

Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ
Centro de Ciências Matemáticas e da Natureza – CCMN
Instituto de Química _ IQ

**VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA
EFICIÊNCIA (CLAE) PARA A IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE
DESREGULADORES ENDÓCRINOS (DE)**

SIDNEI GOMES DOS SANTOS JUNIOR

Agosto 2018

SIDNEI GOMES DOS SANTOS JUNIOR

**VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA
EFICIÊNCIA (CLAE) PARA A IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE
DESREGULADORES ENDÓCRINOS (DE)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Química com Atribuições Tecnológicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do grau em Química.

Orientadoras: **Paula Fernandes de Aguiar (DQA/IQ/UFRJ)**
Débora França de Andrade (DQA/IQ/UFRJ)

Rio de Janeiro

2018

Ficha catalográfica

Código

Santos Jr, Sidnei Gomes dos.

Validação do método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para a identificação e quantificação de desreguladores endócrinos (DE)./ Sidnei Gomes dos Santos Junior – Rio de Janeiro: UFRJ, 2018.

Trabalho de conclusão de curso – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química, 2018.

Orientadores: **Paula Fernandes de Aguiar e Débora França de Andrade** 1. Validação. 2. Desreguladores endócrinos. 3. Cromatografia líquida.

Código

SIDNEI GOMES DOS SANTOS JUNIOR

**VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA
EFICIÊNCIA (CLAE) PARA A IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE
DESREGULADORES ENDÓCRINOS (DE)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Química com Atribuições Tecnológicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de bacharel em Química.

Rio de Janeiro, 01 de agosto de 2018.

Profa. Paula Fernandes Aguiar (DQA/IQ/UFRJ) - Orientadora

Profa. Débora França de Andrade (DQA/IQ/UFRJ) - Co-Orientadora

Prof. Carlos Alberto da Silva Riehl (DQA/IQ/UFRJ)

Profa. Jéssica Frontino Paulino (DQA/IQ/UFRJ)

Eu dedico este trabalho aos meus familiares. Cada um de vocês, a sua medida, estiveram comigo durante toda esta minha longa jornada na graduação. Certamente eu não teria conseguido sem a ajuda, suporte e o amor de vocês. Obrigado

Agradecimentos

Ao meu Deus, pelo seu Amor Imensurável, pelo seu Sacrifício Redentor e por sua Presença Confortante; a Ti rendo graças por tudo. Que a minha vida cante a Ti!

Aos meus Pais Rosalina de Jesus e Sidnei Gomes (*in memoriam*). Pai, gostaria muito de ter tido mais momentos com você, sinto sua falta, queria você aqui hoje. Mãe, me lembro da senhora me dizendo para eu me tornar alguém na vida, entendo que a senhora estava dizendo para eu me tornar um homem digno, justo, honesto e admirável. Palavras me faltam para expressar o quanto te admiro, a senhora nos criou sozinha e fez um excelente trabalho. Te dar orgulho é o que me move.

As minhas irmãs por parte de Mãe: Rosilene e Rosiléia, sou muito feliz por ter vocês como irmãs, sou muito grato por todo carinho e cuidado que vocês têm por mim. Rose, o que seria de mim sem você?

As minhas irmãs por parte de Pai: Sidnéia e Erica, nossa reaproximação foi um dos momentos mais emocionantes que já vivi, relembrar das histórias do nosso Pai sempre nos faz explodir de emoção. Ele faz falta. Dou graças a Deus por ter vocês na minha vida.

As minhas sobrinhas Yasmin e Nayelli. Vocês são as melhores parceiras de dança da Vida. Vocês têm mais que um tio, tem um amigo. Vai malandra!

Ao meu amigo Christiano e meu primo Marcelo, vocês na verdade são irmãos que a vida me deu. Obrigado pelo companheirismo e conselhos.

Agradeço muito a Professora Paula Fernandes de Aguiar. Suas aulas de Quimiometria me inspiraram, sua orientação me motivou, seu jeito de ser me fez te admirar tanto que posso dizer: Te amo! Obrigado!

Agradeço a Professora Débora França de Andrade por suas contribuições para a elaboração desse trabalho me sinto honrado por tê-la como Coorientadora. Obrigado!

Agradeço a Professora Danielle Maia Billa, minha chefe, (Dani Boss), por permitir que a parte experimental desse trabalho fosse realizada no Laboratório de Engenharia Sanitária (LES), localizado na Uerj. Não minto quando digo que a senhora é a melhor chefe que qualquer um poderia querer. Obrigado!

Agradeço a todos os integrantes do LES, trabalhar com vocês é privilégio para poucos. Em especial agradeço a Ana Fagundes, pela ajuda com o cromatografo e ao Allan Argolo pela ajuda com as etapas de extração. O LES é lindo!

A todos vocês o meu mais sincero obrigado

**“As vezes eu acho que, todo preto como eu,
Só quer um terreno no mato só seu, sem luxo,
Descalço, nadar num riacho, sem fome, pegando
as frutas no cacho, Aê truta, é o que eu acho, e
quero também...”**

Racionais MC'S

Resumo

Um grande número de compostos orgânicos conhecidos como desreguladores endócrinos (DE) têm atraído atenção dos pesquisadores devido aos seus efeitos deletérios aos seres vivos. Esses efeitos, como por exemplo, problemas hormonais e distúrbios reprodutivos, variam devido à classe química do DE e pela forma com que ele é absorvido.

Por serem substâncias utilizadas em diversos produtos (plásticos, produtos de higiene pessoal, pesticidas e etc.) eles são encontrados em diversas matrizes ambientais.

Existem diversas técnicas de identificação e quantificação dessas substâncias, as técnicas cromatográficas são as que mais se destacam devido a sua versatilidade e sensibilidade, entretanto sua identificação e quantificação pode ser dificultada pela ação do meio de análise, esse efeito é conhecido como o efeito de matriz.

Para o presente trabalho foi coletada uma amostra do Rio Maracanã e foram construídas curvas analíticas de quatro DE nessa matriz ambiental.

Realizaram-se ensaios de Cromatografia Líquida de Alta Resolução (CLAE) e usando-se as ferramentas estatísticas sobre os dados obtidos pode-se observar a existência do efeito de matriz e a sua influência na quantificação desses DE.

Lista de Figuras

Figura 1	Mapa da região de coleta	30
Figura 2	Fluxograma com as etapas de concentração da amostra	31

Lista de Tabelas

Tabela 1	Composição da fase móvel	33
Tabela 2	Concentrações (mg/L) dos padrões dos desreguladores endócrinos na solução mãe.	34
Tabela 3	Concentração de cada desregulador endócrino nas curvas analíticas.	34
Tabela 4	Comparação das variâncias das curvas analíticas dos desreguladores endócrinos BPA (bisfenol A) e E2 (17 β estradiol).	36
Tabela 5	Comparação das variâncias das curvas analíticas dos desreguladores endócrinos E3 (Estriol) e EE2 (Etinilestradiol).	36
Tabela 6	Valores de t calculados para a comparação das retas analíticas	37
Tabela 7	Valores de G calculados para os valores suspeitos em cada nível de concentração das curvas analíticas dos quatro desreguladores endócrinos estudados (E3- Estriol; BPA- bisfenol A, E2- 17 β estradiol e EE2- Etinilestradiol).	38
Tabela 8	Valores de C _{calc} para os dados das curvas analíticas dos quatro desreguladores endócrinos estudados (E3- Estriol; BPA- bisfenol A, E2- 17 β estradiol e EE2- Etinilestradiol)	39
Tabela 9	Dados das equações das curvas analíticas dos quatro desreguladores endócrinos estudados (E3- Estriol; BPA- bisfenol A, E2- 17 β estradiol e EE2- Etinilestradiol)	39
Tabela 10	Valores de limite de detecção dos quatro desreguladores endócrinos estudados (E3- Estriol; BPA- bisfenol A, E2- 17 β estradiol e EE2- Etinilestradiol) para o método da CLAE	40
Tabela 11	Valores de limite de quantificação dos quatro desreguladores endócrinos estudados (E3- Estriol; BPA- bisfenol A, E2- 17 β estradiol e EE2- Etinilestradiol) para o método da CLAE.	41
Tabela 12	Valores de recuperação (%) dos quatro desreguladores endócrinos estudados (E3- Estriol; BPA- bisfenol A, E2- 17 β estradiol e EE2- Etinilestradiol) para o método da CLAE.	41
Tabela 13	Valores do coeficiente de variação (%) dos quatro desreguladores endócrinos estudados (E3- Estriol; BPA- bisfenol A, E2- 17 β estradiol e EE2- Etinilestradiol) para o método da CLAE.	42

Lista de Quadros

- Quadro 1** . Fórmula estrutural, classe e abreviação de alguns desreguladores endócrinos **19**
- Quadro 2** . Parâmetros de desempenho para a validação de um método analítico (CGCRE 008 de 2011) **22**

Lista de abreviaturas e siglas

ACN	Acetonitrila,
ANVISA	Agencia Nacional de Vigilância sanitária
ANOVA	Análise de Variância
BPA	Bisfenol A
C1	Concentração inferior
C4	Concentração intermediária
C7	Concentração superior
CG	Cromatografia Gasosa
CGCRE	Coordenação Geral de Acreditação
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CV	Coefficiente de Variação
DAD	Arranjo de diodos
DDT	Dicloro-Difenil-Tricloroetano
DE	Desreguladores Endócrinos
DMP	Dimetilftalato
E2	17- β Estradiol
EAS	Ensaio de Atividade Estrogênica
EFS	Extração em Fase Sólida
EM	Espectrometria de Massas
FLU	Fluorescência
IC	Intervalo de Confiança
Inmetro	Instituto Nacional de Metrologia Estatística
LD	Limite de Detecção
LES	Laboratório de Engenharia Sanitária
LQ	Limite de Quantificação
R(%) ,	Recuperação percentual
UERJ	Universidade do Estado do Rio de Janeiro
UV	Ultra-Violeta
VIM	Vocabulário Internacional de Metrologia

Lista de Equações

Equação 1	Equação da reta	23
Equação 2	Calculo do LD estimado a partir da curva analítica	24
Equação 3	Calculo de LQ estimado a partir da curva analítica	24
Equação 4	Calculo da recuperação percentual	25
Equação 5	Coefficiente de variação	25
Equação 6	Número de graus de liberdade.	26
Equação 7	Intervalo de confiança	26
Equação 8	O valor de t para a comparação de duas retas	26
Equação 9	A variância da inclinação de cada reta	26
Equação 10	Variância residual das retas	27
Equação 11	Variância agrupada para retas com variâncias semelhantes	27
Equação 12	Calculo do valor de F	27
Equação 13	Valor calculado de G para um valor suspeito	28
Equação 14	Soma do quadrado dos desvios após a remoção do par suspeito superior	28
Equação 15	Soma do quadrado dos desvios após a remoção do par suspeito inferior	28
Equação 16	Soma do quadrado dos desvios antes da remoção do par suspeito	29
Equação 17	Valor calculado de G, para dois valores suspeitos.	29
Equação 18	Fórmula para determinar o Ccalculado	29

Sumário

1. Introdução	17
2. Objetivo Geral	18
2.1 Objetivos Específicos	18
3. Fundamentação Teórica	18
3.1. Os desreguladores endócrinos (DE)	18
3.2. As técnicas de caracterização	20
3.3. A validação de um método analítico	22
3.3.1. Critérios de desempenho para a validação de um método analítico	22
3.3.1.1. Seletividade	22
3.3.1.1.1. Efeito de matriz	23
3.3.1.2. Linearidade e faixa de trabalho	23
3.3.1.3. Limite de detecção (LD)	23
3.3.1.4. Limite de quantificação (LQ)	24
3.3.1.5. Exatidão	24
3.3.1.6. Precisão	25
3.4. Ferramentas estatísticas	25
3.4.1. Teste t-Student	25
3.4.1.1 Inclinação de duas retas	26
3.4.2. Teste F-Snedecor	27
3.4.3. Teste de Grubb's	27
3.4.3.1. Teste de Grubb's para um valor suspeito	28
3.4.3.2. Teste de Grubb's para dois valores suspeitos	28
3.4.4. Teste de Cochran	29
4. Metodologia	30
4.1. Seleção da amostra	30
4.2. Preparo da amostra	31
4.3. Análise por CLAE	

4.4. Critérios de desempenho para a validação de um método analítico	32
4.4.1. Seletividade	33
4.4.1.1. Efeito de matriz	33
4.4.1.2. Linearidade e faixa de trabalho	33
4.4.1.3. Limite de detecção (LD)	35
4.4.1.4. Limite de quantificação (LQ)	35
4.4.1.5. Exatidão	35
4.4.1.6. Precisão	35
5. Resultados e Discussão	35
5.1. Critérios de desempenho para a validação de um método analítico	35
5.1.1. Seletividade	35
5.1.1.1. Efeito de matriz	35
5.1.1.2. Linearidade e faixa de trabalho	37
5.1.1.3. Limite de detecção (LD)	40
5.1.1.4. Limite de quantificação (LQ)	40
5.1.1.5. Exatidão	41
5.1.1.6. Precisão	42
6. Conclusões	42
7. Referências Bibliográficas	42
8. Anexos	48
Anexo 1. Tabela com os valores críticos para o teste t de student (MILLER ; MILLER, 1993)	48
Anexo 2. Tabela com os valores críticos para o teste F de snedecor (5% de significância)	49
Anexo 3. Tabela com os valores críticos de Grubb's para um (teste simples) e dois valores (teste duplo) suspeitos	50

Anexo 4. Tabela com os valores críticos de Cochran (95% de confiança)	51
9. Apêndices	52
Apêndice 1. Dados experimentais da curva analítica do E3 (Estriol) em acetoneitrila	52
Apêndice 2. Dados experimentais da curva analítica do BPA (bisfenol A) em acetoneitrila	52
Apêndice 3. Dados experimentais da curva analítica do E2 (17 β estradiol) em acetoneitrila	53
Apêndice 4. Dados experimentais da curva analítica do EE2 (Ethinilestradiol) em acetoneitrila	53
Apêndice 5. Dados experimentais da curva analítica do E3 (Estriol) na matriz	54
Apêndice 6. Dados experimentais da curva analítica do BPA (bisfenol A) na matriz	54
Apêndice 7. Dados experimentais da curva analítica do E2 (17 β estradiol) na matriz	55
Apêndice 8. Dados experimentais da curva analítica do EE2 (Ethinilestradiol) na matriz	55

1. Introdução

Um grande número de compostos orgânicos conhecidos como desreguladores endócrinos (DE) têm atraído atenção dos pesquisadores devido aos seus efeitos deletérios aos seres vivos. Esses efeitos, como por exemplo, problemas hormonais e distúrbios reprodutivos, variam devido à classe química do DE e pela forma com que ele é absorvido (PETER MATTHIESSEN ; JOHNSON, 2007).

