

## CERTIFICAÇÃO DE MATERIAL DE REFERÊNCIA DE HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS (HPA) EM SOLUÇÃO

Evelyn de F. Guimarães<sup>1,2</sup>, Eliane Cristina Pires do Rego<sup>1</sup>, Janaína M. Rodrigues<sup>1</sup>, José Daniel Figueroa Villar<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Análise Orgânica, Divisão de Metrologia Química, Diretoria de Metrologia Científica e Industrial, Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial – INMETRO, Xerém, Brasil, [ecrego@inmetro.gov.br](mailto:ecrego@inmetro.gov.br)

<sup>2</sup>Departamento de Química, Instituto Militar de Engenharia – IME, Rio de Janeiro, Brasil, [efguimaraes@inmetro.gov.br](mailto:efguimaraes@inmetro.gov.br)

**Sumário:** Este trabalho apresenta o valor das propriedades do material e os cálculos das incertezas associadas ao Material de Referência Certificado (MRC) de 16 HPA em solução. Foram certificados os seguintes analitos: Naftaleno, Acenaftileno, Acenafteno, Fluoreno, Fenantreno, Antraceno, Fluoranteno, Pireno, Benz[a]antraceno, Criseno, Benzo[b]fluoranteno, Benzo[k]fluoranteno, Benzo[a]pireno, Indeno[1,2,3-cd]pireno, Dibenzo[a,h]antraceno e Benzo[ghi]perileno.

**Palavras-chave:** Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA), Material de Referência Certificado (MRC), contaminante ambiental.

### 1. INTRODUÇÃO

Os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA) são uma classe de substâncias amplamente distribuídas no ambiente, muitas das quais com potencial tóxico testado e comprovado em animais de laboratório. Os HPA são formados principalmente em processos de combustão incompleta de matérias orgânicas e encontram-se na natureza como contaminantes de água, solos, ar e alimentos [1] (Figura 1).

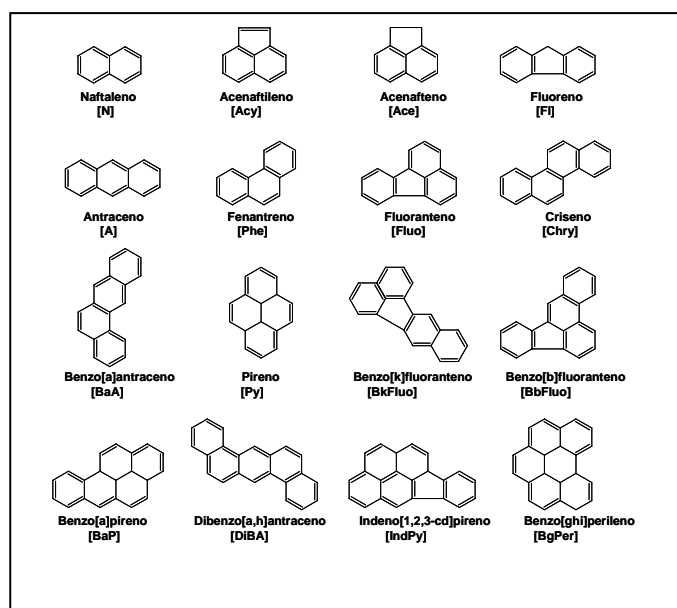


Fig. 1: Estrutura química dos HPA considerados como prioritários pela U. S. EPA e suas abreviações

A Agência Americana de Proteção Ambiental (U.S. – Environmental Protection Agency – EPA) classifica 16 HPA como poluentes prioritários, que representam uma ameaça à saúde e à integridade do ecossistema. O potencial carcinogênico e mutagênico apresentado por alguns HPA tem estimulado o desenvolvimento de pesquisas no sentido de identificar e quantificar as prováveis fontes de exposição humana a estes compostos [1]. Estes HPA foram alvo do processo de certificação descrito neste trabalho.

