AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**ESTUDO DE ESTERÓIS COMO MARCADORES QUÍMICOS EM ÁGUAS
DESTINADAS AO ABASTECIMENTO PÚBLICO NA REGIÃO DO
RIO PARAÍBA DO SUL, SP. DESENVOLVIMENTO E
VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA**

CAROLINE LIMA DE OLIVEIRA

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

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

**São Paulo
2012**

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**ESTUDO DE ESTERÓIS COMO MARCADORES QUÍMICOS EM
ÁGUAS DESTINADAS AO ABASTECIMENTO PÚBLICO NA
REGIÃO DO RIO PARAÍBA DO SUL, SP. DESENVOLVIMENTO E
VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA**

CAROLINE LIMA DE OLIVEIRA

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

Orientadora:

Dra. Elaine Arantes Jardim Martins

SÃO PAULO

2012

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho às pessoas
que me ensinaram o significado
do amor incondicional: meus
pais Traci e Waldir e meu
querido irmão Conrado,*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por mais uma realização profissional;

Aos meus pais pela confiança e carinho dados ao longo de todos esses anos seja na vida pessoal seja na vida profissional;

Ao meu irmão Conrado que sempre esteve intensamente presente em minha vida;

Ao Dymes pelo incentivo, paciência, parceria, carinho e amor nestes oito anos de convívio;

A Dra. Elaine Arantes Jardim Martins por ensinar o verdadeiro significado da palavra orientação, pela amizade, pelos ensinamentos e pela confiança em meu trabalho;

Ao Dr. Hélio Akira Furusawa, pelos ensinamentos em validação, etapa crucial deste trabalho de pesquisa. Ao Dr. Oscar Vegas pelos ensinamentos sobre espectrometria de massas;

À Dra. Maria A. F. Pires e à Dra. Marycel E.B. Cotrim, pelo apoio institucional, disponibilização dos laboratórios e equipamentos;

Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN/CNEN e ao Centro de Química e Meio Ambiente, CQMA, pela infra-estrutura disponibilizada para realização deste projeto;

A SABESP, pela parceria e pela realização das coletas avaliadas neste estudo. Em especial à Eng. Martha Rosângela e aos funcionários da Divisão de Controle Sanitário-RVOC da SABESP de São José dos Campos;

Aos colegas de laboratório, Juliana Ikebe, Carlos, Ligia e Renan pelos momentos de descontração durante as análises das coletas;

Um agradecimento especial a três amigas que me ajudaram muito, do início ao fim do mestrado: Juliana, Flávia e Luci;

Aos colegas Daniel, Helena Miho e Alexandre do Centro de Espectrometria de Massas Aplicada - CEMSA, que me apoiaram na etapa final do mestrado;

A Capes pela bolsa concedida e apoio financeiro.

EPÍGRAFE

*"A água de boa qualidade é
como a saúde ou a
liberdade: só tem valor
quando acaba."*

Guimarães Rosa

ESTUDO DE ESTERÓIS COMO MARCADORES QUÍMICOS EM ÁGUAS DESTINADAS AO ABASTECIMENTO PÚBLICO NA REGIÃO DO RIO PARAÍBA DO SUL, SP. DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA

CAROLINE LIMA DE OLIVEIRA

RESUMO

Estudos recentes na região do rio Paraíba do Sul, SP, apontaram a presença de estrógenos e xenoestrógenos e em virtude deste contexto, identificou-se a necessidade de investigar determinados compostos representantes da classe dos esteróis, marcadores químicos mais utilizados em estudos sobre o aporte de esgotos em matrizes ambientais. A metodologia desenvolvida e validada para determinar os esteróis coprostanol, colesterol, colestanol e estigmasterol em amostras de água bruta e tratada utilizou a técnica de SPE para extração e concentração e as técnicas de derivatização e GC/MS para determinação dos compostos. Por meio do processo de validação, a metodologia desenvolvida se mostrou adequada para a identificação e quantificação dos esteróis em virtude de sua exatidão, precisão, robustez, recuperação e incerteza do método. A validação forneceu confiabilidade estatística aos dados, confirmando a sensibilidade e a seletividade do método, além da boa linearidade nas faixas de trabalho consideradas. Aplicando o procedimento analítico validado nas amostras coletadas, constatou-se que o colesterol foi o esteroide predominante com concentrações médias de $1,2 \mu\text{g L}^{-1}$ para matriz de água bruta e $0,4 \mu\text{g L}^{-1}$ para matriz de água tratada. O coprostanol apresentou concentração média de $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ para matriz de água bruta enquanto seu isômero colestanol apresentou concentração média de $0,4 \mu\text{g L}^{-1}$. O fitoesteróide estigmasterol apresentou concentração média de $0,2 \mu\text{g L}^{-1}$ em águas superficiais. O coprostanol foi observado apenas na terceira coleta de água tratada com concentração média de $0,27 \mu\text{g L}^{-1}$ e o colestanol com concentração média de $0,37 \mu\text{g L}^{-1}$ nesta mesma amostra. Esses resultados proporcionaram uma avaliação preliminar da área de estudo com relação ao aporte de esgoto doméstico contribuindo com o plano de gestão de recursos hídricos da região do Rio Paraíba do Sul, SP indicando o nível de contaminação gerado nas águas de abastecimento público. Este trabalho está vinculado a uma parceria entre o Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) e a Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo (SABESP).

STUDY STEROLS AS MARKERS CHEMICALS IN WATER SUPPLY FOR THE PUBLIC IN THE REGION OF THE PARAÍBA DO SUL RIVER, SP. DEVELOPMENT AND VALIDATION OF ANALYTICAL METHODOLOGY

CAROLINE LIMA DE OLIVEIRA

ABSTRACT

Recent studies in the region of the Paraíba do Sul river, SP state, indicated the presence of estrogens and xenoestrogens. Thus it was identified the need to investigate specific compounds representatives of the sterols group, which are chemical markers most commonly used in studies on the contribution of sewage in environmental matrices. The methodology developed and validated to determine the sterols coprostanol, cholesterol, cholestanol and stigmasterol in samples of raw water and drinking water using the technique of SPE for the extraction and concentration and the techniques of derivatization and GC/MS for the determination of the compounds. Through the validation process, the methodology was characterized as adequate for the identification and quantification of sterols in virtue of its accuracy, precision, robustness, recovery and uncertainty in measurement of the method. The validation provided statistical reliability of the data, confirming the sensitivity and selectivity of the method, besides the good linearity in the range of work considered. Applying the analytical procedure in validated samples, it was found that the predominant sterol was the cholesterol with average concentrations $1.2 \mu\text{g L}^{-1}$ to the matrix raw water and $0.4 \mu\text{g L}^{-1}$ to the matrix of drinking water. The coprostanol presented concentration $0.5 \mu\text{g L}^{-1}$ for matrix of raw water while its isomer the cholestanol showed average concentration $0.4 \mu\text{g L}^{-1}$. The phytosteroid stigmasterol showed the average concentration $0.2 \mu\text{g L}^{-1}$ in surface waters. The coprostanol was observed only in the third sampling of treated water with concentration $0.27 \mu\text{g L}^{-1}$ and cholestanol with concentration $0.37 \mu\text{g L}^{-1}$ in the same sample. These results provided the basis for a preliminary evaluation of the studied area regarding the input of domestic sewage and contributed to the plan of water resources management in the region of the Paraíba do Sul river, SP indicating the level of contamination generated for the public water supply. This work is linked to a partnership between the Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) and Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo (SABESP).

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	1
2.	OBJETIVOS	7
2.1.	Objetivos Gerais	7
2.1.1.	Objetivos Específicos	7
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	8
3.1.	Marcadores químicos de contaminação por esgoto doméstico em corpos d'água	7
3.2.	Esteróides: Estenóis e Estanóis	9
3.3.	Esteróides de interesse	12
3.4.	Área de estudo	20
3.4.1.	Características e contextualização da bacia hidrográfica do rio Paraíba do Sul	20
3.4.2.	Municípios de interesse	23
3.4.2.1.	Guararema	24
3.4.2.2.	Pindamonhangaba	25
3.4.2.3.	Taubaté	25
3.4.2.4.	São José dos Campos	26
3.5.	Técnicas analíticas	26
3.5.1.	Extração em fase sólida (SPE, <i>solid phase extraction</i>)	26
3.5.2.	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas	29
3.5.3.	Derivatização	32
3.6.	Validação de metodologia analítica	34
3.6.1.	Seletividade/Especificidade	36
3.6.2.	Linearidade e faixa de trabalho	36
3.6.3.	Limite de detecção e quantificação	38
3.6.4.	Precisão	39
3.6.5.	Exatidão	40
3.6.6.	Recuperação	40

3.6.7.	Robustez.....	41
3.6.8.	Incerteza de medição.....	42
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	46
4.1.	Reagentes e soluções analíticas	46
4.2.	Equipamentos e materiais.....	47
4.3.	Descontaminação das vidrarias	48
4.4.	Amostragem e preservação das amostras.....	49
4.5.	Etapas analíticas.....	50
4.5.1.	Estudos metodológicos	51
4.5.1.1.	Estudo 1: Extração em fase sólida (SPE)	51
4.5.1.2.	Estudo 2: Reação de derivatização.....	55
3.5.1.3.	Estudo 3: Condições cromatográficas.....	57
4.6.	Validação do método	61
4.6.1.	Seletividade	63
4.6.2.	Linearidade e da faixa linear de trabalho	66
4.6.3.	Limite de detecção (LD)	67
4.6.4.	Limite de quantificação (LQ)	67
4.6.5.	Precisão	68
4.6.6.	Exatidão.....	68
4.6.7.	Recuperação.....	69
4.6.8.	Robustez.....	69
4.6.9.	Estimativa da incerteza	70
4.6.10.	Incerteza associada à curva analítica	71
4.6.11.	Incerteza associada à preparação da solução padrão.....	71
4.6.12.	Incertezas associadas à preparação das soluções de trabalho.....	72
4.6.13.	Incertezas associadas à resposta do equipamento (área).....	73
4.6.14.	Incerteza associada à recuperação	74
4.6.15.	Incerteza associada ao volume final	74
4.6.16.	Incerteza combinada e expandida	75
4.7.	Determinação de carbono orgânico total	75
4.8.	Aplicação da metodologia desenvolvida a outras amostras ambientais ..	76
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	78

5.1.	Estudos metodológicos	78
5.1.1.	Estudo 1: Extração em fase sólida.....	78
5.1.2.	Estudo 2: Reação de derivatização	79
5.1.2.1.	Variável - tempo	79
5.1.2.2.	Variável - Solvente de reação	80
5.1.2.3.	Variável - Solvente para diluição do produto pós-silanização	81
5.1.2.4.	Variável - Volume de BSTFA:TMCS (99:1).....	82
5.1.2.5.	Variável - Temperatura	83
5.2.	Validação dos parâmetros analíticos	84
5.2.1.	Seletividade	84
5.2.2.	Linearidade e faixa de trabalho	92
5.2.3.	Limites de detecção e quantificação	103
5.2.4.	Precisão	104
5.2.5.	Exatidão	106
5.2.6.	Recuperação.....	107
5.2.7.	Robustez.....	109
5.2.8.	Incerteza de medição.....	114
5.3.	Aplicação do método proposto nas amostras de estudo.....	118
5.4.	Avaliação do teor de carbono orgânico total nas amostras de água.....	128
5.5.	Aplicação da metodologia desenvolvida a outras amostras ambientais	128
6.	CONCLUSÃO	130
7.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	132
8.	APÊNDICE.....	133
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	154

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Concentrações ($\mu\text{g L}^{-1}$) de coprostanol, colesterol, colestanol e estigmasterol em amostras de águas bruta (AB) e tratada (AT) em diferentes regiões do mundo.....	19
TABELA 2. Planejamento fatorial saturado para avaliação da estimativa do erro da distribuição dos efeitos utilizando o algoritmo de <i>Dong</i> (pequenos experimentos).....	42
TABELA 3. Informações do reagente derivatizante empregado no estudo.....	46
TABELA 4. Informações dos padrões analíticos utilizados no estudo.....	47
TABELA 5. Avaliação de metodologias de SPE para amostras de água bruta e tratada de Guararema.....	53
TABELA 6. Variáveis avaliadas para o desenvolvimento de metodologia para reação de derivatização.....	56
TABELA 7. Intervalo de monitoramento, tempos de retenção (TR) e relação massa/carga dos íons de cada analito derivatizado monitorado no modo SIM.....	58
TABELA 8. Concentrações das soluções de trabalhos dos compostos estudados.....	62
TABELA 9. Fatores selecionados para avaliação da robustez.....	70
TABELA 10. Resultados da seletividade pela aplicação dos testes F e t para os compostos estudados, pela adição padrão somente nos solventes e na matriz de água tratada, considerando $F_{6,6,95\%} = 4,28$ e $t_{12,95\%} = 2,179$	87
TABELA 11. Resultados da seletividade pela aplicação dos testes F e t para os compostos estudados, pela adição padrão somente nos solventes e na matriz de água bruta, considerando $F_{6,6,95\%} = 4,28$ e $t_{12,95\%} = 2,179$	88
TABELA 12. Resultados obtidos para os testes de inclinação e paralelismo e do intercepto aplicando t (<i>Student</i>) na matriz de água tratada, considerando os dois conjuntos de amostras com 7 graus de liberdade e 95% de confiança, onde 2,179 é o valor crítico.....	91

TABELA 13. Resultados obtidos para os testes de inclinação e paralelismo e do intercepto aplicando t (<i>Student</i>) na matriz de água bruta, considerando os dois conjuntos de amostras com 7 graus de liberdade e 95% de confiança, onde 2,179 é o valor crítico.....	91
TABELA 14. Faixa de trabalho, equação da reta e coeficiente de determinação (r^2) para os compostos de estudo obtidos pela adição padrão na matriz de água tratada (AT).....	92
TABELA 15. Faixa de trabalho, equação da reta e coeficiente de determinação (r^2) para os compostos de estudo obtidos pela adição padrão na matriz de água bruta (AB).....	93
TABELA 16. Faixa de trabalho, equação da reta e coeficiente de determinação (r^2) para os compostos de estudo obtidos pela adição padrão no ensaio sem matriz.....	94
TABELA 17. Valores de t calculado obtidos pelo teste t (<i>Student</i>) para a verificação do desvio da linearidade de cada ponto da curva para os compostos estudados na matriz de água tratada, onde o valor tabelado é $t_{7,95\%} = 2,365$	96
TABELA 18. Valores de t calculado obtidos pelo teste t (<i>Student</i>) para a verificação do desvio da linearidade de cada ponto da curva para os compostos estudados na matriz de água bruta, onde o valor tabelado é $t_{7,95\%} = 2,365$	96
TABELA 19. Valores de t calculado obtidos pelo teste t (<i>Student</i>) para a verificação do desvio da linearidade de cada ponto da curva para os compostos estudados no ensaio sem matriz, onde o valor tabelado é $t_{7,95\%} = 2,365$	97
TABELA 20. Resultados resumidos da análise de variância (ANOVA) para os quatro compostos estudados no ensaio com matriz de água tratada (AT).....	101
TABELA 21. Resultados resumidos da análise de variância (ANOVA) para os quatro compostos estudados no ensaio com matriz de água bruta (AB).....	101
TABELA 22. Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) para os esteróis de estudo na matriz de água tratada (AT).....	103
TABELA 23. Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) para os esteróis de estudo na matriz de água bruta (AB).....	103

TABELA 24. Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) para os esteróis de estudo no ensaio sem matriz.....	103
TABELA 25. Coeficientes de variação (CV %) para os compostos em três níveis de concentração no ensaio com matriz de água tratada.....	104
TABELA 26. Coeficientes de variação (CV %) para os compostos em três níveis de concentração no ensaio com matriz de água bruta.....	104
TABELA 27. Valores do limite de repetitividade (r) para os compostos em três níveis de concentração no ensaio com matriz de água tratada.....	105
TABELA 28. Valores do limite de repetitividade (r) para os compostos em três níveis de concentração no ensaio com matriz de água bruta.....	105
TABELA 29. Valores do limite de reprodutibilidade (R) para os compostos em três níveis de concentração no ensaio com matriz de água tratada.....	106
TABELA 30. Valores do limite de reprodutibilidade (R) para os compostos em três níveis de concentração no ensaio com matriz de água bruta.....	106
TABELA 31. Resultados do índice Z (z Score) para os compostos estudados nos ensaios em matriz de água tratada (AT) e água bruta (AB).....	107
TABELA 32. Resultados dos estudos de recuperação na matriz de água tratada (AT) considerando três níveis de fortificação (n=3).....	108
TABELA 33. Resultados dos estudos de recuperação na matriz de água bruta (AB) considerando três níveis de fortificação (n=3).....	108
TABELA 34. Incertezas expandidas para os esteróis estudados em água tratada, considerando k = 1,96 e 95% de confiança.....	114
TABELA 35. Incertezas expandidas para os esteróis estudados em água bruta, considerando k = 1,96 e 95% de confiança.....	115
TABELA 36. Contribuição da incerteza de cada grandeza de entrada no cálculo do mensurando no ensaio em água tratada (AT).....	115

TABELA 37. Contribuição da incerteza de cada grandeza de entrada no cálculo do mensurando no ensaio em água bruta (AB).....	117
TABELA 38. Resultados das análises das coletas das amostras de água tratada (AT) e água bruta (AB) dos quatro municípios da região do rio Paraíba do Sul.....	118
TABELA 39. Razões entre esteróis aplicados neste estudo.....	125
TABELA 40. Valores das razões entre os esteróis estudados nas amostras de água bruta nas três coletas realizadas.....	126
TABELA 41. Concentração de carbono orgânico total (COT) para amostras de água tratada (AT) e água bruta (AB) dos quatro municípios da região do rio Paraíba do Sul.....	128
TABELA 42. Resultados das análises das coletas das amostras de esgoto tratado dos municípios de Pindamonhangaba e São José dos Campos situados na região do rio Paraíba do Sul.....	129

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Estrutura geral da molécula de esterol.....	10
FIGURA 2. Biossíntese dos estenóis. Fonte: Adaptado de Stefens (2006)...	11
FIGURA 3. Biossíntese dos estanóis. Fonte: Adaptado de Stefens (2006)...	12
FIGURA 4. Esteróides de interesse do presente estudo.....	13
FIGURA 5. Bacia do rio Paraíba do Sul: Comitês de bacias. Fonte: Braga <i>et al.</i> , 2008.....	21
FIGURA 6. Porção paulista da Bacia Hidrográfica do rio Paraíba do Sul. Fonte: Adaptado de Novaes (2006).....	24
FIGURA 7. Principais etapas empregadas em SPE visando a concentração dos analitos.....	28
FIGURA 8. Mecanismo para a reação de derivatização. Fonte: Adaptado de Supelco (2003).....	33
FIGURA 9. Exemplo da reação de derivatização para esteróides. Fonte: Adaptado de Martins (2001).....	34
FIGURA 10. Fluxograma dos passos para a expressão da incerteza de medição. Fonte: RM (2009).....	44
FIGURA 11. Diagrama de Causa e Efeito da metodologia desenvolvida para análise de esteróis em água.....	45
FIGURA 12. Participação na terceira coleta realizada em dezembro nos quatros municípios de estudo.....	50
FIGURA 13. Fluxograma da metodologia analítica utilizada.....	51
FIGURA 14. Sistema de extração em fase sólida utilizado para extração e concentração dos analitos.....	52
FIGURA 15. Eluição dos analitos após a etapa de centrifugação.....	52
FIGURA 16. Fragmentação do derivado trimetil-silícico do colesterol originando o íon com m/z 129.....	59

FIGURA 17. Fragmentação do derivado trimetil-silícico do colesterol originando o íon com m/z 329.....	60
FIGURA 18. 1ª proposta de fragmentação do derivado trimetil-silícico do colesterol originando o íon com m/z 368.....	60
FIGURA 19. 2ª proposta de fragmentação do derivado trimetil-silícico do colesterol originando o íon com m/z 368.....	61
FIGURA 20. Pontos de coleta do esgoto tratado nas ETEs Lavapés e Pindamonhagaba.....	76
FIGURA 21. Participação na coleta da amostra de água a jusante do lançamento do esgoto tratado da ETE de Pindamonhangaba....	77
FIGURA 22. Comparação entre as áreas dos picos cromatográficos dos testes metodológicos para os esteróis de estudo em matriz de água tratada (AT).....	78
FIGURA 23. Comparação entre as áreas dos picos cromatográficos dos testes metodológicos para os esteróis de estudo em matriz de água bruta (AB).....	79
FIGURA 24. Comparação entre as áreas dos picos cromatográficos para a variável tempo avaliada para os esteróis de estudo.....	80
FIGURA 25. Comparação entre as áreas dos picos cromatográficos para a variável solvente de reação avaliada para os esteróis de estudo.....	81
FIGURA 26. Comparação entre as áreas dos picos cromatográficos para a variável solvente para diluição do produto pós-silanização avaliada para os esteróis de estudo.....	82
FIGURA 27. Comparação entre as áreas dos picos cromatográficos para a variável volume de BSTFA:TMCS (99:1) avaliada para os esteróis de estudo.....	82
FIGURA 28. Comparação entre as áreas dos picos cromatográficos para a variável temperatura avaliada para os esteróis de estudo.....	83
FIGURA 29. Comparação entre as áreas dos picos cromatográficos da mistura de padrões antes e após derivatização.....	84
FIGURA 30. Cromatograma da mistura dos compostos estudados na matriz de água tratada referente ao quarto ponto do estudo de seletividade obtido no modo SIM.....	85

FIGURA 31. Cromatograma da mistura dos compostos estudados na matriz de água bruta referente ao quarto ponto do estudo de seletividade obtido no modo SIM.....	85
FIGURA 32. Cromatograma da mistura dos compostos estudados em solventes referente ao quarto ponto do estudo de seletividade obtido no modo SIM.....	85
FIGURA 33. Picos cromatográficos dos compostos estudados obtidos no modo SIM bem como os íons monitorados a esquerda do cromatograma.....	86
FIGURA 34. Gráficos da seletividade representados pelas retas obtidas nos ensaios com água tratada, água bruta e sem matriz.....	90
FIGURA 35. Representação gráfica da linearidade para os esteróis de estudo na matriz de água tratada.....	93
FIGURA 36. Representação gráfica da linearidade para os esteróis de estudo na matriz de água bruta.....	94
FIGURA 37. Representação gráfica da linearidade para os esteróis de estudo no ensaio sem matriz.....	95
FIGURA 38. Gráficos dos resíduos absolutos (esquerda) e normalizados (direita) para o coprostanol e colesterol no ensaio com matriz de água tratada (AT).....	97
FIGURA 39. Gráficos dos resíduos absolutos (esquerda) e normalizados (direita) para o colestanol e estigmasterol no ensaio com matriz de água tratada (AT).....	98
FIGURA 40. Gráficos dos resíduos absolutos (esquerda) e normalizados (direita) para o coprostanol e colesterol no ensaio com matriz de água bruta (AB).....	98
FIGURA 41. Gráficos dos resíduos absolutos (esquerda) e normalizados (direita) para o colestanol e estigmasterol no ensaio com matriz de água bruta (AB).....	99
FIGURA 42. Gráficos dos resíduos absolutos (esquerda) e normalizados (direita) para o coprostanol e colesterol no ensaio sem matriz ...	99
FIGURA 43. Gráficos dos resíduos absolutos (esquerda) e normalizados (direita) para o colestanol e estigmasterol no ensaio sem matriz.....	100

FIGURA 44. Gráficos da faixa de intervalo de confiança no ensaio sem matriz para os compostos estudados na faixa de trabalho considerada.....	102
FIGURA 45. Verificação da significância dos efeitos para os esteróis na matriz de água tratada (AT).....	109
FIGURA 46. Gráficos de <i>rankit</i> para os esteróis na matriz de água tratada (AT).....	110
FIGURA 47. Gráficos de probabilidade normal para os esteróis na matriz de água tratada (AT).....	111
FIGURA 48. Verificação da significância dos efeitos para os esteróis na matriz de água bruta (AB).....	112
FIGURA 49. Gráficos de <i>rankit</i> para os esteróis na matriz de água bruta (AB).....	113
FIGURA 50. Gráficos de probabilidade normal para os esteróis na matriz de água bruta (AB).....	114
FIGURA 51. Representações gráficas das incertezas individuais envolvidas na análise dos esteróis na matriz de água tratada (AT).....	116
FIGURA 52. Representações gráficas das incertezas individuais envolvidas na análise dos esteróis na matriz de água bruta (AB).....	117

LISTA DE ABREVIATURAS

AB	Água bruta
ABG	Água bruta de Guararema
ABP	Água bruta de Pindamonhangaba
ABS	Água bruta de São José dos Campos
ABT	Água bruta de Taubaté
AGEVAP	Agência da Bacia do Rio Paraíba do Sul
ANOVA	<i>Analysis of variance</i> (Análise de variância)
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AT	Água tratada
ATG	Água tratada de Guararema
ATP	Água tratada de Pindamonhangaba
ATS	Água tratada de São José dos Campos
ATT	Água tratada de Taubaté
BSTFA/TMCS	N,O-bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida/trimetilclorosilano
CAS	<i>Chemical Abstract Service</i>
CBH-PS	Comitê das bacias hidrográficas do Rio Paraíba do Sul
CEIVAP	Comitê de Integração da Bacia Hidrográfica do Rio Paraíba do Sul
CETESB	Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
CI	Carbono inorgânico
CIIAGRO	Centro Integrado de Informações Agrometeorológicas
COL	Colesterol
COLESTAN	Colestanol
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
COP	Coprostanol
COT	Carbono orgânico total
CT	Carbono total
CV	Coefficiente de variação
DCM	Diclorometano
ELL	Extração líquido-líquido

ETA Estação de Tratamento de Água

ETE Estação de Tratamento de Esgoto

EtOAc Acetato de Etila

GC *Gas Chromatography* (Cromatografia gasosa)

GC/MS *Gas Chromatography with Mass Spectrometry* (Cromatógrafo gasoso acoplado ao espectrômetro de massas)

HEX Hexano

IBGE Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

INMETRO Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial

IPEN Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares

ISO *International Organization for Standardization* (Organização Internacional para Padronização)

IUPAC *International Union of Pure and Applied Chemistry* (União Internacional de Química Pura e Aplicada)

LC/MS *Liquid Chromatography with Mass Spectrometry* (Cromatógrafo líquido acoplado ao espectrômetro de massas)

LD Limite de detecção

LQ Limite de quantificação

ME *Margin of error* (Margem de erro)

MeOH Metanol

MS *Mass Spectrometry* (Espectrômetro de massas)

SABESP Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo

SCAN Varredura de uma faixa determinada de íons

SIM *Select ion monitoring* (Monitoramento seletivo de íons)

SME *Simultaneous margin of error* (Margem simultânea de erro)

SPE *Solid phase extraction* (Extração em fase sólida)

SPME *Solid phase microextraction* (Microextração em fase sólida)

UGRHI Unidade de Gerenciamento de Recursos Hídricos

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

1. INTRODUÇÃO

A população mundial triplicou nos últimos 100 anos e a demanda por água limpa se multiplicou por seis. O Brasil ostenta certa abundância deste recurso natural, porém 75% da água dos seus 12 mil rios e córregos estão na região norte, na bacia do Amazonas, região onde vive apenas 6 % da população. Este cenário contrasta, por exemplo, com o estado de São Paulo, região metropolitana, que possui mais de 20% da população brasileira e menos de 2% da água com qualidade do País (Água, 2011).

A escassez dos recursos hídricos com qualidade em regiões metropolitanas do Brasil se deve entre outros fatores à falta da preservação dos mananciais causada pela contaminação gerada pelos efluentes da população urbana, que são o esgoto doméstico, industrial e pluvial (Tucci, 2008).

O lançamento de esgotos nos corpos hídricos tornou-se uma atividade corriqueira em virtude principalmente de duas razões: alternativa econômica em relação a tratamentos específicos e a grande capacidade de diluição atribuída aos corpos d'água. Neste contexto, a detecção da poluição por esgotos no ambiente aquático é de considerável importância por questões de saúde pública.

Diversos estudos apresentam como forma de determinação da poluição por esgoto, o uso dos marcadores químicos de contaminação fecal, que aparecem como alternativa em relação aos métodos microbiológicos mais comumente utilizados, pois são menos susceptíveis às mudanças ambientais (Murtaugh e Bunch, 1967; Leeming e Nichols, 1996; Maldonado *et al.*, 2000; Pratt, 2005; Araújo *et al.*, 2011). Os compostos da classe dos esteróis são os marcadores químicos mais utilizados em estudos sobre o aporte de esgotos, devido à especificidade com material fecal de origem humana (Martins *et al.*, 2008).

O colesterol (5-colesten-3 β -ol) é o principal esteróide de origem animal, mas pequenas quantidades são sintetizadas por outros eucariotas, como plantas e fungos. Como principais funções vale destacar a de constituinte estrutural das

membranas celulares e substrato para a síntese de sais biliares e hormônios esteroidais (Shimada *et al.*, 2001; Kawakami e Montone, 2002; Ghiselli, 2006; Martins *et al.*, 2008).

As matrizes deste esteróide no ambiente são os sedimentos de vários sistemas aquáticos e em menor proporção em águas superficiais, cuja origem está relacionada ao aporte natural ou antrópico (Braun, 2006; Venkatesan *et al.*, 2010; Araújo *et al.*, 2011).

Esteróides derivados do colesterol, tais como o coprostanol (5 β -coletan-3 β -ol) e o seu isômero coletanol (5 α -coletan-3 β -ol) são encontrados nas mesmas matrizes ambientais do precursor visto que são gerados e excretados através do metabolismo do colesterol pelo intestino (Shimada *et al.*, 2001; Kawakami e Montone, 2002; Martins *et al.*, 2008).

O coprostanol é um esteróide de origem fecal, formado pela hidrogenação (redução) bacteriana do colesterol no intestino de mamíferos e correspondem a aproximadamente 60% do conteúdo total de esteróides nas matrizes ambientais (Carreira *et al.*, 2001; Schonning *et al.*, 2002; Chou e Liu, 2004).

Este esteróide é amplamente utilizado como marcador químico para avaliar e monitorar a contaminação por efluentes domésticos, visto que sua ocorrência não é natural nos ambientes aquáticos e está diretamente associado ao material fecal de mamíferos, em particular, o homem (Martins *et al.*, 2008).

Além dos esteróides de origem animal, fitoesteróides tais como β -sitosterol e estigmasterol (5,22-colestadien-24-etil-3 β -ol) também são encontrados nos corpos hídricos sendo importantes marcadores de poluição fecal proveniente de efluentes pecuários (Saim *et al.*, 2009).

A utilização dos esteróis, como marcadores de contaminação por esgoto doméstico, é particularmente aplicável a regiões próximas a centros populacionais e a atividade industrial e agropecuária, onde é possível identificar

fontes de descarga de efluentes, na maioria das vezes tratados apenas primariamente (Martins, 2001; Martins *et al.*, 2008).

Considerando o contexto apresentado, o presente estudo analisou a distribuição dos marcadores químicos colesterol, coprostanol, colestanol e estigmasterol em águas destinadas ao abastecimento público na região do rio Paraíba do Sul, SP, visto que poucos estudos têm abordado a ocorrência destes analitos em águas brasileiras e internacionais.

Com uma área de drenagem de 62.074 km², a bacia hidrográfica do rio Paraíba do Sul estende-se pela região sudeste, abrangendo o Vale do Paraíba (13.900 km²), a Zona da Mata Mineira (20.900 km²) e quase metade do estado do Rio de Janeiro (21.900 km²) (CEIVAP – AGEVAP, 2011).

A área de estudo escolhida para a realização desta pesquisa abrangeu quatro municípios situados na região do Vale do Paraíba sendo eles, Guararema, Taubaté, São José dos Campos e Pindamonhangaba, todos pertencentes à parcela paulista da bacia do rio Paraíba do Sul.

A escolha dessa área de estudo é justificada pelo conjunto de problemas ambientais que se acumulam e crescem ano a ano na região devido ao intenso desenvolvimento das atividades urbano-industriais e agropecuárias, expressando-se em danos à qualidade dos recursos hídricos (Tucci, 2008). Outra motivação foi a realização de estudos recentes na região em questão, em que a ocorrência de estrógenos e xenoestrógenos foi observada (Otomo, 2010; Souza, 2011).

Métodos voltados à determinação dos esteróis em água estão, em sua maioria, condicionados a uma etapa de extração e pré-concentração. Inúmeras estratégias têm sido adotadas para este fim, sendo que a grande parte dos trabalhos faz uso de métodos de extração em fase sólida (SPE, *solid phase extraction*) (Sodré *et al.*, 2010a).

Ao longo das últimas duas décadas, combinadas a técnica de SPE, técnicas analíticas como a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de

massa (LC/MS, *Liquid Chromatography with Mass Spectrometry*) e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC/MS, *Gas Chromatography with Mass Spectrometry*) têm sido empregadas na detecção de esteróides em amostras ambientais (Pereira *et al.*, 2002).

Entretanto, a GC/MS tem sido a técnica analítica mais utilizada para quantificação de esteróis em diversas matrizes ambientais (Leeming *et al.*, 1996; Gilli *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2009; Andrási *et al.*, 2011; Furtula *et al.*, 2012).

O emprego da técnica de GC/MS na análise de esteróis preconiza a adoção de uma etapa de derivatização no preparo da amostra, uma vez que a presença do grupo hidroxila no núcleo esteróide das moléculas confere uma baixa volatilidade aos compostos, requisito primordial para que se torne possível a análise dos compostos pela técnica cromatográfica (Ciola, 1985; Collins *et al.*, 2006).

A derivatização consiste em transformar a substância de interesse em um derivado com características adequadas para ser analisado por cromatografia gasosa em que grupos específicos são introduzidos em posições onde há a presença de grupos fortemente polares, no sentido de aumentar a detectabilidade da substância (Collins *et al.*, 2006).

A siliilação é a reação de derivatização mais utilizada para a análise de esteróis em CG/MS, sendo o reagente sinalizante N,O-bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida/trimetilclorosilano (BSTFA/TMCS–99:1) o mais comum (Leeming *et al.*, 1996; Carreira *et al.*, 2001; Kawakami e Montone, 2002; Niven *et al.*, 2001; Schoming *et al.*, 2002; Gilli *et al.*, 2006; Martins *et al.*, 2008; Schummer *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2009; Andrási *et al.*, 2011; Osman *et al.*, 2012).

Para realizar o diagnóstico ambiental da área de estudo selecionada para esta pesquisa, foi desenvolvida uma metodologia analítica utilizando a técnica de SPE para extração e concentração dos analitos, derivatização e posterior análise específica por GC/MS dos esteróis de interesse.

Em metodologias analíticas é praticamente impossível gerar resultados totalmente livres de erros e incertezas, pois em cada operação que constitui a análise química há uma incerteza associada. Dessa forma, após o desenvolvimento de uma metodologia analítica se faz necessário que este novo método gere informações seguras e confiáveis sobre a amostra, e que a qualidade das medições químicas seja demonstrada por meios rastreáveis e comparáveis.

Para tal, a metodologia deve ser submetida a uma avaliação denominada validação. O desenvolvimento de um novo método ou a adaptação de métodos já validados, quando bem definido e documentado, deve sempre fornecer evidências organizadas, claras e objetivas de que o método e o sistema são adequados para o uso desejado (INMETRO, 2003; Ribani *et al.*, 2004; Moracci, 2008).