Encontrados na natureza em baixas concentrações, na ordem de ng.L^{-1} , sua identificação e quantificação podem ser tarefas laboriosas. Entretanto, existem técnicas capazes de identificar e quantificar tais compostos, como técnicas *in vitro* (Ensaio de Atividade Estrogênica –EAS) e técnicas cromatográficas, das quais as técnicas cromatográficas se destacam devido a sua versatilidade e maior sensibilidade (LOCATELLI *et al.*, 2016; OĞUZ ; KANKAYA, 2013).

As técnicas cromatográficas usadas são: cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e cromatografia em fase gasosa (CG). Para elas existe um universo de metodologias com diferentes tipos de detectores, tais como: arranjo de diodos (DAD), ultra-violeta (UV), espectrometria de massas (EM) e fluorescência (FLU), e ainda diferentes tipos de composição da fase móvel. Essa diversidade é explicada devido ao fato de que os DE podem ser divididos em um número muito diverso de classes de compostos químicos (ftalatos, parabenos, esteróides, etc). Portanto, uma metodologia pode ser mais indicada para uma classe de compostos do que outra (MAROGA MBOULA *et al.*, 2013; P. MATTHIESSEN *et al.*, 2006; RODIL *et al.*, 2012; TOURNIER *et al.*, 2015; ZHANG ; LI, 2014).

Há uma grande variação quanto a classe de DE mais encontrados, essa variação se dá devido as diferenças de contaminantes que cada região possui e do tipo de tratamento pelo qual seus efluentes passam. Entretanto, por se tratarem de hormônios sexuais, os DE da classe esteróides estrogênicos estão entre os mais estudados.

Mesmo com um grande número de metodologias, poucos trabalhos descritos na literatura tratam sobre a validação destes métodos, que é uma etapa crucial para a acreditação de laboratórios diante dos órgãos reguladores e essencial para assegurar a confiabilidade do resultados desses métodos (ÉPSHTEIN, 2004). Neste contexto, o presente trabalho pretende preencher parte desta lacuna.

2. Objetivo Geral

Validar a metodologia analítica usada pelo Laboratório de Engenharia Sanitária (LES) da UERJ, para a quantificação de desreguladores endócrinos via CLAE, segundo a norma ISO/IEC 17025.

2.1 Objetivos Específicos

- Selecionar os desreguladores endócrinos que serão usados no presente trabalho;
- Avaliar o comportamento das curvas analíticas;
- Avaliar a influência da matriz na quantificação;
- Determinar os limites de detecção e quantificação;
- Determinar a precisão e exatidão.

3. Fundamentação Teórica

3.1. Os desreguladores endócrinos (DE)

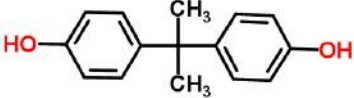
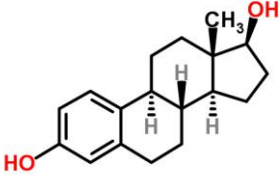
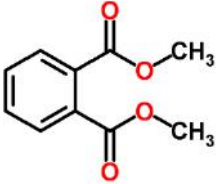
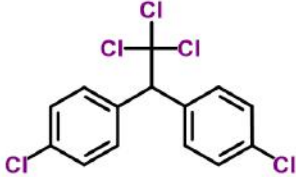
O sistema endócrino pode ser afetado pela ação de uma substância externa que entrou em contato com o corpo. Elas podem atuar no sistema endócrino aumentando ou diminuindo o efeito de um hormônio natural (BIRKETT; LESTER, 2003). A estas substâncias damos o nome de desregulador endócrino (DE) que, por definição, é uma “substância exógena (ou mistura) que altera as funções do sistema endócrino, causando efeitos prejudiciais à saúde de um organismo, ou a sua descendência, ou (sub) população (*European work- shop on the Impact of Endocrine Disrupters on Human Health and Wildlife, Weybridge 2-4/12/1996*)”.

Uma série de efeitos prejudiciais são relacionados à ação dos desreguladores endócrinos em animais, alguns desses efeitos são: aumento da taxa de mortalidade, distúrbios reprodutivos, feminilização de animais, distúrbios na síntese de hormônios etc. Em seres humanos podemos citar: diminuição no nível dos hormônios sexuais, baixa qualidade do esperma, alterações nas funções do fígado, diminuição do peso de recém-nascidos, etc (CANESI ; FABBRI, 2015; CHIKAE *et al.*, 2004; LEE *et al.*, 2014; MEEKER, 2012; THORPE *et al.*, 2003).

Dentro do grupo de DE conhecidos podemos citar diferentes classes de substâncias químicas como por exemplo: ftalatos (fabricação de cosméticos, detergentes e etc), aditivos

fenólicos (fabricação de plásticos), pesticidas (produção de alimentos) e esteroides estrogênicos (hormônios sexuais), apresentados no **Quadro 1** (LAFLEUR ; SCHUG, 2011).

Quadro 1. Fórmula estrutural, classe e sigla de alguns desreguladores endócrinos.

Desregulador endócrino	Classe	Sigla	Fórmula estrutural
Bisfenol A	Aditivo fenólico	BPA	
17-β Estradiol	Hormônio sexual feminino	E2	
Dimetilftalato	Ftalato	DMP	
Dicloro-Difenil-Tricloroetano	Pesticida	DDT	

A classe dos esteróides estrogênicos é a que mais têm atraído a atenção dos cientistas devido aos seguintes fatores: apresentam efeito desregulador em baixas concentrações (ng L^{-1}), seu efeito desregulador pode ser observado poucas horas depois da exposição e são fármacos presentes em muitas prescrições médicas (LAFLEUR ; SCHUG, 2011).

No corpo humano a eliminação dos DE é feita pelo metabolismo xenobiótico, que é responsável pela eliminação de compostos estranhos dentro do corpo humano. Existem três etapas de eliminação: a etapa de modificação, a etapa de conjugação e a etapa de eliminação na forma de fezes, urina, suor e respiração. A etapa de modificação tem por objetivo incluir grupos polares a esses compostos para eliminá-los. Caso essa etapa não seja suficiente para a eliminação segue-se a etapa onde o composto é conjugado com espécies carregadas como: glicina, sulfato etc. Após essa etapa os compostos ganham peso molecular, reduzem seu efeito desregulador e podem ser excretados (JIM ENEZ-DÍAZ *et al.*, 2015).

Por estarem presentes em formulações de fármacos e produtos de higiene pessoal, duas das possíveis rotas, para que os DE sejam encontrados no meio ambiente, é via esgoto doméstico ou efluentes industriais. Outra rota comum é via os aterros sanitários onde a fração líquida do lixo, também conhecida como lixiviado bruto ou chorume é descartado no corpo hídrico após tratamento.

3.2. As técnicas de caracterização

De maneira geral os DE são encontrados em baixas concentrações no corpo hídrico (ng.L^{-1}), levando à necessidade de etapas preliminares de concentração da amostra e seleção do volume adequado para que eles possam ser detectados e quantificados. Comumente usa-se a extração em fase sólida (EFS) como etapa de concentração devido à necessidade de um volume menor de solvente, em comparação com a extração líquido-líquido (ELL) (TOURNIER *et al.*, 2015).

Diversas técnicas experimentais podem ser utilizadas, como técnicas *in vivo*, *in vitro* e técnicas analíticas. A técnica *in vitro* que mais se destaca é o ensaio de atividade estrogênica (EAS) devido a sua robustez, rapidez e sensibilidade (DIAS *et al.*, 2015). Entretanto, a técnica que mais é usada é a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), pois o ensaio EAS não identifica o DE que causa o efeito estrogênico.

As técnicas cromatográficas possuem diversas aplicações laboratoriais, elas são técnicas de separação extremamente poderosas que permitem também a identificação desses compostos.

De maneira geral elas possuem uma fase estacionária e uma fase móvel. A separação é feita devido as diferentes velocidades de migração que cada composto da amostra possuiu ao percorrer a fase estacionária ao ser carregado pela fase móvel (SKOOG, DOUGLAS, 2014).

A detecção e identificação é feita através do uso de detectores que, exploram as propriedades físico-químicas desses compostos para sua quantificação. Esses detectores podem se basear nas seguintes propriedades: absorção, fluorescência, relação carga massa, índice de refração, condutividade, etc (SKOOG, DOUGLAS, 2014).

No caso dos DE podemos utilizar, por exemplo: Espectroscopia no ultravioleta com arranjo de diodos (UV-DAD) (esteróides e ftalatos), fluorescência (FLU) (esteróides estrogênicos, ftalatos, parabenos); estes não são detectores universais, como o espectrômetro de massa (EM), mas obtêm excelentes resultados para as classes de desreguladores acima citados (JIM ENEZ-DÍAZ *et al.*, 2015; LAFLEUR ; SCHUG, 2011).

A maioria dos DE possui alta massa molar, o que dificulta a sua mudança de fase para o estado gasoso e, conseqüentemente, a sua análise via CG. Para que eles sejam analisados por essa técnica por vezes é necessária uma etapa de derivatização, que transforma a substância de interesse em um novo composto mais fácil de ser volatilizado.

Entretanto, a etapa de derivatização não é uma exclusividade das análises via CG. Como há uma grande variedade de moléculas dentro da classe de DE, pode ser necessária a etapa de derivatização para que o DE possa ser analisado via CLAE, pois a técnica de derivatização confere também um aumento na sensibilidade de detecção (LAFLEUR ; SCHUG, 2011; MAHESHWARI *et al.*, 2015).

3.3. A validação de um método analítico

A validação de um método analítico é uma etapa crucial quando se deseja ter uma comprovação experimental de que o método utilizado está adequado ao propósito pretendido.

A Coordenação Geral de Acreditação (CGCRE) do Instituto Nacional de Metrologia Estatística (Inmetro), lançou um documento orientando os laboratórios sobre a validação de métodos analíticos (CGCRE 008 de 2011). Nele está descrita uma série de critérios de desempenho usados para averiguar se o método é adequado ao uso pretendido de acordo com o **Quadro 2**.

Quadro 2. Parâmetros de desempenho para a validação de um método analítico (CGCRE 008 de 2011)

Parâmetro de desempenho	Tipo de ensaio	
	Qualitativo	Quantitativo
Seletividade	X	X
Linearidade/Faixa de trabalho/ Faixa linear de trabalho		X
Sensibilidade		X
Limite de detecção	X	X
Limite de quantificação		X
Tendência/recuperação		X
Precisão		X

Os critérios usados são: seletividade, sensibilidade, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão (repetibilidade) e exatidão (recuperação).

A acreditação é obrigatória para todas as empresas e laboratórios que buscam possuir resultados confiáveis.

3.3.1. Critérios de desempenho para a validação de um método analítico

Os critérios de desempenho citados a seguir têm como fonte o Vocabulário Internacional de Metrologia (VIM, 2012) e o documento de orientação sobre validação de métodos analíticos do CGCRE (DOQ-CGCRE, 2011).

Para a validação de método analítico, que utilize uma curva analítica, são necessários no mínimo 5 concentrações diferentes e a leitura de cada nível de concentração deve ser realizada no mínimo 3 vezes (triplicata) (MASSART *et al.*, 1997).

3.3.1.1. Seletividade

A seletividade pode ser descrita como a habilidade de um método analítico de identificar e quantificar um composto na presença de outros. Ela pode ser avaliada usando-se padrões ou

materiais de referência, com ou sem o analito, ou medindo-se o analito de interesse na presença de compostos interferentes.

O estudo da seletividade é importante para indicar a presença do efeito de matriz, onde a matriz da amostra causa interferência na medição do analito, aumentando ou diminuindo seu sinal.

3.3.1.1.1. Efeito de matriz

Muitas amostras de origem ambiental possuem uma composição química complexa. Essa complexidade pode se tornar um desafio para a separação e quantificação do analito (MONTAGNER ; JARDIM, 2011).

O efeito causado devido ao meio em que o analito se encontra é chamado de efeito de matriz, e pode aumentar ou diminuir o sinal do analito causando erros nas medições cromatográficas (SKOOG, DOUGLAS, 2014).

