

VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE 12 HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS EM AR

Letícia S. B. Pereira^{1,2*}; Jaqueleine Vitória A. Melo^{1,2}; Beatriz C. S. da Cruz¹; Ana Paula S. Macedo¹; Liliane R. Teixeira¹; Vanessa E. Dabkiewicz¹; Thelma Pavesi¹;

¹*Centro de Estudos da Saúde do Trabalhador e Ecologia Humana/ Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca / Fundação Oswaldo Cruz (Cesteh/Ensp/Fiocruz)*

²*Universidade Federal do Rio de Janeiro*

*leticiasbp2201@gmail.com

Palavras-Chave: CLAE, qualidade analítica, HPAs

Introdução

Os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HPAs) são uma classe de centenas de substâncias caracterizadas por dois a seis anéis aromáticos condensados, formados por meio da combustão incompleta de matéria orgânica em altas temperaturas e pressões (ALMEIDA, 2021). São encontrados no ambiente em misturas complexas, e os compostos com três a cinco anéis são os mais analisados, sendo 16 compostos prioritários pela Agência Internacional para Pesquisa do Câncer (IARC, 2013).

A exposição humana pode ser ambiental ou ocupacional, e são absorvidos majoritariamente por inalação, também podendo ser por ingestão e/ou pele (WHO, 2021). Dessa forma, estão associados ao desenvolvimento e aumento de doenças, tais como: comprometimento da capacidade cognitiva e câncer de pulmão e/ou pele na população (HUMPHREYS; VALDÉS HERNÁNDEZ, 2023).

A determinação e quantificação da exposição humana e/ou contaminação ambiental pelos HPAs podem ser alcançadas por técnicas analíticas disponíveis como a cromatografia. Para isso, é necessário que um método seja desenvolvido e/ou otimizado para que atinja os objetivos desejados com a análise e que seja possível reproduzir determinadas condições, como técnica cromatográfica, temperatura, tempo de corrida, volume de matriz necessária, entre outros, que podem ser definidos por meio de leitura bibliográfica e adaptações (RIBEIRO, 2019). Na literatura, há autores descrevem o uso de filtros combinados à resina XAD-2 para coleta de HPAs no ar, realizando extração por ultrassom e análise por HPLC com detecção por fluorescência (NIOSH, 1998).

Para garantir a confiabilidade do método desenvolvido e otimizado, é necessária a validação de um método analítico, que é um conjunto de experimentos e análises estatísticas a partir dos dados obtidos naqueles experimentos, que avaliam a confiabilidade de um método (BRITO et al., 2003). Um método é considerado validado se os parâmetros do experimento cumprem os pré-requisitos estabelecidos por organizações competentes, como a Agência

Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) ou o Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO). Dessa maneira, avaliam-se os resultados e a eficiência do método, verificando se ele apresenta o resultado esperado (BRITO et al., 2003).

Dessa forma, o objetivo deste estudo foi otimizar e validar uma metodologia para a determinação de 12 HPAs no ar, segundo o INMETRO (2020).

Material e Métodos

A validação seguiu os parâmetros do INMETRO, conforme o documento “Diretrizes para Validação de Métodos Analíticos”, Revisão 09, 2020. Os parâmetros avaliados incluíram efeito matriz, linearidade, limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), sensibilidade, recuperação, repetibilidade e precisão intermediária.

Para verificar a existência do efeito matriz, foi preparada uma curva analítica em diluente (60% de acetonitrila (ACN) e 40% de água) e a outra na matriz (XAD-2). Os resultados foram avaliados por Teste t de Student.

A linearidade foi avaliada com o uso da planilha validada e publicada “Planilha para Curva Analítica” de Bazílio (2012), que estimou os parâmetros da homocedasticidade, regressão e teste de desvio de linearidade, autocorrelação dos resíduos e teste de normalidade. Foram definidas a faixa linear e a de trabalho (Bazílio, 2012).