Em função disto, a análise destes contaminantes com o enfoque metrológico torna-se fundamental, pois possibilita o conhecimento do nível de contaminação com elevada confiabilidade nos resultados. Para superar este desafio, o Inmetro tem um papel importante de prover a rastreabilidade e a confiabilidade destas medições, o que ocorre no âmbito das atividades da Divisão de Metrologia Química (Dquim), que tem a responsabilidade de desenvolver procedimentos de referência, implantar métodos primários e desenvolver e certificar materiais de referência na área de química.

O Material de Referência Certificado (MRC) é um material de referência, acompanhado de uma documentação emitida por um organismo com autoridade, a qual fornece um ou mais valores de propriedades especificadas com as incertezas e as rastreabilidades associadas, utilizando procedimentos válidos [2]. Sendo assim, objetivando a certificação de MR de uma solução de 16 HPA em tolueno, utilizou-se a técnica de espectrometria de massas com diluição isotópica (EMDI), considerado método primário pelo CCQM (Comitê Consultivo para a Quantidade de Matéria) [3].

Foram realizados estudos de homogeneidade, caracterização, estabilidade de curta duração, que define condições de transporte, e de longa duração, que define condições de armazenamento e validade do material. Estes estudos e as incertezas associadas foram calculados conforme procedimentos estabelecidos pela ISO Guide 35 [4]. A incerteza do valor certificado deve ser compatível com a exatidão e a confiabilidade requeridas no processo de medição.

### 2. OBJETIVO

O presente trabalho teve como objetivo determinar os valores certificados de fração mássica, com a respectiva incerteza expandida, para os 16 HPA no MRC 8363.0001 desenvolvido pelo Inmetro/Dimci/Dquim.

### 3. DESENVOLVIMENTO

A metodologia de análise utilizada no processo de certificação do MR de 16 HPA em tolueno foi a cromatografia gasosa com espectrometria de massas, utilizando a técnica de diluição isotópica (CG/EMDI).

Todos os padrões e amostras foram preparados gravimetricamente e as concentrações foram corrigidas pela pureza de cada analito, por cromatografia à gás com detecção por ionização em chama (CG-DIC) com duas colunas capilares com polaridades diferentes. A técnica de GC-DIC é fundamentada na determinação direta da fração de massa, tendo em conta fatores como a capacidade de resposta dos analitos e suas impurezas [5,6].

A curva de calibração foi construída através da relação entre área da substância / área do padrão interno e a razão de massa da substância / massa do padrão interno. Os valores de razão de área e razão de massa foram usados para obter a equação de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados. Na construção das curvas de calibração, as diluições foram realizadas também por gravimetria. Utilizou-se o método de padronização interna (diluição isotópica), realizado através do preparo gravimétrico de soluções-padrão das substâncias de interesse em seis níveis de concentrações equidistantes (1 a 11 µg/g), às quais adicionou-se quantidade conhecida de PI dos respectivos HPA investigados (Figura 2).

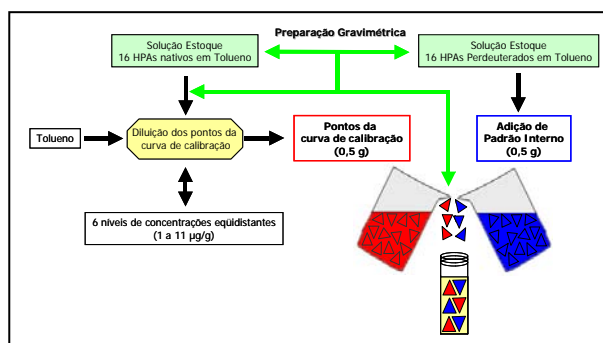


Fig. 2: Preparo dos pontos da curva de calibração

Os íons selecionados para a quantificação dos analitos de interesse e dos padrões internos respectivos estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Íons selecionados para a quantificação