Em alguns casos o efeito de matriz pode ser contornado usando-se dois métodos; o método de adição de padrão e o método do padrão interno.

No método de adição de padrão duas curvas analíticas são construídas, uma em solvente puro e outra usando-se a amostra como solvente. Caso exista o efeito de matriz haverá diferença no valor da inclinação das curvas.

No método do padrão interno uma substância que não está presente na amostra é adicionada e posteriormente quantificada, a diferença entre o valor quantificado e o valor real nos indicará o efeito da matriz sobre essa quantificação.

3.3.1.2. Linearidade e faixa de trabalho

A linearidade diz respeito ao comportamento do sistema ser proporcional a concentração do analito, dentro da faixa de trabalho que pode começar na menor concentração quantificável do analito, até o ponto onde o comportamento do sistema deixa de ser linear.

A linearidade é obtida construindo-se curvas padrão, nelas são feitas as leituras dos sinais variando-se as concentrações do analito (padrão interno ou externo). O comportamento do sistema é então formulado pela **Equação 1**

$$y = a + bx \qquad \text{(Equação 1)}$$

Onde: y é o sinal lido, x é a concentração do analito, a é o coeficiente linear (interseção do eixo y quando x=0) e b é o coeficiente angular (inclinação da curva, sensibilidade).

A linearidade permite estimar a qualidade da curva analítica, quanto mais próximo de 1,0 for o coeficiente de determinação (R^2), menor será a dispersão dos dados experimentais e a incerteza nas medidas (RIBANI *et al.*, 2004).

3.3.1.3. Limite de detecção (LD)

O limite de detecção é a menor quantidade que pode ser detectada de um analito, mas não necessariamente quantificada. O LD pode ser determinado de diversas formas, a forma mais adequada dependerá do tipo de análise. As formas são: avaliação visual, relação sinal ruído e estimativas a partir da curva analítica.

Os DE são comumente encontrados em baixas concentrações, portanto, o LD pode ser estimado a partir da curva analítica segundo a **Equação 2**.

$$LD = 3,3 \frac{s}{b} \quad \text{(Equação 2)}$$

Onde: s é o desvio padrão da resposta do branco e b é inclinação (coeficiente angular) da curva analítica.

3.3.1.4. Limite de quantificação (LQ)

O limite de quantificação é a menor quantidade de um analito que pode ser quantificada com exatidão e precisão aceitáveis. Assim como o LD, o LQ pode ser determinado de diversas formas como: avaliação visual, relação sinal ruído e estimativas a partir da curva analítica.

O LQ pode ser estimado pela **Equação 3**.

$$LQ = 10 \frac{s}{b} \quad \text{(Equação 3)}$$

Onde: s é o desvio padrão da resposta do branco e b é inclinação (coeficiente angular) da curva analítica

3.3.1.5. Exatidão

A exatidão geralmente é expressa através da determinação da recuperação do método. A recuperação (ou fator de recuperação), R(%), é definida como a proporção da quantidade da substância de interesse, presente na porção analítica do material teste, que é passível de ser quantificada (RIBANI *et al*, 2004).

Matematicamente a recuperação é a razão entre o valor observado e o valor atribuído ao analito. Determiná-la é importante para se ter conhecimento sobre a sua influência na incerteza global. Normalmente faz-se a estimativa da recuperação percentual (R%) pela **Equação 4**.

$$R(\%) = \frac{\text{Valor observado}}{\text{Valor atribuído}} \cdot 100 \quad \text{(Equação 4)}$$

3.3.1.6. Precisão

A precisão pode ser definida como o grau de concordância entre os valores medidos, obtidos por medições repetidas. Comumente ela é expressa das seguintes maneiras: repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade.

A repetibilidade é expressa pelo desvio padrão relativo ou coeficiente de variação (CV), conforme mostra a **Equação 5**, onde s é o desvio padrão e \bar{x} é a média dos valores obtidos. A reprodutibilidade é entendida para fins de validação como a participação em ensaios colaborativos. A precisão intermediária normalmente é demonstrada pelos estudos de estabilidade de curta e longa duração.

$$CV(\%) = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100 \quad \text{(Equação 5)}$$

3.4. Ferramentas estatísticas

O uso das ferramentas da estatística é fundamental para expressar, adequadamente, os resultados dos métodos analíticos e para indicar o grau de confiabilidade que o método possui. Algumas dessas ferramentas serão utilizadas para a validação dos métodos analíticos.

As definições dos métodos aqui citados podem ser encontrados nos livros (MASSART, 1997; MILLER, 2010).

3.4.1. Teste t-Student

Utilizado para amostra com até 30 elementos, o teste t-Student é uma ferramenta utilizada para comparar médias e determinar o intervalo de confiança (IC) da média de uma população. Para se conhecer o valor do t tabelado é necessário calcular o número de graus de liberdade (v) da amostra pela **Equação 6**.

$$v = n - 1 \quad \text{(Equação 6)}$$

Onde: n é o tamanho da amostra e v é o número de graus de liberdade.

Os valores de t tabelado podem ser encontrados no **Anexo 1**. O nível de confiança normalmente desejado é de 95%. O intervalo de confiança (IC) pode ser calculado segundo a **Equação 7**.

$$IC = \frac{ts}{\sqrt{n}} \quad \text{(Equação 7)}$$

Onde: t é a função distribuição t de Student (tabelado), s é o desvio padrão e n é o número de elementos na amostra.

3.4.1.1 Inclinação de duas retas

O teste t de Student também é utilizado como ferramenta para avaliar a inclinação de duas retas obtidas a partir de curvas analíticas. O valor de t para a comparação de duas retas, pode ser calculado a partir da **Equação 8**.

$$t_{calc} = \frac{b_1 - b_2}{\sqrt{s_{b_1}^2 + s_{b_2}^2}} \quad \text{(Equação 8)}$$

Onde: b_1 e b_2 são as inclinações das duas retas, $s_{b_1}^2$ e $s_{b_2}^2$ são as variâncias da inclinação das retas 1 e 2, respectivamente.

A variância da inclinação de cada reta pode ser calculada pela **Equação 9**.

$$s_b^2 = \frac{s_e^2}{\sum_{i=1}^{n_1} (x_1 - \bar{x})^2} \quad \text{(Equação 9)}$$

Onde: s_e^2 é a variância residual da reta, x_1 são os valores de concentração, \bar{x} é a média dos valores de concentração.

A **Equação 10** pode ser utilizada para a determinação da variância residual das retas.

$$s_e^2 = \frac{\sum(y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2} \quad \text{(Equação 10)}$$

Onde: y_i é valor lido da medida, \hat{y}_i é o valor da medida obtida pelo ajuste da regressão linear e n é o número de concentrações na reta.

Nos casos onde for identificada que as variâncias residuais das retas são iguais será necessário calcular a variância agrupada segundo a **Equação 11**.

$$s_{ag} = \frac{(n_1-2)s_{e1}^2 + (n_2-2)s_{e2}^2}{(n_1+n_2-4)} \quad \text{(Equação 11)}$$

Onde: s_{e1}^2 e s_{e2}^2 são as variâncias residuais das retas 1 e 2 respectivamente, n_1 e n_2 são o número de pontos em cada curva.

3.4.2. Teste F-Snedecor

Utilizado para comparar variâncias. É usado em teste de hipóteses e na Análise de Variância (ANOVA). A primeira etapa deste teste consiste em calcular o valor de F segundo a **Equação 12**.

$$F_{calc} = \frac{S_M^2}{S_m^2} \quad \text{(Equação 12)}$$

Onde: S_M é a maior variância e S_m é a menor variância.

O F calculado é comparado ao F tabelado (**Anexo 2**) usando-se o número de graus de liberdade do numerador e do denominador como critérios de seleção. Caso o F calculado seja maior que o tabelado assume-se que as variâncias não possuem semelhanças, caso o F calculado seja menor que o tabelado assume-se que as variâncias são semelhantes.

3.4.3. Teste de Grubb's

Utilizado quando se deseja ter uma justificativa estatística para a existência de um, ou dois, resultados aberrantes em uma das extremidades de um conjunto de dados com seis ou mais elementos.

Primeiramente o teste é aplicado a um conjunto de valores para verificar se um dos valores de cada extremidade do conjunto é aberrante. Caso um deles seja considerado aberrante ele é removido do conjunto de dados e o teste é refeito com os demais valores restantes.

3.4.3.1. Teste de Grubb's para um valor suspeito

A **Equação 13** é empregada para a determinação do valor calculado de G, para o teste de Grubb's para um valor suspeito.

$$G_{calc} = \frac{|x_1 - \bar{x}|}{s} \quad \text{(Equação 13)}$$

Onde: G_{calc} é o valor de G calculado para um valor suspeito, x_1 é o valor suspeito de ser aberrante e \bar{x} é a média dos valores do conjunto.

Sendo o valor de G_{calc} maior que o G_{tab} (**Anexo 3**) assume-se que o valor suspeito é aberrante.

3.4.3.2. Teste de Grubb's para dois valores suspeitos

Nos casos onde o valor testado não é considerado aberrante o teste é feito avaliando se há dois valores aberrantes dentre os valores analisados. Esse par suspeito pode ser os dois maiores ou os dois menores.

O cálculo da soma do quadrado dos desvios após a remoção do par suspeito superior é realizado pela **Equação 14**.

$$SS_{n-1,n} = \sum_{i=1}^{n-2} (x_i - \bar{x})^2 \quad \text{(Equação 14)}$$

O cálculo da soma do quadrado dos desvios após a remoção do par suspeito inferior é realizado pela **Equação 15**.

$$SS_{1,2} = \sum_{i=2}^n (x_i - \bar{x})^2 \quad \text{(Equação 15)}$$

Onde: $SS_{n-1,n}$ é a soma do quadrado dos desvios após a remoção do par suspeito, x_i é o valor de cada ponto do conjunto sem os valores aberrantes, \bar{x} é a média do conjunto sem os valores aberrantes e n é o número de termos no conjunto

O cálculo da soma do quadrado dos desvios antes da remoção do par suspeito é realizado pela **Equação 16**.

$$SS_0 = \sum_i^n (x_i - \bar{x})^2 \quad \text{(Equação 16)}$$

Onde: SS_0 é a soma do quadrado dos desvios, x_i é o valor de cada ponto do conjunto, \bar{x} é a média do conjunto sem os valores aberrantes e n é o número de termos no conjunto.

A **Equação 17** é empregada para a determinação do valor calculado de G , para o teste de Grubb's para dois valores suspeitos.

$$G_{calc} = \frac{SS_{n-1,n}}{SS_0} \quad \text{(Equação 17)}$$

Onde: G_{calc} é o valor de G calculado para dois valores suspeitos, $SS_{n-1,n}$ é a soma do quadrado dos desvios após a remoção do par suspeito e SS_0 é a soma do quadrado dos desvios

3.4.4. Teste de Cochran

O teste de Cochran é usado para avaliar o tipo de comportamento de um método analítico, homo ou heterocedástico.

Em uma calibração, a curva analítica pode apresentar dois tipos de comportamentos distintos, ele pode ser homocedástico quando as variâncias obtidas, para os valores crescentes de concentração, permanecem relativamente constantes, ou heterocedástico quando as variâncias aumentam para valores crescentes de concentração.

Avaliar o comportamento do sistema é importante para determinar que tipo de curva analítica será feita, faixa de trabalho e pode indicar que houve algum erro analítico.

O teste de Cochran indica se há diferença entre as variâncias de um determinado grupo de amostras ou não. Para tal teste, determina-se a razão entre a maior variância e a soma de todas as variâncias das amostras, conforme pode ser observado na **Equação 18**.

$$C_{calc} = \frac{s_{Máx}^2}{\sum_{i=1}^n s_i^2} \quad \text{(Equação 18)}$$

Se o valor de $C_{calculado}$ for menor que o valor de $C_{tabelado}$ (**Anexo 4**) pode-se concluir que trata-se de um comportamento homocedástico; e se o valor de $C_{calculado}$ for maior que o valor de $C_{tabelado}$ pode-se concluir que trata-se de um comportamento heterocedástico.