O LQ foi estimado pela equação 1 e o LD pela equação 2 (INMETRO, 2020).

$$\text{Equação 1: } LQ = 10^*s / b$$

Onde:

s: desvio padrão do menor ponto da faixa linear

b: inclinação (coeficiente angular) da curva analítica

$$\text{Equação 2: } LD = LQ / 3,3$$

A sensibilidade foi verificada pela inclinação da curva analítica, pelo coeficiente angular (INMETRO, 2020).

Para a recuperação, foram utilizadas concentrações baixa, média e alta da faixa de trabalho, com 6 replicatas genuínas. As amostras foram extraídas com 5mL de ACN e 5mL de diclorometano (DCM) e passaram 1 hora no ultrassom. Em seguida foi retirada uma alíquota de 5mL e evaporados até 1 mL. Foram avolumadas até 5mL com diluente da fase móvel,

filtradas e injetadas. Foram comparados os resultados de amostras fortificadas com padrão analítico antes e depois do processo de extração (INMETRO, 2020).

A repetibilidade foi avaliada considerando a dispersão dos resultados das amostras (INMETRO, 2020).

A precisão intermediária do método foi avaliada pela medição de 6 amostras fortificadas independentes, com três concentrações, e que passaram pelo processo de extração, analisadas por um mesmo analista, em três dias diferentes, calculando a dispersão dos resultados (INMETRO, 2020).

Foi utilizado a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), com detector de fluorescência. Uma coluna ODS Hypersil C18, diâmetro (mm) 150 x 3, tamanho da partícula 3 μ m, usando acetonitrila (B) e água (A). O gradiente linear foi 0/1min (60% B, 40% A); 1/8min (20% B, 80% A) 8/8,5min (60% B, 40% A); 8,5/10min (60% B, 40% A). O fluxo de 1,5 mL min⁻¹, a temperatura da coluna de 35 °C, volume de injeção de 10 μ L, a pressão inicial de 371 kgf/cm². Os canais utilizados foram, em ordem de excitação e emissão, em nanômetros (nm): Ch1 (220/325); Ch 2 (260/380); Ch 3 (263/310); Ch 4 (292/410).

Resultados e Discussão

Como resultado do teste t de Student, todos os analitos apresentaram valores de t menores que $t_{crítico}$, não houve efeito matriz para todos os analitos, como demonstrado nas tabelas 1 e 2.

Tabela 1: Resultados da avaliação do efeito matriz pelo Teste t de Student para naftaleno, acenafteno, fluoreno, fluoranteno, criseno e benzo(b)fluoranteno.

Teste t	Analitos					
	NAF	ACF	FLU	FOR	CRI	BBF
Grau de Liberdade	32	26	26	26	32	26
t_a	0,63	0,38	0,61	0,20	0,25	0,28
t_b	1,1	1,79	0,25	1,79	1,35	1,36
$t_{(1-a/2;GL)}$	2,04	2,04	2,04	2,04	2,04	2,04

Fonte: A autora, 2025. Legenda: NAF: naftaleno; ACF: acenafteno; FLU: fluoreno; FOR: fluoranteno; CRI: criseno; BBF: benzo(b)fluoranteno; t_a : valor de t calculado para as interseções das curvas; t_b : valor de t calculado para as inclinações das curvas; $t_{(1-a/2;GL)}$: valor crítico.

Tabela 2: Resultados da avaliação do efeito matriz pelo Teste t de Student para benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno; dibenzo(a,h)antraceno, fenantreno, benzo(a)antraceno, antraceno e pireno.

Teste t	Analitos						
	BKF	BAP	DIB	FEN	BAA	ANT	PIR
Grau de Liberdade	32	32	32	32	32	32	26
t_a	0,01	0,10	0,46	0,25	0,05	0,57	0,66
t_b	0,19	1,45	0,59	0,17	1,03	0,52	1,64
$t_{(1-\alpha/2;GL)}$	2,04	2,04	2,04	2,04	2,04	2,04	2,04

Fonte: A autora, 2025. Legenda: BKF: benzo(k)fluoranteno; BAP: benzo(a)pireno; DIB: dibenzo(a,h)antraceno; FEN: fenantreno; BAA: benzo(a)antraceno; ANT: antraceno; PIR: pireno; t_a : valor de t calculado para as interseções das curvas; t_b : valor de t calculado para as inclinações das curvas; $t_{(1-\alpha/2;GL)}$: valor crítico.