HPA nativo / perdeuterado	Íons (m/z)
N / Naftaleno perdeuterado <sup>a</sup>	128 / 136
Acy / Acenaftileno perdeuterado <sup>a</sup>	152 / 160
Ace / Acenafteno perdeuterado <sup>a</sup>	154 / 164
Fl / Fluoreno perdeuterado <sup>a</sup>	166 / 176
Phe / Fenantreno perdeuterado <sup>a</sup>	178 / 188,3
A / Antraceno perdeuterado <sup>a</sup>	178 / 188,3
Fluo / Fluoranteno perdeuterado <sup>a</sup>	202 / 212,3
Py / Pireno perdeuterado <sup>a</sup>	202 / 212,3
BaA / Benz[a]antraceno perdeuterado <sup>a</sup>	228,2 / 240,4
Chry / Criseno perdeuterado <sup>a</sup>	228,2 / 240,4
BbFluo / Benzo[b]fluoranteno perdeuterado <sup>a</sup>	252,4 / 264,4
BkFluo / Benzo[k]fluoranteno perdeuterado <sup>a</sup>	252,4 / 264,4
BaP / Benzo[a]pireno perdeuterado <sup>a</sup>	252,4 / 264,4
IndPy / Indeno[1,2,3-cd]pireno perdeuterado <sup>a</sup>	276,4 / 288,4
DiBa / Dibenzo[a,h]antraceno perdeuterado <sup>a</sup>	278,4 / 292,4
BgPer / Benzo[ghi]perileno perdeuterado <sup>a</sup>	276,4 / 288,4

(a) Padrão interno

A Figura 3 apresenta o perfil cromatográfico para a solução contendo os 16 HPA e os seus respectivos padrões internos isotópicos (perdeuterados) em tolueno na concentração referente ao terceiro ponto da curva de calibração (5 µg/g). No cromatograma estão representados 3 segmentos de detecção no espectrômetro de massas: um por SCAN (varredura total) e 2 por MSI (Monitoramento de Íon Seletivo).

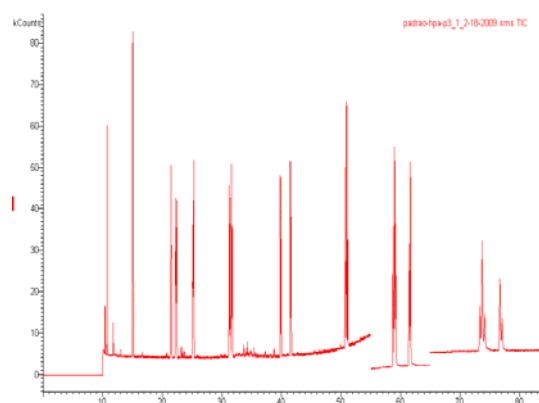


Fig. 3: Cromatograma dos 16 HPA nativos e 16 HPA perdeuterados em tolueno referente ao terceiro nível da curva de calibração.

No processo de certificação do MR de 16 HPA em tolueno, foram realizados estudos de homogeneidade, de caracterização, de estabilidade de curta duração e estabilidade de longa duração, com a estimativa da contribuição de incerteza de cada etapa.

A incerteza combinada da caracterização ( $u_{caracterização}$ ) é obtida através Equação 1:

$$u_c = \sqrt{(u_{razãoA})^2 + (u_{cc})^2 + (u_{mAmostra})^2 + (u_{mPI})^2 + (u_p)^2} \quad (1)$$

Onde:

$u_{razãoA}$  : incerteza da razão de área

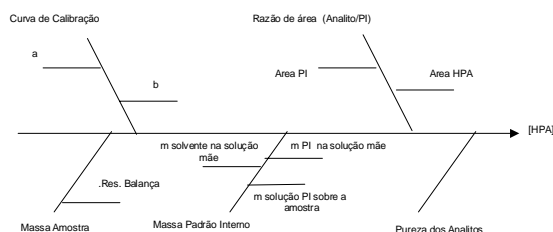
$u_{cc}$  : incerteza da curva de calibração

$u_{mAmostra}$  : incerteza da massa da amostra

$u_{mPI}$  : incerteza da massa de padrão interno

$u_{mP}$  : incerteza da pureza do analito

Para a melhor identificação das fontes, a Figura 4 apresenta o diagrama de causa e efeito (diagrama de Ishikawa ou espinha de peixe) da estimativa da incerteza inerente à caracterização do MRC de HPA em tolueno.