4. Metodologia

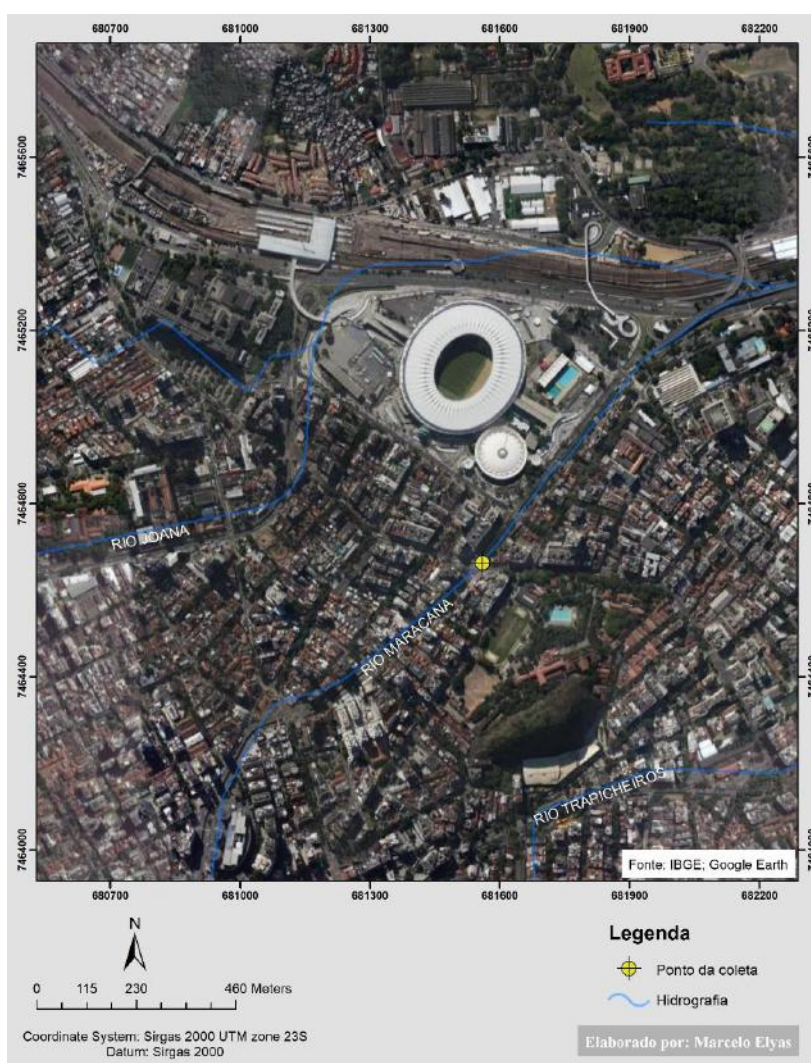
4.1. Amostragem

O critério usado, para a seleção da amostra, foi baseado na frequência em que tal matriz aparece nos trabalhos da área ambiental e de acordo com a característica principal das amostras analisadas no Laboratório de Engenharia Sanitária (LES).

A amostra selecionada foi água do Rio Maracanã no dia 09 de julho às 15h no cruzamento da rua São Francisco Xavier com a Avenida maracanã de acordo com a **Figura 1**. O Rio Maracanã nasce no maciço da Tijuca e passa por uma região muito urbanizada, ao longo do seu percurso até o canal do mangue o Rio acaba recebendo carga de esgoto doméstico, que é descartado inadequadamente. Ao todo foram coletados 5 litros de amostra.

Os desreguladores analisados foram: Etinilestradiol (EE2), 17β estradiol (E2), estriol (E3) e bisfenol A (BPA).

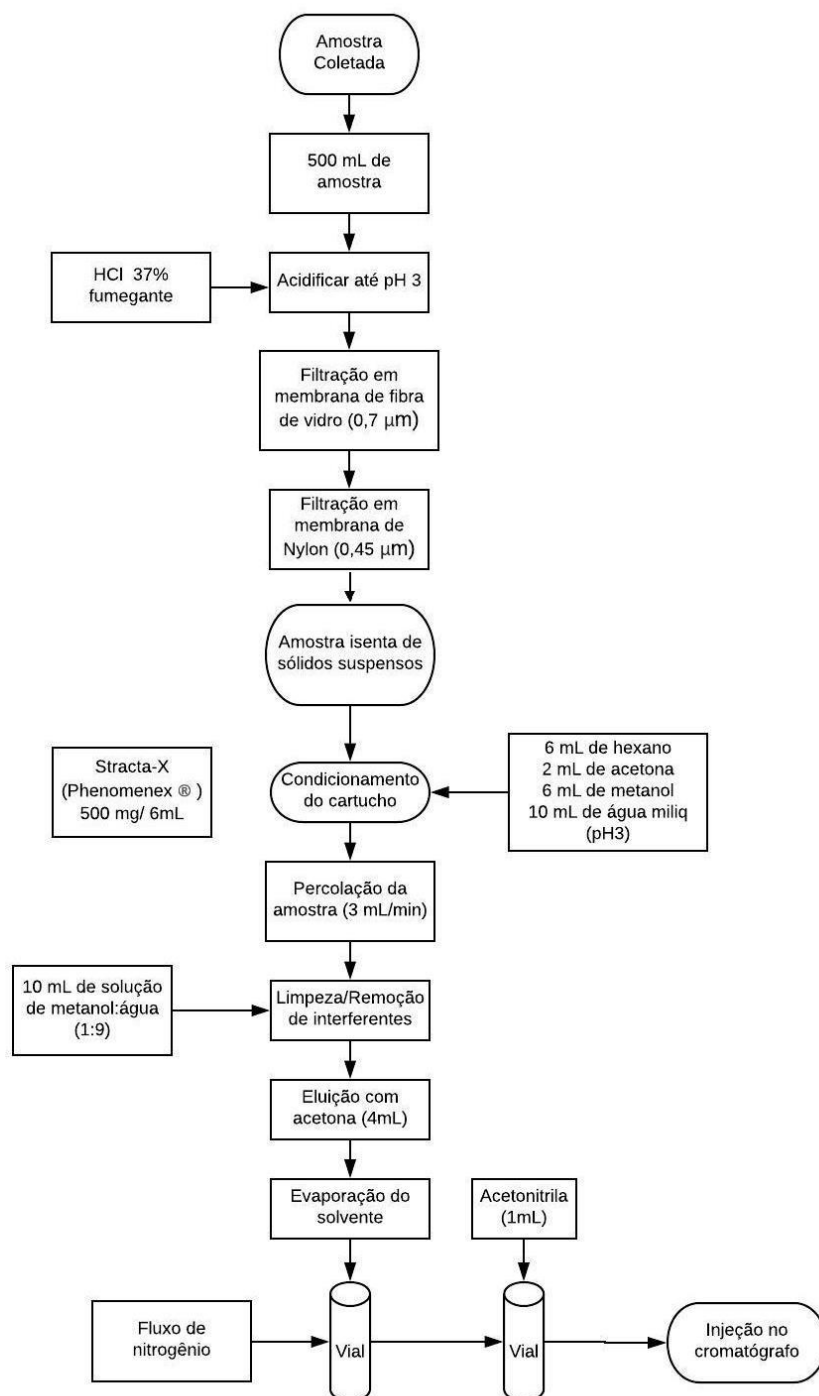
Figura 1: Mapa da região da coleta



4.2. Preparo da amostra

A preparação da amostra para a análise cromatográfica foi realizada de acordo com as etapas descritas na **Figura 2**.

Figura 2: Fluxograma com as etapas de concentração da amostra



Mediu-se 500mL da amostra, em balão volumétrico, que foi acidificada até pH 3 e filtrada em membrana de fibra de vidro com tamanho médio de poros de 0,7 μm . Após, a amostra foi filtrada em membrana de Nylon® com poros de 0,45 μm para a remoção total dos sólidos suspensos. Terminada as etapas de filtração, a amostra foi percolada através de um cartucho de extração em fase sólida (EFS) de fase reversa (C18) da marca Strata-X (Phenomenex®) de 500 mg / 6 mL previamente acondicionados conforme as recomendações do fabricante: 6 mL de *n*-hexano, 2 mL de acetona, 6 mL de metanol e 10 mL de água Milli-Q em pH 3. A extração foi realizada em Manifold (Agilent (VacElut 12)) acoplado em uma bomba de vácuo. Para a remoção dos interferentes foi realizada uma etapa de limpeza do cartucho com 10 mL de uma solução de metanol em água ultrapura (1:9). Seguida da etapa de limpeza, a amostra foi eluída com 4 mL de acetona, seca e redissolvida em acetonitrila. O procedimento de concentração foi repetido 7 vezes para se obter o volume necessário de concentrado para a construção da curva analítica.

4.3. Análise por CLAE

As análises por CLAE foram realizadas em um cromatografo da marca Waters, modelo 1525, composto por uma bomba binária, um detector de fluorescência, modelo 2475 e um auto injetor modelo 2707. Foi utilizada uma coluna C18 (octadecilsilano) da marca Waters, com 250 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno, de 5 μm de tamanho de partícula. As análises foram realizadas na temperatura de 30°C. Foram injetados 20 μL de amostra a um fluxo de 1 mL/min. O fluxo de fase móvel foi feito em um gradiente de concentração (acetonitrila:água) de acordo com o **Tabela 1**. A detecção e quantificação dos DE analisados foi realizada com o detector de fluorescência, o comprimento de onda de excitação de 280 nm e comprimento de onda de emissão de 306 nm (PATROLECCO, L. 2013)

Tabela 1. Composição da fase móvel

Tempo da corrida (min)	Acetonitrila (%)	Água (%)
0	40	60
6	50	50
9	30	70
13	40	60
15	40	60

4.4. Critérios de desempenho para a validação de um método analítico

4.4.1. Seletividade

4.4.1.1. Efeito de matriz

O efeito de matriz foi avaliado comparando-se as inclinações das curvas analíticas construídas, para tal primeiro aplicou-se o teste de Grubb's as replicatas realizadas (3.4.3.1.). Após a remoção dos valores aberrantes aplicou-se o teste de Cochran (3.4.4.). Depois de avaliar o tipo de comportamento da curva analítica as curvas construídas foram comparadas usando-se o teste t e o teste F como descrito em (3.4.1. e 3.4.2)

4.4.1.2. Linearidade e faixa de trabalho

Foi construída uma curva analítica na faixa de 2000 a 5000 µg/L, construída a partir de uma solução mãe contendo todos os quatro desreguladores endócrinos estudados (E3- Estriol; E2- 17β estradiol; BPA- bisfenol A e EE2- Etinilestradiol) com a concentração de 10 mg/L (Tabela 2), usando acetonitrila como solvente.

Tabela 2. Concentrações (mg/L) dos padrões dos desreguladores endócrinos na solução mãe.

Desregulador endócrino	Massa pesada (mg)	Concentração da solução mãe (mg/L)
E3	2,01	10,05
E2	2,04	10,02
BPA	2,07	10,35
EE2	2,00	10,00

E3: Estriol; E2: 17 β estradiol; BPA: bisfenol A e EE2: Etinilestradiol

A partir da solução mãe preparada foram realizadas diluições para a construção das curvas analíticas na faixa de 2000 a 5000 $\mu\text{g/L}$, tanto para as curvas em solvente puro quanto para as curvas na matriz. Os pontos foram igualmente espaçados de acordo com a **Tabela 3**.

Tabela 3. Concentração de cada desregulador endócrino nas curvas analíticas.

Nível	Concentração de DE ($\mu\text{g/L}$)			
	E3	BPA	E2	EE2
1	2010	2070	2040	2000
2	2512,5	2587,5	2550	2500
3	3015	3105	3060	3000
4	3517,5	3622,5	3570	3500
5	4020	4140	4080	4000
6	4525	4657,5	4590	4500
7	5025	5175	5100	5000

E3: Estriol; E2: 17 β estradiol; BPA: bisfenol A e EE2: Etinilestradiol

Os valores aberrantes, quando presentes, foram removidos usando-se o teste de Grubb's (ver item 3.4.3). O comportamento das curvas analíticas foi avaliado segundo o teste de Cochran (ver item 3.4.4), e então as curvas foram equacionadas usando o método dos mínimos quadrados.

4.4.1.3. Limite de detecção (LD)

O limite de detecção (LD) foi calculado segundo a equação 2 (ver item 3.3.1.3).

4.4.1.4. Limite de quantificação (LQ)

O limite de quantificação (LQ) foi calculado segundo a equação 3 (ver item 3.3.1.4).

4.4.1.5. Exatidão

A exatidão do método foi avaliada por meio da determinação da recuperação, segundo **equação 4** (ver item 3.3.1.5). Para a análise da recuperação foram selecionadas nove determinações em três concentrações distintas ao longo da faixa de trabalho, foram estas C1 (concentração inferior), C4 (concentração intermediária) e C7 (concentração superior), respectivamente, da curva analítica.

4.4.1.6. Precisão

A precisão (repetibilidade) do método foi avaliada por meio da determinação do desvio padrão relativo ou coeficiente de variação, segundo **Equação 5** (ver item 3.3.1.6). Para a análise da repetibilidade, da mesma maneira foram selecionadas nove determinações em três concentrações distintas ao longo da faixa de trabalho, foram estas C1 (concentração inferior), C4 (concentração intermediária) e C7 (concentração superior), respectivamente, da curva analítica.

5. Resultados e Discussão

5.1. Critérios de desempenho para a validação de um método analítico

Os **Apêndices 1 a 8** apresentam os dados experimentais para a realização dos cálculos descritos nos itens subsequentes.

5.1.1. Seletividade

5.1.1.1. Efeito de matriz

O efeito de matriz foi avaliado utilizando-se o teste t de Student (**ver item 3.4.1.1 Inclinação de duas retas**) e o teste F- Snedecor (**ver item 3.4.2**). As inclinações das curvas analíticas geradas em solvente puro (acetonitrila, ACN) foram comparadas com as inclinações das curvas analíticas construídas na matriz.

Utilizaram-se as **Equações 9, 10, 11 e 12** (ver itens 3.4.1.1 e 3.4.2) para a construção das **Tabelas 4 e 5**, de modo a avaliar se as curvas analíticas possuíam variâncias estatisticamente semelhantes. O valor de F tabelado foi obtido no (**Anexo 2**) utilizando (n-2) como número de graus de liberdade.

Tabela 4. Comparação das variâncias das curvas analíticas dos desreguladores endócrinos BPA (bisfenol A) e E2 (17 β estradiol).