Após a separação e identificação de cada composto a ser quantificado, estabelecidas todas as condições de análise no equipamento, realiza-se o controle de qualidade analítico normalmente baseado em uma programação de análises de soluções padrão, de diferentes concentrações, em setuplicada das amostras e estudos estatísticos utilizando-se critérios pré-estabelecidos.

Para a validação da metodologia analítica para os esteróis de interesse, foram considerados os parâmetros de desempenho de seletividade, exatidão, precisão, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, robustez, recuperação e incerteza associada ao processo.

Utilizou-se a planilha “Validação de Ensaio Químico” desenvolvida por Furusawa (2007), baseada no documento DOQ-CGCRE-8 (INMETRO, 2003; INMETRO, 2007), como ferramenta estatística para a avaliação dos parâmetros de desempenho da metodologia proposta.

O presente estudo visou auxiliar o plano de gestão de recursos hídricos dos municípios selecionados, subsidiando ações para melhorar seu gerenciamento por meio do diagnóstico ambiental e colaborando para a revisão

das leis vigentes de controle ambiental por parte dos órgãos legisladores. Esta pesquisa está vinculada a uma parceria entre o Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) e a Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo (SABESP) do município de São José dos Campos, cuja participação na escolha dos compostos de interesse deste estudo foi de suma importância.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos Gerais

O objetivo deste estudo foi desenvolver e validar uma metodologia analítica para determinação de marcadores químicos da classe dos esteróis em amostras de água tratada e bruta coletadas na região do rio Paraíba do Sul, SP, utilizando a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC/MS).

2.1.1. Objetivos Específicos

- Desenvolver, adaptar e otimizar metodologia analítica para a extração e quantificação de marcadores químicos da classe dos esteróis – coprostanol, colesterol, colestanol e estigmasterol utilizando a técnica de extração em fase sólida (SPE), derivatização e determinação por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC/MS);
- Validar a metodologia desenvolvida, demonstrando a qualidade dos dados gerados;
- Aplicar a metodologia desenvolvida em amostras de água bruta de áreas de captação do rio Paraíba do Sul e água tratada provenientes das Estações de Tratamento de Água (ETAs) de quatro municípios do Vale do Paraíba paulista – Guararema, Pindamonhangaba, São José dos Campos e Taubaté, a fim de identificar e quantificar os analitos presentes.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Marcadores químicos de contaminação por esgoto doméstico em corpos d'água

O lançamento de esgoto doméstico, com ou sem tratamento prévio, em ambientes aquáticos afeta a qualidade da água do sistema receptor e tem reflexos sobre a manutenção das condições ideais para a sobrevivência dos organismos e sobre a saúde humana podendo causar doenças como febre tifóide, cólera, hepatite, infecções gastrointestinais, entre outras (Firme, 2003; USEPA, 2006). Este impacto pode ser avaliado por meio de marcadores microbiológicos e químicos (Takada e Eganhouse, 1998; Isobe *et al.*, 2004; Savichtcheva e Okabe, 2006; Froehner *et al.*, 2010).

Marcadores microbiológicos, tais como bactérias coliformes (*Escherichia coli*) e estreptococos, são amplamente utilizados para a determinação da poluição causada pelo aporte de esgoto doméstico em corpos d'água e sua quantificação é relativamente simples e rápida. No Brasil e na maioria dos países, diretrizes de qualidade de água para contato primário e secundário são estabelecidas com base no número de bactérias presentes (Lima da Costa e Carreira, 2005).

No entanto, o uso de bactérias como marcadores é controverso, especialmente em regiões tropicais caracterizadas por altas temperaturas e chuvas frequentes (Isobe *et al.*, 2002). Diversos estudos relataram que o crescimento e a sobrevivência dos marcadores microbiológicos são susceptíveis a fatores ambientais, como a temperatura da água, luz solar e precipitação (Berry *et al.*, 1991; Burkhardt *et al.*, 2000; Kistemann *et al.*, 2002; Isobe *et al.*, 2004). Outra desvantagem é o fato destes marcadores não serem capazes de distinguir as diferentes fontes de contaminação fecal (Isobe *et al.*, 2002).

Os marcadores químicos de poluição por esgoto doméstico aparecem como alternativa em relação aos métodos microbiológicos, pois são menos

susceptíveis às mudanças ambientais (Martins, 2001; Savichtcheva e Okabe, 2006).

Determinados representantes da classe dos esteróis são os marcadores químicos mais citados em trabalhos envolvendo poluição fecal e efluentes domésticos sendo aplicados para examinar o histórico de distribuição do esgoto bem como o seu transporte no ambiente aquático (Dutka *et al.*, 1974; Pratt, 2005; Gilli *et al.*, 2006; Tyagi *et al.*, 2007; Araújo *et al.*, 2011; Hussain *et al.*, 2011).

A natureza pouco polar e não-iônica bem como a baixa solubilidade dos esteróis em água resultam na associação dos mesmos a partículas e sedimentos (Hawkins-Writer *et al.*, 1995). Nas estações de tratamento de esgoto que envolvem a remoção de sólidos, são encontrados efluentes com baixos teores de esteróis. Por outro lado, os esteróis em sua forma particulada podem se acumular nos sedimentos, podendo assim indicar se a contaminação de determinada região é recente ou contínua, uma vez que em ambientes anóxicos sua degradação é muito lenta (Martins *et al.*, 2008).

3.2. Esteróides: Estenóis e Estanóis

Os esteróides são lipídios estruturais e estão presentes nas membranas da maioria das células eucarióticas. Sua estrutura característica é o núcleo esteróide consistindo de quatro anéis fundidos, três com seis carbonos e um com cinco. O núcleo esteróide é quase planar e relativamente rígido, ou seja, os anéis fundidos não permitem rotação em torno das ligações C-C (Lehninger, 1970; Senatore, 2010).

Os esteróides compreendem um imenso grupo de compostos, entretanto, ao pertencerem ao grupo dos alcoóis os mesmos são denominados esteróis. Os esteróis (FIG. 1) são compostos cíclicos que possuem um grupo hidroxila na posição três do núcleo esteróide, portanto apresentam propriedades químicas semelhantes aos alcoóis. Podem apresentar cadeia carbônica lateral na posição C₁₇, grupos metilas nas posições C₁₀ e C₁₃ e insaturações em seus anéis (Stefens, 2006).

FIGURA 1. Estrutura geral da molécula de esterol.

Esteróis que possuem o núcleo esteróide de sua molécula insaturado, ou seja, com dupla ligação em C₅ ou C₇ são denominados de estenóis. Na nomenclatura usual, os nomes destes compostos aparecem acompanhados do sufixo – erol. Em contrapartida, esteróis com um conjunto de anéis totalmente saturados são denominados estanóis (Braun, 2006).

Segundo Bandeira e colaboradores (2008), nos organismos de origem vegetal e animal, os esteróis derivam-se a partir de uma mesma molécula, o acetilcoenzima A, e a síntese bioquímica é idêntica até a formação do esqualeno linear (C₃₀H₅₀).

A biossíntese dos estenóis (FIG. 2) é resultado da oxidação enzimática do esqualeno, que é um hidrocarboneto poliinsaturado de cadeia aberta que ocorre em tecidos vegetais e animais, pela enzima NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato) (Stefens, 2006).

FIGURA 2. Biossíntese dos esteróis. Fonte: Adaptado de Stefens (2006).

O resultado desta oxidação é a formação do 2,3-epóxido esqualeno com consequente ciclização. Animais e fungos ciclizam o composto 2,3-epóxido esqualeno para lanosterol como primeiro intermediário cíclico, enquanto vegetais superiores, microalgas e muitos protozoários convertem o mesmo substrato para cicloartenol. Após reações de oxidação enzimática, descarboxilação, perdas e migrações dos grupos metila, o lanosterol é convertido em colesterol, enquanto o cicloartenol dá origem aos fitoesteróides, como por exemplo, o estigmasterol (Piironen *et al.*, 2000; Hernandez, 2009).

Os esteróis podem ser encontrados em diversos ambientes devido à biotransformação dos esteróis mediada por microorganismos seja ela *in situ* ou no intestino de animais superiores. A biossíntese dos esteróis (FIG. 3) baseia-se

na oxidação do estenol a estenona com posterior redução microbiana da mesma a estanona formando os 5 α - e 5 β - estanóis (Stefens, 2006).

FIGURA 3. Biossíntese dos estanóis. Fonte: Adaptado de Stefens (2006).

3.3. Esteróis de interesse

No presente estudo, quatro representantes (FIG. 4) da classe dos esteróis foram selecionados para avaliar a qualidade da água destinada ao abastecimento público da região do rio Paraíba do Sul. São eles: colesterol, coprostanol, colestanol e estigmasterol.

FIGURA 4. Esteróis de interesse do presente estudo.

O colesterol (5-cholesten-3 β -ol) é o principal esteróide de origem animal, mas pequenas quantidades são sintetizadas por plantas e fungos. Embora a maioria dos esteróides destes eucariotas apresente um grupo alquila (metila ou etila) em C₂₄, a ocorrência do colesterol, esteróide sem alquilação em C₂₄, já foi confirmada por meio de estudos que demonstraram a existência de uma enzima capaz de controlar os níveis deste metabólito. O conteúdo de colesterol em plantas pode somar até um quarto de todos os esteróides presentes (Diener *et al.*, 2000; Rocha e Silva *et al.*, 2007).

Como principais funções deste esteróide vale destacar a de constituinte estrutural das membranas celulares e substrato para a síntese de sais biliares, dos hormônios esteroidais da glândula supra-renal do córtex, dos hormônios sexuais masculinos e femininos e de vitamina D. Entretanto, é considerado o maior responsável pelos distúrbios ocorridos nas artérias, como a hipertensão (Shimada *et al.*, 2001; Kawakami e Montone, 2002; Ghiselli, 2006; Bandeira *et al.*, 2008; Martins *et al.*, 2008).

As matrizes deste esteróide no ambiente são os sedimentos de vários sistemas aquáticos e em menor proporção em águas superficiais, cuja origem está relacionada ao aporte natural ou antrópico (Braun, 2006; Volkman, 2006). Niven e colaboradores (2001) investigaram a possível transformação do colesterol em estrógenos durante as etapas realizadas nas estações de tratamento de esgoto (ETEs).

Apesar do colesterol ser encontrado em fezes humanas na faixa de 1,4 a 65 % do total de esteróis, sua presença é comum em ambientes aquáticos tornando-o menos útil como um indicador direto da presença de esgoto doméstico (LeBlanc *et al.*, 1992; Walker, 1995; Braun, 2006; Martins *et al.*, 2008).

Esteróides derivados do colesterol, tais como o coprostanol (5 β -coletan-3 β -ol) e o seu isômero coletanol (5 α -coletan-3 β -ol) são encontrados nas mesmas matrizes ambientais do precursor visto que são gerados e excretados através do metabolismo do colesterol pelo intestino (Shimada *et al.*, 2001; Kawakami e Montone, 2002; Martins *et al.*, 2008; Froehner *et al.*, 2010).

Ambos têm sido utilizados como marcadores de contaminação por esgoto doméstico, em especial o coprostanol, que é um esteroide de origem fecal, formado pela hidrogenação (redução) bacteriana do colesterol no intestino de animais superiores e corresponde a aproximadamente 60% do conteúdo total de esteróides nas matrizes ambientais (Carreira *et al.*, 2001; Schonning *et al.*, 2002; Chou e Liu, 2004). Segundo Isobe e colaboradores (2002), as concentrações de coprostanol em esgoto *in natura* variam de 62 a 2781 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Desde a década de 60, o coprostanol é amplamente utilizado como marcador químico para avaliar e monitorar a contaminação por efluentes domésticos, pois está diretamente associado ao material fecal de animais superiores, em particular, o homem (Dukta *et al.*, 1974; Martins *et al.*, 2008). Segundo Leeming e colaboradores (1996) as fezes humanas contém 10 vezes mais coprostanol, quando comparado por exemplo com as fezes de outros mamíferos como gato, porco e cavalo.

Entretanto, o coprostanol também pode ter outras fontes além das excretas de animais superiores, podendo ser encontrado em regiões onde não haja fonte conhecida de esgoto (Martins, 2008). Existem duas possíveis fontes de coprostanol onde há ausência de esgoto: redução do colesterol *in situ* e fezes de mamíferos aquáticos e terrestres (Grimalt *et al.*, 1990).

Embora seja comum o uso do coprostanol como marcador químico, muitos autores não associam a presença deste esteróide com um risco eminente à saúde, pois a ausência de estudos epidemiológicos dificultam a relação entre a concentração do mesmo com a frequência de doenças de veiculação hídrica (Leeming e Nichols, 1996). No entanto, Gagné e colaboradores (2001), relataram que o coprostanol pode afetar a reprodução e desenvolvimento nos animais selvagens interferindo no funcionamento normal de seus sistemas endócrinos.

Apesar de ser considerado um marcador específico e apresentar boa resistência aos processos iniciais de diagênese, especialmente em ambientes anóxicos, alguns autores apontam limitações ao uso do coprostanol, tais como: falta de um critério quantitativo que associe determinado nível de coprostanol à presença de contaminação fecal e a possível produção *in situ* do mesmo em ambientes anóxicos que representaria uma fonte independente do composto (Carreira *et al.*, 2001).

Para superar essas limitações, tem-se proposto o uso de alguns índices derivados da relação entre a concentração de coprostanol e de outros compostos esteroidais (Takada e Eganhouse, 1998, Carreira *et al.*, 2001). As faixas de valores obtidos para estas relações tendem a distinguir as fontes de esteróis e a estimar o grau de contaminação da área estudada (Cordeiro, 2006).

Como indicativo de contribuição de esgoto na matéria orgânica, Hatcher e McGilivray (1979) propuseram a relação entre as porcentagens da concentração de coprostanol e do total dos esteróis quantificados (% coprostanol / % total de esteróis) em que valores maiores que 6 % indicam área contaminada.

Venkatesan e Santiago (1989) propuseram a relação entre a porcentagem de colesterol e a concentração total dos esteróis quantificados ($\% \text{ colesterol} / \% \text{ total de esteróis}$). Altos valores para esta relação podem indicar contribuição de fontes naturais, pois mamíferos e aves contribuem com grandes quantidades de colesterol enquanto que baixos valores indicariam predominância de esteróis fecais, cuja origem principal é relacionada a fezes humanas.

Grimalt e colaboradores (1990) propuseram a relação entre as concentrações de coprostanol e a somatória das concentrações de coprostanol e colestanol ($\text{coprostanol} / (\text{coprostanol} + \text{colestanol})$). Razões superiores a 0,7 podem ser atribuídas a áreas contaminadas por efluentes domésticos, enquanto que valores inferiores a 0,3 caracterizam áreas não contaminadas.

Outra proposta sugerida por estes autores foi a relação entre as concentrações de coprostanol e colesterol ($\text{coprostanol} / \text{colesterol}$), cujo valor maior que um é indicativo de região contaminada por esgoto. A mesma relação também foi proposta por Takada e colaboradores (1997).

Chaloux e colaboradores (1995) propuseram a relação entre a concentração de colesterol e a somatória das concentrações de colesterol e colestanol ($\text{colesterol} / (\text{colesterol} + \text{colestanol})$). Valores superiores a 0,7 indicam redução *in situ* do colesterol a colestanol, enquanto que valores inferiores a 0,7 indicam entrada de colestanol no ambiente de forma biogênica.

Como indicativo de presença de esgoto em ambientes aquáticos, Takada e Eganhouse (1998) propuseram a relação entre a concentração de coprostanol e a somatória das concentrações de colesterol e colestanol ($\text{coprostanol} / (\text{colesterol} + \text{colestanol})$) em que valores superiores a 1 indicam área contaminada.

Na matéria orgânica recentemente produzida por processos autotróficos, a relação entre a concentração de estenóis e a concentração de estanóis ($\text{estenóis} / \text{estanóis}$) apresenta valores na faixa de 0,1 a 0,5, indicando

predomínio dos esteróis insaturados de origem biogênica (Canuel e Martens, 1993; Wakeham e Canuel, 2006).

Vale lembrar, que o enfoque foi dado às relações existentes entre os esteróis avaliados no presente estudo, no entanto a existência de outras relações não citadas neste texto também é de relevante importância (Venkatesan e Santiago, 1989; Venkatesan e Kaplan, 1990).

Outra proposta sugerida por diversos autores é a análise de correlações de *Pearson* entre a contagem de bactérias indicadoras de contaminação fecal e concentrações de coprostanol (Isobe *et al.*, 2004).

Estudos realizados em regiões temperadas e frias, mostraram que para amostras de águas naturais, há boa correlação entre as contagens de bactérias indicadoras de contaminação fecal e as concentrações de coprostanol (Leeming *et al.*, 1996; Leeming e Nichols, 1996; Isobe *et al.*, 2002; Noblet *et al.*, 2004).

Entretanto, desvios significativos entre o dois marcadores têm sido observados em regiões tropicais devido a condições ambientais específicas (Isobe *et al.*, 2004), tendendo a diminuir com a distância da fonte de descarga de efluente (Takada e Eganhouse, 1998).

Além dos esteróides de origem animal, fitoesteróides tais como β -sitosterol e estigmasterol (5,22-colestadien-24-etil-3 β -ol) também são encontrados nos corpos hídricos sendo importantes marcadores de poluição fecal proveniente de efluentes pecuários (Saim *et al.*, 2009). Nos vegetais, a função dos fitoesteróides ainda não é bem conhecida, entretanto, sabe-se que está relacionada ao controle da permeabilidade e fluidez das membranas celulares (Bandeira *et al.*, 2008).

Estudos mostraram que o β - sitosterol possui atividade estrogênica e reduz a reprodução em peixes e ratos. Em virtude da analogia estrutural entre o β -sitosterol e o estigmasterol, este último vem sendo discutido em estudos como um possível candidato a interferente endócrino (Wenzel *et al.*, 2003).

A aplicação dos esteróides como marcadores de contaminação por esgoto doméstico é particularmente aplicável a regiões próximas a centros populacionais e a atividade industrial e agropecuária, onde é possível identificar fontes de descarga de efluentes, na maioria das vezes tratados apenas primariamente.

Como não existe no Brasil legislação ambiental que inclua valores de esteróis a serem lançados no ambiente, diversos autores sugerem a comparação entre as concentrações encontradas nas matrizes com valores observados principalmente em regiões ambientalmente similares à área de estudo (Carreira *et al.*, 2001).

Para tal, são apresentados na TAB. 1, valores mínimos e máximos bem como as médias das concentrações dos esteróis selecionados para o presente estudo em amostras de água bruta e tratada em diferentes regiões do mundo. Vale lembrar que a ocorrência dos mesmos é frequentemente relatada em amostras de sedimentos e efluentes, porém o presente trabalho tem como foco apresentar apenas dados observados em amostras de água.

TABELA 1. Concentrações ($\mu\text{g L}^{-1}$) de coprostanol, colesterol, colestanol e estigmasterol em amostras de águas bruta (AB) e tratada (AT) em diferentes regiões do mundo.

Local	Tipo de amostra	Coprostanol	Colesterol	Colestanol	Estigmasterol	Referências
Canadá	AB	< 0,001	---	---	---	Pocklington <i>et al.</i> , 1987
Austrália	AB	0,007 – 0,954	---	---	---	Leeming e Nichols, 1996
Vietnã	AB	0,001 – 97,1	---	---	---	Isobe <i>et al.</i> , 2004
Califórnia (USA)	AB	0,005	---	---	---	Noblet <i>et al.</i> , 2004
Países da Europa	AT	---	0,03	---	0,05	Wenzel <i>et al.</i> , 2003
Itália	AB	8,7	---	---	---	Gilli <i>et al.</i> , 2006
Campinas (Brasil)	AB	5,0 – 41,0	9,0 – 301	< 3,0 – 40,2	< 4,5 – 85,5	Ghiselly, 2006
Campinas (Brasil)	AT	< LD	2,40	< LD	< LD	Ghiselly, 2006
Singapura	AB	0,015 – 2,777	0,037 – 0,189	0,049	---	Wu <i>et al.</i> , 2009
Flórida	AB	0,001 – 0,067	< 1,500 – 0,603	---	---	Singh <i>et al.</i> , 2010
Austrália	AB	0,034 – 3,620	1,060 – 5,950	0,213 – 0,467	0,275 – 0,457	Ahmed <i>et al.</i> , 2011
Malásia	AB	0,050 – 1,602	0,050 – 5,393	---	0,050 – 2,619	Osman <i>et al.</i> , 2012

Legenda: LD: Limite de detecção do método desenvolvido pelo autor.

3.4. Área de estudo

3.4.1. Características e contextualização da bacia hidrográfica do rio Paraíba do Sul

Racionalizar o consumo da água, mitigar sua degradação e a consequente contaminação por veiculação hídrica são desafios enfrentados pelo homem do século XXI (Galvão, 2000). O desafio de autoridades e de estudiosos tem sido buscar mecanismos de gestão de recursos hídricos que tornem possível equacionar os conflitos advindos de interesses divergentes quanto ao uso múltiplo da água, sua recuperação e conservação (Feichas, 2002).

No Brasil, a Lei Federal nº 9433/97 (Lei das Águas), institui a Política Nacional de Recursos Hídricos criando o Sistema Nacional de Gerenciamento de Recursos Hídricos que entre outras medidas, adotou bacia hidrográfica como unidade territorial de planejamento e gestão das águas além de criar a entidade Comitê de Bacia Hidrográfica.

No caso do rio Paraíba do Sul, verifica-se a existência do Comitê Paulista do Vale do Paraíba atuando sobre a sub-bacia do rio situada no estado de São Paulo e do Comitê para Integração da Bacia Hidrográfica do rio Paraíba do Sul (CEIVAP), cuja abrangência (FIG. 5) é o rio de domínio da União e seus afluentes interestaduais (Novaes, 2006; Braga *et al.*, 2008).

O CEIVAP foi criado pelo Decreto Federal nº 1.842/96 e atua como o parlamento onde ocorrem os debates e decisões descentralizadas sobre as questões relacionadas aos usos múltiplos das águas da bacia hidrográfica do rio Paraíba do Sul, inclusive a decisão pela cobrança pelo uso da água na bacia. O Comitê é constituído por representantes dos poderes públicos, dos usuários e de organizações sociais com importante atuação para a conservação, preservação e recuperação da qualidade das águas da bacia (Bedaque *et al.*, 2009; CEIVAP – AGEVAP, 2009).

FIGURA 5. Bacia do rio Paraíba do Sul: Comitês de bacias. Fonte: Braga *et al.*, 2008.

Pela sua condição e atribuições legais de comitê de integração que atua em toda a extensão da Bacia, o CEIVAP tem relevante papel integrador no processo de discussão e busca de compromisso acerca do planejamento e gestão das águas da bacia do rio Paraíba do Sul (Serricchio *et al.*, 2005).

Com uma área de drenagem de 62.074 km², a bacia do rio Paraíba do Sul localiza-se na região sudeste entre os estados de São Paulo (13.900 km² no Vale do Paraíba Paulista), de Minas Gerais (20.700 km² na Zona da Mata Mineira) e do Rio de Janeiro (20.900 km² aproximadamente metade do estado), abrangendo 184 municípios - 88 em Minas Gerais, 57 no estado do Rio de Janeiro e 39 no estado de São Paulo, drenando uma das regiões mais desenvolvidas do País (CEIVAP – AGEVAP, 2009; CEIVAP – AGEVAP, 2011).

A área da bacia corresponde a 0,7% da área do país e, aproximadamente, a 6% da região sudeste do Brasil. No Rio de Janeiro, a bacia abrange 63% da área total do estado; em São Paulo, 5% e em Minas Gerais, apenas 4% (CEIVAP – AGEVAP, 2009).

A região é caracterizada por um clima predominantemente tropical quente e úmido, com variações determinadas pelas diferenças de altitude e entradas de ventos marinhos (Feichas, 2002; CEIVAP – AGEVAP, 2009).

O rio Paraíba do Sul forma-se na cidade de Paraibuna (SP) pela junção dos rios Paraitinga e Paraibuna, percorrendo uma distância de 1.150 km até desaguar no oceano Atlântico, no norte fluminense. Os principais afluentes à direita são os rios Piraí, Piabanha e Dois Rios e, à margem esquerda, tem-se os rios Paraibuna, Pomba e Muriaé (Tedeschi, 2003).

Segundo estimativa do IBGE (2005) a população urbana total da bacia é de 5.258.068 habitantes, sendo que desse total, 2.264.070 vivem no estado do Rio de Janeiro, 1.245.300 em Minas Gerais e 1.748.698 em São Paulo, e essa última de imensa concentração populacional nas áreas urbanas (Gil *et al.*, 2008).

A região da bacia Hidrográfica do Paraíba do Sul tem significativa importância econômica e social, concentrando cerca de 10% do PIB nacional, com aproximadamente 8.500 indústrias, sendo 2.500 em São Paulo, aproximadamente 4 mil no Rio de Janeiro e 2 mil em Minas Gerais, conforme relatório do BNDES (2004) sobre o programa de financiamentos para saneamento e proteção ambiental à Bacia do Paraíba do Sul (Bedaque *et al.*, 2009).

O grande potencial hídrico da bacia é prioritariamente utilizado para abastecimento público e outros usos como geração de energia elétrica, industrial, pecuária e irrigação (Braga *et al.*, 2008). A captação de água para abastecimento corresponde a 64 mil L s⁻¹ (17 mil para abastecimento domiciliar da população residente na bacia, mais 47 mil para o abastecimento da Região Metropolitana do Rio de Janeiro). Para uso industrial a captação é estimada em 14 mil L s⁻¹, e para uso agrícola 30 mil L s⁻¹ (CEIVAP – AGEVAP, 2011).

Na atividade agrícola que resiste, verifica-se, de modo generalizado, a falta de técnicas racionais de irrigação e de conservação de solo e o uso inadequado e abusivo de fertilizantes e agrotóxicos (Serricchio *et al.*, 2005).

Segundo Braga e colaboradores (2008), pesca, lazer e turismo têm pouca expressão, embora exista grande potencial para o seu desenvolvimento, ao contrário do transporte fluvial, que nunca foi importante devido a ausência de boas condições de navegabilidade na bacia.

A bacia hidrográfica do rio Paraíba do Sul abrange áreas com grandes problemas de degradação principalmente nas regiões de maior população e crescimento industrial. Segundo Novaes (2006) a concentração de esgoto doméstico e a disposição irregular de efluentes industriais são um dos principais fatores para a degradação dos recursos hídricos da bacia.

Sabe-se que aproximadamente um bilhão de litros de esgotos domésticos, praticamente sem tratamento, são despejados diariamente na bacia do Paraíba e que 90% dos municípios da mesma não contam com estação de tratamento de esgotos (CEIVAP – AGEVAP, 2009).

Apesar da elevada importância do rio Paraíba do Sul, a preservação e a despoluição de sua bacia não têm recebido, a prioridade devida por parte do poder público estadual. O rio Paraíba do Sul se encontra no momento assoreado, poluído e, embora o assunto seja debatido há anos, pouco ou quase nada foi efetivamente feito para tentar garantir em longo prazo a sua sobrevivência (Junior, 2004).

3.4.2. Municípios de interesse

Este estudo selecionou quatro municípios para diagnóstico de suas águas superficiais e de abastecimento público: Guararema, Pindamonhangaba, Taubaté e São José dos Campos.

Os municípios de interesse (FIG. 6) estão localizados na porção paulista da bacia hidrográfica do rio Paraíba do Sul, também conhecida como

região do Vale do Paraíba Paulista. Estudos recentes realizados nos municípios em questão evidenciaram a presença de estrógenos e xenoestrógenos motivando a investigação dos marcadores químicos (Otomo, 2010; Souza, 2011).

FIGURA 6. Porção paulista da Bacia Hidrográfica do rio Paraíba do Sul. Fonte: Adaptado de Novaes (2006).

3.4.2.1. Guararema

Guararema está a leste da grande São Paulo a uma distância de 88 km com área total de 270,50 km². Sua população conta com 25.861 habitantes sendo que 22.251 encontram-se na área urbana. Seu clima predominante é o temperado com temperatura média anual de 23°C (CETESB, 2010; IBGE, 2010; SABESP, 2012).

A SABESP iniciou seu trabalho em Guararema em 01/02/1976 e segundo dados de saneamento básico, 70% do esgoto produzido pelo município é coletado e apenas 35% é tratado sendo o rio Paraíba do Sul o corpo receptor do efluente tratado e não tratado (CETESB, 2010; SABESP, 2012).

3.4.2.2. Pindamonhangaba

Pindamonhangaba situa-se no centro geográfico do Vale do Paraíba, cercada por ramificações da Serra do Mar (Serra do Quebra Cangalha) e da Mantiqueira. Localizada a 140 km da capital do estado, conta com área total de 719 km² sendo 24% de área urbana e 76 % de área rural. Seu clima predominante é o subtropical-quente (SABESP, 2012).

O município apresenta uma população total de 147.034 habitantes sendo que 141.737 encontram-se na área urbana. A principal atividade econômica do município é a industrial, contando com cerca de 250 indústrias.

A SABESP iniciou seu trabalho em Pindamonhangaba em 01/04/1975 e atualmente 93% do esgoto produzido no município é coletado e 100% do mesmo é tratado cujo destino final são as águas dos rios Paraíba, Una e Ribeirão Uruputuba (CETESB, 2010; IBGE, 2010; SABESP, 2012).

3.4.2.3. Taubaté

A cidade de Taubaté está localizada a 130 km de São Paulo com área total de 625 km². Seu clima predominante é o tropical, com inverno seco, e temperatura média anual de 24 °C. Segundo dados do IBGE (2010), o município apresenta uma população total de 278.724 habitantes sendo que 272.712 encontram-se na área urbana. A atividade industrial representa 73% da economia local e a pecuária apresenta destaque para o gado leiteiro. (FCR, 2009; CETESB, 2010; IBGE, 2010; Taubaté, 2012).

Em 2010 foi inaugurado o Sistema de Esgotamento Sanitário Taubaté/Tremembé com notável contribuição para a melhoria da qualidade da água do rio Paraíba do Sul no trecho paulista da bacia. De acordo com a SABESP, o sistema representou a elevação do índice de tratamento de 2% para 100%, tratando em média 1,8 milhões de litros de esgoto por hora. Esse investimento reduziu o volume de esgoto que anteriormente era lançado *in natura* no rio Paraíba do Sul (CBH-PS, 2010).

3.4.2.4. São José dos Campos

Com área total de 1.099,6 km² e distância de 97 km de São Paulo, São José dos Campos é o município mais populoso do Vale do Paraíba contando com 627.544 habitantes sendo 615.610 relativos a população urbana. Seu clima predominante é o mesotérmico com temperatura média anual de 20°C (IBGE, 2010; São José dos Campos, 2012).

No âmbito nacional, a cidade é reconhecida como pólo científico e tecnológico, marcada pelo forte processo de industrialização e por diversos investimentos realizados pelo Governo Federal, voltados para o desenvolvimento de pesquisa e de tecnologias para o setor aeroespacial (Serra e Souza, 2011).

Segundo dados de saneamento básico, 88% do esgoto gerado pelo município é coletado, porém apenas 46% recebem tratamento adequado. Os rios Paraíba, Cambuí, Peixe, Alambari e Pararangaba são os corpos receptores dos efluentes tratados e não tratados (CETESB, 2010).

3.5. Técnicas analíticas

3.5.1. Extração em fase sólida (SPE, *solid phase extraction*)

Métodos voltados à determinação de esteróis em amostras ambientais estão, em sua maioria, condicionados a uma etapa de extração e pré-concentração. Essas etapas tornam os analitos passíveis de quantificação de acordo com o método analítico escolhido.

Extração líquido-líquido (ELL) é uma técnica tradicional para extrair esteróis a partir de amostras aquosas (Leeming *et al.*, 1996; Leeming e Nichols, 1996). No entanto, ela apresenta inúmeras desvantagens, tais como elevada manipulação dos analitos, longos processos, grande volume de solventes orgânicos e a formação de emulsões, que dificultam a separação entre as fases aquosas e orgânicas (Wu *et al.*, 2009).

Visando eliminar esses problemas, inúmeras estratégias foram adotadas, sendo a extração em fase sólida (SPE, *solid phase extraction*)

usualmente praticada por diversos autores para extração dos esteróis em amostras aquosas (Niven *et al.*, 2001; Jeanot *et al.*, 2002; Kolpin *et al.*, 2002; Ghiselli, 2006; Wu *et al.*, 2009; Sodré *et al.*, 2010a; Sodré *et al.*, 2010b; András *et al.*, 2011; Osman *et al.*, 2012). A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA, *United States Environmental Protection Agency*) recomendou o uso da técnica SPE como alternativa à ELL (USEPA, 2007).

A SPE é uma técnica de separação líquido-sólido baseada nos mecanismos de separação da cromatografia líquida de baixa pressão, também conhecida como cromatografia líquida clássica. Do ponto de vista prático, a SPE comporta-se como uma cromatografia líquida empregando-se uma pequena coluna aberta, usualmente denominada de cartucho de extração, a qual contém a fase sólida (denominada fase estacionária em cromatografia) (Lanças, 2004).

A amostra contida em frasco âmbar é continuamente gotejada para o cartucho com auxílio de bomba peristáltica ou pressionada com uma seringa (Sodré *et al.*, 2010b). Após a percolação da amostra, o analito de interesse é retido no cartucho e eluído com um pequeno volume de solvente, de forma que os analitos presentes na solução coletada já se encontre em concentração apropriada para a análise (Lanças, 2004; Brito, 2009).

Wu e colaboradores (2009) investigaram diversos tipos de cartuchos para extração de determinados esteróis em amostras aquosas. Após avaliação, o cartucho com material sorvente octadecil (C₁₈) apresentou melhor recuperação dos analitos frente aos demais cartuchos estudados. O mesmo desempenho foi observado por outros autores (Castilho *et al.*, 1999; Jeannot *et al.*, 2002).

Na FIG. 7 são apresentadas as principais etapas empregadas em SPE visando à concentração dos analitos.

FIGURA 7. Principais etapas empregadas em SPE visando à concentração dos analitos.

Segundo Lanças (2004), as etapas são descritas a seguir:

1. Etapa de condicionamento: Nesta etapa o material sorvente existente dentro do cartucho é ativado com solvente apropriado. Para obter boa reprodutibilidade na extração, deve-se evitar que o material contido no cartucho seque evitando-se assim a formação de caminhos preferenciais que comprometam a separação. Caso isso ocorra durante o condicionamento, o procedimento deve ser repetido.

2. Percolação da amostra: Esta etapa ocorre sob vácuo e deve ser realizada de forma quantitativa a fim de permitir resultados reprodutíveis. Se possível esta etapa deve ser realizada somente com o auxílio da gravidade, o que, usualmente melhora a separação.

3. Lavagem: A etapa de lavagem, também conhecida como *clean-up*, visa à eliminação dos interferentes por meio de um solvente que não possua força de eluição suficiente para remover os analitos aprisionados no cartucho.

4. Eluição: Nesta etapa, após definição do eluente apropriado, os analitos são extraídos do cartucho. O solvente de eluição deverá ter maior força de eluição que o solvente utilizado na etapa de lavagem.

Apesar de a SPE ser uma técnica vantajosa quando comparada aos métodos clássicos, ainda apresenta algumas limitações. Uma delas refere-se à etapa de eluição do analito aprisionado no cartucho que requer geralmente, o uso de solventes tóxicos (Lanças, 2004).

Uma opção alternativa é a aplicação da microextração em fase sólida (SPME, *solid phase microextraction*) que preserva todas as vantagens da SPE, porém não requer o uso de solventes (Barrionuevo e Lanças, 2001). Poucos autores utilizaram a SPME na extração dos esteróis de estudo. Martinez e colaboradores (2010) aplicaram a técnica em amostras ambientais e concluíram que a mesma foi eficiente na etapa de preparação de amostra.