**Fig. 4: Diagrama de causa e efeito para a estimativa da incerteza inerente à caracterização do MRC de HPA**

De acordo com a ISO GUIDE 35 [4] a incerteza associada à homogeneidade da amostra ( $u_{\text{homogeneidade}}$ ) é calculada utilizando análise de variância (ANOVA) de fator único obtida com o Microsoft Excel®. A incerteza combinada é calculada pela expressão de acordo com as características dos dados obtidos.

Como a variância entre amostras (MQentre) foi maior que a variância dentro de uma mesma amostra (MQdentro), a  $u_{\text{homogeneidade}}$  foi calculada pela Equação 2 [4].

$$u_{\text{homogeneidade}} = \sqrt{\frac{MQ_{\text{entre}} - MQ_{\text{dentro}}}{n}} \quad (2)$$

A metodologia utilizada no estudo de estabilidade de curta duração seguiu o método isócrono, onde todas as amostras são analisadas no final do tempo de estudo, em condições de repetitividade [4].

O estudo de estabilidade de longa duração foi conduzido de maneira clássica, ou seja, as amostras individuais foram preparadas ao mesmo tempo (mesmo lote) sob condições idênticas, sendo analisadas em tempos diferentes. Neste estudo foram definidas duas temperaturas de armazenamento (0 e 30 °C) e uma temperatura de referência (4 °C). Foram submetidas 6 ampolas do candidato a MRC, selecionadas aleatoriamente, para cada temperatura (0, 4 e 30 °C) em cada tempo de estudo [4]. O estudo teve como tempo de duração de 17 meses.

A análise estatística utilizada para avaliar a estabilidade do material foi a ANÁLISE de VARIÂNCIA da regressão linear. Consideraram-se estáveis os analitos que apresentem coeficiente angular próximo de zero (Variável X1) e valor P (P level) maior que 0,05. A partir dos dados de regressão gerada pela análise de variância, calculou-se a incerteza inerente à estabilidade.

A incerteza associada à estabilidade de longa foi calculada multiplicando-se o valor para o erro padrão, correlacionado com a linha referente à Variável X1, pelo tempo do estudo. A incerteza associada à estabilidade foi calculada a partir da Equação 3.

$$u_{\text{estab.}} = s(b1) \cdot t \quad (3)$$

Onde:

$s(b1)$  : erro padrão;

$t$  : tempo de estudo.

A incerteza padrão combinada ( $u_{\text{MRC}}$ ) é calculada com a combinação das contribuições das incertezas dos estudos de homogeneidade, de caracterização e de estabilidade de longa duração. A incerteza padrão combinada ( $u_{\text{MRC}}$ ) foi calculada segundo a Equação 4.

$$u_{\text{MRC}} = \sqrt{(u_{\text{caracterização}})^2 + (u_{\text{homogeneidade}})^2 + (u_{\text{estabilidade}})^2} \quad (4)$$

Onde:

$u_{\text{caracterização}}$ : incerteza inerente à caracterização;

$u_{\text{homogeneidade}}$ : incerteza inerente à homogeneidade;

$u_{\text{estabilidade}}$ : incerteza inerente à estabilidade de longa duração.

A incerteza de curta duração não foi incluída na  $u_{\text{MRC}}$ , pois a mesma é estudada apenas para definir condições de transporte e é desprezível em relação à longa duração.

A incerteza expandida é expressa como o produto da incerteza padrão combinada  $u_{\text{MRC}}$  e do fator de abrangência  $k = 2$  (aproximadamente 95 % de confiança). A incerteza expandida (U) foi calculada segundo a Equação 5 [7, 8].

$$U = u_{\text{MRC}} \cdot k \quad (5)$$

Onde:

U : incerteza expandida;

$u_{\text{MRC}}$  : incerteza padrão combinada;

$k$  : fator de abrangência (aproximadamente 95 % de confiança).

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O método de CG/EMDI foi previamente desenvolvido e validado [9] e o candidato a material de referência certificado de HPA foi certificado para os analitos: Naftaleno (N), Acenaftileno (Acy), Acenafteno (Ace), Fluoreno (Fl), Fenantreno (Phe), Antraceno (A), Fluoranteno (Fluo), Pireno (Py), Benz[a]antraceno (BaA), Criseno (Chry), Benzo[b]fluoranteno (BbFluo), Benzo[k]fluoranteno (BkFluo), Benzo[a]pireno (BaP), Indeno[1,2,3-cd]pireno (IndPy), Dibenzo[a,h]antraceno (DiBa) e Benzo[ghi]perileno (BgPer) em tolueno.