F tab = 5,05		Inclinação (b)	Variância residual	$\sum (x_i - \bar{x})^2$	Sag	F calc
ACN	BPA	1,48E+04	7,21E+11	2,90E+11		
Matriz		1,51E+04	7,64E+11	2,38E+11	7,42E+11	1,06
ACN	E2	2,05E+04	1,09E+12	3,57E+11		
Matriz		2,06E+04	8,05E+12	6,08E+11	4,57E+12	0,14

A partir dos resultados apresentados na **Tabela 4**, pode-se observar que os valores de F calculado dos desreguladores endócrinos BPA- bisfenol A (1,06) e E2- 17 β estradiol (0,14) são menores que o valor de F tabelado (5,05). Sendo assim, assume-se que as variâncias são semelhantes.

Tabela 5. Comparação das variâncias das curvas analíticas dos desreguladores endócrinos E3 (Estriol) e EE2 (Etinilestradiol).

F tab = 5,05		Inclinação (b)	Variância residual	$\sum (x_i - \bar{x})^2$	s²_b	F calc
ACN	E3	1,76E+04	8,12E+11	1,83E+11	4,43	8,01
Matriz		1,45E+04	6,5E+12	2,7E+13	0,24	
ACN	EE2	1,92E+04	9,14E+11	3,92E+11	2,33	6,61
Matriz		1,92E+04	6,04E+12	1,09E+11	55,51	

A partir dos resultados apresentados na **Tabela 5**, pode-se observar que os valores de F calculado dos desreguladores endócrinos E3 – Estriol (8,01) e EE2 - Etinilestradiol (6,61) são

maiores que o valor de F tabelado (5,05). Sendo assim, assume-se que as variâncias não são semelhantes.

Após a etapa de comparação das variâncias das retas estudadas calculou-se o valor de t, presentes na **Tabela 6**, usando a **Equação 8** e comparando seu resultado com o valor de t tabelado obtido no (**Anexo 1**) com 5 graus de liberdade.

As curvas analíticas que tiveram valores de variâncias diferentes foram construídas com o mesmo número de níveis de concentração, portanto o valor de t foi calculado usando-se a **Equação 8**.

Tabela 6. Valores de t calculados para a comparação das retas analíticas

t tabelado = 2,51

Desreguladores	t_{calc}
Endócrinos	
E3	1420,29
BPA	116,22
E2	41,70
EE2	5,07

E3: Estriol; E2: 17 β estradiol; BPA: bisfenol A e EE2: Etinilestradiol

A partir dos resultados apresentados na **Tabela 6**, pode-se observar que os valores de t calculado dos desreguladores endócrinos E3 – Estriol (1420,29), BPA- bisfenol A (116,22) EE2 - Etinilestradiol, (41,70) e E2- 17 β estradiol (5,07) são maiores que o valor de t tabelado (2,57). Sendo assim, assume-se que as inclinações das curvas analíticas são diferentes, logo a matriz está causando uma influência na medição.

5.1.1.2. Linearidade e faixa de trabalho

Para avaliar a linearidade das curvas analíticas construídas realizou-se primeiramente o teste de Grubbs para um valor suspeito segundo a **Equação 13** (ver item 3.4.3.1), para determinar se o valor suspeito na replicada de cada nível de concentração era aberrante.

A **Tabela 7** apresenta os resultados de G_{calc} para os valores suspeitos de cada nível de concentração. O valor de G_{tab} foi obtido no (**Anexo 3**) onde o valor de n é o número de replicatas de cada ponto.

Tabela 7. Valores de G calculados para os valores suspeitos em cada nível de concentração das curvas analíticas dos quatro desreguladores endócrinos estudados (E3- Estriol; BPA- bisfenol A, E2- 17β estradiol e EE2- Etinilestradiol).

		Valores de G calculados							
		Curva em acetonitrila				Curva na matriz			
Nível	Valor suspeito da externidade	E3	BPA	E2	EE2	E3	BPA	E2	EE2
1	Inferior	1,044	1,091	0,788	0,173	0,577	1,134	1,148	1,138
	Superior	0,949	0,873	1,125	1,075	1,155	0,756	0,682	0,740
2	Inferior	1,091	1,051	0,801	1,134	1,006	0,893	0,414	0,787
	Superior	0,873	0,940	1,121	0,756	0,994	1,081	1,141	1,125
3	Inferior	1,147	0,776	0,577	0,277	1,109	1,121	0,943	0,861
	Superior	0,688	1,129	1,155	1,109	0,832	0,801	1,048	1,097
4	Inferior	0,873	0,918	1,000	1,049	0,844	0,949	0,873	1,029
	Superior	1,091	1,065	1,000	0,942	1,104	1,044	1,091	0,968
5	Inferior	1,154	1,124	1,062	0,769	1,155	0,913	0,577	0,873
	Superior	0,603	0,790	0,923	1,131	0,577	1,069	1,155	1,091
6	Inferior	1,136	1,155	1,119	1,145	0,577	1,049	0,487	0,907
	Superior	0,749	0,577	0,109	0,701	1,155	0,942	1,025	1,072
7	Inferior	0,737	0,823	1,121	0,752	1,153	1,063	0,873	0,756
	Superior	1,138	1,113	0,801	1,135	0,636	0,922	1,091	1,134

A partir dos resultados apresentados na **Tabela 7** pode-se observar que foi não detectado nenhum valor aberrante, visto que todos os valores de G_{calc} são menores que o valor de G_{tab} (1,155).

Em seguida realizou-se o teste de Cochran empregando a **Equação 18** (ver item 3.4.4) para determinar qual o tipo de comportamento das curvas analíticas construídas.

A **Tabela 8** apresenta os resultados de C_{calc} para cada curva analítica. O valor de C_{tab} foi obtido no (**Anexo 4**) onde o valor de k é o número de concentrações da curva analítica e n é o número de replicatas de cada ponto.

Tabela 8. Valores de C_{calc} para os dados das curvas analíticas dos quatro desreguladores endócrinos estudados (E3- Estriol; BPA- bisfenol A, E2- 17 β estradiol e EE2- Etinilestradiol)

$C_{tab} = 0,561$	Desregulador endócrino	Valor de $C_{calculado}$
Curva em acetonitrila	E3	0,409
	BPA	0,331
	E2	0,334
	EE2	0,373
Curva na matriz	E3	0,312
	BPA	0,232
	E2	0,533
	EE2	0,390

A partir dos resultados apresentados na **Tabela 8** pode-se observar todas as curvas analíticas apresentam comportamento homocedástico (variâncias homogêneas), visto que todos os valores de C_{calc} são menores que o valor de C_{tab} (0,561). Vale lembrar que qualquer método quantitativo que siga um modelo de regressão linear deve apresentar uma curva analítica na qual as variâncias, obtidas para cada concentração distinta da reta, apresentem valores significativamente constantes (homogeneidade das variâncias ou homocedasticidade).

A partir dos resultados obtidos realizou-se a regressão linear pelo método dos mínimos quadrados e os resultados estão apresentados no **Tabela 9**.

Tabela 9. Dados das equações das curvas analíticas dos quatro desreguladores endócrinos estudados (E3- Estriol; BPA- bisfenol A, E2- 17 β estradiol e EE2- Etinilestradiol)

	Desregulador endócrino	Dados da equação		
		Inclinação	Interseção	Coefficiente de determinação (R^2)
Curva em acetonitrila	E3	17568,13	-1578470,08	0,9994
	BPA	14816,88	-910833,3	0,9993
	E2	20460,08	-1650595,2	0,9994
	EE2	19194,29	-1588095,2	0,9994
Curva na matriz	E3	14497,95	62782202,1	0,9928
	BPA	15093,70	1245123,5	0,9992
	E2	20648,08	-1953024,7	0,9957
	EE2	19155,70	-157575,3	0,9961

Para cada curva analítica foi possível determinar a equação da reta e seu coeficiente de determinação (R^2), através do qual se avaliou a linearidade. O R^2 expressa a relação de x e y, assim quanto mais próximo de 1,0, maior a probabilidade de haver uma relação linear definida (LEITE, 2008). Desta forma, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão (RIBANI, 2004).

A partir dos resultados apresentados na **Tabela 9**, pode-se observar que as curvas analíticas apresentaram, portanto, boa linearidade em vista que seus valores de R^2 são superiores a 0,98. A ANVISA (2003) recomenda um coeficiente de correlação igual a 0,99 e o INMETRO (2016) um valor acima de 0,90.

5.1.1.3. Limite de detecção (LD)

O LD foi estimado a partir da **Equação 2** (ver item 3.3.1.3). Como o branco da curva em acetonitrila não apresentou leitura usou-se o desvio padrão do ponto de menor concentração. Os resultados obtidos estão apresentados na **Tabela 10**.

Tabela 10. Valores de limite de detecção dos quatro desreguladores endócrinos estudados (E3- Estriol; BPA- bisfenol A, E2- 17β estradiol e EE2- Etinilestradiol) para o método da CLAE.

	Desregulador endócrino	LD ($\mu\text{g/L}$)
Curva em acetonitrila	E3	6,60
	BPA	6,80
	E2	14,34
	EE2	33,04
Curva na matriz	E3	420,45
	BPA	114,36
	E2	30,03
	EE2	211,65

A partir dos resultados apresentados na **Tabela 10**, pode-se observar que nas curvas construídas na matéria o LD ficou consideravelmente mais alto, evidenciando a influência da matriz na determinação desse parâmetro.

5.1.1.4. Limite de quantificação (LQ)

O LQ foi estimado a partir da **Equação 3** (ver item 3.3.1.4). Como o branco da curva em acetonitrila não apresentou leitura usou-se o desvio padrão do ponto de menor concentração. Os resultados obtidos estão apresentados na **Tabela 11**.

Tabela 11. Valores de limite de quantificação dos quatro desreguladores endócrinos estudados (E3- Estriol; BPA- bisfenol A, E2- 17 β estradiol e EE2- Etnilestradiol) para o método da CLAE.

	Desregulador endócrino	LQ ($\mu\text{g/L}$)
Curva em acetonitrila	E3	19,99
	BPA	20,62
	E2	43,44
	EE2	100,12
Curva na matriz	E3	1274,15
	BPA	346,56
	E2	91,00
	EE2	641,36

A partir dos resultados apresentados na **Tabela 11**, pode-se observar que o LQ das curvas analíticas construídas na matriz ficou consideravelmente mais alto, evidenciando a influência da matriz na determinação desse parâmetro.

5.1.1.5. Exatidão

O parâmetro de exatidão foi determinado por meio da recuperação, utilizando a **Equação 4** (ver item 3.3.1.5). Os resultados obtidos estão apresentados na **Tabela 12**.

Tabela 12. Valores de recuperação (%) dos quatro desreguladores endócrinos estudados (E3- Estriol; BPA- bisfenol A, E2- 17 β estradiol e EE2- Etnilestradiol) para o método da CLAE.

Nível de concentração	Recuperação (%)							
	Curva em acetonitrila				Curva na matriz			
	E3	BPA	E2	EE2	E3	BPA	E2	EE2
C1	101,05	100,96	100,71	100,42	99,83	100,65	99,88	99,68
	101,15	100,84	101,12	101,43	99,45	100,55	99,84	99,63
	100,95	101,03	100,82	100,79	99,46	100,18	99,47	99,39
	99,93	99,86	99,85	99,66	97,74	100,27	100,72	100,57
C4	99,88	99,98	99,98	99,92	100,07	100,44	100,65	100,66
	100,08	100,18	100,10	100,11	105,58	100,17	100,61	100,75
	100,82	100,87	100,76	100,97	98,61	99,51	98,36	98,67
C7	100,56	100,59	100,68	100,43	100,64	99,34	98,94	98,75
	100,51	100,49	100,38	100,54	100,50	99,08	98,58	98,64

Os valores da recuperação devem ser aceitos entre 70% até 120%. É possível observar, portanto, que os valores encontrados na **Tabela 12** estão na faixa de aceitação de acordo com Lanças, (2004).

5.1.1.6. Precisão

O parâmetro de precisão foi expresso através do coeficiente de variação de acordo com a **Equação 5** (ver item 3.3.1.6). Os resultados obtidos estão apresentados na **Tabela 13**.

Tabela 13. Valores do coeficiente de variação (%) dos quatro desreguladores endócrinos estudados (E3- Estriol; BPA- bisfenol A, E2- 17 β estradiol e EE2- Etinilestradiol) para o método da CLAE.

Nível de concentração	Coeficiente de variação (%)							
	Curva em acetonitrila				Curva na matriz			
	E3	BPA	E2	EE2	E3	BPA	E2	EE2
C1	0,10	0,10	0,22	0,52	0,07	0,24	0,23	0,16
C4	0,10	0,17	0,13	0,24	1,80	0,13	0,06	0,08
C7	0,17	0,20	0,20	0,28	0,69	0,21	0,30	0,06

Segundo Lanças, (2004), os valores para o coeficiente de variação devem ser inferiores a 5% para serem considerados aceitos. Desta forma, os valores encontrados na **Tabela 13** estão dentro da faixa de aceitação.

6. Conclusões

As curvas analíticas construídas na matriz para os quatro desreguladores endócrinos estudados (E3- Estriol; BPA- bisfenol A, E2- 17 β estradiol e EE2- Etinilestradiol) apresentaram inclinações diferentes quando comparadas as curvas analíticas construídas em solvente puro (acetonitrila), evidenciando assim o efeito da matriz. Desta forma, para que os desreguladores endócrinos analisados possam ser quantificados na matriz estudada, a curva analítica precisa ser construída na matriz usando-se a técnica de adição padrão com o objetivo de contornar o efeito da matriz.

O presente método apresentou boa linearidade, uma vez que as curvas analíticas estudadas apresentaram boas correlações lineares (coeficientes de determinação, R^2 , superiores a 0,9928).