3.5.2. Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

Ao longo das últimas duas décadas, técnicas analíticas como a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC/MS, *Liquid Chromatography with Mass Spectrometry*) e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC/MS, *Gas Chromatography with Mass Spectrometry*) têm sido empregadas na detecção de esteróis (Shimada *et al.*, 2001; Pereira *et al.*, 2002).

Entretanto, a GC/MS tem sido a técnica analítica mais utilizada dentro do cotidiano de laboratórios de quantificação de esteróis em diversas matrizes ambientais (Leeming *et al.*, 1996; Nichols *et al.*, 1996; Niven *et al.*, 2001; Isobe *et al.*, 2002; Chou e Liu, 2004; Gilli *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2009; Hussain *et al.*, 2010; Costa *et al.*, 2011).

As primeiras idéias para o desenvolvimento da base teórica da cromatografia gasosa foram estabelecidas por Martin e Synge em 1941 e em 1952, Martin e James publicaram o primeiro trabalho a respeito da técnica. A técnica recebe este nome porque a fase móvel utilizada para o analito percolar através da coluna consiste de um gás (gás de arraste) (Santos, 2009).

Gases ou substâncias volatilizáveis podem ser separados utilizando-se a técnica de cromatografia gasosa. A separação cromatográfica ocorre devido a

uma sequência de estágios de partição ou adsorção dos constituintes da amostra entre as duas fases (Collins *et al.*, 2006; Harris, 2008).

A fase estacionária encontra-se acondicionada dentro da coluna, através da qual o gás de arraste flui continuamente. As moléculas da amostra injetada irão distribuir-se ao sofrerem partição entre o gás de arraste e a fase estacionária e os analitos separados fluem pelo detector, cuja resposta é observada em um computador. A coluna deve estar suficientemente aquecida para proporcionar uma pressão de vapor que possibilite a eluição dos analitos em tempo razoável. O detector é mantido em uma temperatura igual ou maior do que a coluna, de modo que todos os analitos permaneçam na forma gasosa (Harris, 2008).

As colunas podem ser classificadas em empacotadas e capilares. As colunas empacotadas são construídas preferencialmente com níquel, aço inox ou vidro. Os comprimentos das colunas variam entre 0,5 a 5 m e os diâmetros variam entre 3 a 6 mm. Na cromatografia por partição, a fase estacionária apresenta-se como filme, com espessura de aproximadamente 10 µm, sobre um suporte sólido inerte finamente dividido dentro da coluna (Santos, 2009).

As colunas capilares são estreitas e compridas, feitas de sílica fundida (SiO₂) e recobertas com poliimida, um plástico capaz de resistir até 350°C, para suportar e proteger a coluna da umidade atmosférica. Quando comparadas às empacotadas, as colunas capilares oferecem maior resolução, menores tempos de análises e maior sensibilidade (Harris, 2008). O diâmetro interno varia entre 0,1 a 0,75 mm e o comprimento empregado geralmente é fixado entre 10 a 100 m, sendo a mais comum com 30 m (Ciola, 1985; Collins *et al.*, 2006; Harris, 2008).

Hélio é o gás de arraste mais utilizado em cromatografia, sendo compatível com a maioria dos detectores (Harris, 2008). Ele conduz a amostra que pode ser injetada manualmente ou de forma automática com ou sem divisão de fluxo do gás (McMaster, 1998).

Na injeção com divisão de fluxo (*split*), uma válvula responsável pela divisão do fluxo do gás de arraste entre a coluna e ambiente externo, permanece aberta durante todo o processo de injeção e até mesmo durante toda a análise, de tal forma que apenas uma fração da amostra injetada é introduzida na coluna (Collins *et al.*, 2006).

A injeção sem divisão (*splitless*) é necessária para a análise de traços em que uma maior quantidade de amostra precisa ser introduzida a coluna. A válvula permanece fechada durante a injeção e após um determinado tempo, a mesma é aberta para purgar traços remanescentes da amostra volatilizada, principalmente o solvente (Collins *et al.*, 2006).

A programação da temperatura da coluna é elevada durante a separação para aumentar a pressão vapor do soluto e diminuir os tempos de retenção dos últimos componentes a serem eluídos. Elevações bruscas de temperatura devem ser evitadas se as mesmas provocarem a degradação dos analitos e da fase estacionária (Harris, 2008).

Como a cromatografia gasosa não é uma técnica qualitativa eficiente é necessária a aplicação de detectores como técnicas de identificação. A melhor escolha de detector para a cromatografia gasosa é a espectrometria de massas que produz espectros extremamente sensíveis propiciando informações tanto de natureza qualitativa como quantitativa, o que permite a identificação segura do analito (Harris, 2008).

Para obter um espectro de massas, as moléculas no estado gasoso são ionizadas. No método do impacto eletrônico, um fluxo de elétrons com energia de ionização específica é produzido por um filamento de tungstênio ou rênio aquecido. Esses elétrons com energia de, geralmente, 70 eV colidem com as moléculas da amostra, provocando a ionização, bem como a fragmentação das mesmas (Collins *et al.*, 2006).

Quando formados, os íons deixam a câmara de ionização e são separados de acordo com a razão massa/carga pelo analisador de massas. O

analisador quadrupolar é o mais comum, podendo ser do tipo linear (quadrupolo) ou de armadilha de íons (Souza, 2010). Depois de separados, os íons são detectados e um sistema sofisticado processa os dados obtidos, fornecendo informações qualitativas e quantitativas.

As informações qualitativas são obtidas pelo modo de aquisição do tipo varredura dos íons em uma faixa pré-definida (SCAN), em que uma série contínua de espectros é adquirida durante a corrida cromatográfica (McMaster, 1998). Quando os compostos presentes na amostra já foram identificados e se deseja proceder à quantificação, a análise é feita no modo de monitoramento de íons selecionados (SIM, *Selected Ion Monitoring*), em que apenas fragmentos específicos serão selecionados pelo analisador e detectados durante a análise. Análises realizadas com este modo de aquisição são mais seletivas (Collins *et al.*, 2006).

3.5.3. Derivatização

O emprego da técnica de GC/MS na análise de esteróis preconiza a adoção de uma etapa de derivatização na preparação da amostra, uma vez que a presença do grupo hidroxila na posição 3 do núcleo esteróide das moléculas confere uma baixa volatilidade aos compostos, grande requisito para que se torne possível a análise dos compostos pela técnica cromatográfica (Ciola, 1985; Collins *et al.*, 2006; Schummer *et al.*, 2009).

A derivatização consiste em transformar a substância de interesse em um derivado com características adequadas para ser analisado por cromatografia gasosa em que grupos específicos são introduzidos em posições onde há a presença de grupos fortemente polares, no sentido de aumentar a detectabilidade da substância (Schummer *et al.*, 2009).

A sililação é a reação de derivatização mais utilizada para a análise de esteróis em GC/MS, sendo o reagente sinalizante N,O-bis(trimetil-silil) trifluoroacetamida/trimetilclorosilano (BSTFA/TMCS–99:1) o mais comum (Leeming *et al.*, 1996; Carreira *et al.*, 2001; Kawakami *et al.*, 2002; Niven *et al.*,

2002; Schoming *et al.*, 2002; Gilli *et al.*, 2006; Martins *et al.*, 2008; Schummer *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2009).

Nesta reação, o hidrogênio ativo presente no grupo polar hidroxila dos esteróides é substituído por um grupo trimetil-silil ($-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$) do reagente silanizante, gerando assim derivados mais voláteis, menos polares que apresentarão por sua vez uma menor interação com a sílica da coluna cromatográfica devido a eliminação da ligação de hidrogênio (Hernandes, 2009). Ao contrário de muitos grupos protetores, os éteres de trimetil-silil são estáveis em solução por dias e até mesmo semanas (Sjöström e Alén, 1998).

O mecanismo (FIG. 8) da reação de derivatização ocorre por meio de uma substituição nucleofílica bimolecular. A hidroxila presente na amostra age como nucleófilo ávido por um centro positivamente carregado. O ataque nucleofílico ocorre sobre o átomo de silício, doador do grupo trimetil-silil, produzindo um estado de transição bimolecular. O grupo trimetil-silil ao deixar a porção X do reagente derivatizante deve possuir a capacidade de estabilizar a carga negativa para que o derivado silanizado seja formado (Knapp, 1979; Supelco, 2003).

FIGURA 8. Mecanismo para a reação de derivatização. Fonte: Adaptado de Supelco (2003).

A reação de derivatização do colesterol (FIG. 9) exemplifica a formação dos derivados trimetil-silícicos para os esteróides:

FIGURA 9. Exemplo da reação de derivatização para esteróides. Fonte: Adaptado de Martins (2001).

O BSTFA/TMCS (99:1) reage mais rapidamente, é termodinamicamente mais estável e é menos susceptível à hidrólise que outros reagentes silanizantes, além de causar menos interferências cromatográficas por ser mais volátil (Cordeiro, 2006).

3.6. Validação de metodologia analítica

A validação de um método analítico é um passo fundamental para a elaboração de métodos de referência e na avaliação da competência de um laboratório em produzir dados analíticos seguros, sendo parte essencial dos processos de controle e garantia da qualidade (Nunes e Campos, 2009).

É fundamental que os laboratórios disponham de meios e critérios objetivos para demonstrar, por meio da validação, que as metodologias de ensaio que executam conduzem a resultados confiáveis e adequados à qualidade pretendida (Ribani *et al.*, 2004; Leite, 2008).

Com o objetivo de confirmar que é apropriado pra o uso pretendido, um método analítico deve ser validado após o seu desenvolvimento ou sempre que houver alterações na sua aplicação tais como, por exemplo, a utilização do método para analisar novas matrizes (EURACHEM, 2010; INMETRO, 2010a).

As normas internacionais, nacionais e sistemas de qualidade destacam a importância da validação de métodos analíticos para a obtenção de resultados confiáveis passíveis de aceitação internacional.

Segundo a norma internacional ISO/IEC 17025 (2005) e sua versão nacional (INMETRO, 2010a), métodos não normalizados, métodos criados ou desenvolvidos pelos laboratórios e métodos normalizados modificados ou que foram utilizados fora dos escopos para os quais foram concebidos devem ser validados.

Segundo o guia AOAC Internacional e a IUPAC, quando o laboratório utiliza um método totalmente validado, ou seja, um método que tenha sido validado em procedimentos interlaboratoriais, o laboratório deve verificar que é capaz de alcançar as características de desempenho publicadas no método, com estudos de linearidade, exatidão (com variação de matriz) e precisão (Bernardes e Souza, 2011).

Quando analisado o documento orientador do INMETRO (2010a), as mesmas exigências internacionais quanto à necessidade de validação são observadas.

Contudo, na resolução Nº 899 da ANVISA, é considerado que no caso de metodologia analítica descrita em farmacopéias ou formulários oficiais, devidamente reconhecidos pela ANVISA, a metodologia é considerada validada. Tal apontamento pode dar margem a interpretação equivocada de que nenhum estudo de implantação é necessário nestes casos (Bernardes e Souza, 2011).

O processo de validação demanda uma decisão sobre quais parâmetros de desempenho precisam ser avaliados. Para a validação da metodologia analítica para identificação dos esteróis, foram considerados fatores de seletividade, exatidão, precisão, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, especificidade, robustez, recuperação e incerteza associada ao processo, todos recomendados pelo INMETRO (2011).

Para tal, como ferramenta estatística para a avaliação dos parâmetros de desempenho da metodologia proposta, utilizou-se a planilha “Validação de Ensaio Químico”, desenvolvida por Furusawa (2007), a qual é baseada no documento DOQ-CGCRE-8 do INMETRO de 2003 e sua revisão de 2007.

3.6.1. Seletividade/Especificidade

Segundo o guia de orientação do INMETRO (2003; 2007; 2010a; 2011), a especificidade e a seletividade estão relacionadas ao evento da detecção. Especificidade é capacidade que um método possui de produzir resposta para apenas um analito, enquanto que seletividade é capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (Lanças, 2004; Leite, 2008; Bernardes e Souza, 2011).

Considerando que os métodos cromatográficos geralmente são utilizados para várias substâncias, o termo seletividade é o mais apropriado (Paschoal *et al.*, 2008). Este parâmetro de desempenho é tido como preliminar no desenvolvimento e validação de metodologias analíticas e quando não é assegurado, pode comprometer todos os demais parâmetros como, por exemplo, linearidade, exatidão e precisão (Ribani *et al.*, 2004).

Dentre as formas de avaliação do parâmetro seletividade, o método de adição padrão é utilizado quando não é possível obter a matriz isenta da substância de interesse. Neste método é feita uma curva analítica com adição da substância de interesse na amostra e comparada com uma curva analítica sem a presença da matriz. Se as inclinações destas duas curvas forem semelhantes, pode-se dizer que não há interferência da matriz na determinação da substância de interesse, ou seja, o único efeito de matriz é a interferência natural causada pelo nível baixo do analito (Ribani *et al.*, 2004; INMETRO, 2010a).

3.6.2. Linearidade e faixa de trabalho

Linearidade é a habilidade de um método analítico de produzir resultados que, por uma transformação matemática bem definida, sejam diretamente proporcionais à concentração do analito dentro de uma dada faixa de aplicação (Barros, 2002).

A linearidade é avaliada pela construção da curva resposta ou curva analítica em que a partir da introdução de uma massa ou concentração do analito, o sistema analítico emite uma resposta relacionada.

Geralmente, uma curva resposta pode ser construída de duas formas: por diluição da solução mãe ou ponto a ponto (Leite, 2008). O INMETRO (2010a) recomenda no mínimo cinco níveis de concentração com um número de replicatas próximo daquele empregado na rotina do laboratório.

A quantificação requer que se conheça a dependência entre a resposta medida e a concentração do analito. A regressão linear (método dos mínimos quadrados) é uma forma de relacionar essas duas variáveis e pode ser expressa pela seguinte equação:

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

Onde:

y = sinal resposta medido, variável dependente;

x = concentração do analito, variável independente;

a = coeficiente angular - inclinação da curva analítica em relação aos eixos;

b = coeficiente linear - intersecção da curva aos eixos.

Para verificar a linearidade em uma dada curva analítica, faz-se o uso do coeficiente de correlação (r) ou de determinação (r^2), que expressa a relação de x e y na curva, onde os valores ideais esperados são 1 e -1, ou seja, quanto mais próximos da unidade, maior a probabilidade da reta ser adequada como modelo matemático. Valores de coeficiente de correlação superiores a 0,90 e de determinação superiores a 0,81 são usualmente requeridos (Leite, 2008; INMETRO, 2010a).

Em virtude da dificuldade em detectar visualmente possíveis desvios de linearidade, a ferramenta análise de resíduos é utilizada para verificar a adequação entre os valores medidos e os valores calculados, indicando se os valores são pertencentes ou não à curva.

Como sugestão do INMETRO (2010a), uma alternativa para avaliar a linearidade seria a realização da análise de variância (ANOVA) na regressão linear verificando o quanto os valores observados que foram utilizados para o ajuste podem ser explicados pela reta de regressão. Esta ferramenta estatística faz uma análise pelos testes F de regressão e F de ajuste.

A faixa de trabalho é geralmente limitada no extremo inferior pelos valores dos limites de detecção ou de quantificação, enquanto no limite superior as restrições são impostas por efeitos dependentes do sistema de detecção do equipamento. Dentro da faixa de trabalho deve existir uma faixa de resposta linear (INMETRO, 2010a; Bernardes e Souza, 2011).

Em geral, são necessários vários pontos de calibração, de preferência superiores a seis, para determinar a faixa de trabalho. Devido ao efeito das interferências provenientes da matriz, a faixa de trabalho e a faixa linear podem ser diferentes para cada tipo de amostra (INMETRO, 2003).

A faixa de trabalho deve abranger a faixa de aplicação para a qual o ensaio é usado e a concentração mais esperada da amostra, sempre que possível, deve estar no centro da faixa de trabalho (INMETRO, 2003).

3.6.3. Limite de detecção e quantificação

O limite de detecção (LD) é definido, de forma habitual, como a quantidade ou a concentração mínima do analito que pode ser detectada com confiabilidade por um método analítico (INMETRO, 2003; Pinho e Luna, 2009).

O INMETRO (2010a) sugere ensaios com sete ou mais replicatas de amostras brancas ou com a menor concentração aceitável do analito, sendo o limite de detecção igual à média do branco mais t desvios padrão do branco para o primeiro caso e com t desvios padrão do branco para o segundo caso, dependendo do tamanho da amostra e do grau de confiança (Bernardes e Souza, 2011). É fundamental que todas as etapas de processamento do método analítico sejam incluídas na determinação do LD (INMETRO, 2011).

O limite de quantificação (LQ) é a menor concentração do analito que pode ser determinada com um nível aceitável de precisão. O LQ é considerado como a concentração do analito correspondente ao valor da média do branco mais 5, 6 ou 10 desvios padrão. Após definição, o LQ deve ser testado experimentalmente para averiguar se a exatidão e a precisão conseguidas são satisfatórias (INMETRO, 2003; INMETRO, 2007; INMETRO, 2010a; Bernardes e Souza, 2011).

3.6.4. Precisão

A precisão avalia a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos para uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas. Segundo Horwitz (1980), a precisão decresce quando a concentração do analito decresce. Este parâmetro pode ser expresso por meio da repetitividade e reprodutibilidade.

A repetitividade é o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas sob as mesmas condições (INMETRO, 2010a). De forma geral, a repetitividade é observada quando ocorre no conjunto: mesma amostra, mesmo analista, mesmo equipamento, mesmo local, mesmo ajuste e mesma calibração (Leite, 2008). O INMETRO (2010a) recomenda sete ou mais repetições para o cálculo do desvio padrão para cada concentração. Com isso, a verificação da repetitividade é realizada a partir do limite de repetitividade (r).

A reprodutibilidade é o grau de concordância entre os resultados das medições de um mesmo mensurando, efetuadas sob condições variadas de medição (mudança de operador, local, equipamentos, entre outros) (Ribani *et al.*, 2004). A partir do desvio padrão obtido sob condições de reprodutibilidade é possível calcular o limite de reprodutibilidade (R) para um nível de confiança de 95% (INMETRO, 2010a).

Outra forma de expressão da precisão é através da estimativa do desvio padrão relativo (RSD), também conhecido como coeficiente de variação (CV). O valor aceitável do CV depende do nível de concentração analisada e da

complexidade da matriz considerada. Para análise de traço ou impurezas, Horwitz e Albert (2006) recomendam um CV aceitável de até 20%.

3.6.5. Exatidão

A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro (INMETRO, 2003).

Segundo o INMETRO (2010a), os experimentos podem ser conduzidos com materiais de referência certificados (MRC) ou por ensaios de recuperação com amostras adicionadas de quantidades conhecidas do analito (Bernardes e Souza, 2011).

Detalhamentos sobre a parte experimental não são realizadas pelo documento, embora exista a recomendação do estudo de pelo menos três diferentes concentrações adicionadas nas amostras na faixa de uso do método.

No caso de MRC, estatísticas são indicadas para comparação entre os resultados obtidos com os valores certificados, como erro relativo, índice z (*z score*) e erro normalizado (Bernardes e Souza, 2011).

3.6.6. Recuperação

A recuperação é definida como a proporção da quantidade da substância de interesse, presente ou adicionada na porção analítica do material teste, que é extraída e passível de ser quantificada (Thompson *et al.*, 2002).

Pode ser estimada pela análise de amostras adicionadas com quantidade conhecidas do analito (*Spike* ou fortificação). Três níveis de concentração devem ser definidos para os ensaios de recuperação sendo os mesmos próximos do limite de detecção, próximo a concentração máxima permissível e em uma concentração próxima a média da faixa de uso do método (INMETRO, 2010a).

Porcentagens de recuperação do analito e do padrão interno próximas a 100% são desejáveis, porém, admitem-se valores menores, desde que a recuperação seja precisa e exata.

3.6.7. Robustez

Tão importante quanto o estudo dos demais parâmetros de desempenho, o teste de robustez estuda a influência que pequenas mudanças deliberadas dos parâmetros operacionais podem causar na resposta do método estudado (Nunes e Campos, 2009). Essas mudanças refletem as alterações que podem ocorrer durante a execução normal do método, sob diferentes condições ou quando é transferido para outro laboratório (Heyden *et al.*, 1998; Heyden *et al.*, 2001).

Este parâmetro deve ser investigado na etapa de desenvolvimento do método sendo um alerta da susceptibilidade do mesmo e não como um parâmetro de aprovação ou reprovação da condição analítica (Leite, 2008)

O INMETRO (2003) recomenda o teste de *Youden*, que permite não só avaliar a robustez do método, como também ordenar a influência de cada uma das variações no resultado final, indicando o tipo de influência de cada uma dessas variações.

Na validação da metodologia do presente estudo, foi utilizado o Planejamento Facionário Saturado, onde sete parâmetros foram selecionados e agrupados em uma combinação fatorial, resultando em oito experimentos distintos. A combinação a ser ensaiada pode ser observada na TAB. 2, conforme sugestão do INMETRO (2003). As letras maiúsculas indicam os valores nominais dos parâmetros, e as minúsculas, suas variações.

TABELA 2. Planejamento fatorial saturado para avaliação da estimativa do erro da distribuição dos efeitos utilizando o algoritmo de *Dong* (pequenos experimentos).

Valor do Fator	Combinação ensaiada							
A ou a	A	A	A	A	a	a	a	a
B ou b	B	B	b	b	B	B	b	b
C ou c	C	c	C	c	C	c	C	c
D ou d	D	D	d	d	d	d	D	D
E ou e	E	e	E	e	e	E	e	E
F ou f	F	f	f	F	F	f	f	F
G ou g	G	g	g	G	g	G	G	g
Resultado	s	t	u	v	w	x	y	z

3.6.8. Incerteza de medição

Como um resultado de medição nada mais é do que meramente uma estimativa do valor verdadeiro do mensurando, a incerteza torna-se necessária para expressar o grau de dúvida associado a essa medição (RM, 2009).

Este parâmetro está associado ao resultado da medição, que caracteriza a dispersão dos valores que podem ser fundamentadamente atribuídos a um mensurando (ABNT/INMETRO, 2003). Os mensurandos são as grandezas particulares submetidas à medição, ou seja, as grandezas de entrada (EURACHEM, 2002; INMETRO, 2010b). Segundo o documento INMETRO (2007), a incerteza de medição associada às estimativas de entrada é avaliada de acordo com os métodos de avaliação do Tipo A ou do Tipo B.

A avaliação do Tipo A da incerteza padrão é o método pela análise estatística de uma série de observações. Neste caso, a incerteza padrão é o desvio padrão experimental da média que se obtêm de um procedimento de cálculo da média aritmética ou de uma análise de regressão adequada.

A avaliação do Tipo B da incerteza padrão é o método por outros meios que não a análise estatística de uma série de observações. Neste caso, a avaliação da incerteza padrão é baseada em algum outro conhecimento científico,

por exemplo, certificados emitidos pelo fabricante, materiais de referência certificados, manuais técnicos, entre outros (INMETRO, 2010b; Leite, 2008).

Para se obter a incerteza total do mensurando (y), as fontes de incerteza devem ser trabalhadas individualmente, obtendo-se a contribuição de cada componente. A incerteza padronizada de uma fonte de erro é a faixa de dispersão em torno do valor central, ou seja, equivale a uma estimativa do desvio padrão. A análise do conjunto dessas incertezas levará a estimativa da incerteza combinada ($uc(y)$) (Leite, 2008).

A incerteza expandida (U) define um intervalo em torno do resultado de uma medição com a qual se espera abranger uma grande fração da distribuição dos valores que possam ser razoavelmente atribuídos ao mensurando. Esta é calculada multiplicando-se a incerteza combinada, $uc(y)$ por um fator de abrangência, k . O valor de k está relacionado ao nível de confiança que se deseja atribuir, para um nível de confiança de aproximadamente 95% por exemplo, k é igual a 2 (Souza, 2011).

Os passos do método de expressão da incerteza descrito pelo ABNT/INMETRO (2003) podem ser resumidos no fluxograma da FIG. 10:

FIGURA 10. Fluxograma dos passos para a expressão da incerteza de medição. Fonte: RM (2009).

Para estimar a incerteza é necessário que se conheça as causas e efeitos sobre a análise a ser realizada permitindo uma visualização sistêmica dos fatores atuantes no resultado analítico (Leite, 2008). Para tal, o Diagrama de Causa e Efeito (Ishikawa ou Espinha de peixe) para a metodologia desenvolvida para a análise dos esteróis é apresentado na FIG. 11 no qual as principais fontes de incerteza foram destacadas.

FIGURA 11. Diagrama de Causa e Efeito para a metodologia desenvolvida para análise de esteróis em água.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Reagentes e soluções analíticas

A água ultrapura de baixa condutância Tipo I (alta resistividade $18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$ e baixa condutividade $0,05 \text{ }\mu\text{S cm}^{-1}$) foi obtida através do equipamento *EasyPure*, da *Barnstead* e a água purificada por osmose reversa pelo equipamento *Elix 3*, da *Millipore*. Os solventes orgânicos de grau cromatográfico empregados neste estudo foram o metanol (MeOH), diclorometano (DCM), acetato de etila (AcOEt), n-hexano (HEX) e acetonitrila (ACN), os quais foram adquiridos da marca *J.T.Baker*.

O derivatizante (TAB. 3) empregado foi o BSTFA/TMCS – 99:1, N,O-bis (trimetil-silil)trifluoroacetamida/trimetilclorosilano com certificado de pureza da *Supelco Analytical*.

TABELA 3. Informações do reagente derivatizante empregado no estudo.

BSTFA:TMCS (99:1)	BSTFA	TMCS
Número CAS	25561 – 30 – 2	75 – 77 – 4
Ponto de ebulição (°C)	50	57
Fórmula Molecular	$\text{CF}_3\text{C}=\text{NSi}(\text{CH}_3)_3\text{OSi}(\text{CH}_3)_3$	$\text{ClSi}(\text{CH}_3)_3$
Peso Molecular (g mol^{-1})	257,40	108,66
Pureza (%)	≥ 99	≥ 99
Nomenclatura IUPAC	N,O-bis-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida	Trimetil-clorosilano

Para descontaminação das vidrarias utilizadas no processo foi preparada uma solução de ácido nítrico (HNO_3) p.a. e ácido sulfúrico (H_2SO_4) p.a. (1:1, v/v), de procedência *Merck*. Para acidificação das amostras, foi usada uma solução de ácido clorídrico p.a. 50% (1:1, v/v), também de procedência *Merck*. Para eliminação de cloro residual, utilizou-se o reagente tiosulfato de sódio anidro ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$), da *J.T.Baker*. Para secagem total dos extratos obtidos foi utilizado o gás nitrogênio (N_2) 5.0 da *White Martins*.

Foram preparadas soluções analíticas estoque de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cada um dos padrões analíticos (TAB. 4). A partir destas soluções, uma solução mista foi preparada contendo as seguintes concentrações: $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ de coprostanol, $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ de colesterol, $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ de colestanol e $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ de estigmasterol.

TABELA 4. Informações dos padrões analíticos utilizados no estudo.

Informações	Compostos			
	Coprostanol	Colesterol	Colestanol	Estigmasterol
Número CAS	360 – 68 – 9	57 – 88 – 5	80 – 97 – 7	83 – 48 – 7
Fórmula Molecular	$\text{C}_{27}\text{H}_{48}\text{O}$	$\text{C}_{27}\text{H}_{46}\text{O}$	$\text{C}_{27}\text{H}_{48}\text{O}$	$\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{O}$
Peso Molecular (g mol^{-1})	388,67	386,67	388,67	412,67
Solubilidade ($\mu\text{g L}^{-1}$)	$4 \cdot 10^{-4}$	95	-	$1,1 \cdot 10^{-4}$
Ponto de ebulição ($^{\circ}\text{C}$)	-	148,5	138	167
Pureza (%)	≥ 98	≥ 99	95	95
Nomenclatura IUPAC	5 β -colestano-3 β -ol	Colest-5en-3 β -ol	5 α -colestano-3 β -ol	24-etilcolesta 5,22-dien-3 β -ol

4.2. Equipamentos e materiais

Para o desenvolvimento deste trabalho foram utilizados os seguintes equipamentos e materiais:

- Sistema de filtração a vácuo da marca *Sartorius* com membranas filtrantes de $0,45 \mu\text{m}$ de porosidade;
- Compressor/aspirador (*Dia pump*), modelo 089 cal, marca *FANEN*;

- Sistema de extração SPE desenvolvido nos laboratórios do Centro de Química e Meio Ambiente (CQMA);
- Cartuchos de SPE C₁₈ (18%) de polipropileno do tipo *ENVITM – 18*, de 6 mL, preenchidos com 500 mg de octadecil polimericamente ligado, da marca *Supelco*;
- Cromatógrafo a gás, *Shimadzu-17A*, acoplado ao detector de espectrometria de massas, *Shimadzu-QP 5000*; um microprocessador de dados equipado com o programa GC/MS solution, *Shimadzu*;
- Coluna capilar DB-5 (26 m x 0,25 mm d.i. x 0,25 µm da fase dimetilpolisiloxano);
- Seringa de 10 µL para injeção manual, marca Hamilton;
- Balança analítica, modelo H16, marca *Mettler*, com cinco casas decimais;
- Centrífuga microprocessada de bancada, marca *Nova Técnica*;
- Estufa para realização da etapa de derivatização, modelo 515A, marca FANEN;
- Analisador de carbono orgânico total, modelo TOC-VCPH/CPN, marca *Shimadzu*;
- Vidraria básica de laboratório: béqueres, erlenmeyers, balões volumétricos, pipetas, provetas, *vials agilent* (2 mL), entre outros.

4.3. Descontaminação das vidrarias

A descontaminação das vidrarias utilizadas nos ensaios e preparo de padrões é primordial em análises de traços a fim de se evitar interferências diretas ou indiretas nos perfis dos compostos analisados.

Para reduzir tal ocorrência, após a lavagem com detergente, as vidrarias foram mantidas por 24 horas em solução nitrossulfônica (1:1, v/v) e cuidadosamente enxaguadas com água de osmose reversa (10 vezes) e água Tipo I (10 vezes).

4.4. Amostragem e preservação das amostras

Foram realizadas três amostragens, todas na primeira quinzena dos meses de junho, outubro e dezembro (FIG. 12) de 2011. Nas três amostragens, seguindo o Guia de Coleta da CETESB (1987), foram coletadas amostras de água bruta e tratada provenientes respectivamente de áreas de captação do rio Paraíba do Sul e das Estações de Tratamento de Água (ETAs) dos quatro municípios do Vale do Paraíba paulista – Guararema, Pindamonhangaba, São José dos Campos e Taubaté.

As coletas foram realizadas de forma simultânea em todas as ETAs, ou seja, tanto as amostras de água bruta quanto as de água tratada foram coletadas sem aguardar o tempo de retenção de 3 horas. Esse período refere-se ao processo de tratamento da água bruta como um todo, predominantemente a etapa de decantação.

As amostras foram acondicionadas sob refrigeração para o transporte ao laboratório. Anterior a etapa de filtração, foram adicionados 0,5 g de tiosulfato de sódio anidro nas amostras de água tratada para eliminar a presença de cloro residual provenientes da etapa de cloração das ETAs.

Em seguida, todas as amostras foram filtradas em membranas de 0,45 µm de porosidade para retirada de sólidos em suspensão e mantidas sob refrigeração até a etapa de pré-concentração para posterior análise dos esteróis avaliados. O período de armazenamento e análise das amostras baseou-se nas recomendações definidas pelo método específico da EPA (USEPA, 2007).

FIGURA 12. Participação na terceira coleta realizada em dezembro nos quatro municípios de estudo.

4.5. Etapas analíticas

A FIG.13 representa o fluxograma da metodologia analítica empregada na determinação dos esteróis de estudo. Para defini-la, testes metodológicos para cada etapa analítica foram realizados tendo como base métodos descritos na literatura.

FIGURA 13. Fluxograma da metodologia analítica utilizada.

4.5.1. Estudos metodológicos

4.5.1.1. Estudo 1: Extração em fase sólida (SPE)

Para análise das amostras em GC/MS é necessário realizar a pré-concentração das mesmas tornando possível a sua determinação. Para tal,

estudos voltados para a definição da metodologia de SPE foram realizados com as amostras de água tratada e água bruta provenientes da ETA de Guararema. O processo envolvendo a extração em fase sólida pode ser observado nas FIG. 14 e 15 a seguir:

FIGURA 14. Sistema de extração em fase sólida utilizado para extração e concentração dos analitos.

FIGURA 15. Eluição dos analitos após a etapa de centrifugação.

Cinco metodologias (TAB. 5) provenientes de estudos correlatos foram adaptadas para definição do método final. Os testes em questão foram acidificados a pH 3, para preservação dos analitos, e fortificados com 1 mL da

solução mista ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$) dos padrões utilizando o cartucho do tipo *ENVI*TM – 18 (*Wu et. al., 2009*). A etapa de percolação ocorreu sob fluxo constante de 6 mL min^{-1} .

Em todos os testes, após a etapa de lavagem (*Clean-up*), houve a etapa de secagem para remoção completa da amostra remanescente, em que o cartucho é seco primeiramente por 10 minutos sob vácuo e em seguida é transferido para o tubo de centrifuga, onde é centrifugado por 30 minutos, a uma rotação de 2.500 rpm (rotações por minuto). Após a etapa de eluição, realizada em fluxo inferior a 2 mL min^{-1} , todos os ensaios foram levados a secagem total sob fluxo suave de nitrogênio (N_2).

TABELA 5. Avaliação de metodologias de SPE para amostras de água bruta e tratada de Guararema.

Teste (Referência)	Condicionamento	Percolação	Lavagem (<i>Clean-up</i>)	Eluição
1 (Otomo, 2010)	5 ml de MeOH + 5 ml de MeOH /H ₂ O 1:9	1 L de amostra fortificada	-----	5 mL MeOH: DCM (4:6)
2 (Adap. de Otomo, 2010)	5 ml de MeOH + 5 ml de MeOH /H ₂ O 1:9	1L de amostra fortificada	5 mL MeOH:H ₂ O (1:9)	5 mL MeOH:DCM (4:6)
3 (Souza, 2011)	5mL de AcOEt + 5mL de MeOH /H ₂ O (1:1)	1 L de amostra fortificada	5 mL MeOH:H ₂ O (1:9)	2 x 3 mL AcOEt: MeOH (6:4)
4 (Adap. de Jeannot <i>et al.</i> , 2002)	5 ml de MeOH + 5 ml de MeOH /H ₂ O 1:9	1 L de amostra fortificada	5 mL MeOH:H ₂ O (1:9)	2 x 3 mL MeOH: DCM (4:6)
5 (Adap. de Wu <i>et</i> <i>al.</i> , 2008)	5mL de AcOEt + 5mL de MeOH /H ₂ O (1:1)	1 L de amostra fortificada	-----	1 X 4 mL DCM

O teste 2 apresentou maior sinal analítico para ambas as matrizes tornando-se a metodologia mais eficiente para a etapa de SPE. A avaliação da metodologia mais adequada foi realizada por meio da média das triplicatas referentes a cada teste observando-se a intensidade do sinal analítico de cada esteróide comparando-se com o cromatograma da solução mista utilizada no

processo de fortificação. No item 5.1.1. do capítulo 5 desta dissertação, os resultados que levaram a essa escolha serão explanados e discutidos.