A avaliação da linearidade foi realizada com a curva em diluente, já que não há efeito matriz. Como resultados para a linearidade: há homocedasticidade, a regressão linear é significativa, não há desvio de linearidade, não há autocorrelação dos resíduos e os resultados seguem a distribuição normal. Os resultados estão demonstrados na tabela 3.

Tabela 3: Resultados de faixa linear e faixa de trabalho, limite de detecção e de quantificação.

Analito	Faixa linear e de trabalho (µg/L)	LQ (µg/L)	LD (µg/L)	Equação do modelo linear	Coeficiente de correlação (r^2)
NAF	1-200	1	0,3	$y = 45573,94 + 24441,66x$	0,999
ACF	10-200	10	3	$y = 497353,68 + 81666,68x$	0,997
FLU	1-100	1	0,3	$y = -219288,01 + 126910,52x$	0,981
FOR	1-200	1	0,3	$y = 1213,86 + 1681,0601x$	0,997
CRI	0,5-10	0,5	0,2	$y = -1265,75 + 59898,75x$	0,997
BBF	1-200	1	0,3	$y = 7614,71 + 5822,16x$	0,998
BKF	0,5-50	0,5	0,2	$y = 333,81 + 95096,50x$	0,999
BAP	0,1-5	0,1	0,03	$y = -4766,41 + 141487,67x$	0,999
FEN	5-200	5	1,5	$y = 48432,42 + 14499,78x$	0,997
BAA	1-50	1	0,3	$y = -1018,75 + 0,45x$	0,999
ANT	1-200	1	0,3	$y = 80797,89 + 47259,94x$	0,999
PIR	1-200	1	0,3	$y = 83578,98 + 32300,06x$	0,999

Fonte: A autora, 2025. Legenda: NAF: naftaleno; ACF: acenafteno; FLU: fluoreno; FOR: fluoranteno; CRI: criseno; BBF: benzo(b)fluoranteno; BKF: benzo(k)fluoranteno; BAP: benzo(a)pireno; FEN: fenantreno; BAA: benzo(a)antraceno; ANT: antraceno; PIR: pireno; LD: limite de detecção; LQ: limite de quantificação.

Neste estudo, para a determinação do limite de quantificação (LQ), os cálculos foram realizados conforme as diretrizes estabelecidas pelo INMETRO. Contudo, o valor obtido foi inferior ao primeiro ponto da curva analítica. Diante disso, foi adotado como LQ o menor ponto da curva de calibração de cada analito, uma vez que este atendeu aos demais critérios de validação exigidos.

O coeficiente angular da curva analítica está diretamente relacionado à sensibilidade do método, representando o quanto a resposta instrumental varia proporcionalmente à concentração do analito. De modo geral, os valores obtidos indicaram que o método apresenta sensibilidade adequada para a quantificação dos analitos nas faixas estudadas, refletindo boa capacidade do sistema em detectar alterações mesmo em níveis baixos.

Os resultados obtidos para os ensaios de recuperação foram considerados satisfatórios para todos os analitos, conforme o critério de aceitação estabelecido pelo INMETRO (2020), que preconiza valores entre 80% e 110%. Os dados correspondentes encontram-se apresentados na tabela 4.

Tabela 4: Resultados da recuperação de todos os HPAs.

Analitos	Recuperação (%)
ACF	91,37 - 97,71
ANT	99,46 - 101,86
BAA	97,31 - 98,15
BAP	95,33 - 96,96
BBF	96,12 - 98,76
BKF	98,34 - 99,30
CRI	99,98 - 101,17
FEN	99,19 - 100,82
FOR	97,24 - 98,26
FLU	93,67 - 102,57
NAF	89,50 - 92,53
PIR	97,78 - 102,34

Fonte: A autora, 2025. NAF: naftaleno; ACF: acenafteno; FLU: fluoreno; FOR: fluoranteno; CRI: criseno; BBF: benzo(b)fluoranteno; BKF: benzo(k)fluoranteno; BAP: benzo(a)pireno; FEN: fenantreno; BAA: benzo(a)antraceno; ANT: antraceno; PIR: pireno.