O presente método apresentou limite de detecção (em $\mu\text{g/L}$) de 6,60; 6,80; 14,34 e 33,04, respectivamente, para os desreguladores endócrinos E3- Estriol; BPA- bisfenol A, E2- 17 β estradiol e EE2- Etinilestradiol na curva analítica em acetonitrila. Já na curva analítica na matriz, o método por CLAE apresentou limite de detecção (em $\mu\text{g/L}$) de 420,45; 114,36; 30,03 e 211,65, respectivamente, para os desreguladores endócrinos E3- Estriol; BPA- bisfenol A, E2- 17 β estradiol e EE2- Etinilestradiol.

O presente método apresentou limite de quantificação (em $\mu\text{g/L}$) de 19,99; 20,62; 43,44 e 100,12, respectivamente, para os desreguladores endócrinos E3- Estriol; BPA- bisfenol A, E2- 17 β estradiol e EE2- Etinilestradiol na curva analítica em acetonitrila. Já na curva analítica na matriz, o método por CLAE apresentou limite de quantificação (em $\mu\text{g/L}$) de 1274,15; 346,56; 91,00 e 641,36, respectivamente, para os desreguladores endócrinos E3- Estriol; BPA- bisfenol A, E2- 17 β estradiol e EE2- Etinilestradiol.

Os valores de LD e LQ foram estimados a partir dos dados das curvas analíticas. Este método é mais indicado de ser usado em curvas analíticas onde a faixa de concentração chega a nível de traços, portanto os valores aqui relatados podem estar superestimados.

Para a avaliação da exatidão e precisão o presente método apresentou resultados dentro do esperado, com recuperação entre 70-120%, e repetibilidade abaixo de 5%.

7. Referências Bibliográficas

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA); Resolução RE nº899, de 29/05/2003.

BIRKETT, J.W.; LESTER, J.N. *Endocrine Disrupters in Wastewater and Sludge Treatment Processes*. 1st ed. USA: IWA Publishing, Lewis Publishers CRC Press LLC, 2003.

CANESI, L., ; FABBRI, E. (2015). *Environmental Effects of BPA : Focus on Aquatic Species*. <http://doi.org/10.1177/1559325815598304>

CHIKAE, M., IKEDA, R., HATANO, Y., HASAN, Q., MORITA, Y., ;TAMIYA, E. (2004). 17
ⁿ -estradiol on the fry stage of medaka (*Oryzias latipes*), 18, 9–12.
<http://doi.org/10.1016/j.etap.2004.04.004>

DIAS, A. C. V., GOMES, F. W., BILA, D. M., SANT'ANNA, G. L., ; DEZOTTI, M. (2015). Analysis of estrogenic activity in environmental waters in Rio de Janeiro state (Brazil) using the yeast estrogen screen. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 120, 41–47. <http://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.05.013>

ÉPSHTEIN, N. (2004). Structure of chemical compounds, methods of analysis and process control: Validation of HPLC techniques. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 38(4), 212–228.
JIM ENEZ-DÍAZ, I., VELA-SORIA, F., RODRÍGUEZ-G OMEZ, R., ZAFRA-G OMEZ, A., BALLESTEROS, O., NAVAL ON, A., ; ACTA, A. C. (2015). Analytical methods for the assessment of endocrine disrupting chemical exposure during human fetal and lactation stages: A review. *Analytica Chimica Acta*, 892, 27–48. <http://doi.org/10.1016/j.aca.2015.08.008>

LAFLEUR, A. D., ; SCHUG, K. A. (2011). *Analytica Chimica Acta* A review of separation methods for the determination of estrogens and plastics-derived estrogen mimics from aqueous systems. *Analytica Chimica Acta*, 696(1–2), 6–26. <http://doi.org/10.1016/j.aca.2011.03.054>

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

LEE, P., LIN, C., ; CHEN, T. (2014). Environmentally relevant exposure of 17 a -

ethinylestradiol impairs spawning and reproductive behavior in the brackish medaka *Oryzias melastigma*. *Marine Pollution Bulletin*, 85(2), 338–343. <http://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.04.013>

LEITE, F. Validação em Análise Química. Ed. Átomo. São Paulo. 5ªed. 2008

LOCATELLI, M., SCIASCIA, F., CIFELLI, R., MALATESTA, L., BRUNI, P., ; CROCE, F. (2016). Analytical methods for the endocrine disruptor compounds determination in environmental water samples. *Journal of Chromatography A*. <http://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.01.034>

MAHESHWARI, M. L., MEMON, A. A., MEMON, S., MEMON, F. UN N., MUGHAL, U. U. R., DAYO, A., ... KHAN LEGHARI, M. (2015). Optimization of HPLC method for determination of cefixime using 2-thiophenecarboxaldehyde as derivatizing reagent: A new approach. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 23(4), 444–452. <http://doi.org/10.1016/j.jsps.2015.01.016>

MAROGA MBOULA, V., HÉQUET, V., ANDRÈS, Y., PASTRANA-MARTÍNEZ, L. M., DOÑA-RODRÍGUEZ, J. M., SILVA, A. M. T., ; FALARAS, P. (2013). Photocatalytic degradation of endocrine disruptor compounds under simulated solar light. *Water Research*, 47(12), 3997–4005. <http://doi.org/10.1016/j.watres.2013.01.055>

MASSART, D.L. et al. Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A –Data Handling in Science and Technology – v.20A. s.l.: Elsevier, 1997

MATTHIESSEN, P., ARNOLD, D., JOHNSON, A. C., PEPPER, T. J., POTTINGER, T. G., ; PULMAN, K. G. T. (2006). Contamination of headwater streams in the United Kingdom by oestrogenic hormones from livestock farms. *Science of the Total Environment*, 367(2–3), 616–630. <http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2006.02.007>

MATTHIESSEN, P., ; JOHNSON, I. (2007). Implications of research on endocrine disruption for the environmental risk assessment, regulation and monitoring of chemicals in the European Union. *Environmental Pollution*, 146(1), 9–18. <http://doi.org/10.1016/j.envpol.2006.05.036>

MEEKER, J. D. (2012). Exposure to environmental endocrine disruptors and child development. *Arch Pediatr Adolesc Med*, 166(10), 952–958. <http://doi.org/10.1001/archpediatrics.2012.241>

MILLER, J.N;MILLER, J.C *Statistics and chemometrics for Analytical Chemistry*. Editora Person. Sixth Edition, 2010.

OĞUZ, A. R., ; KANKAYA, E. (2013). Determination of selected endocrine disrupting chemicals in Lake Van, Turkey. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 91(3), 283–286. <http://doi.org/10.1007/s00128-013-1036-1>

Orientação sobre validação de métodos analíticos – DOQ-GCRE-008; Instituto nacional de metrologia, normalização e qualidade industrial – INMETRO:2008

PATROLECCO, L.; ADEMOLLO, N.; GRENNI, P.; TOLOMEI, A.; CARACCIOLO, A.; CAPRI, S. Simultaneous determination of human pharmaceuticals in water samples by solid phase extraction and HPLC with UV-fluorescence detection, *Microchemical Journal*, Volume 107, 2013, Pages 165-171, ISSN 0026-265X, <https://doi.org/10.1016/j.microc.2012.05.035>.

Requisitos gerais de competência de laboratórios de ensaios e calibração - ISO/IEC 17025: 2011

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos Cromatográficos e Eletroforéticos. *Química Nova*, v.27, p. 771-780. 2004.

RODIL, R., QUINTANA, J. B., CONCHA-GRAÑA, E., LÓPEZ-MAHÍA, P., MUNIATEGUI-LORENZO, S., ; PRADA-RODRÍGUEZ, D. (2012). Emerging pollutants in sewage, surface and drinking water in Galicia (NW Spain). *Chemosphere*, 86(10), 1040–1049. <http://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.11.053>

SKOOG, Douglas A., West, Donald M., Holler, F. James, Crouch, Stanley R., Fundamentos de química analítica. 9. ed. São Paulo : Cengage Learning, 2014

THORPE, K. L., CUMMINGS, R. I., HUTCHINSON, T. H., SCHOLZE, M., BRIGHTY, G., SUMPTER, J. P., ; TYLER, C. R. (2003). Relative potencies and combination effects of steroidal estrogens in fish. *Environmental Science and Technology*, 37(6), 1142–1149. <http://doi.org/10.1021/es0201348>

TOURNIER, M., POUECH, C., QUIGNOT, N., LAFAY, F., WIEST, L., LEMAZURIER, E., ... VULLIET, E. (2015). Determination of endocrine disruptors and endogenic androgens and estrogens in rat serum by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Steroids*, 104, 252–262. <http://doi.org/10.1016/j.steroids.2015.10.011>

ZHANG, A., ; LI, Y. (2014). Removal of phenolic endocrine disrupting compounds from waste activated sludge using UV, H₂O₂, and UV/H₂O₂ oxidation processes: Effects of reaction conditions and sludge matrix. *Science of the Total Environment*, 493, 307–323. <http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.05.149>

8. Anexos

Anexo 1. Tabela com os valores críticos para o teste t de student (MILLER ; MILLER, 1993).

Valor de t para um intervalo de confiança de	90%	95%	98%	99%
Valor crítico de t para valores de P de	0,10	0,05	0,02	0,01
Número de graus de liberdade				
1	6.31	12.71	31.82	63.66
2	2.92	4.30	6.96	9.92
3	2.35	3.18	4.54	5.84
4	2.13	2.78	3.75	4.60
5	2.02	2.57	3.36	4.03
6	1.94	2.45	3.14	3.71
7	1.89	2.36	3.00	3.50
8	1.86	2.31	2.90	3.36
9	1.83	2.26	2.82	3.25
10	1.81	2.23	2.76	3.17
12	1.78	2.18	2.68	3.05
14	1.76	2.14	2.62	2.98
16	1.75	2.12	2.58	2.92
18	1.73	2.10	2.55	2.88
20	1.72	2.09	2.53	2.85
30	1.70	2.04	2.46	2.75
50	1.68	2.01	2.40	2.68
∞	1.64	1.96	2.33	2.58

Anexo 2. Tabela com os valores críticos para o teste F de snedcor (5% de significância).

v1 ↘	v2 ↑	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	15	20	24	25	30
1	161,45	199,50	215,71	224,58	230,16	233,99	236,77	238,88	240,54	241,88	242,98	243,90	245,95	248,02	249,05	249,26	250,10	
2	18,51	19,00	19,16	19,25	19,30	19,33	19,35	19,37	19,38	19,40	19,40	19,41	19,43	19,45	19,45	19,46	19,46	
3	10,13	9,55	9,28	9,12	9,01	8,94	8,89	8,85	8,81	8,79	8,76	8,74	8,70	8,66	8,64	8,63	8,62	
4	7,71	6,94	6,59	6,39	6,26	6,16	6,09	6,04	6,00	5,96	5,94	5,91	5,86	5,80	5,77	5,77	5,75	
5	6,61	5,79	5,41	5,19	5,05	4,95	4,88	4,82	4,77	4,74	4,70	4,68	4,62	4,56	4,53	4,52	4,50	
6	5,99	5,14	4,76	4,53	4,39	4,28	4,21	4,15	4,10	4,06	4,03	4,00	3,94	3,87	3,84	3,83	3,81	
7	5,59	4,74	4,35	4,12	3,97	3,87	3,79	3,73	3,68	3,64	3,60	3,57	3,51	3,44	3,41	3,40	3,38	
8	5,32	4,46	4,07	3,84	3,69	3,58	3,50	3,44	3,39	3,35	3,31	3,28	3,22	3,15	3,12	3,11	3,08	
9	5,12	4,26	3,86	3,63	3,48	3,37	3,29	3,23	3,18	3,14	3,10	3,07	3,01	2,94	2,90	2,89	2,86	
10	4,96	4,10	3,71	3,48	3,33	3,22	3,14	3,07	3,02	2,98	2,94	2,91	2,85	2,77	2,74	2,73	2,70	
11	4,84	3,98	3,59	3,36	3,20	3,09	3,01	2,95	2,90	2,85	2,82	2,79	2,72	2,65	2,61	2,60	2,57	
12	4,75	3,89	3,49	3,26	3,11	3,00	2,91	2,85	2,80	2,75	2,72	2,69	2,62	2,54	2,51	2,50	2,47	
13	4,67	3,81	3,41	3,18	3,03	2,92	2,83	2,77	2,71	2,67	2,63	2,60	2,53	2,46	2,42	2,41	2,38	
14	4,60	3,74	3,34	3,11	2,96	2,85	2,76	2,70	2,65	2,60	2,57	2,53	2,46	2,39	2,35	2,34	2,31	
15	4,54	3,68	3,29	3,06	2,90	2,79	2,71	2,64	2,59	2,54	2,51	2,48	2,40	2,33	2,29	2,28	2,25	
16	4,49	3,63	3,24	3,01	2,85	2,74	2,66	2,59	2,54	2,49	2,46	2,42	2,35	2,28	2,24	2,23	2,19	
17	4,45	3,59	3,20	2,96	2,81	2,70	2,61	2,55	2,49	2,45	2,41	2,38	2,31	2,23	2,19	2,18	2,15	
18	4,41	3,55	3,16	2,93	2,77	2,66	2,58	2,51	2,46	2,41	2,37	2,34	2,27	2,19	2,15	2,14	2,11	
19	4,38	3,52	3,13	2,90	2,74	2,63	2,54	2,48	2,42	2,38	2,34	2,31	2,23	2,16	2,11	2,11	2,07	
20	4,35	3,49	3,10	2,87	2,71	2,60	2,51	2,45	2,39	2,35	2,31	2,28	2,20	2,12	2,08	2,07	2,04	
21	4,32	3,47	3,07	2,84	2,68	2,57	2,49	2,42	2,37	2,32	2,28	2,25	2,18	2,10	2,05	2,05	2,01	
22	4,30	3,44	3,05	2,82	2,66	2,55	2,46	2,40	2,34	2,30	2,26	2,23	2,15	2,07	2,03	2,02	1,98	
23	4,28	3,42	3,03	2,80	2,64	2,53	2,44	2,37	2,32	2,27	2,24	2,20	2,13	2,05	2,01	2,00	1,96	
24	4,26	3,40	3,01	2,78	2,62	2,51	2,42	2,36	2,30	2,25	2,22	2,18	2,11	2,03	1,98	1,97	1,94	
25	4,24	3,39	2,99	2,76	2,60	2,49	2,40	2,34	2,28	2,24	2,20	2,16	2,09	2,01	1,96	1,96	1,92	
26	4,23	3,37	2,98	2,74	2,59	2,47	2,39	2,32	2,27	2,22	2,18	2,15	2,07	1,99	1,95	1,94	1,90	
27	4,21	3,35	2,96	2,73	2,57	2,46	2,37	2,31	2,25	2,20	2,17	2,13	2,06	1,97	1,93	1,92	1,88	
28	4,20	3,34	2,95	2,71	2,56	2,45	2,36	2,29	2,24	2,19	2,15	2,12	2,04	1,96	1,91	1,91	1,87	
29	4,18	3,33	2,93	2,70	2,55	2,43	2,35	2,28	2,22	2,18	2,14	2,10	2,03	1,94	1,90	1,89	1,85	
30	4,17	3,32	2,92	2,69	2,53	2,42	2,33	2,27	2,21	2,16	2,13	2,09	2,01	1,93	1,89	1,88	1,84	
35	4,12	3,27	2,87	2,64	2,49	2,37	2,29	2,22	2,16	2,11	2,07	2,04	1,96	1,88	1,83	1,82	1,79	
40	4,08	3,23	2,84	2,61	2,45	2,34	2,25	2,18	2,12	2,08	2,04	2,00	1,92	1,84	1,79	1,78	1,74	