O procedimento escolhido, referente ao teste 2 da TAB. 5 contemplou as seguintes etapas:

1. Condicionamento do cartucho: a ativação da fase estacionária C_{18} por solvatação é realizada inicialmente com 5 mL de metanol, seguido de 5 mL de metanol/ H_2O ultrapura (1:9, v/v). Nas duas etapas de condicionamento, a fase estacionária foi mantida em contato inicial por cerca de 2 minutos com cada solução, sempre evitando a secagem do material de empacotamento da fase sólida (C_{18}).

2. Percolação da amostra: o volume de 1L de amostra a temperatura ambiente, a fim de reduzir a solubilidade dos analitos na mesma, foi acidificado para pH 3 com solução de ácido clorídrico (50%) e percolada pelo cartucho a um fluxo de aproximadamente 6 mL min^{-1} , evitando a secagem da fase sólida (C_{18}).

3. Remoção dos interferentes (Lavagem ou *clean-up*): a remoção de interferentes foi realizada com 5 mL de metanol/ H_2O ultrapura (1:9, v/v), mantendo-se a mistura de solventes em contato inicial por 2 minutos com a fase estacionária.

4. Secagem do cartucho: para eliminação da amostra residual, o cartucho foi mantido por cerca de 10 minutos sob vácuo e em seguida, centrifugado por 30 minutos, a uma rotação de 2.500 rpm.

5. Eluição do analito: esta etapa foi realizada com 5 mL da mistura diclorometano/metanol (6:4, v/v), a um fluxo inferior a 2 mL min^{-1} mantendo-se a mesma em contato inicial com a fase estacionária por 2 minutos para aumentar a eficiência da extração. O extrato obtido foi recolhido em tubos de ensaios acoplados a balões sob vácuo (FIG. 15).

6. Evaporação: o extrato foi cuidadosamente transferido para *vial* de 2 mL e levado a secura total sob fluxo suave de N_2 . Esta etapa preconiza a reação de derivatização e deve ser feita com atenção para evitar a perda dos analitos.

4.5.1.2. Estudo 2: Reação de derivatização

Inicialmente, os quatro compostos de interesse foram analisados individualmente no GC/MS para avaliar o perfil cromatográfico e a sensibilidade do detector. Observou-se que o equipamento não apresentou sensibilidade considerável em relação aos compostos estudados devido ao alto ponto de ebulição, alta polaridade e o elevado peso molecular, fatores estes que limitam a análise por cromatografia gasosa. Em virtude destas limitações, a derivatização tornou-se uma etapa relevante e primordial para a análise dos esteróis.

Para definir e otimizar a metodologia de derivatização, diversos estudos foram realizados baseando-se nas informações da literatura utilizada para o desenvolvimento do trabalho. A sililação é a reação de derivatização mais utilizada para a análise de esteróis em GC/MS, sendo o reagente sinalizante N,O-bis (trimetil-silil) trifluoroacetamida/trimetilclorosilano (BSTFA/TMCS–99:1) o mais comum (Leeming *et al.*, 1996; Carreira *et al.*, 2001; Kawakami *et al.*, 2002; Niven *et al.*, 2002; Schoming *et al.*, 2002; Gilli *et al.*, 2006; USEPA, 2007; Martins *et al.*, 2008; Schummer *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2009).

Para todos os estudos foi utilizada uma solução mista dos quatro padrões na concentração de $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ preparada em metanol a partir das soluções estoque de cada composto. Com o auxílio da micropipeta, foi adicionado em um *vial* de 2 mL uma alíquota de 1 mL da solução mista que em seguida foi levada a secura total sob fluxo suave de nitrogênio para posterior derivatização.

Em seguida, adicionou-se o volume do derivatizante BSTFA:TMCS em local refrigerado, evitando-se ao máximo o contato do mesmo com a umidade bem como sua volatilização. A mistura foi mantida na estufa por tempo e temperatura controlados. Com a reação finalizada, o produto pós-silanização foi retomado a 1 mL com solvente apropriado para que a análise no GC/MS fosse realizada.

As variáveis avaliadas foram:

- Diferentes polaridades dos solventes para retomar ao volume ideal para a análise no GC/MS. Os solventes escolhidos foram 100% hexano, 100% diclorometano, 100% metanol e a mistura diclorometano e metanol na proporção 6:4;

- Os tempos de reação de 30 minutos, 60 minutos e 90 minutos;
- As temperaturas de reação de 70°C e 100°C;
- Uso de acetonitrila como solvente polar de reação;
- Os volumes de BSTFA:TMCS (99:1) de 50 µL e 100 µL.

O uso de catalisador não foi avaliado, pois o derivatizante possui em sua composição 1% TMCS, que aumenta consideravelmente a reatividade do BSTFA. Em cada experimento realizado (TAB. 6) apenas uma das condições de estudo foi variada mantendo-se fixas as demais.

TABELA 6. Variáveis avaliadas para o desenvolvimento de metodologia para reação de derivatização.

Experimento	Volume (µL)	Tempo de reação (min)	Temperatura de reação (°C)	Solvente de reação (Acetonitrila)	Solvente para diluição do produto
Variável avaliada: Solventes para diluição do produto sinalizado					
1	50	30	70	Não	MeOH
2	50	30	70	Não	DCM
3	50	30	70	Não	HEX
4	50	30	70	Não	DCM:MeOH (3:2)
Variável avaliada: Tempo de reação (min)					
1	50	30	70	Não	DCM
2	50	60	70	Não	DCM
3	50	90	70	Não	DCM
Variável avaliada: Temperatura de reação (°C)					
1	50	30	70	Não	DCM
2	50	30	100	Não	DCM
Variável avaliada: Solvente de reação – Uso de acetonitrila					
1	50	30	70	Não	DCM
2	50	30	70	Sim	DCM
Variável avaliada: Volume de BSTFA:TMCS (99:1) (µL)					
1	50	30	70	Não	DCM
2	100	30	70	Não	DCM

Com a observação da intensidade do sinal analítico de cada esteróide para cada teste, foi definida a metodologia adequada para a etapa de derivatização que será explanada no item 5.1.2. do capítulo 5 desta dissertação.

Após a concentração das amostras por SPE, os extratos obtidos foram transferidos para o *vial* de 2 mL, conforme citado anteriormente para início da reação de derivatização. Ao conteúdo do *vial* previamente levado a total secura foram adicionados 100 µL de BSTFA:TMCS (99:1, v/v), em seguida a mistura reagente é levada à estufa por 30 minutos na temperatura de 100°C e após o término da reação o produto pós-silanização foi retomado a 1 mL com diclorometano e analisado no GC/MS.

3.5.1.3. Estudo 3: Condições cromatográficas

Com as informações individuais dos esteróis de interesse derivatizados, o próximo passo foi observar o comportamento cromatográfico da solução mista de estoque em uma concentração elevada (10 µg mL⁻¹) a fim de se definir as melhores condições de análise bem como observar a ocorrência de interferências no cromatograma.

Neste estudo foram realizadas variações em parâmetros tais como: fluxo do gás de arraste, programação do forno, temperaturas do injetor e interface e voltagem do detector a fim de se obter as melhores condições cromatográficas para a análise.

Estabelecidas as melhores condições cromatográficas, a injeção manual de 1 µL foi feita sem divisão de fluxo (*splitless*), com injetor e interface GC/MS a 300°C. Na programação da temperatura do forno utilizou-se: início a 150°C com incrementos de 40°C min⁻¹ a 300°C permanecendo nesta temperatura por 10 minutos. Helio foi usado como gás de arraste, mantido em fluxo constante a 1,5 mL min⁻¹.

Considerando que os esteróis selecionados neste estudo apresentam uma diferença menor que 100°C em seus valores de ponto de ebulição, não foi

necessária a presença de quatro isotermas na programação da temperatura no GC/MS, conforme recomendado habitualmente (Collins *et al.*, 2006).

A programação do detector foi realizada nos dois modos de aquisição com fonte de ionização por impacto de elétrons (70 eV) e voltagem a 2,5 kV. No modo varredura de uma faixa determinada de íons (SCAN), foi definido o intervalo de varredura de 70 a 500 m/z.

No modo Monitoramento de Íons (SIM), cinco fragmentos de relação massa/carga (m/z) dos compostos derivatizados foram monitorados. Esses fragmentos foram selecionados com base na literatura e nos espectros de massas (FIG 1A – 4A do Apêndice) de cada analito. As relações m/z características dos analitos derivatizados, assim como o intervalo de monitoramento dos fragmentos e os tempos de retenção encontram-se na TAB. 7.

TABELA 7. Intervalo de monitoramento, tempos de retenção (TR) e relação massa/carga dos íons de cada analito derivatizado monitorado no modo SIM.

Compostos	Intervalo tempo (min)	TR. (min)	Relação massa/carga				
			Ch1	Ch2	Ch3	Ch4	Ch5
Coprostanol	6.90 – 8.45	8,092	207	215	257	355	370*
Colesterol	8.45 – 9.40	8,742	129*	145	329	368	458
Colestanol	8.45 – 9.40	8,842	75	215*	355	445	460
Estigmasterol	9.40 – 14.00	9,892	129*	255	355	394	484

* Relação m/z de maior intensidade.

Os espectros de massas dos derivados trimetil-silícicos dos esteróis de estudo mostram claramente os picos dos íons moleculares correspondentes à remoção de um elétron, fornecendo, assim, informação sobre a massa molecular.

As fragmentações dos esteróis de estudo são muito similares, por isso apenas será discutida a identificação dos íons selecionados para a análise do derivado trimetil-silícico do colesterol.

O íon com m/z 73 é característico do íon trimetil-silil $[(CH_3)_3Si]^+$, entretanto, os íons selecionados (TAB. 7) para a análise no modo de operação SIM foram os mais intensos observados no espectro de massa do composto

sendo eles: m/z 129, m/z 145, m/z 329 $[M-129]^+$, m/z 368 $[M-90]^+$ e m/z 458 (íon molecular).

Segundo Silvério (2008), os íons com m/z 129 e m/z 329 correspondem à eliminação de um fragmento contendo o grupo trimetil-silil e de três carbonos C1, C2 e C3 localizados no primeiro anel. Este tipo de fragmentação é característico de esteróides com hidroxilas na posição 3 substituídas pelo grupo trimetil-silil (Björkhem *et al.*, 1972; Brooks *et al.*, 1979).

A fragmentação representada na FIG. 16 que gera o íon com m/z 129 é favorecida, pois o rearranjo do hidrogênio ocorre através de um anel de seis membros e a clivagem acontece na posição alílica, ou seja, no C4 (Silvério, 2008).

FIGURA 16. Fragmentação do derivado trimetil-silílico do colesterol originando o íon com m/z 129.

O íon 329 (FIG. 17) com perda neutra de massa 129 é formado via anel de seis membros, após clivagem da ligação na posição alílica. O hidrogênio localizado no C2 migra para o C6. O íon 329 apresenta duas estruturas de

ressonância que se estabilizam entre si (Diekman e Djerassi, 1967; Brooks *et al.*, 1979).

FIGURA 17. Fragmentação do derivado trimetil-silílico do colesterol originando o íon com m/z 329.

A formação do íon com m/z 368 pode ser explicada a partir de duas propostas de fragmentação (Silvério, 2008). A primeira proposta (FIG. 18) sugere uma abstração do hidrogênio 4β (C_4) pelo oxigênio eletronegativo. Para restabelecer a estabilidade da molécula, ocorre a eliminação do grupo trimetilsilanol ($(CH_3)_3SiOH$) e a formação do íon m/z 368.

FIGURA 18. 1ª proposta de fragmentação do derivado trimetil-silílico do colesterol originando o íon com m/z 368.

A segunda proposta (FIG. 19), sugere a clivagem de um radical metila do grupo trimetil-silil, seguido de um rearranjo envolvendo a formação do radical dimetilsilanol ((CH₃)₂SiOH) e do íon radicalar com m/z 368 .

FIGURA 19. 2ª proposta de fragmentação do derivado trimetil-silícico do colesterol originando o íon com m/z 368

Para a formação do íon m/z 145 não há relatos de propostas de fragmentação. Uma possível fragmentação pode ocorrer nas ligações entre C1 e C10 e entre C4 e C5 com sucessivos rearranjos.

4.6. Validação do método

Definidas as melhores condições de separação dos esteróis de estudo, condições de extração, de cromatografia e de reação de derivatização, a etapa seguinte foi validar a metodologia desenvolvida.

A validação da metodologia foi realizada a partir da avaliação estatística dos seguintes parâmetros de desempenho: seletividade, linearidade,

limite de detecção e quantificação, exatidão, precisão, robustez, recuperação e estimativa da incerteza (INMETRO, 2010a).

Em virtude da ausência de uma matriz isenta dos compostos de interesse, para o estudo destes parâmetros de validação, foram utilizadas as matrizes de água bruta e água tratada. Estabeleceu-se a área dos picos como a medida da resposta do detector e a adição de padrão externo como forma de padronização.

A adição padrão utilizada neste estudo consistiu na adição de diferentes concentrações dos analitos à matriz extraída. Neste estudo, as matrizes escolhidas foram a água tratada e bruta provenientes da ETA de Guararema, pois apresentaram o menor nível de contaminação quando comparada com as amostras dos demais municípios. Esta definição foi obtida a partir das análises da primeira coleta.

Para tal, foram extraídos 3 L de ambas as amostras e os respectivos extratos foram divididos em 9 alíquotas e distribuídas em *vials* de 2 mL. Uma das alíquotas foi designada para ser o branco da matriz, ou seja, o ponto sem fortificação. As demais alíquotas foram fortificadas com os respectivos volumes da solução mista para a obtenção das oito concentrações definidas das soluções de trabalho (TAB. 8) para cada analito.

Para o estudo sem matriz, as soluções de trabalho foram preparadas diretamente nos *vials* com a mistura dos solventes diclorometano/metanol (6:4, v/v) utilizada na etapa de eluição na SPE. Todos os pontos de estudo com e sem matriz foram derivatizados.

TABELA 8. Concentrações das soluções de trabalhos dos compostos estudados.

Compostos	Concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$)							
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8
Coprostanol	0,125	0,250	0,500	1,000	2,000	3,500	5,250	7,000
Colesterol	0,050	0,100	0,200	0,400	0,800	1,400	2,100	2,800
Colestanol	0,100	0,200	0,400	0,800	1,600	2,800	4,200	5,600
Estigmasterol	0,100	0,200	0,400	0,800	1,600	2,800	4,200	5,600

As injeções dos níveis de concentração adicionados em ambas as matrizes e somente em solvente foram realizadas em setuplicatas e suas respectivas áreas foram obtidas no modo SIM de aquisição do GC/MS.

Para análise dos resultados e aplicação dos cálculos estatísticos para avaliação dos parâmetros de validação foi utilizada a planilha “Validação de Ensaio Químicos” desenvolvida por Furusawa (2007), a qual foi baseada nas orientações do INMETRO (2003; 2007).

4.6.1. Seletividade

Para os métodos cromatográficos a seletividade é avaliada no sentido de garantir que o pico de resposta do analito (avaliado no tempo de retenção característico) seja proveniente exclusivamente do mesmo e não de outros compostos (interferentes) presentes na amostra (Paschoal *et al.*, 2008).

Para este teste, os compostos foram avaliados em diferentes concentrações de acordo com a sensibilidade de cada composto estudado, na faixa de 0,4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$, tanto nas matrizes de água tratada e bruta quanto apenas em solvente para que fosse possível a comparação das intensidades dos sinais analíticos bem como a observação das inclinações com as sobreposições das retas obtidas para cada ensaio.

Segundo INMETRO (2003), vários testes e suas estatísticas correspondentes podem ser utilizados para o estudo da seletividade. Neste estudo foram aplicados os seguintes testes: Teste F (*Snedecor*) de homogeneidade das variâncias, teste t (*Student*) de comparação das médias e teste t (*Student*) de inclinação e paralelismo e do intercepto.

Para verificar se as variâncias de cada uma das oito amostras podem ser consideradas iguais e se há interferência da matriz na precisão das medidas, faz-se o teste F calculando-se:

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2} \quad \text{Equação (2)}$$

Onde:

s_1^2 = maior variância (ensaio com a matriz);

s_2^2 = menor variância (ensaio sem a matriz).

Os valores de F calculados obtidos pela equação 2 são comparados ao valor de F tabelado = 4,28, com 6 graus de liberdade (n-1) e um nível de confiança de 95%. Se os valores de F calculados forem superiores ao de F tabelado conclui-se que o teste F é significativo, ou seja, a matriz tem um efeito importante sobre a precisão do método na faixa de concentração em estudo e as variâncias podem ser consideradas desiguais.

O t calculado é obtido pela seguinte equação:

$$t_{\text{calculado}} = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}} \quad \text{Equação (3)}$$

Sendo:

$\bar{x}_1$ e $\bar{x}_2$ = médias das respostas dos analitos em amostras com matriz e sem matriz na mesma faixa de concentrações;

n_1 e n_2 = número de replicatas para cada ensaio (setuplicata).

Neste caso, para a obtenção do t tabelado, o número de graus de liberdade (ν) é igual a:

$$v = \frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2} \right)^2}{\frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1} \right)^2}{n_1 + 1} + \frac{\left(\frac{s_2^2}{n_2} \right)^2}{n_2 + 1}} - 2 \quad \text{Equação (4)}$$

O valor de t tabelado é obtido a partir da tabela da distribuição de *Student* para $(n_1 + n_2 - 2)$ graus de liberdade e a confiança desejada. Neste estudo, o valor de t calculado foi comparado ao valor crítico $t_{12, 95\%} = 2,179$. Se os valores de t calculado forem superiores aos de t tabelado pode-se concluir que há diferença na média dos dois conjuntos de soluções e a matriz interfere estatisticamente sobre o resultado do método.

O teste t (*Student*) foi utilizado para avaliar outros dois testes de seletividade. O teste de inclinação e paralelismo e o teste de intercepto foram calculados respectivamente pelas equações 5 e 6:

$$t = \frac{b_1 - b_2}{\bar{S}_{xy} \sqrt{\frac{1}{\sum (x_{1i} - \bar{x})^2} + \frac{1}{\sum (x_{2i} - \bar{x})^2}}} \quad \text{Equação (5)}$$

Sendo:

b_1 = coeficiente linear da equação da reta do ensaio com matriz;

b_2 = coeficiente linear da equação da rela do ensaio sem matriz.

$$t = \frac{a_1 - a_2}{\bar{S}_{xy} \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{\bar{x}_1^2}{\sum (x_{1i} - \bar{x}_1)^2} + \frac{1}{n_2} + \frac{\bar{x}_2^2}{\sum (x_{2i} - \bar{x}_2)^2}}} \quad \text{Equação (6)}$$

Sendo:

a_1 = coeficiente angular da equação da reta do ensaio com matriz;

a_2 = coeficiente angular da equação da rela do ensaio sem matriz.

Os valores de $\bar{S}_{xy}$ das equações 5 e 6 são calculados pela equação 7.

$$\bar{S}_{xy} = \sqrt{\frac{(n1-2)S_{y1x1}^2 + (n2-2)S_{y2x2}^2}{n1+n2-4}} \quad \text{Equação (7)}$$

Em ambos os testes, se o valor de t calculado for superior ao valor crítico $t_{12,95\%} = 2,179$ tanto as inclinações quanto os interceptos das curvas com matriz serão estatisticamente diferentes quando comparados com a curva sem matriz.

4.6.2. Linearidade e faixa linear de trabalho

A regressão linear (método dos mínimos quadrados) é uma forma de estimar qual a melhor reta que passa pelos pontos obtidos experimentalmente (Leite, 2008).

Lançando mão deste método, o parâmetro linearidade foi avaliado a partir dos coeficientes de determinação (r^2) relativos a cada curva analítica dos quatro compostos de estudo nos três ensaios realizados, com um número de replicatas próximo daquele empregado na rotina do laboratório (INMETRO, 2010a).

Para verificação do desvio de linearidade de cada ponto da curva, foram analisados os valores de t calculado por meio do teste de t (*Student*) em relação ao valor de t tabelado = 2,365. Para tal, utilizou-se a seguinte equação:

$$t_{\text{calculado}} = \frac{\text{resíduo}}{s_r / \sqrt{n}} \quad \text{Equação (8)}$$

A linearidade também foi avaliada pelos gráficos de resíduos pela concentração e pela probabilidade normalizada nos ensaios com as amostras de água tratada, água bruta e somente com solventes.

O INMETRO (2010a) sugere também a aplicação da análise da variância (ANOVA, *Analysis of Variance*) como ferramenta estatística para avaliação da linearidade. Para tal, utilizou-se o teste F de regressão e o teste F de ajuste para a avaliação da porcentagem de variação explicada e da porcentagem máxima de variação explicável.

4.6.3. Limite de detecção (LD)

Para determinar o LD do método desenvolvido, admitiu-se o desvio padrão das setuplicatas da menor concentração aceitável dos analitos adicionados nas matrizes de estudo e apenas em solventes, cujo resultado foi aplicado na equação a seguir:

$$LD = t_{(n-1, 1-\alpha)} \cdot (s) \quad \text{Equação (9)}$$

Sendo:

t = distribuição de *Student* com 95% de confiança e 6 graus de liberdade (n-1);

s = desvio padrão das setuplicatas.

4.6.4. Limite de quantificação (LQ)

Para determinar o LQ do método desenvolvido, admitiu-se a média da menor concentração dos analitos adicionados nas matrizes de estudo e apenas em solventes mais cinco vezes o desvio padrão dessas determinações, cujos valores foram aplicados na equação a seguir:

$$LQ = \bar{X} + 5s \quad \text{Equação (10)}$$

Sendo:

$\bar{X}$ = média dos valores das replicatas da concentração do menor ponto da curva analítica;

s = desvio padrão amostral das replicatas da concentração do menor ponto da curva analítica.

4.6.5. Precisão

Este parâmetro foi determinado por meio dos valores de coeficiente de variação (CV), limite de repetibilidade (r) e limite de reprodutibilidade (R) das setuplicatas para todos os compostos para ambas as matrizes, cujas equações são apresentadas a seguir:

$$CV(\%) = \frac{s}{x} \cdot 100 \quad \text{Equação (11)}$$

$$r = 2,8 \cdot S_r \quad \text{Equação (12)}$$

$$R = 2,8 \cdot \sqrt{S_r^2} \quad \text{Equação (13)}$$

Sendo:

s = desvio padrão das replicatas em três níveis de concentrações;

X = média dos valores das replicatas em três níveis de concentrações;

S_r = desvio padrão das replicatas utilizadas no ensaio da repetibilidade;

S_r^2 = variância das replicatas utilizadas no ensaio de reprodutibilidade.

4.6.6. Exatidão

No processo de validação deste estudo, o parâmetro exatidão foi avaliado por meio da análise de variância (ANOVA) que determina a existência de diferenças significativas entre os valores obtidos pelos ensaios, da recuperação dos analitos e pelo índice Z (*Z score*).

A exatidão quando avaliada pela ferramenta índice Z utilizou a seguinte equação:

$$Z = \frac{(X_{lab} - X_v)}{s} \quad \text{Equação (14)}$$

Sendo:

X_{lab} = valor obtido experimentalmente ou média dos valores;

X_v = valor aceito como verdadeiro (valor certificado do MRC);

s = unidade de desvio.

Os valores obtidos foram avaliados (ISO Guia 43) de acordo com a seguinte escala de pontuação:

$Z \leq 2$ = Resultado satisfatório;

$2 < Z \leq 3$ = Resultado questionável;

$Z > 3$ = Resultado insatisfatório.

4.6.7. Recuperação

O estudo da recuperação consistiu na "fortificação" da amostra, ou seja, na adição de soluções com níveis baixo, médio e alto dos analitos de interesse seguida pela determinação da concentração dos analitos adicionados. Calculou-se a quantidade percentual recuperada pelo processo usando a seguinte equação:

$$\text{Rec (\%)} = \frac{\text{Valor observado}}{\text{Valor esperado}} * 100 \quad \text{Equação (15)}$$

Neste estudo, 500 mL das amostras de água tratada e bruta de Guararema foram fortificadas com os pontos 2, 5 e 8 dos ensaios de seletividade dos compostos de interesse (TAB. 8) e submetidas a todos os procedimentos de concentração, derivatização e análise. Os testes foram realizados em triplicata.

4.6.8. Robustez

Para determinar a robustez do método, recorreu-se ao planejamento fatorial de 7 variáveis com 8 experimentos (planejamento fracionário saturado) proposto por Vander Heyden e colaboradores (2001).

As médias das triplicatas de cada experimento foram avaliadas utilizando-se os cálculos da planilha elaborada por Furusawa (2007) permitindo

não só avaliar a robustez do método, como também ordenar a influência de cada uma das variações nos resultados finais, indicando a magnitude da influência de cada uma dessas variações.

Para este estudo, foram selecionados 7 fatores (TAB. 9) com influência sobre o método em ambas as matrizes que foram fortificadas com concentração conhecida da solução mista dos compostos de estudo.

TABELA 9. Fatores selecionados para avaliação da robustez.

Fator	Nominal	Variação
Lavagem (<i>Clean-up</i>)	Sim	Não
pH da amostra	3	Original
Temperatura de derivatização (°C)	100	70
Temperatura do injetor (°C)	300	280
Temperatura da interface (°C)	300	280
Fluxo coluna (mL min ⁻¹)	1,7	1,5
Voltagem detector (kV)	2,5	2,3

Essas 14 variáveis foram combinadas em 8 experimentos (TAB. 2) de acordo com a orientação do documento do INMETRO (2003). Cada ensaio combinado gerou resultados que representam a influência que cada fator exerce sobre o composto analisado. Esses resultados foram explorados por meio dos gráficos de robustez, probabilidade normalizada e *Rankit*.

4.6.9. Estimativa da incerteza

Como demonstrado pelo diagrama de Causa e Efeito (Espinha de Peixe ou Ishikawa) da FIG. 11, as fontes de incerteza identificadas neste estudo foram associadas a curva analítica envolvendo preparação da solução padrão, ao volume final da solução e ao fator de recuperação do analito. Todos os cálculos de incerteza realizados nesta dissertação são baseados no Guia EURACHEM (2002).

4.6.10. Incerteza associada à curva analítica

Neste estudo, as fontes de incerteza consideradas foram as associadas à preparação da solução padrão, às sucessivas diluições para a obtenção das soluções de trabalho e às respectivas áreas obtidas como resposta do equipamento.

4.6.11. Incerteza associada à preparação da solução padrão

De acordo com o diagrama apresentado na FIG. 11, para o cálculo da incerteza associada à preparação da solução padrão, as incertezas envolvidas foram as associadas à pesagem da massa, a pureza do padrão e ao volume do balão.

Para o cálculo da incerteza da massa ($u_{\text{massa padrão}}$) considerou-se a incerteza da repetitividade, do peso padrão e da calibração da balança, conforme a equação 16:

$$u_{\text{massa padrão}} = \sqrt{(u_{\text{repe}})^2 + (u_{\text{peso pad.}})^2 + (u_{\text{calibração da balança}})^2} \quad \text{Equação (16)}$$

Em relação à incerteza associada ao volume do balão volumétrico de 10 mL, foram consideradas as repetições, informação da incerteza pelo fabricante, variação de temperatura e coeficiente de dilatação do vidro, de acordo com a equação 17:

$$u_{\text{volume do balão}} = \sqrt{(u_{\text{repe}})^2 + (u_{\text{fabricante}})^2 + (u_{\Delta t})^2 + (u_{\text{coef. dil.}})^2} \quad \text{Equação (17)}$$

Para a incerteza combinada da preparação da solução padrão aplicou-se a equação 18:

$$u_{\text{padrão}} = \sqrt{(u_{\text{massa pad.}})^2 + (u_{\text{volume do balão}})^2 + (u_{\text{pureza do padrão}})^2} \quad \text{Equação (18)}$$

Para estimar a incerteza associada à pureza, considerou-se uma distribuição retangular, logo a incerteza da pureza fornecida pelo fabricante foi dividida por raiz de 3.

4.6.12. Incertezas associadas à preparação das soluções de trabalho

Para o cálculo das incertezas associadas à diluição para preparação das soluções de trabalho, as fontes de incerteza consideradas foram o volume da pipeta e o volume dos balões. Para ambas as incertezas consideraram-se a informação do fabricante, repetições, variação de temperatura e coeficiente de dilatação, conforme a equação 17.

Para o cálculo da incerteza combinada da preparação das soluções de trabalho foram consideradas as incertezas de cada uma das diluições, aplicando-as na equação 19:

$$u_{(C_{sol_{trab.}})} = C_{sol_{trab.}} \cdot \sqrt{\left(\frac{u(V_{sol_{estoque}})}{V_{sol_{estoque}}}\right)^2 + \left(\frac{u(V_{10})}{V_{10}}\right)^2 + \left(\frac{u(C_{sol_{estoque}})}{C_{sol_{estoque}}}\right)^2} \quad \text{Equação(19)}$$

Sendo:

$C_{sol_{trab.}}$ = Concentração da solução mista de trabalho;

$uV_{sol_{estoque}}$ = Incerteza do volume pipetado da solução estoque individual para preparação da solução mista;

$V_{sol_{estoque}}$ = Volume pipetado da solução estoque individual para preparação da solução mista;

uV_{10} = Incerteza do volume final da solução mista de trabalho;

V_{10} = Volume final da solução mista de trabalho;

$uC_{sol_{estoque}}$ = Incerteza da solução estoque de cada composto;

$C_{sol_{estoque}}$ = Concentração da solução estoque de cada composto.

Para a obtenção das concentrações das soluções padrão para a curva analítica utilizou-se a seguinte equação:

$$C_{sol_{trab}} = C_{sol_{estoque}} \cdot \frac{V_{estoque}}{V_{10}} \quad \text{Equação (20)}$$

O valor da incerteza relacionada ao coeficiente de dilatação do vidro para volumes pequenos (1 e 2 mL), comparada as demais grandezas de entrada, é desprezível (< 0,04%), portanto pode ser desconsiderada no cálculo.

4.6.13. Incertezas associadas à resposta do equipamento (área)

Para o cálculo da incerteza vinculada à área obtida como resposta do GC/MS foram consideradas as incertezas da repetitividade das injeções e da resolução do equipamento.

A incerteza para a repetitividade foi obtida por meio da seguinte equação:

$$u_{repe} = \frac{s}{\sqrt{n}} \quad \text{Equação (21)}$$

Sendo:

s = Desvio padrão das injeções;

n = Número de injeções realizadas.

A incerteza do equipamento foi calculada dividindo-se a resolução (Equação 22) do GC/MS por raiz de 3 (distribuição retangular).

$$R = \frac{\Delta Tr}{W_{b2} - W_{b1}} \quad \text{Equação (22)}$$

Sendo:

ΔTr = Diferença entre os tempos de retenção de dois picos adjacentes;

W_{b2} e W_{b1} = Largura da base de cada pico.

A incerteza combinada da resposta do equipamento foi obtida pela equação 23:

$$u_{C(área)} = \sqrt{(u_{repe})^2 + (u_R)^2} \quad \text{Equação (23)}$$

4.6.14. Incerteza associada à recuperação

A incerteza associada à recuperação para os compostos em ambas as matrizes, foi calculada de acordo com a equação 24.

$$u_{C_{Rec}} = R \cdot \sqrt{\frac{u(C_{real})^2}{C_{real}} + \frac{u(C_{obtida})^2}{C_{obtida}}} \quad \text{Equação (24)}$$

Sendo:

R = Valor de recuperação;

$u(C_{Real})$ = Incerteza da solução padrão adicionada;

C_{Real} = Concentração real adicionada;

$u(C_{Obtida})$ = Incerteza da concentração obtida;

C_{Obtida} = Concentração obtida.

A incerteza da solução padrão adicionada, $u(C_{Real})$, foi calculada pela equação 19, e a incerteza da concentração obtida, $u(C_{Obtida})$, pela equação 25.

$$u_{C_{Obtida}} = \frac{S_{Rec}}{\sqrt{n}} \quad \text{Equação (25)}$$

Sendo:

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

n = Número de ensaios de recuperação.

4.6.15. Incerteza associada ao volume final

Para o cálculo da incerteza associada ao volume final da amostra, $u(V_{Final})$, foram consideradas as incertezas vinculadas ao *vial*, cujo volume é de 1 mL. As incertezas em questão foram o erro informado pelo fabricante, desvio padrão das 10 repetições e variação de temperatura. As mesmas foram aplicadas na equação 26 para a obtenção da incerteza combinada para o volume final.

$$u_{V_{Final}} = \sqrt{(u_{repe})^2 + (u_{fabricante})^2 + (u_{\Delta t})^2} \quad \text{Equação (26)}$$

4.6.16. Incerteza combinada e expandida

A incerteza combinada de todas as fontes envolvidas é calculada pela equação 27.

$$u_{esteróis} = C_{esteróis} \sqrt{\left(\frac{u(C_{curva})}{C_{curva}}\right)^2 + \left(\frac{u(V_f)}{V_f}\right)^2 + \left(\frac{u(V_i)}{V_i}\right)^2 + \left(\frac{u(Re\ c)}{Re\ c}\right)^2} \quad \text{Equação (27)}$$

Sendo:

u_{V_f} = Incerteza associada ao volume da amostra;

u_{Rec} = Incerteza associada à recuperação;

$u_{C_{curva}}$ = Incerteza associada à curva analítica.

Para o cálculo da incerteza expandida multiplicou-se a incerteza combinada pelo fator de abrangência k , de acordo com a equação 28. Neste estudo considerou-se $k = 1,96$, ou seja, com um nível de confiança de 95%.

$$u_{C_{esteróis}} = K \cdot \mu_{C(cf)} \quad \text{Equação (28)}$$

4.7. Determinação de carbono orgânico total

Com o intuito de avaliar a interferência da matéria orgânica presente nas matrizes nas determinações dos analitos estudados, foi realizada a análise do teor de carbono orgânico nas amostras provenientes das três coletas.

Após a filtração das amostras com membrana de 0,45 μm , cerca de 50 mL de cada matriz de todas as ETAs de estudo foram separadas para a realização da análise. A determinação foi realizada por método instrumental que envolve a reação de oxidação do carbono, sendo capaz de determinar o carbono em baixas concentrações.

As determinações de carbono orgânico total (COT) foram feitas em um Analisador de Carbono a partir de medidas de quantidade de Carbono Total (CT) e Carbono Inorgânico (CI), presentes na amostra. O COT é calculado pela diferença entre CT e CI.

Para a determinação de CT, a amostra injetada é direcionada para um tubo de combustão a 680°C contendo platina suportada em alumina e é submetida a uma oxidação catalítica resultando em dióxido de carbono (CO₂). Para a determinação de Cl a amostra injetada reage com o ácido fosfórico 25%, sendo todo o Cl convertido a CO₂. O CO₂ produzido, tanto na oxidação catalítica como proveniente do Cl é medido espectrofotometricamente na região de absorção do infravermelho (NDIR, *non-dispersive infrared*), com grande sensibilidade e precisão nas medições.

4.8. Aplicação da metodologia desenvolvida a outras amostras ambientais

No transcorrer deste trabalho, foram realizadas no mesmo período das coletas das amostras de água tratada e bruta, amostragens de esgoto tratado (FIG. 20) provenientes das ETEs de Lavapés e Pindamonhangaba.

FIGURA 20. Pontos de coleta do esgoto tratado nas ETEs de Lavapés e Pindamonhangaba.

Sabe-se que o lançamento do esgoto tratado em ambas as ETEs é realizado diretamente no rio Paraíba do Sul. Com o intuito de avaliar de forma preliminar este impacto, na terceira coleta, uma amostra a jusante (FIG. 21) do lançamento da ETE de Pindamonhangaba foi coletada e analisada. Segundo informações da SABESP, o ponto de coleta se encontra localizado a aproximadamente 200 m a jusante do lançamento do esgoto tratado de Pindamonhangaba.

