g}$

FIGURA 39: Contribuição das incertezas para determinação de Antraceno em amostra fortificada com aproximadamente 0,4 $\mu\text{g/g}$.

Resultado das incertezas para o Fluoranteno para o ponto 0,1 da curva analítica.

	$u_{rel}(Curva)$	$u_{rel}(Vf)$	$u_{rel}(m_{sedto})$	$u_{rel}(RECUP)$	$u_{r[FL]}$
[FI] = 0,4536 $\mu\text{g/g}$	0,0156	0,0029	0,0002	0,0077	0,0080

Resultado:	Fluoranteno contido no sedimento:	0,454 $\mu\text{g/g}$
	Incerteza expandida	0,016 $\mu\text{g/g}$

FIGURA 40: Contribuição das incertezas para determinação de Fluoranteno em amostra fortificada com aproximadamente 0,4 $\mu\text{g/g}$.

Resultado das incertezas para o Pireno para o ponto 0,1 da curva analítica.

	$u_{rel}(Curva)$	$u_{rel}(Vf)$	$u_{rel}(m_{sedto})$	$u_{rel}(RECUP)$	$u_{r[Py]}$
[Py] = 0,4653 $\mu\text{g/g}$	0,0149	0,0029	0,0002	0,0048	0,0074

Resultado:	Pireno contido no sedimento:	0,465 $\mu\text{g/g}$
	Incerteza expandida	0,015 $\mu\text{g/g}$

FIGURA 41: Contribuição das incertezas para determinação de Pireno em amostra fortificada com aproximadamente 0,4 $\mu\text{g/g}$.

Resultado das incertezas para o Benzo[a]Antraceno para o ponto 0,1 da curva analítica.

	$u_{rel}(Curva)$	$u_{rel}(Vf)$	$u_{rel}(m_{sedto})$	$u_{rel}(RECUP)$	$u_{r(B[a]An)}$
[B[a]An] = 0,5468 $\mu\text{g/g}$	0,0110	0,0029	0,0002	0,0076	0,0075

Resultado:	Benzo[a]antraceno contido no sedimento:	0,547 $\mu\text{g/g}$
	Incerteza expandida	0,015 $\mu\text{g/g}$

FIGURA 42: Contribuição das incertezas para determinação de Benzo[a]antraceno em amostra fortificada com aproximadamente 0,4 $\mu\text{g/g}$.

Resultado das incertezas para o Criseno para o ponto 0,1 da curva analítica.

	$u_{rel}(Curva)$	$u_{rel}(Vf)$	$u_{rel}(m_{sedto})$	$u_{rel}(RECUP)$	$u_{r(Chry)}$
[Chry] = 0, 4465 $\mu\text{g/g}$	0,0228	0,0029	0,0002	0,0165	0,0126

Resultado:	Criseno contido no sedimento:	0,446 $\mu\text{g/g}$
	Incerteza expandida	0,025 $\mu\text{g/g}$

FIGURA 43: Contribuição das incertezas para determinação de Criseno em amostra fortificada com aproximadamente 0,4 $\mu\text{g/g}$.

Resultado das incertezas para o Benzo[e]acenaftileno para o ponto 0,1 da curva analítica.

	$u_{rel}(Curva)$	$u_{rel}(Vf)$	$u_{rel}(m_{sedto})$	$u_{rel}(RECUP)$	$u_{f[B[e]Acy]}$
[B[e]Acy] = 0,4584 µg/g	0,0129	0,0029	0,0002	0,0129	0,0085

Resultado:	Benzo[e]acenaftileno contido no sedimento:	0,458 µg/g
	Incerteza expandida	0,017 µg/g

FIGURA 44: Contribuição das incertezas para determinação de Benzo[e]acenaftileno em amostra fortificada com aproximadamente 0,4 µg/g.

Resultado das incertezas para o Benzo[k]fluoranteno para o ponto 0.1 da curva analítica.

	$u_{\text{rel}}(\text{Curva})$	$u_{\text{rel}}(Vf)$	$u_{\text{rel}}(m_{\text{sedto}})$	$u_{\text{rel}}(\text{RECUP})$	$u_{\text{f[B[k]FI]}}$
[B[k]FI] = 0,5242 µg/g	0,0257	0,0029	0,0002	0,0306	0,0210

Resultado:	Benzo[k]fluoranteno contido no sedimento:	0,524	µg/g
	Incerteza expandida	0,042	µg/g

FIGURA 45: Contribuição das incertezas para determinação de Benzo[k]fluoranteno em amostra fortificada com aproximadamente 0,4 µg/g.

Resultado das incertezas para o Benzo[a]pireno para o ponto 0,1 da curva analítica.

	$u_{rel}(Curva)$	$u_{rel}(Vf)$	$u_{rel}(m_{sedto})$	$u_{rel}(RECUP)$	$u_{r(B[a]Py)}$
[B[a]Py] = 0,5338 $\mu\text{g/g}$	0,0176	0,0029	0,0002	0,0291	0,0182

Resultado:	Benzo[a]pireno contido no sedimento:	0,534 $\mu\text{g/g}$
	Incerteza expandida	0,036 $\mu\text{g/g}$

FIGURA 46: Contribuição das incertezas para determinação de Benzo[a]pireno em amostra fortificada com aproximadamente 0,4 $\mu\text{g/g}$.

Resultado das incertezas para o DiBenzo[a,h]antraceno para o ponto 0,1 da curva analítica.

	$u_{\text{rel}}(\text{Curva})$	$u_{\text{rel}}(\text{Vf})$	$u_{\text{rel}}(m_{\text{sedto}})$	$u_{\text{rel}}(\text{RECUP})$	$u_{\text{r}}[\text{DiB[a,h]An}]$
[DiB[a,h]An] = 0,5086 $\mu\text{g/g}$	0,0170	0,0029	0,0002	0,0222	0,0143

Resultado:	DiB[a,h]An contido no sedimento:	0,509 $\mu\text{g/g}$
	Incerteza expandida	0,029 $\mu\text{g/g}$

FIGURA 47: Contribuição das incertezas para determinação de Dibenzo[a,h]antraceno em amostra fortificada com aproximadamente 0,4 $\mu\text{g/g}$.