Anexo 3. Tabela com os valores críticos de Grubb's para um valor suspeito.

n	0,1	0,05	0,025	0,01	0,005
3	1,148	1,153	1,154	1,155	1,155
4	1,425	1,462	1,481	1,492	1,496
5	1,602	1,671	1,715	1,749	1,764
6	1,729	1,822	1,887	1,944	1,973
7	1,828	1,938	2,02	2,097	2,139
8	1,909	2,032	2,127	2,221	2,274
9	1,977	2,11	2,215	2,323	2,387
10	2,036	2,176	2,29	2,41	2,482
11	2,088	2,234	2,355	2,484	2,564
12	2,134	2,285	2,412	2,549	2,636
13	2,176	2,331	2,462	2,607	2,699
14	2,213	2,372	2,507	2,658	2,755
15	2,248	2,409	2,548	2,705	2,806
16	2,279	2,443	2,586	2,747	2,852
17	2,309	2,475	2,62	2,785	2,894
18	2,336	2,504	2,652	2,821	2,932
19	2,361	2,531	2,681	2,853	2,968
20	2,385	2,557	2,708	2,884	3,001
21	2,408	2,58	2,734	2,912	3,031
22	2,429	2,603	2,758	2,939	3,06
23	2,449	2,624	2,78	2,963	3,087
24	2,468	2,644	2,802	2,987	3,112
25	2,486	2,663	2,822	3,009	3,135
26	2,503	2,681	2,841	3,029	3,158
27	2,52	2,698	2,859	3,049	3,179

n	0,1	0,05	0,025	0,01	0,005
28	2,536	2,714	2,876	3,068	3,199
29	2,551	2,73	2,893	3,086	3,218
30	2,565	2,745	2,908	3,103	3,236
31	2,579	2,76	2,924	3,119	3,253
32	2,592	2,773	2,938	3,135	3,27
33	2,605	2,787	2,952	3,15	3,286
34	2,618	2,799	2,965	3,164	3,301
35	2,63	2,812	2,978	3,178	3,316
36	2,641	2,824	2,991	3,191	3,33
37	2,652	2,835	3,003	3,204	3,343
38	2,663	2,846	3,014	3,216	3,356
39	2,674	2,857	3,025	3,228	3,369
40	2,684	2,868	3,036	3,239	3,381
50	2,772	2,957	3,128	3,337	3,482
60	2,841	3,027	3,2	3,411	3,56
70	2,898	3,084	3,258	3,471	3,622
80	2,946	3,132	3,306	3,521	3,673
90	2,987	3,173	3,348	3,563	3,716
100	3,024	3,21	3,384	3,6	3,754
110	3,056	3,242	3,416	3,633	3,787
120	3,086	3,271	3,445	3,662	3,817
130	3,112	3,297	3,471	3,688	3,843
140	3,136	3,321	3,495	3,712	3,867

Anexo 4. Tabela com os valores críticos de Cochran (95% de confiança).

k \ n	n																
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	17	37	145	∞			
2	0,9985	0,9750	0,9392	0,9057	0,8772	0,8534	0,8332	0,8159	0,8010	0,7880	0,7341	0,6602	0,5813	0,5000			
3	0,9669	0,8709	0,7977	0,7457	0,7071	0,6771	0,6530	0,6333	0,6167	0,6025	0,5466	0,4748	0,4031	0,3333			
4	0,9065	0,7679	0,6841	0,6287	0,5895	0,5598	0,5365	0,5175	0,5017	0,4884	0,4366	0,3720	0,3093	0,2500			
5	0,8413	0,6838	0,5931	0,5441	0,5065	0,4783	0,4564	0,4387	0,4241	0,4118	0,3645	0,3066	0,2513	0,2000			
6	0,7808	0,6161	0,5321	0,4803	0,4447	0,4194	0,3980	0,3817	0,3682	0,3568	0,3135	0,2612	0,2119	0,1667			
7	0,7271	0,5612	0,4800	0,4307	0,3974	0,3726	0,3535	0,3384	0,3299	0,3154	0,2756	0,2278	0,1833	0,1429			
8	0,6798	0,5157	0,4377	0,3910	0,3595	0,3362	0,3185	0,3043	0,2926	0,2829	0,2462	0,2022	0,1616	0,1250			
9	0,6385	0,4775	0,4027	0,3584	0,3286	0,3067	0,2901	0,2768	0,2659	0,2568	0,2226	0,1820	0,1446	0,1111			
10	0,6020	0,4450	0,3733	0,3311	0,3029	0,2823	0,0666	0,2541	0,2439	0,2353	0,2032	0,1655	0,1308	0,1000			
12	0,5410	0,3924	0,3264	0,2880	0,2624	0,2439	0,2299	0,2187	0,2098	0,2020	0,1737	0,1403	0,1100	0,0833			
15	0,4709	0,3346	0,2758	0,2419	0,2195	0,2034	0,1911	0,1815	0,1736	0,1671	0,1429	0,1144	0,0889	0,0667			
20	0,3894	0,2705	0,2205	0,1921	0,1735	0,1602	0,1501	0,1422	0,1357	0,1303	0,1108	0,0879	0,0675	0,0500			
24	0,3434	0,2354	0,1907	0,1656	0,1493	0,1374	0,1246	0,1216	0,1160	0,1113	0,0942	0,0743	0,0567	0,0417			
30	0,2929	0,1980	0,1593	0,1377	0,1237	0,1137	0,1061	0,1002	0,0958	0,0921	0,0771	0,0604	0,0457	0,0333			
40	0,2370	0,1576	0,1259	0,1082	0,0968	0,0887	0,0827	0,0780	0,0745	0,0713	0,0595	0,0462	0,0347	0,0250			
60	0,1737	0,1131	0,0895	0,0765	0,0682	0,0625	0,0583	0,0552	0,0520	0,0497	0,0411	0,0316	0,0234	0,0167			
120	0,0998	0,0632	0,0495	0,0419	0,0371	0,0337	0,0312	0,0292	0,0279	0,0266	0,0218	0,0165	0,0120	0,0083			
∞	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000			

Apêndice 1. Dados experimentais da curva analítica do E3 (Estríol) em acetonitrila.

E3								
Valor esperado (µg/L)	Valor lido (µg/L)	Área	MÉDIA	desvios (xi-xmed)	Desvios ²	s	s ²	CV (%)
2010,0	2031,0	3,409E+07	3,41E+07	3,33E+03	1,11E+07	3,51E+04	1,23E+09	0,10
2010,0	2033,0	3,412E+07		3,33E+04	1,11E+09			
2010,0	2029,0	3,405E+07		-3,67E+04	1,34E+09			
2512,5	2484,4	4,206E+07	4,21E+07	3,33E+03	1,11E+07	1,53E+04	2,33E+08	0,04
2512,5	2485,1	4,207E+07		1,33E+04	1,78E+08			
2512,5	2483,7	4,204E+07		-1,67E+04	2,78E+08			
3015,0	3045,3	5,191E+07	5,19E+07	6,00E+04	3,60E+09	8,72E+04	7,60E+09	0,17
3015,0	3035,8	5,175E+07		-1,00E+05	1,00E+10			
3015,0	3043,6	5,189E+07		4,00E+04	1,60E+09			
3517,5	3515,2	6,018E+07	6,02E+07	-1,33E+04	1,78E+08	6,11E+04	3,73E+09	0,10
3517,5	3513,3	6,014E+07		-5,33E+04	2,84E+09			
3517,5	3520,2	6,026E+07		6,67E+04	4,44E+09			
4020,0	3977,9	6,831E+07	6,85E+07	-2,23E+05	4,99E+10	1,93E+05	3,74E+10	0,28
4020,0	3996,6	6,864E+07		1,07E+05	1,14E+10			
4020,0	3997,1	6,865E+07		1,17E+05	1,36E+10			
4525,0	4509,6	7,765E+07	7,75E+07	1,03E+05	1,07E+10	1,38E+05	1,90E+10	0,18
4522,5	4506,4	7,760E+07		5,33E+04	2,84E+09			
4522,5	4494,7	7,739E+07		-1,57E+05	2,45E+10			
5025,0	5066,0	8,744E+07	8,73E+07	1,70E+05	2,89E+10	1,49E+05	2,23E+10	0,17
5025,0	5053,4	8,721E+07		-6,00E+04	3,60E+09			
5025,0	5050,5	8,716E+07		-1,10E+05	1,21E+10			
				Somatório	1,83E+11			

Apêndice 2. Dados experimentais da curva analítica do BPA (bisfenol A) em acetonitrila.

BPA								
Valor esperado (µg/L)	Valor lido (µg/L)	Área	MÉDIA	desvios (xi-xmed)	Desvios ²	s	s ²	CV (%)
2070,0	2089,8	3,000E+07	29993333	6,67E+03	44444444	30550,5	9,33E+08	0,10
2070,0	2087,5	2,996E+07		-3,33E+04	1,11E+09			
2070,0	2091,4	3,002E+07		2,67E+04	7,11E+08			
2587,5	2565,4	3,706E+07	37003333	5,67E+04	3,21E+09	60277,14	3,63E+09	0,16
2587,5	2557,5	3,694E+07		-6,33E+04	4,01E+09			
2587,5	2562,2	3,701E+07		6,67E+03	44444444			
3105,0	3155,1	4,581E+07	45596667	2,13E+05	4,55E+10	189032,6	3,57E+10	0,41
3105,0	3130,5	4,545E+07		-1,47E+05	2,15E+10			
3105,0	3136,1	4,553E+07		-6,67E+04	4,44E+09			
3622,5	3617,3	5,267E+07	52753333	-8,33E+04	6,94E+09	90737,72	8,23E+09	0,17
3622,5	3621,7	5,274E+07		-1,33E+04	1,78E+08			
3622,5	3629,0	5,285E+07		9,67E+04	9,34E+09			
4140,0	4095,0	5,976E+07	60006667	-2,47E+05	6,08E+10	219393,1	4,81E+10	0,37
4140,0	4116,1	6,008E+07		7,33E+04	5,38E+09			
4140,0	4123,1	6,018E+07		1,73E+05	3E+10			
4657,5	4635,6	6,779E+07	67696667	9,33E+04	8,71E+09	161658,1	2,61E+10	0,24
4657,5	4635,7	6,779E+07		9,33E+04	8,71E+09			
4657,5	4617,1	6,751E+07		-1,87E+05	3,48E+10			
5175,0	5219,9	7,646E+07	76293333	1,67E+05	2,78E+10	149777,6	2,24E+10	0,20
5175,0	5205,6	7,625E+07		-4,33E+04	1,88E+09			
5175,0	5200,6	7,617E+07		-1,23E+05	1,52E+10			
				Somatório	2,9E+11			

Apêndice 3. Dados experimentais da curva analítica do E2 (17 β estradiol) em acetonitrila.