FIGURA 21. Participação na coleta da amostra de água bruta a localizada a jusante do lançamento do esgoto tratado da ETE de Pindamonhangaba.

Vale lembrar que a quantificação das amostras de esgoto tratado de ambas as ETEs foi realizada a partir das curvas analíticas construídas para as amostras em questão. Para a amostra da jusante foi utilizada a curva analítica referente à amostra de água bruta de Pindamonhangaba.

As etapas analíticas que envolveram a análise das amostras de esgoto tratado bem como a da água a jusante, foram as mesmas executadas para as amostras de água tratada e bruta, porém não foi realizada uma validação aprofundada para as novas matrizes.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Estudos metodológicos

5.1.1. Estudo 1: Extração em fase sólida

Os testes foram realizados conforme o descrito anteriormente na TAB. 5 do item 4.6.1. do capítulo 4 desta dissertação a partir de procedimentos adaptados de estudos correlatos. O cartucho escolhido para as análises foi o preenchido com C₁₈ devido à grande aplicação do mesmo em análises de esteróis em amostras de águas naturais (Wu *et al.*, 2009).

As amostras com o pH natural, na faixa de 5 a 6, foram avaliadas, porém os resultados observados foram semelhantes aos das amostras acidificadas, portanto todos os testes realizados para definição da metodologia contemplaram a etapa de acidificação que segundo Ying (2007), tem o intuito de preservar os analitos presentes nas amostras.

Com a avaliação dos cinco testes metodológicos (FIG. 22 e 23) constatou-se para ambas as matrizes que o teste 2 apresentou os melhores resultados, ou seja, maiores valores de área (sinal analítico) foram obtidos para todos os analitos de interesse quando comparados com os valores apresentados pela solução mista analisada diretamente no GC/MS. Com isso, o teste em questão foi escolhido para a etapa de SPE.

FIGURA 22. Comparação entre as áreas dos picos cromatográficos dos testes metodológicos para os esteróis de estudo em matriz de água tratada (AT).

FIGURA 23. Comparação entre as áreas dos picos cromatográficos dos testes metodológicos para os esteróis de estudo em matriz de água bruta (AB).

5.1.2. Estudo 2: Reação de derivatização

Todos os experimentos foram analisados pelo GC/MS no modo de aquisição SCAN. Para definição da metodologia de derivatização, os valores utilizados para comparação dos rendimentos foram às áreas integradas referentes às triplicatas de cada ensaio estudado.

5.1.2.1. Variável - tempo

A variável tempo é extremamente importante para otimização da reação de derivatização. É necessário definí-la para evitar que a reação seja incompleta ou que ocorra a formação de subprodutos. Diversas literaturas trabalharam com os três tempos de reação escolhidos e avaliados neste estudo (Kawakami *et al.*, 2002; Niven *et al.*, 2002; Gilli *et al.*, 2006; USEPA, 2007; Araújo *et al.*, 2011).

Em todos os tempos estudados, os esteróis derivatizados foram observados sem a presença dos picos cromatográficos do derivatizante ou de subprodutos. Ao comparar o rendimento da reação em 30 minutos com a reação de 60 minutos, houve uma variação de aproximadamente 25% para o derivado trimetil-silílico do coprostanol, 4,6% para o derivado trimetil-silílico do colesterol, 8,2% para o derivado trimetil-silílico do colestanol e 11,6% para o derivado trimetil-silílico do estigmasterol. Já para a reação realizada em 90 minutos, o

rendimento em relação ao tempo de 30 minutos aumentou cerca de 1% para o derivado trimetil-silícico do coprostanol. Os demais esteróis apresentaram rendimento inferior.

Com base nos resultados obtidos (FIG. 24), o tempo de reação de 30 minutos foi definido como ideal para a etapa de derivatização, visto que o aumento do rendimento observado em 60 minutos não foi significativo para que a reação fosse prolongada por mais 30 minutos. O rendimento observado em 90 minutos também justifica a escolha do tempo inferior.

FIGURA 24. Comparação entre as áreas dos picos cromatográficos para a variável tempo avaliada para os esteróis de estudo.

5.1.2.2. Variável - Solvente de reação

A aplicação da acetonitrila como solvente de reação pode facilitar as reações de derivatização (Supelco, 2003). Com o uso deste solvente, observou-se que a intensidade dos picos dos derivados trimetil-silícicos foi muito semelhante à intensidade dos picos da reação sem a presença do mesmo, como pode ser observado na FIG. 25. Como o rendimento não foi significativo, o uso de mais um solvente nocivo e inflamável durante o procedimento experimental foi desconsiderado.

FIGURA 25. Comparação entre as áreas dos picos cromatográficos para a variável solvente de reação avaliada para os esteróis de estudo.

5.1.2.3. Variável - Solvente para diluição do produto pós-silanização

Ao utilizar o solvente metanol e a mistura de solventes diclorometano e metanol na proporção 6:4, foi proposta a hipótese de que o metanol presente em ambos os testes, tenha interagido com o produto derivatizado ocasionando uma reação reversível justificada pela presença de picos cromatográficos característicos dos padrões não derivatizados.

Na reação em questão, é provável que o metanol tenha caráter nucleofílico realizando um ataque ao átomo de silício ocasionando a quebra da ligação entre o oxigênio do esterol e o radical trimetil-silícico gerando a formação dos compostos não derivatizados.

Ao analisar o solvente hexano, percebeu-se que sua baixa polaridade prejudicou a sensibilidade dos derivados frente ao GC/MS (FIG. 26).

Quando utilizado apenas o solvente diclorometano, os picos cromatográficos dos derivados trimetil-silícicos foram os mais intensos (FIG. 26) demonstrando que o mesmo não interage com os produtos silanizados e não interfere na sensibilidade do GC/MS configurando assim a melhor escolha para diluir os produtos ao volume de 1 mL. Wu e colaboradores (2009) também constataram a viabilidade do uso do diclorometano na etapa final da derivatização.

FIGURA 26. Comparação entre as áreas dos picos cromatográficos para a variável solvente para diluição do produto pós-silanização avaliada para os esteróis de estudo.

5.1.2.4. Variável - Volume de BSTFA:TMCS (99:1)

Os volumes selecionados para o estudo foram observados em diversos trabalhos envolvendo a etapa de derivatização de esteróis (Leeming *et al.*, 1996; Gilli *et al.*, 2006; Singh *et al.*, 2010).

Os rendimentos (FIG. 27) observados para cada volume estudado foram próximos, porém como os testes foram realizados apenas em solvente, decidiu-se pelo excesso de derivatizante. Essa escolha foi justificada pelo fato das amostras apresentarem possíveis interferentes que possam vir a consumir o derivatizante ou competir com o analito de interesse a ser derivatizado. Portanto, o volume de 100 µL foi escolhido para garantir a derivatização de todos os esteróis de estudo presentes nas amostras.

FIGURA 27. Comparação entre as áreas dos picos cromatográficos para a variável volume de BSTFA:TMCS (99:1) avaliada para os esteróis de estudo.

5.1.2.5. Variável - Temperatura

Ao analisar os resultados obtidos (FIG. 28) para as temperaturas de reação estudadas, constatou-se que o rendimento da reação a 100°C foi superior ao observado a 70 ° C. Outro fator determinante foi a ausência da degradação dos derivados silanizados assegurando a integridade dos mesmos após exposição à temperatura mais elevada.

FIGURA 28. Comparação entre as áreas dos picos cromatográficos para a variável temperatura avaliada para os esteróis de estudo.

Os resultados obtidos neste estudo metodológico comprovaram a vantagem em utilizar mais uma etapa analítica no processo de análise. Na FIG. 29 é apresentada a comparação das áreas da mistura de padrões antes e após a etapa de derivatização realizada de acordo com o procedimento otimizado pelos estudos metodológicos. Pode-se observar na FIG. 29 que houve um aumento significativo na sensibilidade do equipamento após a etapa de derivatização, favorecendo a determinação dos compostos.

FIGURA 29. Comparação entre as áreas dos picos cromatográficos da mistura de padrões antes e após derivatização.

5.2. Validação dos parâmetros analíticos

É importante salientar que o foco deste trabalho não foi discutir estatística, mas sim entender e utilizar de forma correta a ferramenta desenvolvida por Furusawa (2007) para a avaliação do desempenho da metodologia em questão.

5.2.1. Seletividade

Para métodos cromatográficos, a seletividade é avaliada no sentido de garantir que o pico de resposta do analito (avaliado no tempo de retenção característico) seja proveniente exclusivamente do mesmo e não de outros compostos (interferentes) presentes na amostra (Paschoal *et al.*, 2008).

Para este teste, os compostos foram avaliados de acordo com a sensibilidade, na faixa de 0,4 a 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Ponto 4, TAB. 8), tanto nas matrizes de água bruta e tratada como apenas em solvente (FIG. 30 a 32) para que fosse possível a comparação das intensidades dos sinais. Os resultados foram obtidos no modo de aquisição SIM.

FIGURA 30. Cromatograma da mistura dos compostos estudados na matriz de água tratada referente ao quarto ponto do estudo de seletividade obtido no modo SIM.

FIGURA 31. Cromatograma da mistura dos compostos estudados na matriz de água bruta referente ao quarto ponto do estudo de seletividade obtido no modo SIM.

FIGURA 32. Cromatograma da mistura dos compostos estudados em solventes referente ao quarto ponto do estudo de seletividade obtido no modo SIM.

Analisando os cromatogramas (FIG. 30 a 32), observou-se a perfeita separação de todos os picos, evidenciando uma boa seletividade do método além da ausência de picos interferentes nos tempos de retenção específicos dos analitos de estudo. Notou-se também a influência da matriz na sensibilidade do método, pois os sinais analíticos de todos os compostos foram mais intensos nas matrizes de água tratada e bruta.

Na FIG. 33 são apresentados respectivamente os picos cromatográficos dos quatro compostos estudados obtidos no modo SIM bem como os íons monitorados à esquerda de cada cromatograma. Esse resultado justifica a escolha dos cinco íons selecionados para o monitoramento, pois não foi

observado nenhum interferente com íons semelhantes configurando em uma adequada separação dos analitos de interesse.

FIGURA 33. Picos cromatográficos dos compostos estudados obtidos no modo SIM bem como os íons monitorados a esquerda do cromatograma.

Outra forma de avaliação do parâmetro seletividade é o uso de ferramentas estatísticas que comprovam a presença de efeitos de matriz a partir das áreas observadas para cada uma das sete replicatas das oito concentrações estudadas nos ensaios com e sem matriz. Os testes estatísticos utilizados foram: teste F (*Snedecor*) de homogeneidade das variâncias e teste t (*Student*) de significância das diferenças.

Os resultados obtidos pelo teste F (*Snedecor*) e teste t (*Student*) (TAB. 10 e 11), de acordo com as equações 02 e 03 descritas no item 4.7.1 do capítulo 4 (Materiais e Métodos) desta dissertação, para os ensaios com e sem matriz, foram comparados respectivamente com os valores tabelados de $F_{6,6,95\%} = 4,28$ e $t_{12,95\%} = 2,179$.

Nos ensaios em questão, todos os compostos apresentaram valores calculados de t e F superiores aos valores tabelados indicando que a matriz interfere na precisão do método, ou seja, tem um efeito significativo sobre o resultado do ensaio na faixa de concentração de estudo evidenciando que a quantificação deve ser realizada em uma curva preparada na própria matriz.

TABELA 10. Resultados da seletividade pela aplicação dos testes F e t para os compostos estudados, pela adição padrão somente nos solventes e na matriz de água tratada, considerando $F_{6,6,95\%} = 4,28$ e $t_{12,95\%} = 2,179$.

Coprostanol				
	Sem matriz	Matriz de Água Tratada		
Concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	s^2	s^2	F_{calc}	t_{calc}
0,125	3,71E+07	3,45E+08	9,29	23,79
0,25	2,15E+07	7,27E+08	33,88	22,71
0,50	1,27E+08	2,88E+09	22,64	23,17
1,00	7,98E+08	1,55E+10	19,44	14,47
2,00	2,64E+08	4,45E+10	168,54	21,11
3,50	5,90E+09	7,74E+10	13,11	18,37
5,25	2,07E+10	1,41E+11	6,81	22,37
7,00	5,14E+09	5,06E+11	98,30	20,13
Colesterol				
	Sem matriz	Matriz de Água Tratada		
Concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	s^2	s^2	F_{calc}	t_{calc}
0,05	1,15E+09	2,26E+10	19,74	12,13
0,10	8,54E+08	5,00E+09	5,85	6,34
0,20	2,39E+09	4,58E+09	1,91	1,79
0,40	3,60E+09	6,26E+09	1,74	11,84
0,80	6,57E+08	8,77E+10	133,40	9,14
1,40	6,77E+09	1,13E+11	16,65	13,21
2,10	4,43E+10	1,36E+11	3,07	13,61
2,80	1,77E+10	5,40E+11	30,51	13,33

Continuação TAB. 10:

Colestanol				
	Sem matriz	Matriz de Água Tratada		
Concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	s²	s²	F_{calc}	t_{calc}
0,10	5,26E+07	1,30E+08	2,47	23,62
0,20	8,57E+07	3,26E+08	3,80	17,89
0,40	8,04E+07	1,44E+09	17,89	16,97
0,80	1,57E+08	1,74E+09	11,06	34,42
1,60	2,43E+08	3,69E+10	151,79	14,30
2,80	1,64E+09	4,94E+10	30,22	18,35
4,20	1,83E+10	9,36E+10	5,13	18,27
5,60	1,10E+10	3,97E+11	35,93	14,40
Estigmasterol				
	Sem matriz	Matriz de Água Tratada		
Concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	s²	s²	F_{calc}	t_{calc}
0,10	6,14E+07	1,86E+08	3,03	22,40
0,20	8,57E+07	6,12E+08	7,14	17,56
0,40	8,04E+07	2,52E+09	31,29	17,05
0,80	1,57E+08	4,86E+09	31,01	27,51
1,60	2,43E+08	5,88E+10	241,63	15,15
2,80	1,64E+09	8,34E+10	50,97	18,12
4,20	1,83E+10	1,71E+11	9,39	19,03
5,60	1,10E+10	7,01E+11	63,47	14,31

TABELA 11. Resultados da seletividade pela aplicação dos testes F e t para os compostos estudados, pela adição padrão somente nos solventes e na matriz de água bruta, considerando $F_{6,6,95\%} = 4,28$ e $t_{12,95\%} = 2,179$.

Coprostanol				
	Sem matriz	Matriz de Água Bruta		
Concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	s²	s²	F_{calc}	t_{calc}
0,125	3,71E+07	8,63E+07	2,33	13,07
0,25	2,15E+07	3,59E+08	16,72	13,27
0,50	1,27E+08	1,02E+09	8,02	16,33
1,00	7,98E+08	7,72E+09	9,67	10,43
2,00	2,64E+08	1,89E+10	71,72	20,85
3,50	5,90E+09	2,93E+10	4,97	23,74
5,25	2,07E+10	4,18E+10	2,02	17,42
7,00	5,14E+09	1,13E+11	21,88	32,40

Continuação TAB. 11:

Coolesterol				
	Sem matriz	Matriz de Água Bruta		
Concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	s²	s²	F_{calc}	t_{calc}
0,05	1,15E+09	2,83E+08	0,25	8,29
0,10	8,54E+08	1,11E+10	12,95	8,86
0,20	2,39E+09	7,53E+09	3,15	7,20
0,40	3,60E+09	1,26E+10	3,50	6,23
0,80	6,57E+08	2,12E+10	32,31	16,25
1,40	6,77E+09	1,96E+10	2,90	18,01
2,10	4,43E+10	7,87E+10	1,78	10,02
2,80	1,77E+10	2,18E+11	12,33	19,68
Coletanol				
	Sem matriz	Matriz de Água Bruta		
Concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	s²	s²	F_{calc}	t_{calc}
0,10	5,26E+07	1,09E+08	2,07	4,27
0,20	8,57E+07	5,15E+08	6,01	7,09
0,40	8,04E+07	2,99E+09	37,22	6,40
0,80	1,57E+08	6,40E+09	40,84	9,00
1,60	2,43E+08	8,70E+09	35,78	20,28
2,80	1,64E+09	9,99E+09	6,11	28,95
4,20	1,83E+10	2,76E+10	1,51	16,52
5,60	1,10E+10	1,21E+11	10,98	20,83
Estigmaterol				
	Sem matriz	Matriz de Água Bruta		
Concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	s²	s²	F_{calc}	t_{calc}
0,10	6,14E+07	9,30E+07	1,51	4,78
0,20	8,57E+07	3,04E+08	3,54	9,97
0,40	8,04E+07	2,31E+09	28,73	8,46
0,80	1,57E+08	1,42E+10	90,26	9,37
1,60	2,43E+08	1,40E+10	57,67	23,53
2,80	1,64E+09	2,46E+10	15,06	29,54
4,20	1,83E+10	5,63E+10	3,08	20,23
5,60	1,10E+10	2,10E+11	19,01	23,48

Com a sobreposição dos gráficos de seletividade de ambas as matrizes e sem matriz (FIG. 34), foi possível realizar uma comparação dos resultados e observar uma ligeira diferença na inclinação das curvas de regressão linear entre as matrizes de estudo, porém uma sensível diferença das mesmas em relação ao ensaio sem matriz.

Uma maior inclinação da reta foi observada para matriz de água tratada, corroborando com os valores obtidos nos testes t e F mencionados anteriormente. A matriz de água bruta apresentou inclinação inferior a da água tratada, porém superior ao ensaio sem matriz. Os quatro compostos de estudos apresentaram comportamentos semelhantes nos três ensaios analisados.

FIGURA 34. Gráficos da seletividade representados pelas retas obtidas nos ensaios com água tratada, água bruta e sem matriz.

Para comprovar estatisticamente os perfis observados na FIG. 34, foram utilizadas como ferramentas estatísticas, os testes de inclinação e paralelismo e o teste do intercepto pela aplicação do teste t (*Student*). Nesse estudo, valores de t calculado são comparados ao valor de t tabelado = 2,179 com 95 % de confiança e 7 graus de liberdade.

Nas TAB. 12 e 13 são apresentados respectivamente os resultados obtidos nos ensaios com as matrizes de água tratada e bruta para o teste de

inclinação e paralelismo e do intercepto, pela aplicação das equações 05 e 06 descritas no item 4.7.1 do capítulo 4 desta dissertação.

TABELA 12. Resultados obtidos para os testes de inclinação e paralelismo e do intercepto aplicando t (*Student*) na matriz de água tratada, considerando os dois conjuntos de amostras com 7 graus de liberdade e 95% de confiança, onde 2,179 é o valor crítico.

T_{Calculado} – Matriz de Água tratada		
Composto	Teste de inclinação e Paralelismo	Teste do Intercepto
Coprostanol	60,9	1,1
Colesterol	63,0	3,9
Colestanol	47,1	1,0
Estigmasterol	57,9	1,5

Observando os resultados, constatou-se que para o ensaio com matriz de água tratada os quatro compostos apresentaram valores de t calculado para o teste de inclinação e paralelismo superiores ao valor de t tabelado confirmando o observado nos gráficos apresentados na FIG. 34 em que as inclinações são estatisticamente diferentes em relação ao ensaio sem matriz.

Já para o teste do intercepto, apenas o colesterol apresentou valor de t calculado superior ao t tabelado, ou seja, somente este composto apresentou gráficos de seletividade com intercepto estatisticamente diferente quando comparado ao ensaio sem matriz.

TABELA 13. Resultados obtidos para os testes de inclinação e paralelismo e do intercepto aplicando t (*Student*) na matriz de água bruta, considerando os dois conjuntos de amostras com 7 graus de liberdade e 95% de confiança, onde 2,179 é o valor crítico.

T_{Calculado} – Matriz de água Bruta		
Composto	Teste de inclinação e Paralelismo	Teste do Intercepto
Coprostanol	49,0	2,7
Colesterol	58,9	3,4
Colestanol	39,4	2,7
Estigmasterol	53,5	3,7

Para o teste de inclinação e paralelismo com a matriz de água bruta, foram observados valores de t calculados superiores ao valor de t tabelado = 2,179, porém foram ligeiramente menores quando comparados com os valores obtidos para a matriz de água tratada. O teste de intercepto, porém, apresentou

um perfil diferente ao observado na matriz de água tratada visto que os quatro compostos apresentaram valores de t calculados superiores ao valor de t tabelado, ou seja, todos os compostos de estudo possuem curvas com interceptos estatisticamente diferentes.

5.2.2. Linearidade e faixa de trabalho

A regressão linear (método dos mínimos quadrados) é uma forma de estimar qual a melhor reta que passa pelos pontos obtidos experimentalmente (LEITE, 2008). Lançando mão deste método, o parâmetro linearidade foi primeiramente avaliado a partir dos coeficientes de determinação (r^2) relativos a cada curva analítica dos quatro compostos de estudo nos três ensaios realizados, com um número de replicatas próximo daquele empregado na rotina do laboratório (INMETRO, 2010).

Para verificação do desvio de linearidade de cada ponto da curva, foram analisados os valores de t calculado por meio do teste de t (*Student*) em relação ao valor de t tabelado = 2,365. Gráficos de resíduos também foram explorados com o intuito de avaliar a ocorrência de flutuações, positivas ou negativas, entre as replicatas bem como a distribuição dos pontos.

Nas TAB. 14 a 16 são apresentados a faixa de trabalho, as equações das retas e os coeficientes de determinação (r^2) obtidos nos ensaios com matriz e sem matriz para cada um dos compostos estudados. As representações gráficas das curvas analíticas para cada um dos compostos nos ensaios com água tratada, água bruta e sem matriz podem ser visualizadas nas FIG. 35 a 37.

TABELA 14. Faixa de trabalho, equação da reta e coeficiente de determinação (r^2) para os compostos de estudo obtidos pela adição padrão na matriz de água tratada (AT).

Composto	Faixa de trabalho ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Equação da reta	r^2
Coprostanol	0,125 – 2	$y = 1\text{E}+06x + 5,60\text{E}+04$	0,998
Colesterol	0,2 - 2,1	$y = 2,10\text{E}+06x + 1,15\text{E}+05$	0,999
Colestanol	0,1 – 4,2	$y = 9,07\text{E}+05x + 6,15\text{E}+04$	0,998
Estigmasterol	0,1 – 1,6	$y = 1,20\text{E}+06x + 1,76\text{E}+04$	0,999

FIGURA 35. Representação gráfica da linearidade para os esteróis de estudo na matriz de água tratada.

TABELA 15. Faixa de trabalho, equação da reta e coeficiente de determinação (r^2) para os compostos de estudo obtidos pela adição padrão na matriz de água bruta (AB).

Composto	Faixa de trabalho ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Equação da reta	r^2
Coprostanol	0,125 – 2	$y = 7,95E+05x - 4,39E+04$	0,998
Colesterol	0,2 – 2,1	$y = 2E+06x + 32918$	0,989
Colestanol	0,1 – 1,6	$y = 7,91E+05x - 3,71E+04$	0,995
Estigmasterol	0,1 – 1,6	$y = 1E+06x - 81812$	0,997

FIGURA 36. Representação gráfica da linearidade para os esteróis de estudo na matriz de água bruta.

Mesmo se tratando de duas matrizes distintas, a faixa de trabalho e a faixa linear com exceção do coletanol foram as mesmas, indicando que o efeito das interferências provenientes das matrizes são semelhantes.

TABELA 16. Faixa de trabalho, equação da reta e coeficiente de determinação (r^2) para os compostos de estudo obtidos pela adição padrão no ensaio sem matriz.

Composto	Intervalo Linear ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Equação da reta	r^2
Coprostanol	0,125 – 2	$y = 4,19E+05x - 4,84E+04$	0,993
Colesterol	0,05 – 1,4	$y = 1E+06x + 1,2E+05$	0,974
Coletanol	0,1 – 2,8	$y = 3,34E+05x + 8,53E+03$	0,999
Estigmasterol	0,1 – 1,6	$y = 3,13E+05x + 1,60E+04$	0,998

FIGURA 37. Representação gráfica da linearidade para os esteróis de estudo no ensaio sem matriz.

Para avaliar se os pontos pertencem à curva e se a faixa até ele é linear foi realizada a comparação do t calculado com o t tabelado = 2,365 por meio do cálculo de resíduos. Se o valor de t calculado for inferior ao t tabelado o ponto pertence à curva analítica.

Neste estudo, os quatro compostos foram avaliados e observou-se que ao menos dois pontos em cada ensaio apresentaram valores de t calculado superiores ao t tabelado (TAB. 17 a 19).

Na matriz de água tratada, pontos de baixa e alta concentração apresentaram valores de t calculado superiores ao de t tabelado. Para os ensaios realizados com a água bruta e sem matriz, apenas nas concentrações mais altas foram observados desvios de linearidade. Porém, os valores de t calculado

superiores ao de t tabelado encontram-se próximos do valor ideal, possibilitando o uso dos mesmos no processo de quantificação.

Outro fator que assegura a linearidade do método são os valores de coeficiente de determinação que cada curva de regressão linear apresentou. Todos os valores foram superiores ao valor recomendado pelo INMETRO (2010) de 0,90, considerado como evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão.

TABELA 17. Valores de t calculado obtidos pelo teste t (*Student*) para a verificação do desvio da linearidade de cada ponto da curva para os compostos estudados na matriz de água tratada, onde o valor tabelado é $t_{7,95\%} = 2,365$.

Coprostanol	$\mu\text{g mL}^{-1}$	0,125	0,25	0,50	1,00	2,00	3,50	5,25	7,00
	$t_{\text{calc.}}$	0,210	0,172	0,950	0,718	2,528	6,220	0,937	2,923
Colesterol	$\mu\text{g mL}^{-1}$	0,05	0,10	0,20	0,40	0,80	1,40	2,10	2,80
	$t_{\text{calc.}}$	5,642	0,696	2,735	2,252	1,278	2,008	1,958	1,271
Colestanol	$\mu\text{g mL}^{-1}$	0,10	0,20	0,40	0,80	1,60	2,80	4,20	5,60
	$t_{\text{calc.}}$	0,871	1,479	1,049	2,574	3,021	5,809	0,344	1,528
Estigmasterol	$\mu\text{g mL}^{-1}$	0,10	0,20	0,40	0,80	1,60	2,80	4,20	5,60
	$t_{\text{calc.}}$	0,283	0,765	0,465	1,959	2,983	6,295	0,908	1,389

TABELA 18. Valores de t calculado obtidos pelo teste t (*Student*) para a verificação do desvio da linearidade de cada ponto da curva para os compostos estudados na matriz de água bruta, onde o valor tabelado é $t_{7,95\%} = 2,365$.

Coprostanol	$\mu\text{g mL}^{-1}$	0,125	0,25	0,50	1,00	2,00	3,50	5,25	7,00
	$t_{\text{calc.}}$	0,322	0,145	0,108	0,266	0,849	0,287	6,138	4,160
Colesterol	$\mu\text{g mL}^{-1}$	0,05	0,10	0,20	0,40	0,80	1,40	2,10	2,80
	$t_{\text{calc.}}$	1,439	2,572	1,439	1,070	0,319	0,882	5,094	4,154
Colestanol	$\mu\text{g mL}^{-1}$	0,10	0,20	0,40	0,80	1,60	2,80	4,20	5,60
	$t_{\text{calc.}}$	0,623	0,634	0,430	0,667	0,867	0,408	5,866	4,387
Estigmasterol	$\mu\text{g mL}^{-1}$	0,10	0,20	0,40	0,80	1,60	2,80	4,20	5,60
	$t_{\text{calc.}}$	0,685	0,495	0,047	0,358	0,836	0,233	6,055	4,210

TABELA 19. Valores de t calculado obtidos pelo teste t (*Student*) para a verificação do desvio da linearidade de cada ponto da curva para os compostos estudados no ensaio sem matriz, onde o valor tabelado é $t_{7,95\%} = 2,365$.

Coprostanol	$\mu\text{g mL}^{-1}$	0,125	0,25	0,50	1,00	2,00	3,50	5,25	7,00
	$t_{\text{calc.}}$	1,131	1,084	0,782	1,922	1,413	1,267	6,445	5,223
Colesterol	$\mu\text{g mL}^{-1}$	0,05	0,10	0,20	0,40	0,80	1,40	2,10	2,80
	$t_{\text{calc.}}$	1,253	0,514	0,943	1,388	1,932	4,363	4,939	5,162
Colestanol	$\mu\text{g mL}^{-1}$	0,10	0,20	0,40	0,80	1,60	2,80	4,20	5,60
	$t_{\text{calc.}}$	0,455	0,414	0,031	0,675	0,674	0,205	7,100	5,118
Estigmasterol	$\mu\text{g mL}^{-1}$	0,10	0,20	0,40	0,80	1,60	2,80	4,20	5,60
	$t_{\text{calc.}}$	0,463	0,411	0,034	0,673	0,673	0,206	7100	5,119

A linearidade também foi avaliada pelos gráficos de resíduos que relacionam a distribuição espacial dos resíduos absolutos em função das concentrações e a distribuição dos resíduos em função da probabilidade normalizada nos ensaios com as amostras de água tratada (FIG. 38 e 39), água bruta (FIG. 40 e 41) e sem matriz (FIG. 42 e 43).

FIGURA 38. Gráficos dos resíduos absolutos (esquerda) e normalizados (direita) para o coprostanol e colesterol no ensaio com matriz de água tratada (AT).

FIGURA 39. Gráficos dos resíduos absolutos (esquerda) e normalizados (direita) para o colestanol e estigmasterol no ensaio com matriz de água tratada (AT).

FIGURA 40. Gráficos dos resíduos absolutos (esquerda) e normalizados (direita) para o coprostanol e colesterol no ensaio com matriz de água bruta (AB).

FIGURA 41. Gráficos dos resíduos absolutos (esquerda) e normalizados (direita) para o coletanol e estigmaterol no ensaio com matriz de água bruta (AB).

FIGURA 42. Gráficos dos resíduos absolutos (esquerda) e normalizados (direita) para o coprostanol e colesterol no ensaio sem matriz.

FIGURA 43. Gráficos dos resíduos absolutos (esquerda) e normalizados (direita) para o colestanol e estigmasterol no ensaio sem matriz.

Analisando os gráficos de resíduos normalizados para a matriz de água tratada é possível observar flutuações tanto em concentrações baixas quanto em altas. Já para água bruta e sem matriz as flutuações se deram apenas nas concentrações altas.

Porém, ao analisar os gráficos dos resíduos pela probabilidade normal nota-se que a maioria dos pontos está distribuída no intervalo de probabilidade de -2 a +2, ou seja, dentro de ± 2 desvios padrão, com 95% de confiança. Observa-se ainda, que a distribuição se aproxima de uma reta, sem grandes tendências que depreciem o comportamento linear.

O INMETRO (2010a) sugere também a aplicação da análise da variância (ANOVA, *Analysis of Variance*,) como ferramenta estatística para avaliação da linearidade. A partir dos cálculos da tabela ANOVA, foi possível realizar a análise pelo teste F de regressão que verifica a adequação do modelo de regressão adotado aos dados obtidos e pelo teste F de ajuste que verifica o

quanto esse modelo se ajusta ao conjunto de dados obtidos, com o mesmo limite de confiança. O teste ANOVA ainda faz uma avaliação da porcentagem de variação explicada e da porcentagem máxima de variação explicável (Otomo, 2010).

Observando os resultados obtidos pela ANOVA para ambas as matrizes (TAB. 20 e 21), foi possível constatar pelo teste de F de regressão que a regressão aplicada é significativa, ou seja, que a equação da reta é adequada para os pares de pontos considerados, uma vez que os valores de F calculados foram superiores ao valor de F tabelado = 3,81.

No teste F de ajuste, houve significativa falta de ajuste apenas no ensaio de água bruta para todos os compostos de estudo, pois o t calculado foi superior ao t tabelado = 3,69. Esse resultado indica uma possível ocorrência de dispersão entre os pontos considerados ou a existência de valores discrepantes (*outliers*).

TABELA 20. Resultados resumidos da análise de variância (ANOVA) para os quatro compostos estudados no ensaio com matriz de água tratada (AT).

Composto	F _{Calculado} Matriz AT			
	Regressão F _(2,13,95%) = 3,81	Ajuste F _(5,8, 95%) = 3,69	% de variação explicada	% máxima de variação explicável
Coprostanol	351,8	1,5	98,19	99,08
Colesterol	276,6	2,4	97,70	99,08
Colestanol	621,1	0,1	98,96	99,05
Estigmasterol	479,2	0,3	98,66	98,86

TABELA 21. Resultados resumidos da análise de variância (ANOVA) para os quatro compostos estudados no ensaio com matriz de água bruta (AB).

Composto	F _{Calculado} Matriz AB			
	Regressão F _(2,13,95%) = 3,81	Ajuste F _(5,8, 95%) = 3,69	% de variação explicada	% máxima de variação explicável
Coprostanol	140,9	23,0	90,96	99,51
Colesterol	197,1	23,8	96,81	99,80
Colestanol	572,3	13,5	98,88	99,88
Estigmasterol	463,6	13,4	98,62	99,85

A falta de ajuste observada na matriz de água bruta pode ser considerada insignificante, visto que os resultados das porcentagens de variação explicadas estão próximos às porcentagens máximas explicáveis, com valores acima de 90% para todos os compostos. Esses resultados indicam que as variações foram explicadas satisfatoriamente pelos modelos lineares adotados e que os mesmos se ajustam ao conjunto de dados.

Na FIG. 44 são apresentados os gráficos contendo as faixas de intervalos de confiança para cada composto nas faixas de trabalho consideradas, cujos resultados são estatisticamente aceitáveis. O intervalo de confiança para o colestanol e o estigmasterol, se mostrou estreito em toda a faixa de trabalho.

Porém, para o coprostanol e colesterol notou-se uma redução na confiança do resultado obtido tanto no limite inferior quanto superior da curva analítica. Esse resultado sugere que a confecção da curva analítica para quantificação seja realizada com pontos próximos a esses limites.

FIGURA 44. Gráficos da faixa de intervalo de confiança no ensaio sem matriz para os compostos estudados na faixa de trabalho considerada.

5.2.3. Limites de detecção e quantificação

Nas TAB. 22 a 24 são apresentados os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) do método para ambas as matrizes e para o ensaio sem matriz obtidos a partir da concentração em mil vezes de 1L de amostra.

Observando os limites alcançados em ambas as matrizes, os valores de LD e LQ foram próximos entre si corroborando com o parâmetro seletividade discutido anteriormente no item 5.2.1.

TABELA 22. Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) para os compostos de estudo na matriz de água tratada (AT).

Composto	Limites do método – Matriz AT	
	LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Coprostanol	0,045	0,189
Colesterol	0,032	0,100
Colestanol	0,031	0,123
Estigmasterol	0,033	0,217

TABELA 23. Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) para o esteróis de estudo na matriz de água bruta (AB).

Composto	Limites do método – Matriz AB	
	LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Coprostanol	0,029	0,215
Colesterol	0,080	0,250
Colestanol	0,032	0,162
Estigmasterol	0,031	0,134

TABELA 24. Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) para o esteróis de estudo no ensaio sem matriz.

Composto	Limites do método – Sem matriz	
	LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Coprostanol	0,067	0,297
Colesterol	0,080	0,108
Colestanol	0,053	0,122
Estigmasterol	0,061	0,107

5.2.4. Precisão

Este parâmetro é normalmente determinado por meio dos valores de coeficiente de variação, limite de repetitividade e limite de reprodutibilidade. Com o intuito de avaliar a dispersão dos resultados, os coeficientes de variação (CV) das setuplicatas para todos os compostos foram calculados para ambas as matrizes em três níveis de concentrações.