Na Tabela 2 são apresentados os valores das incertezas referentes aos estudos de homogeneidade, de caracterização e de estabilidade de longa duração e a incerteza padrão combinada ( $u_{\text{MRC}}$ ) para cada analito.

**Tabela 2: Valores das incertezas referentes os estudos de homogeneidade, de caracterização e de estabilidade de longa duração e incerteza padrão combinada para cada analito**

HPA	$u_{\text{caracterização}}$ (µg/g)	$u_{\text{Homogeneidade}}$ (µg/g)	$u_{\text{estabilidade}}$ (µg/g)	$u_{\text{MRC}}$ (µg/g)
N	0,07	0,041	0,06	0,10
Acy	0,10	0,082	0,05	0,14
Ace	0,15	0,031	0,11	0,19
Fl	0,11	0,044	0,11	0,16
Phe	0,09	0,036	0,13	0,16
A	0,15	0,047	0,04	0,16
Fluo	0,12	0,099	0,05	0,17
Py	0,12	0,114	0,12	0,20
BaA	0,10	0,039	0,08	0,23
Chry	0,20	0,033	0,14	0,25
BbFluo	0,17	0,120	0,11	0,24
BkFluo	0,13	0,049	0,12	0,18
BaP	0,21	0,078	0,35	0,42
IndPy	0,16	0,044	0,36	0,39
DiBa	0,15	0,078	0,09	0,19
BgPer	0,13	0,068	0,14	0,21

De acordo com o estudo de estabilidade de curta duração, o MRC deve ser transportado por um período máximo de 60 dias a temperatura de 30 °C sem alteração dos seus valores das propriedades certificadas.

De acordo com os dados do estudo de estabilidade de longa duração todos os 16 HPA foram considerados estáveis na temperatura de 4 °C (condição de armazenamento). O estudo de longa teve a duração de 17 (dezesete) meses e após esse período está sendo realizado o monitoramento da estabilidade.

Este MRC é válido até dezembro/2011, podendo ser revalidado conforme o monitoramento da estabilidade que está sendo realizado de acordo com o item 8.4.2. da ISO Guide 35, através do seguinte critério (Equação 6):

$$X_{MRC} - X_{med} \leq k * \sqrt{u_{MRC}^2 + u_{med}^2} \quad (6)$$

Onde:

$X_{MRC}$ : valor da propriedade do MRC;

$X_{med}$ : valor obtido na medição;

$u_{MRC}$ : incerteza padrão combinada declarada no certificado do MRC;

$u_{med}$ : incerteza padrão da medição.

$k$ : Fator de abrangência.

O valor certificado com a respectiva incerteza expandida, para um nível de confiança de 95% ( $k = 2$ ) para o MRC 8363.0001, estão apresentados nas Tabelas 3 e 4.

O MRC 8363.0001 foi envasado em ampolas de vidro âmbar contendo 1,2 mL de solução/ampola, e este foi acondicionado em embalagens adequadas contendo cinco ampolas cada (Figura 5). Informações sobre este MRC estão disponibilizadas no site do Inmetro ([www.inmetro.gov.br/metcientifica/MRC/mrc\\_8363.asp](http://www.inmetro.gov.br/metcientifica/MRC/mrc_8363.asp)).