E2								
Valor esperado ($\mu\text{g/L}$)	Valor lido ($\mu\text{g/L}$)	Área	MÉDIA	desvios (xi-xmed)	Desvios ²	s	s ²	CV (%)
2040,0	2054,5	4,035E+07	40420000	-7,00E+04	4,90E+09	88881,94	7,9E+09	0,22
2040,0	2062,9	4,052E+07		1,00E+05	1,00E+10			
2040,0	2056,7	4,039E+07		-3,00E+04	9,00E+08			
2550,0	2524,4	4,997E+07	49946667	2,33E+04	5,44E+08	20816,66	4,33E+08	0,04
2550,0	2523,0	4,994E+07		-6,67E+03	4,44E+07			
2550,0	2522,2	4,993E+07		-1,67E+04	2,78E+08			
3060,0	3098,7	6,174E+07	61566667	1,73E+05	3,00E+10	150111,1	2,25E+10	0,24
3060,0	3086,1	6,148E+07		-8,67E+04	7,51E+09			
3060,0	3086,0	6,148E+07		-8,67E+04	7,51E+09			
3570,0	3564,5	7,128E+07	71370000	-9,00E+04	8,10E+09	90000	8,1E+09	0,13
3570,0	3569,1	7,137E+07		0,00E+00	0,00E+00			
3570,0	3573,5	7,146E+07		9,00E+04	8,10E+09			
4080,0	4045,4	8,112E+07	81323333	-2,03E+05	4,13E+10	191398,4	3,66E+10	0,24
4080,0	4063,8	8,150E+07		1,77E+05	3,12E+10			
4080,0	4056,5	8,135E+07		2,67E+04	7,11E+08			
4590,0	4575,6	9,198E+07	91783333	1,97E+05	3,87E+10	244199,4	5,96E+10	0,27
4590,0	4569,6	9,186E+07		7,67E+04	5,88E+09			
4590,0	4552,6	9,151E+07		-2,73E+05	7,47E+10			
5100,0	5138,7	1,035E+08	1,03E+08	1,67E+05	2,78E+10	208166,6	4,33E+10	0,20
5100,0	5134,6	1,034E+08		6,67E+04	4,44E+09			
5100,0	5119,6	1,031E+08		-2,33E+05	5,44E+10			
				Somatório	3,57133E+11			

Apêndice 4. Dados experimentais da curva analítica do EE2 (Ethinilestradiol) em acetonitrila.

EE2								
Valor esperado ($\mu\text{g/L}$)	Valor lido ($\mu\text{g/L}$)	Área	MÉDIA	desvios (xi-xmed)	Desvios ²	s	s ²	CV (%)
2000,0	2008,4	3,697E+07	37143333	-1,73E+05	3,00E+10	192180,5	3,69E+10	0,52
2000,0	2028,6	3,735E+07		2,07E+05	4,27E+10			
2000,0	2015,9	3,711E+07		-3,33E+04	1,11E+09			
2500,0	2472,2	4,587E+07	45860000	1,00E+04	1,00E+08	26457,51	7E+08	0,06
2500,0	2470,3	4,583E+07		-3,00E+04	9,00E+08			
2500,0	2472,7	4,588E+07		2,00E+04	4,00E+08			
3000,0	3030,0	5,657E+07	56530000	4,00E+04	1,60E+09	36055,51	1,3E+09	0,06
3000,0	3027,1	5,652E+07		-1,00E+04	1,00E+08			
3000,0	3026,1	5,650E+07		-3,00E+04	9,00E+08			
3500,0	3488,0	6,536E+07	65523333	-1,63E+05	2,67E+10	155670,6	2,42E+10	0,24
3500,0	3497,1	6,554E+07		1,67E+04	2,78E+08			
3500,0	3503,9	6,567E+07		1,47E+05	2,15E+10			
4000,0	3975,8	7,472E+07	74776667	-5,67E+04	3,21E+09	73711,15	5,43E+09	0,10
4000,0	3983,2	7,486E+07		8,33E+04	6,94E+09			
4000,0	3977,1	7,475E+07		-2,67E+04	7,11E+08			
4500,0	4483,6	8,447E+07	84306667	1,63E+05	2,67E+10	232880,5	5,42E+10	0,28
4500,0	4480,5	8,441E+07		1,03E+05	1,07E+10			
4500,0	4461,3	8,404E+07		-2,67E+05	7,11E+10			
5000,0	5048,3	9,531E+07	95003333	3,07E+05	9,40E+10	270246,8	7,3E+10	0,28
5000,0	5021,7	9,480E+07		-2,03E+05	4,13E+10			
5000,0	5026,9	9,490E+07		-1,03E+05	1,07E+10			
				Somatório	3,91733E+11			

Apêndice 5. Dados experimentais da curva analítica do E3 (Estríol) na matriz.

E3								
Valor esperado (µg/L)	Valor lido (µg/L)	Área	MÉDIA	desvios (xi-xmed)	Desvios ²	s	s ²	CV (%)
2010,0	2006,6	9,187E+07	91796667	7,33E+04	5,38E+09	63508,53	4,03E+09	0,07
2010,0	1998,9	9,176E+07		-3,67E+04	1,34E+09			
2010,0	1999,1	9,176E+07		-3,67E+04	1,34E+09			
2512,5	2463,3	9,849E+07	98466667	2,33E+04	5,44E+08	1845111	3,4E+12	1,87
2512,5	2333,2	9,661E+07		-1,86E+06	3,45E+12			
2512,5	2586,2	1,003E+08		1,83E+06	3,36E+12			
3015,0	2994,6	1,062E+08	1,07E+08	-1,20E+06	1,44E+12	1081665	1,17E+12	1,01
3015,0	3098,4	1,077E+08		3,00E+05	9,00E+10			
3015,0	3138,3	1,083E+08		9,00E+05	8,10E+11			
3517,5	3437,9	1,126E+08	1,14E+08	-1,73E+06	3,00E+12	2052641	4,21E+12	1,80
3517,5	3519,9	1,138E+08		-5,33E+05	2,84E+11			
3517,5	3714,0	1,166E+08		2,27E+06	5,14E+12			
4020,0	3846,6	1,185E+08	1,21E+08	-2,27E+06	5,14E+12	1962991	3,85E+12	1,63
4020,0	4074,5	1,219E+08		1,13E+06	1,28E+12			
4020,0	4075,1	1,219E+08		1,13E+06	1,28E+12			
4525,0	4536,3	1,286E+08	1,28E+08	4,67E+05	2,18E+11	404145,2	1,63E+11	0,32
4522,5	4490,5	1,279E+08		-2,33E+05	5,44E+10			
4522,5	4491,7	1,279E+08		-2,33E+05	5,44E+10			
5025,0	4955,0	1,346E+08	1,36E+08	-9,67E+05	9,34E+11	838649,7	7,03E+11	0,62
5025,0	5057,2	1,361E+08		5,33E+05	2,84E+11			
5025,0	5050,2	1,360E+08		4,33E+05	1,88E+11			
				Somatório	2,70236E+13			

Apêndice 6. Dados experimentais da curva analítica do BPA (bisfenol A) na matriz.

BPA								
Valor esperado (µg/L)	Valor lido (µg/L)	Área	MÉDIA	desvios (xi-xmed)	Desvios ²	s	s ²	CV (%)
2070,0	2083,5	3,275E+07	32690000	6,00E+04	3,60E+09	79372,54	6,3E+09	0,24
2070,0	2081,5	3,272E+07		3,00E+04	9,00E+08			
2070,0	2073,6	3,260E+07		-9,00E+04	8,10E+09			
2587,5	2573,1	3,955E+07	39574451	-2,35E+04	5,54E+08	125449,3	1,57E+10	0,32
2587,5	2485,8	3,971E+07		1,36E+05	1,84E+10			
2587,5	2582,2	3,946E+07		-1,12E+05	1,25E+10			
3105,0	3117,1	4,833E+07	48296667	3,33E+04	1,11E+09	104083,3	1,08E+10	0,22
3105,0	3107,4	4,818E+07		-1,17E+05	1,36E+10			
3105,0	3120,3	4,838E+07		8,33E+04	6,94E+09			
3622,5	3632,5	5,610E+07	56106667	-6,67E+03	4,44E+07	70237,69	4,93E+09	0,13
3622,5	3638,4	5,618E+07		7,33E+04	5,38E+09			
3622,5	3628,5	5,604E+07		-6,67E+04	4,44E+09			
4140,0	4179,5	6,434E+07	64156667	1,83E+05	3,36E+10	171561,5	2,94E+10	0,27
4140,0	4165,6	6,413E+07		-2,67E+04	7,11E+08			
4140,0	4157,0	6,400E+07		-1,57E+05	2,45E+10			
4657,5	4685,7	7,197E+07	71823333	1,47E+05	2,15E+10	155670,6	2,42E+10	0,22
4657,5	4677,3	7,184E+07		1,67E+04	2,78E+08			
4657,5	4665,3	7,166E+07		-1,63E+05	2,67E+10			
5175,0	5149,8	7,896E+07	78806667	1,53E+05	2,35E+10	166232,8	2,76E+10	0,21
5175,0	5140,9	7,883E+07		2,33E+04	5,44E+08			
5175,0	5127,4	7,863E+07		-1,77E+05	3,12E+10			
				Somatório	2,38208E+11			

Apêndice 7. Dados experimentais da curva analítica do E2 (17β estradiol) na matriz.

E2								
Valor esperado (µg/L)	Valor lido (µg/L)	Área	MÉDIA	desvios (xi-xmed)	Desvios ²	s	s ²	CV (%)
2040,0	2037,7	4,102E+07	40956667	6,33E+04	4,01E+09	92915,732	9E+09	0,23
2040,0	2036,8	4,100E+07		4,33E+04	1,88E+09			
2040,0	2029,2	4,085E+07		-1,07E+05	1,14E+10			
2550,0	2534,2	4,776E+07	4,805E+07	-2,92E+05	8,54E+10	402391,2	2E+11	0,84
2550,0	2447,4	4,788E+07		-1,67E+05	2,78E+10			
2550,0	2540,2	4,851E+07		4,59E+05	2,11E+11			
3060,0	3076,1	6,209E+07	61990000	1,00E+05	1,00E+10	95393,92	9E+09	0,15
3060,0	3066,8	6,190E+07		-9,00E+04	8,10E+09			
3060,0	3070,8	6,198E+07		-1,00E+04	1,00E+08			
3570,0	3595,7	7,264E+07	72590000	5,00E+04	2,50E+09	45825,757	2E+09	0,06
3570,0	3593,1	7,258E+07		-1,00E+04	1,00E+08			
3570,0	3591,7	7,255E+07		-4,00E+04	1,60E+09			
4080,0	4133,7	8,355E+07	83423333	1,27E+05	1,60E+10	109696,55	1E+10	0,13
4080,0	4124,3	8,336E+07		-6,33E+04	4,01E+09			
4080,0	4124,3	8,336E+07		-6,33E+04	4,01E+09			
4590,0	4619,8	9,342E+07	93546667	-1,27E+05	1,60E+10	130128,14	2E+10	0,14
4590,0	4625,7	9,354E+07		-6,67E+03	4,44E+07			
4590,0	4632,8	9,368E+07		1,33E+05	1,78E+10			
5100,0	5016,4	1,015E+08	1,02E+08	-2,67E+05	7,11E+10	305505,05	9E+10	0,30
5100,0	5045,9	1,021E+08		3,33E+05	1,11E+11			
5100,0	5027,4	1,017E+08		-6,67E+04	4,44E+09			
				Somatório	6,08E+11			

Apêndice 8. Dados experimentais da curva analítica do EE2 (Ethinilestradiol) na matriz.

EE2								
Valor atribuído (µg/L)	Valor observado (µg/L)	Área	MÉDIA	desvios (xi-xmed)	Desvios ²	s	s ²	CV (%)
2000,0	1993,7	3,779E+07	3,77E+07	4,33E+04	1,88E+09	58594,65	3,43E+09	0,16
2000,0	1992,6	3,777E+07		2,33E+04	5,44E+08			
2000,0	1987,8	3,768E+07		-6,67E+04	4,44E+09			
2500,0	2484,8	4,439E+07	4,44E+07	-4,96E+04	2,46E+09	146294,1	2,14E+10	0,33
2500,0	2394,8	4,460E+07		1,65E+05	2,71E+10			
2500,0	2495,7	4,432E+07		-1,15E+05	1,32E+10			
3000,0	3016,5	5,707E+07	5,71E+07	-3,00E+04	9,00E+08	127671,5	1,63E+10	0,22
3000,0	3012,2	5,699E+07		-1,10E+05	1,21E+10			
3000,0	3025,0	5,724E+07		1,40E+05	1,96E+10			
3500,0	3520,1	6,657E+07	6,66E+07	-5,67E+04	3,21E+09	55075,71	3,03E+09	0,08
3500,0	3523,2	6,663E+07		3,33E+03	1,11E+07			
3500,0	3526,1	6,668E+07		5,33E+04	2,84E+09			
4000,0	4048,3	7,653E+07	7,64E+07	8,33E+04	6,94E+09	76376,26	5,83E+09	0,10
4000,0	4042,9	7,643E+07		-1,67E+04	2,78E+08			
4000,0	4040,4	7,638E+07		-6,67E+04	4,44E+09			
4500,0	4533,4	8,567E+07	8,56E+07	4,33E+04	1,88E+09	40414,52	1,63E+09	0,05
4500,0	4530,8	8,562E+07		-6,67E+03	4,44E+07			
4500,0	4528,9	8,559E+07		-3,67E+04	1,34E+09			
5000,0	4933,5	9,321E+07	9,32E+07	-2,00E+04	4,00E+08	52915,03	2,80E+09	0,06
5000,0	4937,4	9,329E+07		6,00E+04	3,60E+09			
5000,0	4932,1	9,319E+07		-4,00E+04	1,60E+09			
				Somatório	1,09E+11			