Consideram-se ideais para análise de traços, valores de CV inferiores a 20% (Horwitz e Albert, 2006). Neste estudo, para todas as concentrações analisadas, todos os valores de CV (TAB. 25 e 26) se mostraram abaixo do indicado.

TABELA 25. Coeficientes de variação (CV %) para os compostos em três níveis de concentração no ensaio com matriz de água tratada.

Coprostanol	($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,25	1,00	5,25
	CV (%)	11,22	13,11	8,09
Colesterol	($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,80	1,40	2,10
	CV (%)	17,43	10,52	8,79
Colestanol	($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,10	0,80	4,20
	CV (%)	11,58	5,29	8,0
Estigmasterol	($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,20	0,80	4,20
	CV (%)	8,54	7,22	9,00

TABELA 26. Coeficientes de variação (CV %) para os compostos em três níveis de concentração no ensaio com matriz de água bruta.

Coprostanol	($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,25	1,00	5,25
	CV (%)	9,93	11,01	6,70
Colesterol	($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,80	1,40	2,10
	CV (%)	10,47	10,52	8,79
Colestanol	($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,10	0,80	4,20
	CV (%)	12,35	12,95	5,57
Estigmasterol	($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,20	0,80	4,20
	CV (%)	7,57	6,89	6,21

Segundo Chui e colaboradores (2009), para que a metodologia apresente repetitividade e reprodutibilidade os valores de r e R devem ser superiores à diferença entre as replicatas. Observando os limites de repetitividade (r) e de reprodutibilidade (R) para ambas as matrizes (TAB. 27 a 30) constatou-se

que a metodologia desenvolvida foi precisa, pois todos os valores em questão foram superiores as médias dos valores de desvio padrão.

TABELA 27. Valores do limite de repetitividade (r) para os compostos em três níveis de concentração no ensaio com matriz de água tratada.

Compostos	$\mu\text{g mL}^{-1}$	$\bar{S}_{\text{replicatas}}$	r
Coprostanol	0,25	0,027	0,075
	1,00	0,125	0,349
	5,25	0,375	1,051
Colesterol	0,80	0,141	0,395
	1,40	0,160	0,447
	2,10	0,175	0,491
Coletanol	0,10	0,013	0,035
	0,80	0,046	0,129
	4,20	0,337	0,945
Estigmasterol	0,20	0,014	0,038
	0,80	0,070	0,195
	4,20	0,414	1,159

TABELA 28. Valores do limite de repetitividade (r) para os compostos em três níveis de concentração no ensaio com matriz de água bruta.

Compostos	$\mu\text{g mL}^{-1}$	$\bar{S}_{\text{replicatas}}$	r
Coprostanol	0,25	0,024	0,067
	1,00	0,110	0,309
	5,25	0,257	0,720
Colesterol	0,80	0,090	0,253
	1,40	0,087	0,243
	2,10	0,174	0,486
Coletanol	0,10	0,029	0,080
	0,80	0,101	0,283
	4,20	0,210	0,587
Estigmasterol	0,20	0,016	0,045
	0,80	0,110	0,308
	4,20	0,220	0,617

TABELA 29. Valores do limite de reprodutibilidade (R) para os compostos em três níveis de concentração no ensaio com matriz de água tratada.

Compostos	$\mu\text{g mL}^{-1}$	$\overline{S}_{\text{replicatas}}$	R
Coprostanol	0,25	0,010	0,028
	1,00	0,067	0,188
	5,25	0,159	0,444
Colesterol	0,80	0,126	0,352
	1,40	0,058	0,163
	2,10	0,272	0,762
Coletanol	0,10	0,005	0,013
	0,80	0,029	0,080
	4,20	0,130	0,363
Estigmaterol	0,20	0,004	0,012
	0,80	0,028	0,079
	4,20	0,156	0,437

TABELA 30. Valores do limite de reprodutibilidade (R) para os compostos em três níveis de concentração no ensaio com matriz de água bruta.

Compostos	$\mu\text{g mL}^{-1}$	$\overline{S}_{\text{replicatas}}$	R
Coprostanol	0,25	0,014	0,038
	1,00	0,023	0,063
	5,25	0,164	0,459
Colesterol	0,80	0,094	0,263
	1,40	0,058	0,161
	2,10	0,258	0,722
Coletanol	0,10	0,015	0,043
	0,80	0,038	0,107
	4,20	0,096	0,268
Estigmaterol	0,20	0,005	0,013
	0,80	0,057	0,159
	4,20	0,130	0,364

5.2.5. Exatidão

A exatidão foi avaliada pelo índice Z (Z score) (TAB. 31), em que valores de $Z < 2$ indicam um resultado satisfatório (INMETRO, 2010a). Os resultados dos testes para os compostos do presente estudo apresentaram

valores de Z abaixo do especificado evidenciando a exatidão do método para todos os compostos estudados.

TABELA 31. Resultados do índice Z (Z Score) para os compostos estudados nos ensaios em matriz de água tratada (AT) e água bruta (AB).

Composto	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Índice Z (Z Score)	
		Matriz AT	Matriz AB
Coprostanol	0,25	0,05	0,32
Colesterol	0,20	0,23	0,60
Colestanol	0,20	0,66	0,27
Estigmasterol	0,20	1,28	0,83

5.2.6. Recuperação

O ensaio de recuperação constitui o método mais utilizado para validação de processos analíticos. A recuperação está relacionada com a exatidão, pois reflete a quantidade de determinado analito, recuperado no processo, em relação à quantidade real presente na amostra. A exatidão é expressa como erro sistemático percentual, inerente ao processo (Validation, 1995; González *et al.*, 1999). O erro sistemático ocorre pela perda da substância devido à baixa recuperação da extração, medidas volumétricas imprecisas ou substâncias interferentes na amostra (entre outros).

O estudo da recuperação consiste na “fortificação” da amostra, ou seja, na adição de soluções com níveis baixo, médio e alto do analito de interesse seguida pela determinação da concentração do analito adicionado após todas as etapas de análise. Neste estudo, foram utilizados os pontos 2, 5 e 8 das curvas analíticas dos compostos de interesse, cujos valores de recuperação (Rec) são apresentados nas TAB. 32 e 33 para ambas as amostras. O teste foi realizado em triplicata.

TABELA 32. Resultados dos estudos de recuperação na matriz de água tratada (AT) considerando três níveis de fortificação (n=3).

Composto	Recuperação (Rec) – Matriz AT					
	Nível Baixo ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Rec %	Nível Médio ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Rec %	Nível Alto ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Rec %
Coprostanol	0,25	63	2,00	80	7,00	120
Colesterol	0,10	61	0,80	90	2,80	102
Colestanol	0,20	61	1,60	87	5,60	102
Estigmasterol	0,20	67	1,60	85	5,60	92

TABELA 33. Resultados dos estudos de recuperação na matriz de água bruta (AB) considerando três níveis de fortificação (n=3).

Composto	Recuperação (Rec) – Matriz AB					
	Nível Baixo ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Rec %	Nível Médio ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Rec %	Nível Alto ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Rec %
Coprostanol	0,25	113	2,00	65	7,00	111
Colesterol	0,10	154	0,80	60	2,80	102
Colestanol	0,20	92	1,60	63	5,60	99
Estigmasterol	0,20	119	1,60	63	5,60	93

Os valores de recuperação se encontraram na faixa de 60% a 120% indicando uma adequada recuperação do método desenvolvido para ambas as matrizes, além de mostrar que a semelhança dos compostos de estudo gerou valores de recuperação próximos. Foi encontrada uma recuperação acima do recomendado, 154%, apenas para o colesterol na amostra de água bruta em nível baixo de fortificação. A presença deste analito no branco da matriz em questão é relevante sugerindo uma possível causa de uma recuperação excessiva.

Os intervalos aceitáveis de recuperação para análise de resíduos geralmente estão entre 70 e 120%, com precisão de até $\pm 20\%$. Porém, dependendo da complexidade analítica e da amostra, este valor pode ser de 50 a 120%, com precisão de até $\pm 15\%$ (Ribani *et al.*, 2004).

Deve-se ressaltar que o processo de fortificação tenta simular condições reais, não interferindo significativamente nas interações que ocorrem na própria amostra. Isso nem sempre é possível, visto que a solução de fortificação é preparada com solventes orgânicos, geralmente ausentes na matriz. Por essa razão, tenta-se usar volume reduzido de solução de fortificação e condições que alterem a amostra o mínimo possível (Amarante *et al.*, 2001).

5.2.7. Robustez

Na FIG. 45 são apresentados os gráficos de robustez que evidenciam os fatores de influência positiva ou negativa sobre os compostos analisados na matriz de água tratada.

Os quatro compostos apresentaram perfis semelhantes visto que para todos os compostos, os fatores de maior influência positiva foram a voltagem do detector e a etapa de *clean-up* realizada na pré – concentração por SPE.

Para os compostos coprostanol, colesterol e estigmasterol, o único fator de influência negativa foi a temperatura da interface. Para o composto colestanol nenhum dos fatores analisados gerou influências negativas.

FIGURA 45. Verificação da significância dos efeitos para os esteróis na matriz de água tratada (AT).

Quando um fator gera uma influência positiva, sugere que a alteração do mesmo na metodologia possa favorecer a análise dos compostos de interesse.

Porém, analisando os resultados dos gráficos de *Rankit* (FIG. 46) para os compostos na amostra de água tratada, observou-se que os efeitos das variações aplicadas não apresentaram significância sobre os resultados, pois os valores obtidos encontram-se abaixo do limite mais crítico, ME (*Margin of Error*) (Zeaiter *et al.*, 2004; Furusawa, 2007).

FIGURA 46. Gráficos de *rankit* para os esteróis na matriz de água tratada (AT).

Os gráficos de probabilidade normal apresentados na FIG. 47 representam o comportamento da distribuição dos resultados. Um comportamento linear significa que os dados têm distribuição normal, ou seja, encontram - se

distribuídos no intervalo entre -2 e +2 desvios padrão, o que significa que provavelmente não haja *outliers*.

FIGURA 47. Gráficos de probabilidade normal para os esteróis na matriz de água tratada (AT).

Os gráficos de robustez, *rankit* e probabilidade normal corroboram para a caracterização do método como robusto frente a pequenas variações para a matriz de água tratada.

Na FIG. 48 são apresentados os gráficos de robustez que evidenciam os fatores de influência positiva ou negativa sobre os compostos analisados na matriz de água bruta.

Os quatro compostos apresentaram perfis semelhantes, pois o fator de maior influência positiva para todos foi o pH da amostra. Apenas o coprostanol

apresentou os parâmetros temperatura do injetor e *clean-up* como fatores de influências negativas. Os demais compostos apresentaram apenas fatores de influências positivas.

FIGURA 48. Verificação da significância dos efeitos para os esteróis na matriz de água bruta (AB).

Analisando os resultados dos gráficos de *Rankit* (FIG. 49) para os compostos na amostra de água bruta, apenas o parâmetro pH da amostra apresentou valor ligeiramente acima do limite mais crítico, ME (*Margin of Error*).

Essa informação sugere que o parâmetro em questão encontra-se em uma região de atenção, ou seja, pode eventualmente exercer influência no processo de análise.

FIGURA 49. Gráficos de *rankit* para os esteróis na matriz de água bruta (AB).

Os gráficos de probabilidade normal apresentados na FIG. 50 representam o comportamento linear da distribuição dos resultados para os compostos na matriz de água bruta onde os dados encontram – se distribuídos no intervalo entre -2 e +2 desvios padrão, o que significa que provavelmente não haja *outliers*.

Os gráficos de robustez, *rankit* e probabilidade normal corroboram para a caracterização do método para água bruta como robusto frente a pequenas variações, porém o parâmetro pH da amostra deve estar sob controle.

FIGURA 50. Gráficos de probabilidade normal para os esteróis na matriz de água bruta (AB).

5.2.8. Incerteza de medição

Os resultados das incertezas expandidas obtidos para os esteróis nas matrizes de água tratada e água bruta são apresentados nas TAB. 34 e 35.

TABELA 34. Incertezas expandidas para os esteróis estudados em água tratada, considerando $k = 1,96$ e 95% de confiança.

Composto	Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Incerteza expandida	%
Coprostanol	0,773	$\pm 0,075$	9,70
Colesterol	0,500	$\pm 0,099$	19,80
Colestanol	0,152	$\pm 0,018$	11,84
Estigmasterol	0,148	$\pm 0,013$	8,78

TABELA 35. Incertezas expandidas para os esteróis estudados em água bruta, considerando $k = 1,96$ e 95% de confiança.

Composto	Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Incerteza expandida	%
Coprostanol	0,166	$\pm 0,022$	13,25
Colesterol	0,606	$\pm 0,069$	11,38
Colestanol	0,079	$\pm 0,012$	15,18
Estigmasterol	0,061	$\pm 0,011$	18,03

Analisando as contribuições de cada grandeza de entrada para a matriz de água tratada, constatou-se que para os compostos coprostanol, colestanol e estigmasterol a incerteza associada à recuperação influenciou de forma mais significativa a incerteza combinada.

Já para o colesterol a incerteza associada à curva analítica foi a maior contribuição para a incerteza combinada.

Essas contribuições calculadas a partir da equação 27 do item 4.7.15. do capítulo 4 desta dissertação, podem ser visualizadas na TAB. 36 e nas representações gráficas da FIG. 51.

TABELA 36. Contribuição da incerteza de cada grandeza de entrada no cálculo do mensurando no ensaio em água tratada (AT).

Composto	Valor calculado ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Contribuições de cada grandeza de entrada em matriz de AT				
		U_{curva}	$U_{\text{vol. final}}$	U_{rec}	$U_{\text{vol. Inicial}}$	$U_{\text{combinada}}$
Coprostanol	0,0007729	0,0168	0,0060	0,0464	0,0004	0,0000384
Colesterol	0,0005004	0,0950	0,0060	0,0344	0,0004	0,0000507
Colestanol	0,0001520	0,0171	0,0060	0,0352	0,0004	0,0000060
Estigmasterol	0,0001481	0,0283	0,0060	0,0353	0,0004	0,0000068

FIGURA 51. Representações gráficas das incertezas individuais envolvidas na análise dos esteróis na matriz de água tratada (AT).

Para a matriz de água bruta, constatou-se que para os compostos coprostanol, colesterol e estigmasterol a incerteza associada à recuperação também influenciou de forma mais significativa a incerteza combinada. O colestanol por sua vez apresentou a incerteza associada à curva analítica como maior contribuição para a sua incerteza combinada. Essas contribuições calculadas a partir da equação 27 do item 4.7.15. do capítulo 4 desta dissertação, podem ser visualizadas na TAB. 37 e nas representações gráficas da FIG. 52.

Estes resultados são coerentes, uma vez que as grandezas mencionadas estão relacionadas às concentrações e a resposta do equipamento.

TABELA 37 Contribuição da incerteza de cada grandeza de entrada no cálculo do mensurando no ensaio em água bruta (AB).

Composto	Valor calculado ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Contribuições de cada grandeza de entrada em matriz de AB				
		U_{curva}	$U_{\text{vol. final}}$	U_{rec}	$U_{\text{vol. Inicial}}$	$U_{\text{combinada}}$
Coprostanol	0,0001658	0,0119	0,0060	0,0677	0,0004	0,0000114
Colesterol	0,0006057	0,0363	0,0060	0,0451	0,0004	0,0000352
Colestanol	0,0000793	0,0621	0,0060	0,0488	0,0004	0,0000063
Estigmasterol	0,0000615	0,0456	0,0060	0,0765	0,0004	0,0000055

FIGURA 52. Representações gráficas das incertezas individuais envolvidas na análise dos esteróis na matriz de água bruta (AB).

No apêndice encontram-se os valores de todas as incertezas envolvidas nos cálculos de incertezas para os esteróis estudados em ambas as matrizes.

5.3. Aplicação do método proposto nas amostras de estudo

Para determinar a ocorrência e a concentração dos analitos de estudo foi aplicado o método desenvolvido e validado nas amostras de água tratada e bruta dos quatro municípios abastecidos pelo rio Paraíba do Sul. As coletas foram realizadas nos meses de junho, outubro e dezembro de 2011 contemplando épocas seca e chuvosa. Os valores encontrados (TAB. 38) são referentes às médias das triplicatas mais o valor das incertezas associadas considerando $k = 1,96$ e 95% de confiança.

TABELA 38. Resultados das análises das coletas das amostras de água tratada (AT) e água bruta (AB) dos quatro municípios da região do rio Paraíba do Sul.

1ª Coleta – Junho de 2011 - Concentração em $\mu\text{g L}^{-1}$ na amostra de 1L				
Amostra	Coprostanol	Colesterol	Colestanol	Estigmasterol
ATG	< LD	$0,79 \pm 0,12$	< LD	< LD
ATT	< LD	$0,31 \pm 0,09$	< LD	< LD
ATP	< LD	$0,28 \pm 0,05$	< LD	< LD
ATSJC	< LD	$0,10 \pm 0,03$	< LD	< LD
ABG	$0,48 \pm 0,05$	< LD	$0,21 \pm 0,03$	$0,10 \pm 0,02$
ABT	$0,80 \pm 0,02$	$1,83 \pm 0,02$	$0,42 \pm 0,01$	$0,21 \pm 0,01$
ABP	$1,01 \pm 0,02$	$0,71 \pm 0,02$	$0,60 \pm 0,01$	$0,22 \pm 0,02$
ABSJC	$0,82 \pm 0,08$	$1,04 \pm 0,01$	$0,40 \pm 0,01$	$0,16 \pm 0,01$
2ª Coleta – Outubro de 2011 - Concentração em $\mu\text{g L}^{-1}$ na amostra de 1L				
Amostra	Coprostanol	Colesterol	Colestanol	Estigmasterol
ATG	< LD	$0,17 \pm 0,02$	< LD	< LD
ATT	< LD	$0,10 \pm 0,01$	< LD	< LD
ATP	< LD	< 0,10	< LD	< LD
ATSJC	< LD	$0,16 \pm 0,01$	< LD	< LD
ABG	< LD	< 0,25	< LD	< 0,13
ABT	< 0,21	< 0,25	< LD	< LD
ABP	< 0,21	< 0,25	< LD	< LD
ABSJC	< 0,21	$0,60 \pm 0,13$	< LD	< 0,13
3ª Coleta – Dezembro de 2011 - Concentração em $\mu\text{g L}^{-1}$ na amostra de 1L				
Amostra	Coprostanol	Colesterol	Colestanol	Estigmasterol
ATG	< LD	< 0,10	$0,30 \pm 0,03$	< LD
ATT	< LD	< 0,10	$0,45 \pm 0,05$	< 0,22
ATP	$0,27 \pm 0,03$	$0,12 \pm 0,02$	$0,34 \pm 0,06$	< LD
ATSJC	< LD	< 0,10	< 0,12	< LD
ABG	$0,45 \pm 0,07$	$0,29 \pm 0,04$	$0,52 \pm 0,08$	< 0,13
ABT	< 0,21	$0,27 \pm 0,07$	< LD	< LD
ABP	< LD	$0,39 \pm 0,08$	< LD	< LD
ABSJC	< LD	< 0,25	$0,29 \pm 0,04$	< LD

Legenda: **ATG:** Água tratada de Guararema; **ATT:** Água tratada de Taubaté; **ATP:** Água tratada de Pindamonhangaba; **ATSJC:** Água tratada de São José dos Campos; **ABG:** Água bruta de Guararema; **ABT:** Água bruta de Taubaté; **ABP:** Água bruta de Pindamonhangaba; **ABSJC:** Água bruta de São José dos Campos. **LD:** Limite de detecção do método.

Guararema, o município de estudo menos populoso, deveria apresentar as menores concentrações dos marcadores químicos devido ao menor aporte de efluentes quando comparado aos municípios de estudo mais populosos.

Porém, ao observar a ocorrência dos esteróis nas amostras coletadas, constatou-se que não houve uma tendência de predominância de contaminação ao longo das coletas.

Os maiores níveis de contaminação foram observados na primeira coleta e esse resultado pode ser atribuído à baixa pluviosidade ocorrida durante o mês de junho causando a concentração dos analitos no corpo hídrico. A precipitação pluviométrica dos meses em que as coletas foram realizadas pode ser observada nas FIG. 5A a 7A do Apêndice.

Nas duas primeiras coletas, o colesterol foi o esterol predominante nas amostras de água tratada provenientes de todas as ETAs de estudo com concentrações médias de $0,37 \mu\text{g L}^{-1}$ na primeira coleta e $0,11 \mu\text{g L}^{-1}$ na segunda coleta.

Wenzel e colaboradores (2003) elaboraram um relatório acerca da qualidade das águas destinadas ao abastecimento público de diversos países da Europa. Os autores observaram uma média de $0,03 \mu\text{g L}^{-1}$ de colesterol evidenciando uma baixa contaminação quando comparado ao presente estudo.

Ghiselli (2006) observou na água tratada distribuída na região de Campinas uma média de $2,40 \mu\text{g L}^{-1}$ de colesterol, cerca de seis vezes mais ao observado nas amostras do presente estudo. Entretanto, na mesma área de estudo, Sodré e colaboradores (2010b) registraram em 33 % das amostras analisadas níveis de contaminação próximos aos encontrados no presente estudo, com média de $0,27 \mu\text{g L}^{-1}$ para o esteróide em questão.

Na terceira coleta, em pelo menos uma das ETAs de estudo, observou-se a presença dos demais esteróis na água tratada. As concentrações de estigmasterol ficaram abaixo do limite de quantificação ($0,22 \mu\text{g L}^{-1}$), porém a

ocorrência do mesmo já foi registrada por outros autores em águas potáveis brasileiras com uma média de $0,34 \mu\text{g L}^{-1}$ (Sodré *et al.*, 2010b).

Em águas destinadas ao abastecimento público de países europeus registrou-se média de $0,05 \mu\text{g L}^{-1}$ deste fitoesteróide (Wenzel *et al.*, 2003).

Na coleta em questão (dezembro/2011), a presença de coprostanol e colestanol nas amostras de água tratada foi observada. O coprostanol foi encontrado apenas na água tratada de Pindamonhangaba (ATP) com concentração de $0,28 \mu\text{g L}^{-1}$. O colestanol por sua vez foi observado na faixa entre $0,30$ a $0,45 \mu\text{g L}^{-1}$, com exceção da água tratada de São José dos Campos (ATSJC).

Até o presente momento, não foram encontrados registros da presença dos isômeros em águas destinadas ao abastecimento público. Essa escassez de informações gera grandes dificuldades em discutir se a presença destes marcadores inspira preocupação e atenção por parte dos órgãos responsáveis pela qualidade de água distribuída à população.

As concentrações encontradas de colesterol nas amostras de água bruta estiveram na faixa de $< 0,25$ a $1,83 \mu\text{g L}^{-1}$. O fitoesteróide estigmasterol por sua vez apresentou concentração na faixa $< 0,13$ a $0,22 \mu\text{g L}^{-1}$. Os isômeros coprostanol e colestanol apresentaram respectivamente concentrações nas faixas entre $< 0,21$ a $1,01 \mu\text{g L}^{-1}$ e $< 0,12$ a $0,60 \mu\text{g L}^{-1}$.

Kolpin e colaboradores (2002) ao realizarem as análises de 139 pontos de coletas de águas superficiais em 30 estados pertencentes aos Estados Unidos registraram níveis de colesterol na faixa entre $0,83$ a $1 \mu\text{g L}^{-1}$ e de coprostanol na faixa entre $0,080$ a $0,700 \mu\text{g L}^{-1}$. Esses pontos de coleta localizavam-se a jusante da intensa urbanização e produção pecuária.

Suprihatin e colaboradores (2003) investigaram a ocorrência de colesterol e estigmasterol em águas superficiais da Austrália. O colesterol foi o esteróide predominante com concentração na faixa de 1 a $9 \mu\text{g L}^{-1}$ enquanto que o estigmasterol apresentou concentração máxima de $34 \mu\text{g L}^{-1}$.

Szucs e colaboradores (2006) analisaram 38 amostras de águas superficiais em várias regiões da Hungria e observaram a presença dos esteróis em apenas 2 amostras com concentrações ligeiramente superiores ao limite de detecção do método (5 a 10 ng L⁻¹).

Saim e colaboradores (2009) analisaram um total de 48 amostras de águas de áreas poluídas do rio Langat na Malásia Peninsular. Os autores registraram a presença de coprostanol na faixa de 4 a 26 µg L⁻¹, colesterol na faixa de 52 a 59,9 µg L⁻¹ e estigmasterol na faixa de 1,8 a 7,5 µg L⁻¹. Com os resultados obtidos, foi possível traçar as fontes de contaminação fecal nas águas em questão.

Estudos realizados por Costa e colaboradores (2011) em estuário Mandaú-Manguaba localizado em Alagoas, registraram a ocorrência dos esteróis coprostanol, colesterol, colestanol e estigmasterol. Um total de 24 amostras de água bruta foram coletadas incluindo 10 pontos na lagoa de Manguaba, 5 pontos na lagoa de Mandaú, 5 pontos localizados em canais conectores destas lagoas e 4 pontos nos rio Mandaú, Paraíba do meio e Samaúna.

Todos os pontos coletados pelo autores mencionados acima apresentaram contaminação pelos quatro esteróis. O esterol coprostanol apresentou concentração na faixa de < 0,05 a 1,73 µg L⁻¹ enquanto seu isômero colestanol apresentou concentração na faixa de 0,06 a 0,42 µg L⁻¹. O colesterol registrou concentração variando entre < 0,05 a 2,14 µg L⁻¹ e o fitoesteróide estigmasterol apresentou concentração na faixa de < 0,05 a 7,20 µg L⁻¹.

Furtula e colaboradores (2012) realizaram estudos na bacia hidrográfica de Nathan Creek no Canadá para investigar a presença de 18 esteróis. Foram analisados 5 pontos de amostragens bem como um ponto controle sem nenhuma atividade humana. O esterol predominante foi o colesterol com concentração variando entre 0,02 a 58,21 µg L⁻¹, enquanto o coprostanol, colestanol e estigmasterol foram apenas detectados.

Diversos autores observaram a ocorrência dos esteróis em questão em amostras de águas bruta, porém na maioria dos trabalhos, os valores encontrados foram superiores aos encontrados na região avaliada do rio Paraíba do Sul (Cathum e Sabik, 2001; Suprihatin *et al.*, 2003; Ghiselli, 2006; Gilli *et al.*, 2006; Saim *et al.*, 2009; Costa *et al.*, 2011).

A presença do colesterol é justificada por fontes tanto naturais (fitoplâncton e zooplâncton) quanto antrópicas, portanto não pode ser utilizado como indicador direto de contaminação por esgoto doméstico (Braun, 2006; Martins *et al.*, 2008). No entanto, diversos autores associam o esterol em questão diretamente a excretas humanas (Sodré *et al.*, 2010b).

A presença do fitoesteróide estigmasterol nas amostras de água bruta se dá por meio da contribuição vegetal e pelo descarte de efluentes pecuários (Saim *et al.*, 2009). Porém, na água tratada, há registros de que o possível crescimento de algas no sistema de distribuição local seja uma das causas da presença do mesmo (Wenzel *et al.*, 2003).

O colestanol, embora também possa ter origem no interior do intestino de mamíferos, é normalmente encontrado *in situ* como produto da redução microbiana do colesterol no ambiente (Araújo *et al.*, 2011).

A presença do coprostanol indica que há descarga de esgoto doméstico nas águas brutas dos municípios de estudo, pois parte do esgoto coletado nos mesmos retorna ao corpo hídrico sem tratamento ou ainda contaminado com os compostos que não sofreram degradação nas ETEs.

Apesar da associação com o aporte de esgoto doméstico em águas, diversos autores não associam a presença do coprostanol com um risco eminente à saúde, pois a ausência de estudos epidemiológicos dificultam a relação entre a concentração do mesmo com a frequência de doenças de veiculação hídrica (Leeming e Nichols, 1996). No entanto, Gagné e colaboradores (2001), relataram que o coprostanol pode afetar a reprodução e desenvolvimento nos animais selvagens interferindo no funcionamento normal de seus sistemas endócrinos.

Muitos autores recomendaram limites máximos de coprostanol em amostras de águas naturais. Em sua tese de doutorado, Kirchmer (1971) recomendou valores máximos de coprostanol em águas cujo contato primário e secundário eram praticados. Para contato primário, o autor sugeriu a concentração de 2 a 4 $\mu\text{g L}^{-1}$ e para contato secundário a concentração de 20 a 40 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Correlações entre o número de coliformes fecais e a concentração de coprostanol foram realizadas por Dukta e colaboradores (1974). Os autores propuseram para contato primário em águas canadenses o limite de 500 ng L^{-1} de coprostanol, valor equivalente a 200 coliformes fecais por 100 mL de água.

Churchland e colaboradores (1982) recomendaram em estudos nas águas do rio Fraser no Canadá, que o limite de 400 ng L^{-1} de coprostanol era proporcional a 1000 coliformes fecais por 100 mL, critério utilizado no país para contato secundário.

Para contato primário em águas australianas, Leeming e colaboradores (1996) recomendaram concentração na faixa entre 60 a 400 ng L^{-1} de coprostanol. Em águas tropicais asiáticas, estudos sugeriram para contato secundário que concentrações entre 30 e 400 ng L^{-1} de coprostanol correspondiam a 1000 coliformes fecais por 100 mL de água (Isobe *et al.*, 2002; Isobe *et al.*, 2004).

No Brasil, a resolução CONAMA 357 (2005) dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento. Neste documento a definição para contato primário se refere ao contato direto e prolongado com a água (natação, mergulho, esqui-aquático) na qual a possibilidade do banhista em ingerir a mesma é elevada enquanto que para contato secundário está associada a atividades em que o contato com a água é esporádico ou acidental e a possibilidade de ingerir a mesma é pequena, como na pesca e navegação.

Estudos realizados pelo CEIVAP enquadraram a parcela paulista da bacia do rio Paraíba do Sul em classe 2. Para rios classe 2, a CONAMA 357 (2005) define para o uso de recreação de contato primário os padrões de qualidade de balneabilidade, previstos na Resolução CONAMA 274 (2000), de até 1000 coliformes termotolerantes por 100 mL de água.

Até o presente momento, nenhum estudo de correlação entre o número de bactérias e a concentração de coprostanol foi realizado em águas brasileiras. A concentração máxima de coprostanol obtida nas amostras de água bruta ficou ligeiramente acima do valor recomendado por autores que correlacionaram a concentração do marcador com critérios de qualidade de água semelhantes aos aplicados no Brasil (Churchland *et al.*, 1982; Isobe *et al.*, 2002; Isobe *et al.*, 2004).

Atualmente, não há legislação nacional ou internacional que contemple os esteróis de estudo em água tratada ou bruta. Relatórios sobre os níveis dos esteróis em águas destinadas ao abastecimento público são escassos quando comparados aos estudos relativos a sua ocorrência em esgoto e águas superficiais (Sodré *et al.*, 2010b).

Para superar tais limitações, diversos índices considerando razões de concentração de diferentes marcadores químicos têm sido utilizados tanto na avaliação do grau de impacto no ambiente como para avaliar transformações diagenéticas dessas moléculas e, assim, obter informações sobre sua persistência no ambiente (Cordeiro, 2006).

No presente trabalho, foram calculadas algumas das principais razões entre os esteróides estudados baseando-se na TAB. 39 com o intuito de avaliar o impacto causado na área de estudo. As relações foram calculadas (TAB. 40) apenas para as amostras de água bruta, pois não sofreram nenhum tipo de tratamento que alterasse as condições naturais das mesmas. As coletas que apresentaram concentrações dos esteróis abaixo do LQ e LD não tiveram seus índices calculados.

TABELA 39. Razões entre esteróis aplicados neste estudo.

Razão (R)	Razão entre os esteróis	Indicativos	Área Contaminada por esgoto doméstico	Área não contaminada	Referências Bibliográficas
R1	COP/(COP + COLESTAN)	Contaminação fecal humana	> 0,7	< 0,3	Grimalt <i>et al.</i> , 1990 Marvin <i>et al.</i> , 2001 Martins <i>et al.</i> , 2008 Froehner <i>et al.</i> , 2009
R2	COP/(COP + COLESTAN)	Redução <i>in situ</i> de colesterol	> 0,7	< 0,3	Grimalt <i>et al.</i> , 1990
R3	COP/COL	Contaminação fecal humana	> 0,5	< 0,5	Grimalt <i>et al.</i> , 1990 Takada <i>et al.</i> , 1994 Gilpin <i>et al.</i> , 2003 Carreira <i>et al.</i> , 2004
R4	COP/COLESTAN	Contaminação fecal humana	> 0,5	< 0,3	Shah <i>et al.</i> , 2007
R5	COP/(COLESTAN + COL)	Contaminação fecal humana	> 0,2	< 0,15	Chan <i>et al.</i> , 1998
R6	COL/(COL + COLESTAN)	Redução <i>in situ</i> de colesterol ou entrada de colestanol biogênico	> 0,7	< 0,7	Chaloux <i>et al.</i> , 1995

Legenda: COP: Coprostanol; COL: Colesterol; COLESTAN: Colestanol.

TABELA 40. Valores das razões entre os esteróis estudados nas amostras de água bruta nas três coletas realizadas.

1ª Coleta – Junho de 2011							
Amostras	Razões	R1	R2	R3	R4	R5	R6
ABG		0,69	0,69	-	2,25	-	-
ABT		0,65	0,65	0,43	1,90	0,35	0,81
ABP		0,63	0,63	1,42	1,70	0,77	0,54
ABSJC		0,67	0,67	0,79	2,06	0,57	0,72
2ª Coleta – Outubro de 2011							
Amostras	Razões	R1	R2	R3	R4	R5	R6
ABG		-	-	-	-	-	-
ABT		-	-	-	-	-	-
ABP		-	-	-	-	-	-
ABSJC		-	-	-	-	-	-
3ª Coleta – Dezembro de 2011							
Amostras	Razões	R1	R2	R3	R4	R5	R6
ABG		0,46	0,46	1,57	0,86	0,56	0,35
ABT		-	-	-	-	-	-
ABP		-	-	-	-	-	-
ABSJC		-	-	-	-	-	-

Os maiores valores para as razões entre os esteróis selecionadas foram observados na primeira coleta. Para a segunda coleta, nenhuma razão foi calculada devido à ausência de pelo menos um dos compostos relativos às razões.

A razão coprostanol/(coprostanol + colestanol) (R1) apresentou valores próximos a 0,7 apenas na primeira coleta. Esta razão, proposta para indicar a contaminação fecal humana para valores acima de 0,7, pode ser afetada por processos diagenéticos, devido à produção de colestanol *in situ* (Grimalt *et al.*, 1990). Esse perfil pode ser avaliado pela R2

Valores inferiores a 0,3 são característicos de ambientes não poluídos, onde o predomínio de colestanol é associado a fontes naturais (diagênese). Esse perfil não foi observado nas amostras, pois os valores encontrados foram superiores a 0,3. Alguns autores sugerem a utilização de um índice mais específico relacionando os isômeros 5 α e 5 β das estanonas, quando a área estudada apresentar valores entre 0,3 e 0,7 para esta razão (Cordeiro, 2006).

A razão coprostanol/colesterol (R3) pode indicar se a área está contaminada por esgoto doméstico. Valores elevados desta razão (superiores a 0,5) podem estar associados a contribuições por esgoto. O maior valor desta razão foi observado na terceira coleta para a água bruta de Guararema.