**Tabela 3: Valor certificado (em µg/g) e incerteza expandida (U) para cada analito constituinte do MRC 8363.0001.**

HPA	Valor certificado (µg/g)	U <sup>a</sup> (µg/g)
N	4,58	0,20
Acy	4,92	0,28
Ace	4,76	0,37
Fl	5,07	0,32
Phe	4,61	0,31
A	5,09	0,32
Fluo	4,85	0,33
Py	4,73	0,40
BaA	4,73	0,46
Chry	5,29	0,49
BbFluo	4,51	0,47
BkFluo	5,06	0,36
BaP	4,65	0,83
IndPy	5,00	0,79
DiBa	4,54	0,38
BgPer	4,65	0,41

<sup>a</sup>  $k = 2$ , 95 %

**Tabela 4: Valor Certificado (em µg/mL)<sup>b</sup> e incertezas expandidas (U) para cada analito constituinte do MRC 8363.0001**

HPA	Valor certificado (µg/g)	U <sup>a,b</sup> (µg/mL)
N	3,97	0,18
Acy	4,27	0,24
Ace	4,13	0,32
Fl	4,40	0,28
Phe	4,00	0,27
A	4,41	0,27
Fluo	4,20	0,29
Py	4,10	0,35
BaA	4,10	0,40
Chry	4,59	0,43
BbFluo	3,91	0,41
BkFluo	4,39	0,31
BaP	4,03	0,72
IndPy	4,34	0,68
DiBa	3,94	0,33
BgPer	4,03	0,36

<sup>a</sup>  $k = 2$ , 95 %

<sup>b</sup> Valor Certificado em µg/mL foi convertido através da densidade do MRC de HPA a 20 °C ( $d = 0,8668562 \pm 0,0000011$  g/cm<sup>3</sup>)



**Fig. 5: MRC 8363.0001 acondicionado em embalagem com 5 ampolas**

## 5. CONCLUSÃO

O candidato a material de referência de HPA em tolueno foi certificado para todos os 16 analitos citados anteriormente. Estes resultados constituem importantes subsídios para o trabalho que o Inmetro/Dimci/Dquim, através do Laboratório de Análise Orgânica (Labor), está desenvolvendo no sentido de produzir e certificar materiais de referência para HPA. O uso de um método primário de análise, ou seja, a técnica espectrometria de massas com diluição isotópica, irá conferir rastreabilidade e confiabilidade das medições na área ambiental.

A disponibilidade deste material em nível nacional oferece uma alternativa inédita, mais econômica e com maior agilidade para que laboratórios acreditados ou não, garantam a qualidade de suas medições.

Vale destacar que, os laboratórios acreditados ou em processo de acreditação carecem de MRC, preferencialmente produzidos no país, devido a questões referentes à validade e elevados custos de importação. Diante de tal cenário, é imperiosa a atuação do Inmetro como órgão provedor de MRC em áreas estratégicas.

## REFERÊNCIAS

- [1] M. Mastral, M. Callen, A Review on Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) Emissions from Energy Generation. *Environmental Science & Technology*, v. 34, p. 3051, 2000.
- [2] INMETRO- Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. *Vocabulário Internacional de Metrologia. Conceitos Fundamentais e Gerais e Termos Associados*. VIM, 2009.
- [3] M. Milton, T. Quinn, "Primary methods for the measurement of amount of substance," *Metrologia* Vol. 38, pp. 289-296, 2001.
- [4] ISO Guide 35. Reference materials – General and statistical principles for certification. International Organization for Standardization. ISO, 3 ed. 2006.
- [5] B. King; S. Westwood. GC-FID as a primary method for establishing the purity of organic CRMs used for drugs in sport analysis, *Fresenius. J Anal Chem.*, 370, 194–199, 2001.
- [6] David L. Duewer, Reenie M. Parris, Edward White V, Willie E. May; An Approach to the Metrologically Sound Traceable Assessment of the Chemical Purity of Organic Reference Materials, NIST Special Publication 1012, 2004.
- [7] ISO GUM. Guia para a Expressão da estimativa de Incerteza de Medição. 3ª edição brasileira, ABNT/Inmetro, SERIFA comunicação, Rio de Janeiro, 2003.
- [8] GUIA EURACHEM/CITAC. Determinando a incerteza na Medição Analítica. 2ª edição, SBM, 2002
- [9] E. F. Guimarães, E. C. P. Rego, H. C. M. Cunha, J. M. Rodrigues, J. D. F. Villar, V. S. Cunha, Validação de Metodologia Analítica para a Determinação de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Solução Produto & Produção, vol. 11, n. 1, p. 113 - 123, fev. 2010