Para a repetibilidade e precisão intermediária, os dados apresentaram valores de HorRat inferiores a 2, que mostram variabilidade adequada e desvio padrão relativo/coeficiente de variação, para repetibilidade e precisão intermediária, respectivamente, até 15% (INMETRO, 2020), demonstrando dispersão satisfatória dos resultados como demonstrado na tabela 5.

Tabela 5: Resultados de desvio padrão relativo e de HorRat para avaliação da repetibilidade e precisão intermediária

Analitos	Repetibilidade (HorRat/DPR)	Precisão intermediária (HorRat/CV)
NAF	0,84/4,86%	1,08/5,82%
ACF	1,08/6,12%	0,94/4,88%
FLU	0,95/5,66%	0,99/5,29%
FOR	0,53/2,95%	1,36/7,14%
CRI	0,55/3,14%	0,83/4,42%
BBF	0,52/2,74%	0,95/5,29%
BKF	0,55/3,05%	0,98/5,15%
BAP	0,70/3,67%	0,98/5,07%
FEN	1,1/5,06%	1,35/6,28%
BAA	3,20/0,56%	0,88/4,56%
ANT	0,51/2,90%	0,85/4,49%
PIR	0,78/4,85%	0,90/4,78%

Fonte: NAF: naftaleno; ACF: acenafteno; FLU: fluoreno; FOR: fluoranteno; CRI: criseno; BBF: benzo(b)fluoranteno; BKF: benzo(k)fluoranteno; BAP: benzo(a)pireno; FEN: fenantreno; BAA: benzo(a)antraceno; ANT: antraceno; PIR: pireno. DPR: Desvio padrão relativo; CV: coeficiente de variação HorRat: razão de Horwitz.

Conclusões

A metodologia otimizada e validada por esse trabalho se mostrou eficaz para todos os 14 HPAs, e se mostrou seletiva, linear e precisa para o objetivo, tendo cumprido os parâmetros estabelecidos pelo guia orientativo de validação de métodos analíticos do INMETRO (2020). Dessa maneira, o método poderá ser aplicado com maior confiabilidade e segurança, tanto em relação ao método, como também com relação aos resultados.

Agradecimentos

Letícia Pereira e Jaqueline Melo agradecem ao CNPq projeto ENSP-024-Fio-21-2-2e. e ao Pibic Fiocruz.

Referências

Almeida, Jose Claudino Souza. Estimativa experimental do fator de emissão veicular no Túnel Rebouças. 2021. 135 f. Tese de Doutorado - Faculdade de Engenharia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2021.

Amorim, Antônia.F.V. Química Métodos Cromatográficos. 1º edição. Editora da Universidade Estadual do Ceará- EduECE, 2019

BAZÍLIO, F.S. et al. Uso de Planilha Eletrônica na Verificação da Adequação de Curva Analítica ao Modelo Linear. Revista Analytica, São Paulo, SP, v. 10, n. 59, p. 60–67, jul. 2012.

BRITO, N. M. et al. *Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão*. Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente, v. 13, p. 129–146, 2003.

HUMPHREYS, J.; VALDÉS HERNÁNDEZ, M. del C. Impact of polycyclic aromatic hydrocarbon exposure on cognitive function and neurodegeneration in humans: A systematic review and meta-analysis. *Frontiers in Neurology*, v. 13, 2023.

INMETRO. ORIENTAÇÃO SOBRE VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS. [S. l.: s.n.], jun. 2020.

NIOSH – National Institute for Occupational Safety and Health. Polynuclear Aromatic Hydrocarbons by HPLC: Method 5506. 3. ed. Cincinnati, 1998.

RIBEIRO, J. P. Metodologia científica: teoria e prática. 2. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Regional Office for Europe. *Human health effects of polycyclic aromatic hydrocarbons as ambient air pollutants: report of the Working Group on Polycyclic Aromatic Hydrocarbons of the Joint Task Force on the Health Aspects of Air Pollution*. Copenhagen: World Health Organization, 2021.