Para a razão coprostanol/colestanol (R4) valores acima de 0,5 indicam contaminação fecal humana (Shah *et al.*, 2007). Todas as amostras, cujas razões foram calculadas, apresentaram valores superiores ao mencionado.

Segundo Chan e colaboradores (1998), valores da razão coprostanol/(colestanol + colesterol) (R5) superiores a 0,2 indicam contaminação fecal propriamente humana. Todos os valores obtidos para esta razão nas amostras analisadas foram superiores a 0,2. Takada e Eganhouse (1998) também avaliaram essa relação e definiram que valores superiores a 1 indicariam área contaminada. Apenas a água bruta de Guararema apresentou valor superior a 1 indicando uma possível área contaminada.

Os valores entre 0,35 e 0,81 foram encontrados para a razão colesterol/(colesterol + colestanol) (R6). Valores acima de 0,7 indicam contaminação por esgoto doméstico, enquanto valores inferiores a 0,7 indicam redução extensiva do colesterol por processos diagenéticos (Chaloux *et al.*, 1995; Carreira *et al.*, 2001).

Com os resultados obtidos pelas razões, é possível caracterizar de forma preliminar a área de estudo com relação à contaminação fecal em pelo menos uma das coletas realizadas. Considerando o fato de que cada amostra representa um único momento e pode não ser representativa da real situação da região, um número maior de amostragens deve ser estudado para que as tendências sejam confirmadas e, com isso, atestar sobre a eficiência do tratamento realizado pelas ETEs da SABESP.

Em relação a qualidade da água tratada, a presença da maioria dos contaminantes foi inferior nas amostras de água tratada evidenciando a eficiência

do tratamento realizados nas ETAs da SABESP em reduzir a concentração dos mesmos.

5.4. Avaliação do teor de carbono orgânico total nas amostras de água

Segundo Burone e colaboradores (2003), altas concentrações de carbono orgânico em amostras ambientais podem estar associadas ao acúmulo de detritos oriundos de fontes antrópicas.

Neste contexto, o presente estudo com o intuito de observar tal associação, mensurou os valores das concentrações de carbono orgânico total (COT) (TAB. 41) para as matrizes de água tratada e bruta nas três coletas realizadas.

A partir dos resultados, verificou-se a tendência da matriz de água bruta em apresentar os maiores valores de COT corroborando com a observação de maiores concentrações dos esteróis nas amostras de água bruta.

TABELA 41. Concentração de carbono orgânico total (COT) para amostras de água tratada (AT) e água bruta (AB).

Amostras	Carbono Orgânico total (COT) (mg L ⁻¹)		
	1ª Coleta: Junho de 2011	2ª Coleta: Outubro de 2011	3ª Coleta: Dezembro de 2011
ATG	1,13 ± 0,02	0,87 ± 0,05	2,56 ± 0,02
ATT	1,24 ± 0,06	1,10 ± 0,08	2,98 ± 0,07
ATP	1,38 ± 0,07	1,29 ± 0,07	4,80 ± 0,16
ATSJC	1,88 ± 0,02	1,43 ± 0,09	2,37 ± 0,06
ABG	1,72 ± 0,04	1,95 ± 0,07	2,20 ± 0,01
ABT	2,57 ± 0,07	3,88 ± 0,14	6,54 ± 0,06
ABP	2,41 ± 0,04	3,72 ± 0,12	4,88 ± 0,07
ABSJC	2,74 ± 0,07	2,63 ± 0,14	5,35 ± 0,16

5.5. Aplicação da metodologia desenvolvida a outras amostras ambientais

As amostras de esgoto da ETE de Pindamonhangaba e da ETE de São José dos Campos (Lavapés) foram avaliadas por meio da metodologia desenvolvida e validada para amostras de água adaptada para as matrizes de efluentes. Na terceira coleta, a amostra de água referente a jusante ao lançamento de esgoto tratado da ETE de Pindamonhangaba foi avaliada com o

intuito de diagnosticar um possível impacto ambiental na região em questão. Os resultados estão apresentados na TAB. 42.

TABELA 42. Resultados das análises das coletas das amostras de esgoto tratado dos municípios de Pindamonhangaba e São José dos Campos situados na região do rio Paraíba do Sul.

1ª Coleta – Junho de 2011 - Concentração em $\mu\text{g L}^{-1}$				
Amostra	Coprostanol	Colesterol	Colestanol	Estigmasterol
ETL	17,62 $\pm$ 0,50	6,74 $\pm$ 0,67	1,02 $\pm$ 0,79	0,82 $\pm$ 0,59
ETP	8,25 $\pm$ 0,50	4,32 $\pm$ 0,50	0,69 $\pm$ 0,78	6,33 $\pm$ 0,89
2ª Coleta – Outubro de 2011 - Concentração em $\mu\text{g L}^{-1}$				
Amostra	Coprostanol	Colesterol	Colestanol	Estigmasterol
ETL	8,21 $\pm$ 0,50	5,90 $\pm$ 0,61	0,97 $\pm$ 0,12	0,99 $\pm$ 0,08
ETP	3,42 $\pm$ 0,06	3,55 $\pm$ 0,08	0,59 $\pm$ 0,05	3,70 $\pm$ 0,08
3ª Coleta – Dezembro de 2011 - Concentração em $\mu\text{g L}^{-1}$				
Amostra	Coprostanol	Colesterol	Colestanol	Estigmasterol
ETL	36,14 $\pm$ 3,86	16,26 $\pm$ 3,04	3,13 $\pm$ 0,70	2,30 $\pm$ 0,33
ETP	1,93 $\pm$ 0,11	3,88 $\pm$ 0,17	< LD	12,74 $\pm$ 0,40
JUSANTE	<0,215	<0,250	<LD	<LD

Legenda: LD do colestanol para matriz de esgoto tratado: 0,04 $\mu\text{g L}^{-1}$

LD do estigmasterol para matriz de esgoto tratado: 0,05 $\mu\text{g L}^{-1}$

Ao comparar os resultados obtidos para as amostras de esgoto tratado (TAB. 42) com os observados nas amostras de água bruta dos municípios de Pindamonhangaba e São José dos Campos (TAB. 38), foi possível constatar que o fator diluição e o processo natural de autodepuração do rio Paraíba do Sul se mostraram eficientes na redução da concentração dos compostos. A sedimentação dos esteróis, em virtude da baixa solubilidade em água, também reduziu a presença dos mesmos nas amostras de água bruta. Os resultados obtidos pela amostra referente a jusante ao lançamento de esgoto tratado da ETE de Pindamonhangaba também corroborou com essa evidência.

6. CONCLUSÃO

- 1) A metodologia desenvolvida por este estudo mostrou-se, com base no processo de validação, ser adequada para a análise dos esteróis coprostanol, colesterol, colestanol e estigmasterol como marcadores químicos nas matrizes de água tratada e bruta.
- 2) A partir de estudos metodológicos, constatou-se que a etapa de derivatização foi relevante e primordial para a análise dos esteróis em virtude da maior sensibilidade observada.
- 3) A metodologia desenvolvida mostrou ser linear, precisa e exata na faixa de trabalho proposta, fornecendo resultados de área diretamente proporcionais à concentração dos analitos dentro de uma variação aceitável fornecendo confiabilidade estatística aos dados gerados.
- 4) Em ambas as matrizes, os esteróis de interesse apresentaram nos três níveis de concentração estudados, valores de recuperação dentro da faixa recomendada pela literatura. Observou-se maior influência da matriz de água bruta para o nível baixo de concentração para o analito colesterol.
- 5) A partir dos resultados de robustez, a metodologia foi considerada robusta para ambas as matrizes. Entretanto, constatou-se que o parâmetro pH para a matriz de água bruta encontra-se em uma região de atenção o que sugere que o mesmo deve estar sob controle durante toda a análise.
- 6) Com a aplicação do cálculo de incerteza, foi possível constatar para a metodologia desenvolvida que as maiores fontes de incerteza foram as associadas às curvas analíticas e à recuperação.
- 7) Constatou-se pela aplicação da metodologia nas amostras de água provenientes do rio Paraíba do Sul, que há a ocorrência dos marcadores químicos em ambas as matrizes, sendo predominante a presença do colesterol. Em relação à qualidade da água de abastecimento, a presença da

maioria dos contaminantes foi inferior quando comparada as amostras de água bruta evidenciando a eficiência do tratamento realizados nas ETAs da SABESP em reduzir a concentração dos mesmos.

- 8) A avaliação de impacto usando os índices descritos na literatura possibilitou caracterizar de forma preliminar a área de estudo com relação à contaminação fecal em pelo menos uma das coletas realizadas. Porém, um número maior de amostragens deve ser estudado para que as tendências sejam confirmadas e, com isso, atestar sobre a eficiência do tratamento realizado pelas ETEs da SABESP.
- 9) Estes resultados proporcionaram uma avaliação satisfatória da área de estudo, contribuindo com o plano de gestão de recursos hídricos da região do rio Paraíba do Sul, SP e indicando uma preocupação quanto ao aumento do aporte de esgoto doméstico nas águas superficiais.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho de pesquisa é de suma importância em virtude dos escassos estudos envolvendo marcadores químicos em águas destinadas ao abastecimento público. Com a aplicação da metodologia desenvolvida e validada foi possível realizar um diagnóstico preliminar da área de estudo auxiliando o plano de gestão de recursos hídricos dos municípios selecionados no que concerne em melhorias em seu gerenciamento e na revisão das leis vigentes de controle ambiental por parte dos órgãos legisladores.

Nos tópicos abaixo são apresentadas sugestões para trabalhos futuros:

- Avaliação da porção não dissolvida dos esteróis presentes na água bruta e tratada, por meio de investigação dos sólidos gerados na etapa de filtração.
- Sugere-se o monitoramento contínuo da área estudada para confirmação de tendências, além de atestar sobre a eficiência do tratamento realizado pelas ETEs e ETAs da SABESP.
- Avaliação da ocorrência de outros representantes da classe dos esteróis.
- A aplicação de técnicas cromatográficas mais sensíveis objetivando alcançar limites de detecção inferiores aos obtidos neste estudo, além de otimizações nas etapas de tratamento de amostra.
- Propõe-se ainda, a realização de estudos ecotoxicológicos com as amostras da região de estudo bem como para os marcadores monitorados isoladamente.

8. APÊNDICE

Resultados das incertezas parciais envolvidas no cálculo de Incertezas para os compostos com recuperação acima de 90%.

CÁLCULO DE INCERTEZAS PARA O COPROSTANOL

1. Incerteza da preparação da solução padrão estoque

Grandezas de entrada: pureza do padrão e volume final da solução estoque.

Componentes de incertezas:

$$u(m) = 0,0353701 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$u(P) = 0,0115470 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$u(V) = 0,0120944 \mu\text{g mL}^{-1}$$

Incerteza combinada:

$$UC (\text{Coprostanol}_{\text{sol.padrão}}) = 0,00391 \mu\text{g mL}^{-1} \text{ (solução } 25 \mu\text{g mL}^{-1}\text{)}$$

2. Incerteza da preparação da solução de trabalho intermediária

Grandezas de entrada: incerteza da solução estoque, volume pipetado da solução estoque individual para preparação da solução mista de trabalho e volume final da solução mista de trabalho.

Componentes de incertezas:

$$u(C_{\text{sol. estoque}}) = 0,00391235 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$\text{calibração} = 0,000433013$$

$$\text{repe} = 0,00025$$

$$\Delta t = 3,03109\text{E-}05$$

$$\rightarrow u(V_{i_{\text{estoque}}}) = 0,005009179 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$\text{calibração} = 0,011547005$$

$$\text{repe} = 0,003162278$$

$$\Delta t = 0,001212436$$

$$\rightarrow u(V_{\text{final}}) = 0,012033426 \mu\text{g mL}^{-1}$$

Incerteza combinada:

$$u_C (\text{Coprostanol}_{\text{sol_intermediária}}) = 0,057270955 \mu\text{g mL}^{-1}$$

3. Incerteza da preparação das soluções de calibração para a curva analítica

Grandezas de entrada: incerteza da solução de trabalho, volume pipetado da solução de trabalho e volume dos balões usados para diluição das soluções.

Incerteza volume pipetado para cada solução da curva.

Componentes de incertezas:

$$\text{calibração} = 6,9282\text{E-}05$$

$$\text{repe} = 8,86279\text{E-}07 \quad \rightarrow u(V_{1_{\text{sol.trabalho}}}) = 6,92903\text{E-}05 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$\Delta t = 6,06218\text{E-}07$$

$$\text{calibração} = 0,000173205$$

$$\text{repe} = 1,79992\text{E-}06 \quad \rightarrow u(V_{2_{\text{sol.trabalho}}}) = 0,00173219 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$\Delta t = 1,21244\text{E-}06$$

$$\text{calibração} = 0,00034641$$

$$\text{repe} = 0,00002 \quad \rightarrow u(V_{3_{\text{sol.trabalho}}}) = 0,000346996 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$\Delta t = 2,42487\text{E-}06$$

$$\text{calibração} = 0,00069282$$

$$\text{repe} = 0,00004 \quad \rightarrow u(V_{4_{\text{sol.trabalho}}}) = 0,000693991 \mu\text{g.mL}^{-1}$$

$$\Delta t = 4,84974\text{E-}06$$

$$\text{calibração} = 0,00046188$$

$$\text{repe} = 0,00008 \quad \rightarrow u(V_{5_{\text{sol.trabalho}}}) = 0,000468858 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$\Delta t = 9,69948\text{E-}06$$

Incerteza vial 1mL:

$$\text{calibração} = 0,005773503$$

$$\text{repe} = 0,001755148 \quad \rightarrow u(V_{\text{vial_1mL}}) = 0,006035609 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$\Delta t = 0,000121244$$

Incerteza combinada para cada uma das soluções da curva:

$u_C(\text{Coprostanol}_{\text{C1sol_curva}}) = 0,001873646 \mu\text{g mL}^{-1}$ (solução $0,125 \mu\text{g mL}^{-1}$)

$u_C(\text{Coprostanol}_{\text{C2sol_curva}}) = 0,004530447 \mu\text{g mL}^{-1}$ (solução $0,250 \mu\text{g mL}^{-1}$)

$u_C(\text{Coprostanol}_{\text{C3sol_curva}}) = 0,009073705 \mu\text{g mL}^{-1}$ (solução $0,500 \mu\text{g mL}^{-1}$)

$u_C(\text{Coprostanol}_{\text{C4sol_curva}}) = 0,018147409 \mu\text{g mL}^{-1}$ (solução $1 \mu\text{g mL}^{-1}$)

$u_C(\text{Coprostanol}_{\text{C4sol_curva}}) = 0,017113947 \mu\text{g mL}^{-1}$ (solução $2 \mu\text{g mL}^{-1}$)

Os cálculos até aqui apresentados podem ser aplicados às duas matrizes (água tratada e bruta), uma vez que as grandezas de entrada não envolvem as respostas das amostras. A seguir são descritas individualmente as incertezas calculadas para as curvas analíticas e a recuperação de cada matriz.

- **MATRIZ ÁGUA TRATADA**

1. Incerteza da curva analítica

Grandezas de entrada: área das amostras, área do branco, soluções da curva (C1 a C5), áreas referentes às soluções da curva.

Incerteza combinada da curva analítica

$u_C(\text{Coprostanol}_{\text{curva_analítica}}) = 0,0156 \mu\text{g mL}^{-1}$

2. Incerteza da recuperação

Grandezas de entrada: concentração da solução padrão e resultado da concentração encontrada.

Incerteza combinada da recuperação:

$u(C_{\text{real}}) = 0,03341717 \mu\text{g mL}^{-1}$

$u(C_{\text{encontrada}}) = 0,032181353 \mu\text{g mL}^{-1}$

$u_C(\text{Coprostanol}_{\text{recuperação}}) = 0,0556 \mu\text{g mL}^{-1}$

- **MATRIZ ÁGUA BRUTA**

1. Incerteza da curva analítica

Grandezas de entrada: área da amostras, área do branco, soluções da curva (C1 a C5), áreas referentes às soluções da curva.

Incerteza combinada da curva analítica

$$u_C (\text{Coprostanol}_{\text{curva_analítica}}) = 0,0022 \mu\text{g mL}^{-1}$$

2. Incerteza da recuperação

Grandezas de entrada: concentração da solução padrão e resultado da concentração encontrada.

Incerteza combinada da recuperação:

$$u(C_{\text{real}}) = 0,06515281 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$u(C_{\text{encontrada}}) = 0,018405526 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$u_C (\text{Coprostanol}_{\text{recuperação}}) = 0,0755 \mu\text{g mL}^{-1}$$

CÁLCULO DE INCERTEZAS PARA O COLESTEROL

1. Incerteza da preparação da solução padrão estoque

Grandezas de entrada: pureza do padrão e volume final da solução estoque.

Componentes de incertezas:

$$u(m) = 0,0353701 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$u(P) = 0,0057735 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$u(V) = 0,0120944 \mu\text{g mL}^{-1}$$

Incerteza combinada:

$$u_C (\text{Colesterol}_{\text{sol.padrão}}) = 0,00378 \mu\text{g mL}^{-1} \text{ (solução } 10 \mu\text{g mL}^{-1}\text{)}$$

2. Incerteza da preparação da solução de trabalho intermediária

Grandezas de entrada: incerteza da solução estoque, volume pipetado da solução estoque individual para preparação da solução mista de trabalho e volume final da solução mista de trabalho.

Componentes de incertezas:

$$u(C_{\text{sol. estoque}}) = 0,003782391 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$\text{calibração} = 0,001732051$$

$$\text{repe} = 0,001 \quad \rightarrow u(V_{i_{\text{estoque}}}) = 0,002003672 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$\Delta t = 0,000121244$$

$$\text{calibração} = 0,011547005$$

$$\text{repe} = 0,003162278 \quad \rightarrow u(V_{\text{final}}) = 0,012033426 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$\Delta t = 0,001212436$$

Incerteza combinada:

$$u_C(\text{Colesterol}_{\text{sol. intermediária}}) = 0,023141857 \mu\text{g mL}^{-1}$$

3. Incerteza da preparação das soluções de calibração para a curva analítica

Grandezas de entrada: incerteza da solução de trabalho, volume pipetado da solução de trabalho e volume dos balões usados para diluição das soluções.
Incerteza volume pipetado para cada solução da curva.

Componentes de incertezas:

$$\text{calibração} = 0,000277128$$

$$\text{repe} = 3,54512\text{E-}06 \quad \rightarrow u(V_{1_{\text{sol. trabalho}}}) = 0,000277161 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$\Delta t = 2,42487\text{E-}06$$

$$\text{calibração} = 0,00069282$$

$$\text{repe} = 7,19968\text{E-}06 \quad \rightarrow u(V_{2_{\text{sol. trabalho}}}) = 0,000692875 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$\Delta t = 4,84974\text{E-}06$$

calibração = 0,001385641

repe = 0,00008

→ $u(V_{3_sol.trabalho}) = 0,001387982 \mu\text{g mL}^{-1}$

$\Delta t = 9,69948\text{E-}06$

calibração = 0,002424871

repe = 0,00014

→ $u(V_{4_sol.trabalho}) = 0,002428969 \mu\text{g mL}^{-1}$

$\Delta t = 1,69741\text{E-}05$

calibração = 0,001818653

repe = 0,00021

→ $u(V_{5_sol.trabalho}) = 0,001830915 \mu\text{g mL}^{-1}$

$\Delta t = 2,54611\text{E-}05$

Incerteza vial 1mL

calibração = 0,005773503

repe = 0,001755148

→ $u(V_{vial_1\text{mL}}) = 0,006035609 \mu\text{g mL}^{-1}$

$\Delta t = 0,000121244$

Incerteza combinada para cada uma das soluções da curva:

$u_C(\text{Colesterol_C1sol_curva}) = 0,003028422 \mu\text{g mL}^{-1}$ (solução $0,200 \mu\text{g mL}^{-1}$)

$u_C(\text{Colesterol_C2sol_curva}) = 0,00732268 \mu\text{g mL}^{-1}$ (solução $0,400 \mu\text{g mL}^{-1}$)

$u_C(\text{Colesterol_C3sol_curva}) = 0,014666067 \mu\text{g mL}^{-1}$ (solução $0,800 \mu\text{g mL}^{-1}$)

$u_C(\text{Colesterol_C4sol_curva}) = 0,025665617 \mu\text{g mL}^{-1}$ (solução $1,4 \mu\text{g mL}^{-1}$)

$u_C(\text{Colesterol_C4sol_curva}) = 0,022574865 \mu\text{g mL}^{-1}$ (solução $2,1 \mu\text{g mL}^{-1}$)

Os cálculos até aqui apresentados podem ser aplicados às duas matrizes (água tratada e bruta), uma vez que as grandezas de entrada não envolvem as respostas das amostras. A seguir são descritas individualmente as incertezas calculadas para as curvas analíticas e a recuperação de cada matriz.

- **MATRIZ ÁGUA TRATADA**

1. Incerteza da curva analítica

Grandezas de entrada: área da amostras, área do branco, soluções da curva (C1 a C5), áreas referentes às soluções da curva.

Incerteza combinada da curva analítica:

$$u(C_{\text{Colesterol}_{\text{curva_analítica}}}) = 0,0484 \mu\text{g mL}^{-1}$$

2. Incerteza da recuperação

Grandezas de entrada: concentração da solução padrão e resultado da concentração encontrada.

Incerteza combinada da recuperação:

$$u(C_{\text{real}}) = 0,02933062 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$u(C_{\text{encontrada}}) = 0,017947 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$u(C_{\text{Colesterol}_{\text{recuperação}}}) = 0,0350 \mu\text{g mL}^{-1}$$

- **MATRIZ ÁGUA BRUTA**

1. Incerteza da curva analítica

Grandezas de entrada: área da amostras, área do branco, soluções da curva (C1 a C5), áreas referentes às soluções da curva.

Incerteza combinada da curva analítica:

$$u(C_{\text{Colesterol}_{\text{curva_analítica}}}) = 0,0223 \mu\text{g mL}^{-1}$$

2. Incerteza da recuperação

Grandezas de entrada: concentração da solução padrão e resultado da concentração encontrada.

Incerteza combinada da recuperação:

$$u(C_{\text{real}}) = 0,03937181 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$u(C_{\text{encontrada}}) = 0,022025019 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$u_C (\text{Colesterol}_{\text{recuperação}}) = 0,0458 \mu\text{g mL}^{-1}$$

CÁLCULO DE INCERTEZAS PARA O COLESTANOL**1. Incerteza da preparação da solução padrão estoque**

Grandezas de entrada: pureza do padrão e volume final da solução estoque.

Componentes de incertezas:

$$u(m) = 0,0353701 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$u(P) = 0,0288675 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$u(V) = 0,0120944 \mu\text{g mL}^{-1}$$

Incerteza combinada:

$$u_C (\text{Coletanol}_{\text{sol.padrão}}) = 0,00472 \mu\text{g mL}^{-1} \text{ (solução } 20 \mu\text{g mL}^{-1}\text{)}$$

2. Incerteza da preparação da solução de trabalho intermediária

Grandezas de entrada: incerteza da solução estoque, volume pipetado da solução estoque individual para preparação da solução mista de trabalho e volume final da solução mista de trabalho.

Componentes de incertezas:

$$u(C_{\text{sol. estoque}}) = 0,004722974 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$\text{calibração} = 0,003464102$$

$$\text{repe} = 0,002 \quad \rightarrow u(V_{i_{\text{estoque}}}) = 0,004007343 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$\Delta t = 0,000242487$$

$$\text{calibração} = 0,011547005$$

$$\text{repe} = 0,003162278 \quad \rightarrow u(V_{\text{final}}) = 0,012033426 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$\Delta t = 0,001212436$$

Incerteza combinada:

$$u_C (\text{Colesterol}_{\text{sol_intermediária}}) = 0,044417778 \mu\text{g mL}^{-1}$$

3. Incerteza da preparação das soluções de calibração para a curva analítica

Grandezas de entrada: incerteza da solução de trabalho, volume pipetado da solução de trabalho e volume dos balões usados para diluição das soluções.

Incerteza volume pipetado para cada solução da curva.

Componentes de incertezas:

$$\text{calibração} = 6,9282\text{E-}05$$

$$\text{repe} = 8,86279\text{E-}07 \quad \rightarrow u(V_{1_sol.trabalho}) = 6,92904\text{E-}05 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$\Delta t = 6,06218\text{E-}07$$

$$\text{calibração} = 0,000173205$$

$$\text{repe} = 1,79992\text{E-}06 \quad \rightarrow u(V_{2_sol.trabalho}) = 0,000173219 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$\Delta t = 1,21244\text{E-}06$$

$$\text{calibração} = 0,001385641$$

$$\text{repe} = 0,00008 \quad \rightarrow u(V_{3_sol.trabalho}) = 0,001387982 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$\Delta t = 9,69948\text{E-}06$$

$$\text{calibração} = 0,002424871$$

$$\text{repe} = 0,00014 \quad \rightarrow u(V_{4_sol.trabalho}) = 0,002428969 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$\Delta t = 1,69741\text{E-}05$$

$$\text{calibração} = 0,001818653$$

$$\text{repe} = 0,00021 \quad \rightarrow u(V_{5_sol.trabalho}) = 0,001830915 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$\Delta t = 2,54611\text{E-}05$$

Incerteza vial 1mL:

$$\text{calibração} = 0,005773503$$

$$\text{repe} = 0,001755148 \quad \rightarrow u(V_{\text{vial_1mL}}) = 0,006035609 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$\Delta t = 0,000121244$$

Incerteza combinada para cada uma das soluções da curva:

$$u_C (\text{Coestanol_C1sol_curva}) = 0,001453034 \mu\text{g mL}^{-1} \text{ (solução } 0,100 \mu\text{g mL}^{-1}\text{)}$$

$$u_C (\text{Coestanol_C2sol_curva}) = 0,003513412 \mu\text{g mL}^{-1} \text{ (solução } 0,200 \mu\text{g mL}^{-1}\text{)}$$

$$u_C (\text{Coestanol_C3sol_curva}) = 0,028147038 \mu\text{g mL}^{-1} \text{ (solução } 1,600 \mu\text{g mL}^{-1}\text{)}$$

$$u_C (\text{Coestanol_C4sol_curva}) = 0,049257317 \mu\text{g mL}^{-1} \text{ (solução } 2,800 \mu\text{g mL}^{-1}\text{)}$$

$$u_C (\text{Coestanol_C4sol_curva}) = 0,043325684 \mu\text{g mL}^{-1} \text{ (solução } 4,200 \mu\text{g mL}^{-1}\text{)}$$

Os cálculos até aqui apresentados podem ser aplicados às duas matrizes (água tratada e bruta), uma vez que as grandezas de entrada não envolvem as respostas das amostras. A seguir são descritas individualmente as incertezas calculadas para as curvas analíticas e a recuperação de cada matriz.

• MATRIZ ÁGUA TRATADA

1. Incerteza da curva analítica

Grandezas de entrada: área da amostras, área do branco, soluções da curva (C1 a C5), áreas referentes às soluções da curva.

Incerteza combinada da curva analítica:

$$u_C (\text{Coestanol}_{\text{curva_analítica}}) = 0,0027 \mu\text{g mL}^{-1}$$

2. Incerteza da recuperação

Grandezas de entrada: concentração da solução padrão e resultado da concentração encontrada.

Incerteza combinada da recuperação:

$$u(C_{\text{real}}) = 0,0269211 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$u(C_{\text{encontrada}}) = 0,022607173 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$u_C (\text{Coestanol}_{\text{recuperação}}) = 0,0359 \mu\text{g mL}^{-1}$$

- **MATRIZ ÁGUA BRUTA**

1. Incerteza da curva analítica

Grandezas de entrada: área da amostras, área do branco, soluções da curva (C1 a C5), áreas referentes às soluções da curva.

Incerteza combinada da curva analítica:

$$u(C_{\text{Colesterol}_{\text{curva_analítica}}}) = 0,0049 \mu\text{g mL}^{-1}$$

2. Incerteza da recuperação

Grandezas de entrada: concentração da solução padrão e resultado da concentração encontrada.

Incerteza combinada da recuperação:

$$u(C_{\text{real}}) = 0,04473205 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$u(C_{\text{encontrada}}) = 0,019605042 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$u(C_{\text{Colesterol}_{\text{recuperação}}}) = 0,0486 \mu\text{g mL}^{-1}$$

CÁLCULO DE INCERTEZAS PARA O ESTIGMASTEROL

1. Incerteza da preparação da solução padrão estoque

Grandezas de entrada: pureza do padrão e volume final da solução estoque.

Componentes de incertezas:

$$u(m) = 0,0353701 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$u(P) = 0,0288675 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$u(V) = 0,0120944 \mu\text{g mL}^{-1}$$

Incerteza combinada:

$$u(C_{\text{Estigmasterol}_{\text{sol.padrão}}}) = 0,00472 \mu\text{g mL}^{-1} \text{ (solução } 20 \mu\text{g mL}^{-1}\text{)}$$

2. Incerteza da preparação da solução de trabalho intermediária

Grandezas de entrada: incerteza da solução estoque, volume pipetado da solução estoque individual para preparação da solução mista de trabalho e volume final da solução mista de trabalho.

Componentes de incertezas:

$$u(C_{\text{sol. estoque}}) = 0,004722974 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$\text{calibração} = 0,003464102$$

$$\text{repe} = 0,002 \quad \rightarrow u(V_{i_{\text{estoque}}}) = 0,004007343 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$\Delta t = 0,000242487$$

$$\text{calibração} = 0,011547005$$

$$\text{repe} = 0,003162278 \quad \rightarrow u(V_{\text{final}}) = 0,012033426 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$\Delta t = 0,001212436$$

Incerteza combinada:

$$u_C(\text{Estigmasterol}_{\text{sol. intermediária}}) = 0,044417778 \mu\text{g mL}^{-1}$$

3. Incerteza da preparação das soluções de calibração para a curva analítica

Grandezas de entrada: incerteza da solução de trabalho, volume pipetado da solução de trabalho e volume dos balões usados para diluição das soluções.
Incerteza volume pipetado para cada solução da curva.

Componentes de incertezas:

$$\text{calibração} = 6,9282\text{E-}05$$

$$\text{repe} = 8,86279\text{E-}07 \quad \rightarrow u(V_{1_{\text{sol. trabalho}}}) = 6,92904\text{E-}05 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$\Delta t = 6,06218\text{E-}07$$

$$\text{calibração} = 0,000173205$$

$$\text{repe} = 1,79992\text{E-}06 \quad \rightarrow u(V_{2_{\text{sol. trabalho}}}) = 0,000173219 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$\Delta t = 1,21244\text{E-}06$$

calibração = 0,00034641

repe = 0,00002

→ $u(V_{3_sol.trabalho}) = 0,000346996 \mu g mL^{-1}$

$\Delta t = 2,42487E-06$

calibração = 0,00069282

repe = 0,00004

→ $u(V_{4_sol.trabalho}) = 0,000693991 \mu g mL^{-1}$

$\Delta t = 4,84974E-06$

calibração = 0,00046188

repe = 0,00008

→ $u(V_{5_sol.trabalho}) = 0,000468858 \mu g mL^{-1}$

$\Delta t = 9,69948E-06$

Incerteza vial 1mL:

calibração = 0,005773503

repe = 0,001755148

→ $u(V_{vial_1mL}) = 0,006035609 \mu g mL^{-1}$

$\Delta t = 0,000121244$

Incerteza combinada para cada uma das soluções da curva:

$u_C(\text{Estigmasterol_C1sol_curva}) = 0,001453034 \mu g mL^{-1}$ (solução 0,100 $\mu g mL^{-1}$)

$u_C(\text{Estigmasterol_C2sol_curva}) = 0,003513412 \mu g mL^{-1}$ (solução 0,200 $\mu g mL^{-1}$)

$u_C(\text{Estigmasterol_C3sol_curva}) = 0,00703676 \mu g mL^{-1}$ (solução 0,400 $\mu g mL^{-1}$)

$u_C(\text{Estigmasterol_C4sol_curva}) = 0,014073519 \mu g mL^{-1}$ (solução 0,800 $\mu g mL^{-1}$)

$u_C(\text{Estigmasterol_C4sol_curva}) = 0,013272117 \mu g mL^{-1}$ (solução 1,600 $\mu g mL^{-1}$)

Os cálculos até aqui apresentados podem ser aplicados às duas matrizes (água tratada e bruta), uma vez que as grandezas de entrada não envolvem as respostas das amostras. A seguir são descritas individualmente as incertezas calculadas para as curvas analíticas e a recuperação de cada matriz.

- **MATRIZ ÁGUA TRATADA**

1. Incerteza da curva analítica

Grandezas de entrada: área da amostras, área do branco, soluções da curva (C1 a C5), áreas referentes às soluções da curva.

Incerteza combinada da curva analítica:

$$u_C (\text{Estigmasterol}_{\text{curva_analítica}}) = 0,0039 \mu\text{g mL}^{-1}$$

2. Incerteza da recuperação

Grandezas de entrada: concentração da solução padrão e resultado da concentração encontrada.

Incerteza combinada da recuperação:

$$u(C_{\text{real}}) = 0,02721409 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$u(C_{\text{encontrada}}) = 0,022537094 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$u_C (\text{Estigmasterol}_{\text{recuperação}}) = 0,0325 \mu\text{g mL}^{-1}$$

- **MATRIZ ÁGUA BRUTA**

1. Incerteza da curva analítica

Grandezas de entrada: área da amostras, área do branco, soluções da curva (C1 a C5), áreas referentes às soluções da curva.

Incerteza combinada da curva analítica:

$$u_C (\text{Estigmasterol}_{\text{curva_analítica}}) = 0,0026 \mu\text{g mL}^{-1}$$

2. Incerteza da recuperação

Grandezas de entrada: concentração da solução padrão e resultado da concentração encontrada.

Incerteza combinada da recuperação:

$$u(C_{\text{real}}) = 0,06650548 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$u(C_{\text{encontrada}}) = 0,037886477 \mu\text{g mL}^{-1}$$

$$uC (\text{Estigmasterol}_{\text{recuperação}}) = 0,0713 \mu\text{g mL}^{-1}$$

FIGURA 1A. Espectro de massas do derivado trimetil-silílico do coprostanol. Fonte: Adaptado de Stefens (2006).

FIGURA 2A. Espectro de massas do derivado trimetil-silícico do colesterol. Fonte: Adaptado de Stefens (2006).

FIGURA 3A. Espectro de massas do derivado trimetil-silícico do colestanol. Fonte: Adaptado de Stefens (2006).

FIGURA 4A. Espectro de massas do derivado trimetil-silícico do estigmasterol. Fonte: Adaptado de Stefens (2006).

FIGURA 5A. Balanço hídrico observado em junho de 2011 em São Paulo, Brasil. Fonte: Adaptado de CIIAGRO (2011).

FIGURA 6A. Balanço hídrico observado em outubro de 2011 em São Paulo, Brasil. Fonte: Adaptado de CIIAGRO (2011).

FIGURA 7A. Balanço hídrico observado em dezembro de 2011 em São Paulo, Brasil. Fonte: Adaptado de CIIAGRO (2011).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT/INMETRO. **Guia para a Expressão da Incerteza de Medição (GUM). Terceira edição brasileira em língua portuguesa**. Rio de Janeiro: ABNT, INMETRO, p. 120, 2003.

ABNT ISO/IEC Guia 43-1 – **Ensaio de proficiência por comparações interlaboratoriais Parte 1: Desenvolvimento e operação de programas de ensaios de proficiência**. Rio de Janeiro: ABNT, INMETRO, 1999.

ÁGUA, sem ela não dá. **Revista TAE: Especializada em tratamento de água e efluentes**, n. 1, p. 30-32, 2011.

AMARANTE, J.O.P.; CALDAS, E.P.A.; BRITO, N.M.; SANTOS, T.C.R.; VALE, M. L.B.F. **Validação de métodos analíticos: uma breve revisão**. Cad. Pesq., v. 12, p. 116-131, 2001.

ANDRÁSI, N.; HELENKÁR, A.; ZÁRAY, G.; VASANITS, A.; MOLNÁR-PERL, I. Derivatization and fragmentation pattern analysis of natural and synthetic steroids, as their trimethylsilyl (oxime) ether derivatives by gas chromatography mass spectrometry: Analysis of dissolved steroids in wastewater samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 1878-1890, 2011.

ARAÚJO, M. P.; COSTA, T. L. F.; CARREIRA, R. S. Esteróis como indicadores do acúmulo de esgotos domésticos em sedimentos de um sistema estuarino-lagunar tropical (Mundaú-Manguaba, AL). **Química Nova**, v. 34, n. 1, p. 64-70, 2011.

AHMED, W.; KIRS, M.; GILPIN, B. **Microbial Source Tracking: Methods, Applications and Case Studies**, 2011, Cap 21, p. 485, Source Tracking in Australia and New Zealand: Case Studies.

BANDEIRA, C.M.; FERREIRA, J.M.; BRAGAGNOLO, N.; MARIUTTI, L.R.B. Desenvolvimento de metodologia analítica para determinação de colesterol em ração para ruminantes através de planejamento experimental fatorial. **Química Nova**, v. 31, n. 6, p. 1422-1426, 2008.

BARROS, C.B. Validação de métodos analíticos. **Biológico**, v. 64, p. 175-177, 2002.

BARRIONUEVO, W.R.; LANÇAS, F.M. Extração em fase sólida (SPE) e micro extração em fase sólida (SPME) de piretróides em água. **Química Nova**, v. 24, n. 2, p. 172-175, 2001.

BEDAQUE, F.M.A.; ARREZZE, B.C.M.; BEDAQUE, L.F. A gestão participativa na Bacia Hidrográfica do Rio Paraíba do Sul: percursos para

uma análise sócio-espacial. In: **Anais II Seminário de Recursos Hídricos da Bacia Hidrográfica do Paraíba do Sul: Recuperação de Áreas Degradadas, Serviços Ambientais e Sustentabilidade**, Taubaté, p. 717-724, 2009.

BERNARDES, A.C.M.; SOUZA, S.V.C. Análise comparativa do guia para validação de Métodos analíticos proposto pela ANVISA (RE nº 899 de 2003) com o documento orientativo do INMETRO e o protocolo internacional harmonizado pela AOAC internacional, ISO e IUPAC. **Revista Analytica**, n. 51, p. 66-77, 2011.

BERRY, C.; LLOYD, B.J.; COLBOURNE, J.S. Effect of heat shock on recovery of *Escherichia coli* from drinking water. **Water Science Technology**, n. 24, p. 85-88, 1991.

BJORKHEM, I.; EINARSSON, K.; GUSTAFSSON, J.A. b-Hydroxy-D5-C19- and C21-steroid oxidoreductase activity in rat liver. **Steroids**, v. 19, p. 471-476, 1972.

BRAGA, B.P.F.; FLECHA, R.; PENA, D.S.; KELMAN, J. Pacto federativo e gestão de águas. **Estudos avançados**, v. 22, n. 63, 2008.

BRASIL. Agência nacional de vigilância sanitária do ministério da saúde (ANVISA). **Consulta pública nº 107**, D.O.U. de 28/11/2003, Brasília, 2003.

BRASIL. Ministério do desenvolvimento urbano e meio ambiente. Conselho nacional do meio ambiente (CONAMA). **Resolução n. 357**, D.O.U. de 17/03/05, Brasília, 2005.

BRASIL. Ministério do meio ambiente Lei Federal 9.433, de 08/01/1997. Institui a Política Nacional de Recursos Hídricos e cria o Sistema Nacional de Gerenciamento de Recursos Hídricos. Disponível em: <http://ceivap.org.br/base_6.php>. Acesso em 16 jan. 2012.

BRAUN, J.A.F. **Uso de esteróides na avaliação de aportes antrópicos e naturais da matéria orgânica no Complexo Estuarino de Paranaguá**. 2006. Dissertação (Mestrado) - Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande do Sul.

BRITO, C.F. **Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em sedimentos. Avaliação da represa do Parque do Parque Pedroso, Santo André, SP**. 2009. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN/USP, São Paulo.

BROOKS, C. J. W. **Some aspects of mass spectrometry in research on steroids**. Phil. Trans. R. Soc. London A, 1979.

BURKHARDT, W.; CALCI, K.R.; WATKINS, W.D.; RIPPEY, S.R.; CHIRTEL, S.J. Inactivation of indicator microorganisms in estuarine waters. **Water Research**, n. 34, p. 2207-2214, 2000.

BURONE, L.; MUNIZ, P.; PIRES-VANIN, A.M.S.; RODRIGUES, M. Spatial distribution of organic matter in the surface sediments of Ubatuba Bay (Southeastern – Brazil). In: **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 75, n. 1, p. 77-90, 2003.

CANUEL, E.A.; MARTENS, C.S. Seasonal variations in the sources and alteration of organic matter associated with recently-deposited sediments. **Org. Geochem**, v. 20, p. 563-577, 1993.

CARREIRA, R.; WAGENER, A.L.R.; FILEMAN, T.; READMAN, J.W. Distribuição de coprostanol (5 β -coleston-3 β -ol) em Sedimentos Superficiais da Baía de Guanabara: Indicador da poluição recente por Esgotos domésticos. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 37-42, 2001.

CARREIRA, R.S.; WAGENER, A.L.R.; READMAN, J.W. Sterols as markers of sewage contamination in a tropical urban estuary (Guanabara Bay, Brazil): space-time variations. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 60, n. 4, p. 587-598, 2004.

CATHUM, S.; SABIK, H.; TRAVERSI, D.; SCHILIRO, T. Determination of Steroids and Coprostanol in Surface Water, Effluent and Mussel Using Gas Chromatography-Mass Spectrometry. **Chromatographia**, v. 53, p. 394-399, 2001.

CEIVAP – AGEVAP. **Relatório de situação: bacia hidrográfica do rio Paraíba do Sul 2008-2009**. Resende, RJ: CEIVAP – AGEVAP, 2009.

CEIVAP – AGEVAP. **Relatório de situação: bacia hidrográfica do rio Paraíba do Sul 2010-2011**. Resende, RJ: CEIVAP – AGEVAP, 2011.

CETESB – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. **Guia de coleta e preservação de amostras de água**. São Paulo: CETESB, 1987.

CETESB – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. **Relatório de qualidade das águas interiores no estado de São Paulo 2009**. São Paulo: CETESB, 2010. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/agua/aguas-superficiais/35-publicacoes-/relatorios>. Acesso em 22 mar. 2012.

CHALAU, N.; TAKADA, H.; BAYONA, J.M. Molecular markers in Tokyo bay sediments: sources and distribution. **Marine Environmental Research**, v. 40, n. 1, p. 77- 92, 1995.

CHAN, K.H.; LAM, M.H.W.; POON, K.F.; YEUNG, H.Y.; CHIU, T.K.T. Application of sedimentary fecal stanols and sterols in tracing sewage pollution in coastal waters. **Water Research**, v. 32, n. 1, p. 225-235, 1998.

CHOU, C.C.; LIU, Y.P. Determination of fecal sterols in the sediments of different wastewater outputs by GC-MS. **Intern. J. Environ. Anal. Chem.**, v. 84, n. 5, p. 379-388, 2004.

CHUI, Q.S.H.; BARROS, C.B.; SILVA, T.D. Parâmetros r e R obtidos de programa interlaboratorial–como usá-los. **Química Nova**, v. 32, n. 8, p. 2209-2213, 2009.

CHURCHLAND, L.M.; KAN, G.; AGES, A. Variation in faecal pollution indicators through tidal cycles in Fraser River estuary. **Can. J. Microbiol.**, v. 28, p. 239-247, 1982.

CIOLA, R. **Fundamentos da cromatografia a gás**. Editora Edgard Blücher LTDA, 1985.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Editora Unicamp, 2006. Cap. 8, Cromatografia Gasosa. p. 244.

CORDEIRO, L.G.M.S. **Esteróis como marcadores moleculares da contaminação fecal no sistema estuarino Iguaçu-Sarapuí, noroeste da Baía de Guanabara (RJ)**. 2006. Dissertação (Mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

COSTA, T.L.F.; ARAÚJO, M.P.; KNOPPERS, B.A.; CARREIRA, R.S. Sources and Distribution of Particulate Organic Matter of a Tropical Estuarine-Lagoon System from NE Brazil as Indicated by Lipid Biomarkers. **Aquat Geochem.**, v. 17, p. 1-19, 2011.

DIEKMAN, J.; DJERASSI, C. Mass spectrometry in structural and stereochemical problems. CXXV. Mass spectrometry of some steroid trimethylsilyl ethers. **Journal Organic Chemistry**, v. 32, p. 1005-1012, 1967.

DIENER, A.C.; LI, H.; ZHOU, W.; WHORISKEY, W.J.; NES, W.D.; FINK, G.R. Sterol methyltransferase 1 Controls the Level of Cholesterol in Plants. **The Plant Cell**, v. 12, p. 853-870, 2000.

DUTKA, B.J.; CHAU, A.S.Y.; COBURN, J. Relationship between bacterial indicators of water pollution and fecal sterols. **Water Research**, v. 8, p. 1047-1055, 1974.

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

EURACHEM .Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement, 3rd Edition. 2012.

FARIA, L.J.S. **Avaliação de diferentes sorventes na extração em fase sólida de pesticida em água. Desenvolvimento e validação de metodologia**. 2004. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Campinas, São Paulo.

FCR. **Plano da Bacia Hidrográfica do Paraíba do Sul – UGRHI 02 – 2009-2012**. São Paulo: Fundação Christiano Rosa, 2009.

FEICHAS, S.A.Q. **Fatores que facilitam e que dificultam o funcionamento do Comitê da Bacia Hidrográfica do Rio Paraíba do Sul**. 2002. Dissertação (Mestrado) - Universidade federal Fluminense, Niterói.

FIRME, L.P. **Caracterização físico-química de solos de mangue e avaliação de sua contaminação por esgoto doméstico via traçadores fecais**. 2003. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, São Paulo.

FROEHNER, S.; SOUZA, D.B.; MACHADO, K.S.; ROSA, E.C. Tracking Anthropogenic Inputs in Barigui River, Brazil Using Biomarkers. **Water Air Soil Pollut**, v. 210, p. 33-41, 2010.

FURTULA, V.; OSACHOFF, H.; DERSEN, G.; JUAHIR, H.; COLODEY, A.; CHAMBERS, P. Inorganic nitrogen, sterols and bacterial source tracking as tools to characterize water quality and possible contamination sources in surface water. **Water research**, v. 46, p. 1079-1092, 2012.

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

GAGNÉ, F.; BLAISE, C.; LACHANCE, G.I.; SUNAHARA, G.I.; SABIK, H. Evidence of coprostanol estrogenicity to the freshwater mussel *Elliptio complanata*. **Environmental Pollution**, v. 115, p. 97-106, 2001.

GALVÃO, L.E. As águas não vão mais rolar. O alto preço do desperdício. Rumos. ABDE Editorial, ano 24, no. 168, janeiro 2000.

GHISELLI, G. **Avaliação da qualidade das águas destinadas ao abastecimento público na região de Campinas: ocorrência e determinação dos interferentes endócrinos (IE) e produtos farmacêuticos e de higiene pessoal (PFHP)**. 2006. Tese (Doutorado) - Universidade de Campinas, São Paulo.

GIL, J.S.B.; RICCI, F.; DIAS, N.W. A contextualização histórica da bacia do rio Paraíba do Sul - trecho paulista – para a análise dos projetos do FEHIDRO. In: **XII Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e VIII Encontro Latino Americano de Pós-Graduação** – Universidade do Vale do Paraíba. São José dos Campos, SP, 2008.

GILLI, G.; ROVERE, R.; TRAVERSI, D.; SCHILIRO, T.P.C. Faecal sterols determination in wastewater and surface water. **Journal of Chromatography B**, v. 842, p. 120-124, 2006.

GILPIN, B.; JAMES, T.; NOUROZI, F.; SAUNDERS, D.; SCHOLLES, P.; SAVILL, M. The use of chemical and molecular microbial indicators for fecal source identification. **Water Science Technology**, v. 47, n. 3, p. 39-43, 2003.

GONZÁLEZ, A.G.; HERRADOR, M.A.; ASUERO, A.G. Intra-laboratory testing of method accuracy from recovery assays. **Talanta**, v. 48, p. 729-736, 1999.
GRIMALT, J.O.; FERNANDEZ, P.; BAYONA, J.M.; ALBAIGES, J. Assessment of fecal sterols and ketones as indicators of urban sewage inputs to coastal waters. **Environmental Science & Technology**, v.24, p. 357-363, 1990.

GRUBEN, A.; LOPES, P.D.; JOHNSON, R.M.F. **A bacia do rio Paraíba do Sul, São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais – 2001**. Brasília: Projeto Marca D'água, 2002.

GUIA CITAC/EURACHEM. **Guia para qualidade em química analítica. Uma assistência à acreditação**. Versão Brasileira. 2002.

HARRIS, D.C. **Análise Química Quantitativa**. Editora LTC, 2008.

HATCHER, P.G.; MCGILIVARY, P.A. Sewage contamination in the New York Bight: Coprostanol as an indicator. **Environmental Science & Technology**, v.13, n.10, p. 1225-1229, 1979.

HAWKINS-WRITER, J.; LEENHEER, J.A.; BARBER, L.B.; AMY, G.L.; CHAPRA, S.C. Sewage Contamination in the Upper Mississippi River as Measured by the Fecal Sterol, Coprostanol, **Water Research**, v. 29, n. 6, p. 1427-1436, 1995.

HERNANDES, J.C. **Determinação de marcadores orgânicos no perfil sedimentar do complexo estuarino de Paranaguá (PR) por CG-EM**. 2009. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande do Sul.

HEYDEN, Y.V.; NIJHUIS, A.; SMEYERS-WERBEKE, J.; VANDEGINSTE, B.G.M.; MASSART, L. Guidance for robustness/ruggedness tests in methods validation. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 24, p 723-753, 2001.

HORWITZ, W. Quality Assurance in the analysis of foods for trace constituents. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, v. 63, n. 6, p. 1344-1354, 1980.

HORWITZ, W.; ALBERT, R. The Horwitz ratio (HorRat): a useful index of method performance with respect to precision. **Journal of AOAC International**, v. 89, n. 4, 2006.

HUSSAIN, M.A.; FORD, R.; HILL, J. Determination of fecal contamination indicator sterols in an Australian water supply system. **Environ. Monit. Assess**, v. 165, p. 147-157, 2010.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Diretoria de pesquisas, Departamento de População e Indicadores Sociais, Pesquisa Nacional de Saneamento Básico**, 2000.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **IBGE Cidades**. Disponível em< <http://www.ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm?1>>. Acesso em 10 jan. 2012.

INMETRO – Instituto Nacional De Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos**. Rio de Janeiro. DOQ-CGCRE-008. Revisão 01. Mar. 2003.

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos**. Rio de Janeiro. DOQ-CGCRE-008. Revisão 02. Jun. 2007.

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos**. Rio de Janeiro. DOQ-CGCRE-008. Revisão 03. Fev. 2010a.

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. NIT-DICLA-021. **Expressão da incerteza de medição**. Rev. 04 de fev. 2010b.

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos**. Rio de Janeiro. DOQ-CGCRE-008. Revisão 04. Fev. 2011.

ISO (International Standard Organization).ISO/IEC 17025.**General requirements for the competence of testing and calibration laboratories**, 2005.

ISOBE, K.O.; TARAO, M.; ZAKARIA, M.P.; CHIEM, N.H.; MINH, L.Y., TAKADA, H. Quantitative application of fecal sterols using gás chromatography–mass spectrometry to investigate fecal pollution in tropical waters: Western Malaysia and Mekong Delta, Vietnam. **Environmental Science & Technology**, v. 36, n. 21, p. 4497-4507, 2002.

ISOBE, K.O.; TARAO, M.; CHIEM, N.H.; MINH, L.Y.; TAKADA, H. Effect of Environmental Factors on the Relationship between Concentrations of Coprostanol and Fecal Indicator Bacteria in Tropical (Mekong Delta) and Temperate (Tokyo) Freshwaters. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 2, p. 814-821, 2004.

JEANNOT, R.; SABIH, H.; SAUVARDA, E.; DAGNACA, T.; DOHRENDORF, K. Determination of endocrine-disrupting compounds in environmental samples using gas and liquid chromatography with mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 974, p. 143-159, 2002.

JUNIOR, D. I. S. A degradação da bacia do rio Paraíba do Sul. **ENGEVISTA**, v. 6, n. 3, p. 99-105, 2004.

KAWAKAMI, S.K.; MONTONE, R.C. An efficient ethanol-based analytical protocol to quantify faecal steroids in marine sediments. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 13, n. 2, p. 226-232, 2002.

KIRCHMER, C.J. **5 Beta-Cholestan-3Beta-ol na indicator of fecal pollution**. 1971. Tese (Doutorado) – Universidade da Flórida, EUA.

KISTEMANN, T.; CLASEN, T.; KOCH, C.; DANGENDORF, F.; FISCHER, R.; GEBEL, J.; VACATA, V.; EXNER, M. Microbial load of drinking water reservoir tributaries during extreme rainfall and runoff. **Appl. Environ. Microbiol**, n. 68, p. 2188 – 2197, 2002.

KNAPP. **Handbook of Analytical Derivatization Reactions**. John Wiley & Sons, New York, 1979.

KOLPIN, D.W.; FURLONG, E.T.; MEYER, M.T.; THURMAN, E.M.; BARBER, L.B.; BUXTON, H.T. Pharmaceuticals, Hormones, and Other Organic Wastewater Contaminants in U.S. Streams, 1999-2000: A National Reconnaissance. **Environmental Science & Technology**, v. 36, n. 6, p. 1202-1211, 2002.

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

LANÇAS, F.M. **Validação de métodos cromatográficos de análises**. São Carlos: RiMa, 2004b.

LEBLANC, L.A.; LATIMER, J.S.; ELLIS, J.T.; QUINN, J.G. The geochemistry of coprostanol in waters and surface sediments from Narragansett Bay. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 34, p. 439-458, 1992.

LEEMING, R.; BALL, A.; ASHBOLT, N.; NICHOLS, P. Using faecal sterols from humans and animals to distinguish faecal pollution in receiving waters. **Water Research**, v. 30, n.12, p. 2893-2900, 1996.

LEEMING, R.; NICHOLS, P.D. Concentrations of coprostanol that correspond to existing bacterial indicator guideline limits. **Water Research**, v. 30, n. 12, p. 2997-3006, 1996.

LEHNINGER, A.L. **Princípios de bioquímica**. São Paulo: Editora Savier, 1970.

LEITE, F. **Validação em análise química**. 5.ed. Campinas, SP: Editora Átomo, 2008. Cap. 17, Fator de recuperação. p. 135-137.

LIMA DA COSTA, R.; CARREIRA, R.S. A comparison between faecal sterols and coliform counts in the investigation of sewage contamination in sediments. **Brazilian Journal of Oceanography**, v. 53, n. 3/4, p. 157-167, 2005.

MALDONADO, C.; VENKATESAN, M.I.; PHILLIPS, C.R.; BAYONA, J.M. Distribution of Trialkylamines and Coprostanol in San Pedro Shelf Sediments Adjacent to a Sewage Outfall. **Marine Pollution Bulletin**, v. 40, n. 8, p. 680-687, 2000.

MARTINEZ, Y.M.; HERNANDEZ, R.H.; LEGUA, C.M.; FALCÓ, P.C. Improving analysis of apolar organic compounds by the use of a capillary titania-based column: Application to the direct determination of faecal sterols cholesterol and coprostanol in wastewater samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 4682-4687, 2010.

MARTINS, C.C. **Avaliação de introdução de esteróides fecais e hidrocarbonetos marcadores geoquímicos em sedimentos da baía da Almirantado, Península Antártica**. 2001. Dissertação (Mestrado) – Instituto Oceanográfico, São Paulo.

MARTINS, C.C.; AZEREDO, F.A.A.; FERREIRA, J.A.; MONTONE, R.C. Marcadores de contaminação por esgotos sanitários em sedimentos superficiais da baía de Santos, São Paulo. **Química Nova**, v. 31, n. 1, p. 1008-1014, 2008.

MARTINS, R.F. **Avaliação da presença de metais e de biomarcadores fecais em sedimentos do rio Barigüi na região metropolitana de Curitiba – PR**. 2008. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Paraná.

MARVIN, C.; COAKLEY, J.; MAYER, T.; BROWN, M.; THIESSEN, L. Application of Faecal Sterol Ratios in Sediments and Effluents as Source Tracers. **Water Qual. Res. J. Canada**, v. 36, n. 4, p. 781-792, 2001.

MCMASTER, M.; MCMASTER, C. **GC/MS a practical user's guide**. Ed. Wiley-VCH, USA, 1998.

MURTAUGH, J.J.; BUNCH, R.L. Sterols as a measure of faecal pollution. **Research Journal Water Pollution**. v. 39, p. 404-409, 1967.

NICHOLS, P.D.; LEEMING, R.; RAYNER, M.S.; LATHAM, V.; ASHBOLT, N.J.; TURNER, C. Comparison of the abundance of the faecal sterol coprostanol and faecal bacterial groups in inner-shelf waters and sediments near Sydney, Australia. **J. Chromatog.**, v. 643, p. 189-195, 1992.

NIVEN, S.; JA, J.; HETHERIDGE S.M.; EVANS, M.; MCEVOY, J.; ROWLAND, S.J. Investigations of cholesterol transformation during sewage treatment: relevance to estrogen formation pathways? **The Science of the Total Environment**, v. 279, p. 75-86, 2001.

NOBLET, J.A.; YOUNG, D.L.; ZENG, E.Y.; ENSARI, S. Use of fecal steroids to infer the sources of fecal indicator bacteria in the lower Santa Ana River

watershed, California: Sewage is unlikely a significant source. ***Environmental Science & Technology***, v. 38, p. 6002-6008, 2004.

NOVAES, R.C. **Cooperação e conflito nas águas da Bacia do rio Paraíba do Sul: Limites e possibilidades de gestão integrada no “trecho paulista”**. 2006. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, São Paulo.

NUNES, C.A.; CAMPOS, D.H. Avaliação da robustez de métodos analíticos utilizando planejamentos fatoriais fracionários. ***Revista Analytica***, n. 38, p 46-53, 2009.

OSMAN, R.; SAIM, N.; JUAHI, H.; ABDULLAH, M.P. Chemometric application in identifying sources of organic contaminants in Langat river basin. ***Environ. Monit. Assess.*** , v. 184, p. 1001-1014, 2012.

OTOMO, J.I. **Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para determinação de hormônios, considerados disruptores endócrinos, nas águas destinadas ao abastecimento público na região do rio Paraíba do Sul, SP**. 2010. Dissertação (Mestrado). Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN/USP, São Paulo.

PASCHOAL, J.A.R.; RATH, S.; AIROLDI, F.P.R. Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos em alimentos. ***Química Nova***, v. 31, n. 5, p.1190-1198, 2008.

PEREIRA, H.M.G.; MARQUES, M.A.S.; CARDOSO, J.N.; NETO, F.R.A. Análise de glicocorticosteróides por CG-EM: uma nova abordagem de derivatização para o controle de dopagem no esporte. ***Química Nova***, v. 25, n. 1, p. 1096-1102, 2002.

PIIRONEN, V.; LINDSAY, D.G.; MIETTINEN, T.A.; TOIVO, J.; LAMPI, A.M. Review - Plant sterols: biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition. ***J. Sci. Food Agric.***, v. 80, n. 7, p.939-966, 2000.

PINHO, J.S.A.; LUNA, A.S. O limite de detecção em química analítica. ***Revista Analytica***, n. 38, p 66-70, 2009.

POCKINGTLON, R.; LEONARD, J.D.; CREWE, N.F. Le coprostanol comme indicateur de la contamination fécale dans l'eau de mer et les sédiments marins. ***Oceanologica Acta***, v. 10, n. 1, p. 83-89, 1987.

PRATT, C. **Investigations into faecal sterols and *E. coli* as indicators of sewage and non-sewage inputs into a subtropical estuarine embayment system in South Eastern QLD, Australia**. 2005. Tese (Doutorado) – Department of Environmental and Applied Sciences, Griffith University, Queensland.

QUESTIER, F.; VANDER HEYDEN, Y.; MASSART, D.L. RTS, a computer program for the experimental set-up and interpretation of ruggedness tests. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 18, p. 287-303, 1998.

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, n. 5, p. 771-780, 2004.

RM – Rede Metrológica RS. **RM 68 - Incerteza de Medição: Guia Prático do Avaliador de Laboratórios**. Revisão. 03 de fev. 2009.

ROCHA E SILVA, H.; SILVA, C.C.M.; NETO, L.B.C.; LOPES, J.A.D.; CITÓ, A.M.G.L.; CHAVES, M.H. Constituintes químicos das cascas do caule de *cenostigma macrophyllum*: ocorrência de colesterol. **Química Nova**, v. 30, n. 8, p. 1877-1881, 2007.

SABESP. **Sua região**. Disponível em <http://site.sabesp.com.br/site/a-sabesp/sua-regiao.aspx?secaold=18>. Acesso em 16 jan. 2012.

SAIM, N.; OSMAN, R.; SPIAN, D.R.S.A.; JAAFAR, M.Z.; JUAHIR, H.; ABDULLAH, M.; GHANI, F.A. Chemometric approach to validating faecal sterols as source tracer for faecal contamination in water. **Water Research**, v. 43, p. 5023-5030, 2009.

SANTOS, B.C.D.B. **Desenvolvimento, aperfeiçoamento e validação de método cromatográfico para previsão da qualidade e propriedades físico-químicas do óleo diesel tipo B**. 2009. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, São Paulo.

SÃO JOSÉ DOS CAMPOS. **Prefeitura da Cidade de São José dos Campos**. Disponível em <http://www.sjc.sp.gov.br/>. Acesso em 16 jan. 2012.

SAVICHTCHEVA, O.; OKABE, S. Alternative indicators of fecal pollution: Relations with pathogens and conventional indicators, current methodologies for direct pathogen monitoring and future application perspectives. **Water Research**, v. 40, p. 2463-2476, 2006.

SCHONNING, C.; LEEMING, R.; STENSTROM, T.A. Faecal contamination of source-separated human urine based on the content of faecal sterols. **Water Research**, v. 36, p. 1965-1972, 2002.

SCHUMMER, C.; DELHOMME, O.; APPENZELLER, B.M.R.; WENNIG, R.; MILLET, M. Comparison of MTBSTFA and BSTFA in derivatization reactions of polar compounds prior to GC/MS analysis. **Elsevier**, v. 77, p. 1473-1482, 2009.

SENATORE, D.B. **Uso de marcadores orgânicos moleculares na determinação da origem da matéria orgânica em sedimentos do Sistema**

Estuarino - Lagunar de Cananéia - Iguape – SP - Brasil. 2010. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, São Paulo.

SERRA, G.A.N.; SOUZA, A.A.M. Industrialização em São José dos Campos, SP: uma análise das atividades econômicas do distrito industrial do chácaras reunidas. In: **XV Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e XI Encontro Latino Americano de Pós-Graduação** – Universidade do Vale do Paraíba. São José dos Campos, SP, 2011.

SERRICCHIO, C.; CALAES, V.; FORMIGA-JOHNSSON, R.M.; LIMA, A.J.R.; ANDRADE, E.P. **O CEIVAP e a gestão integrada dos recursos hídricos da bacia do rio Paraíba do Sul Um relato da prática.** Prêmio Caixa Melhores Práticas em Gestão Local, 2005.

SHAH, V.G.; DUNSTAN, R.H.; GEARY, P.M.; COOMBES, P.; ROBERTS, T.K.; VON NAGY-FELSOBUKI, E. Evaluating potential applications of faecal sterols in distinguishing sources of faecal contamination from mixed faecal samples. **Water Research**, v. 41, n. 16, p. 3691- 3700, 2007.

SHIMADA, K.; MITAMURA, K.; HIGASHI, T. Gas chromatography and high-performance liquid chromatography of natural steroids. **Journal of Chromatography A**, v. 935, p. 141-172, 2001.

SILVÉRIO, F.O. **Caracterização de extrativos de madeira de eucalyptus e depósitos de pitch envolvidos na fabricação de celulose e papel.** 2008. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais.

SINGH, S.P.; AZUA, A.; CHAUDHARY, A.; KHAN, S.; WILLETT, K.L.; GARDINALI, P.R. Occurrence and distribution of steroids, hormones and selected pharmaceuticals in South Florida coastal environments. **Ecotoxicology**, v. 19, p. 338-350, 2010.

SJÖSTRÖM, E.; ALÉN, R. **Analytical Methods in wood chemistry, pulping, and papermaking.** Springer. Germany, 1998. p. 316.

SODRÉ, F.F; LOCATELLI, M.A.F.; JARDIM, W.F. Sistema limpo em linha para extração em fase sólida de contaminantes em águas naturais. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 216-219, 2010a.

SODRÉ, F.F; LOCATELLI, M.A.F.; JARDIM, W.F. Occurrence of Emerging Contaminants in Brazilian Drinking Waters: A Sewage-To-Tap Issue. **Water Air Soil Pollut**, v. 206, p. 57-67, 2010b.

SOUZA, R.R. **Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para determinação de disruptores endócrinos resultantes de atividades antrópicas nas águas da região do rio Paraíba do Sul, sp.** Dissertação (Mestrado). Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN/USP, São Paulo, 2011.

STEFENS, J.L. **Caracterização molecular de compostos orgânicos biogênicos e antropogênicos em sedimentos da lagoa Rodrigo de Freitas Rio de Janeiro**. Dissertação (Mestrado). Instituto Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2006.

SUPELCO®. **Certificado de Análise do BSTFA**. Sigma-Aldrich, Inc. 2003.

SUPRIHATIN, I.; FALLOWFIELD, H.; BENTHAM, R.; CROMAR, N. Determination of faecal pollutants in Torrens and Patawalonga catchment waters in South Australia using faecal sterols. **Water Science and Technology**, v. 47, n. 7-8, p. 283- 289, 2003.

SZUCS, S.; SÁRVÁRY, A.; CAIN, T.; ÁDÁNY, R. Method Validation for the Simultaneous Determination of Fecal Sterols in Surface Waters by Gas Chromatography–Mass Spectrometry. **Journal of Chromatographic Science**, v. 44, p. 70-76, 2006.

TAKADA, H.; EGANHOUSE, R.P. **Molecular markers of anthropogenic waste**. p.2883-2940. 1998. In: R. A. MEYERS (Ed.). *Encyclopedia of Environmental Analysis and Remediation*. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1998.

TAKADA, H.; SATOH, F.; BOTHNER, M.H.; TRIPP, B.W.; JOHNSON, C.G.; FARRINGTON, J.W. **Anthropogenic molecular markers: tools to identify the sources and transport pathways of pollutants**. (ACS Symposium Series n. 671). p.178-195, 1997. In: EGANHOUSE, R. P. (Ed.). *Molecular markers in environmental geochemistry*. Washington: American Chemical Society, 1997.

TAUBATÉ. **Guia oficial on line**. Disponível em <http://www.taubate-sp.com.br/informacoes.htm>. Acesso em 16 jan. 2012.

THOMPSON, M.; ELLISON, S.L.R.; WOOD, R. *Harmonized guidelines for single-laboratory validation of method of analysis*. **IUPAC Technical Report. Pure Appl. Chem.**, v. 72, n. 5, p. 835-855, 2002.

TUCCI, C.E.M. Águas urbanas. **Estudos Avançados**, v. 22, n. 63, 2008.

TYAGI, P.; EDWARDS, D.R.; COYNE, M.S. Use of selected chemical markers in combination with a multiple regression model to assess the contribution of domesticated animal sources of fecal pollution in the environment. **Chemosphere**, v. 69, p. 1617-1624, 2007.

USEPA - United States Environmental Protection Agency. **Distribution System Indicators of Drinking Water Quality**. Washington, 2006.

USEPA - United States Environmental Protection Agency. **Method 1698: Steroids and Hormones in Water, Soil, Sediment, and Biosolids by HRGC/HRMS**. Washington, 2007.

VALIDATION. Validation of analytical methods: definitions and terminology. London: ICH, p. 5, 1995.

VANDER HEYDEN, Y.; NIJHUIS, A.; SMEYERS-VERBEKE, J.; ANDEGINSTE, B.G.M.; MASSART, D.L. Guidance for robustness/ruggedness test in method validation. **J. pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 24, p. 723-753, 2001.

VEGA-BUSTILLOS, O.; SASSINE, A.; MARCH, R. **A espectrometria de massas quadrupolar**. São Paulo, 2001.

VENKATESAN, M.I.; KAPLAN, I.R. Sedimentary coprostanol as an index of sewage addition in Santa Monica Basin, Southern California. **Environmental Science & Technology**, v. 24, p. 208-214, 1990.

VENKATESAN, M.I.; MERINO, O.; BAEK, J.; NORTHRUP, T.; SHENG, Y.; SHISKO, J. Trace organic contaminants and their sources in surface sediments of Santa Monica Bay, California, USA. **Marine Environmental Research**, v. 69, p. 350-362, 2010.

VENKATESAN, M.I.; SANTIAGO, C.A. Sterols in the ocean sediments: novel tracers to examine habitats of cetaceans, pinnipeds, penguins and humans. **Marine Biology**, v. 102, p. 431-437, 1989.

WALKER, C.H. Biochemical biomarkers in ecotoxicology - some recent developments. **The Science of the Total Environment**, v. 171, p.189-195, 1995.

WENZEL, A.; MÜLLER, J.; TERNES, T.A. **Study on endocrine disrupters in drinking water**, 2003. Disponível em: <http://ec.europa.eu/research/endocrine/pdf/drinking_water_en.pdf>. Acesso em: 16 jan. 2012.

VOLKMAN, J.K. Lipid markers for marine organic matter. In: VOLKMAN, J.K. (Ed.). **Handbook of Environmental Chemistry**, v. 2: Reactions and Processes 2 (N). Berlin: Springer, p. 27-70, 2006.

WAKEHAM, S.G.; CANUEL, E.A. Degradation and preservation of organic matter in sediments. In: VOLKMAN, J. K. (Ed.). **Handbook of Environmental Chemistry**, v. 2: Reactions and Processes 2 (N). Berlin: Springer, p. 295-321, 2006.

WU, J.; HU, R.; YUE, J.; YANG, Z.; ZHANG, L. Determination of fecal sterols by gas chromatography–mass spectrometry with solid-phase extraction and injection-port derivatization. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 1053-1058, 2009.

YING, G. Analysis of endocrine disrupting chemicals and pharmaceuticals and personal care products in water. IN: NOLLET, L.M.L (Ed.) **Handbook of water analysis**. CRC Press, 2007.

ZEAITER, M.; ROGER, J.M.; BELLON-MAUREL, V., RUTLEDGE, D.N. Robustness of models developed by multivariate calibration. Part I: The assessment of robustness. ***Trends in Analytical Chemistry***, v. 23, n. 2, p. 157-170, 2004.