

MARCOS CANTO MACHADO

**ESTUDO E SISTEMATIZAÇÃO ESTATÍSTICA E QUIMIOMÉTRICA NA
DETERMINAÇÃO DE HIDROCARBONETOS POLICICLICOS AROMÁTICOS
(HPAS) POR HPLC-FLU**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Química, Universidade Estadual Paulista,
como parte dos requisitos para obtenção do
título de Mestre em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Mary Rosa Rodrigues de Marchi

Co-orientadora: Profa. Dra. Marisa Veiga Capela

Arararaquara

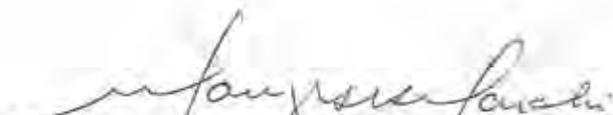
Agosto/2012

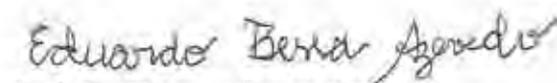
MARCOS CANTO MACHADO

Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.

Araraquara, 16 de agosto de 2012.

BANCA EXAMINADORA


Prof^a Dr^a Mary Rosa Rodrigues de Marchi
Instituto de Química – UNESP, Araraquara


Prof. Dr. Eduardo Bessa Azévedo
Instituto de Química – USP, São Carlos


Prof. Dr. Sandro José de Andrade
Centro de Ciências Exatas– UNIFEI, Itajubá

DADOS CURRICULARES

1. DADOS PESSOAIS

Nome: Marcos Canto Machado

Nome em citações bibliográficas: MACHADO, M. C.

Nascimento: 08/06/1984

Nacionalidade: Brasileira

Naturalidade: Elias Fausto – SP

Filiação: Carlos Alberto Machado

Rita de Cássia Canto Machado

E-mail: marcosiq@gmail.com

Endereço: Rua Orlando Rossi, 66, Jardim São José, Elias Fausto – SP

2. FORMAÇÃO ACADÊMICA

2.1 Licenciatura em Química: Concluído em Dezembro de 2009 no Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Paulista - UNESP. Parte dos créditos acadêmicos cursados na Universidade de Aveiro – UA/Portugal em 2008.

3. ARTIGOS PUBLICADOS

3.1 LEME, D. M.; OLIVEIRA, D. P.; RENZ, S.; REINEL, S.; FERRAZ, E. R. A.; MARCHI, M. R. R.; MACHADO, M. C.; ZOCOLO, G. J.; MARIN-MORALES, M. A. Genotoxicity assessment of water soluble fractions of biodiesel and its diesel blends using the Salmonella assay and the in vitro MicroFlow kit (Litron) assay. **Chemosphere** (Oxford), v. 86, p. 512-520, 2012.

3.2 LEME, D. M.; GRUMMT, T.; HEINZE, R., SEHR, A.; RENZ, S.; REINEL, S.; OLIVEIRA, D. P.; FERRAZ, E. R. A.; MARCHI, M. R. R.; MACHADO, M. C.; ZOCOLO, G. J.; MARIN-MORALES, M. A. An overview of biodiesel soil pollution: Data based on cytotoxicity and genotoxicity assessments. **Journal of Hazardous Materials**, v. 199-200, p. 343-349, 2012.

3.3 LEME, D. M.; GRUMMT, T.; HEINZE, R., SEHR, A.; SKERSWETAT, M., MARCHI, M. R. R. , MACHADO, M. C.; OLIVEIRA, D. P.; MARIN-MORALES, M. A. Cytotoxicity of water-soluble fraction from biodiesel and its diesel blends to human cell lines. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, p. 2148-2155, 2011.

4. RESUMOS PUBLICADOS EM ANAIS DE CONGRESSOS

4.1 MACHADO, M. C.; CAPELA, J. M. V.; CAPELA, M. V ; MARCHI, M. R. R. . Elaboração de planilhas de cálculo para análise e tratamento de dados em determinações ambientais. In: II Workshop de Quimiometria, 2011, Arembepe-Camaçari/BA. II Workshop de Quimiometria, 2011.

4.2 SILVA, F. S.; MACHADO, M. C.; TAULER, R.; MARCHI, M. R. R. Análise elementar de material particulado atmosférico em períodos de safra e entressafra da cana de açúcar utilizando HCA como ferramenta quimiométrica. In: II Workshop de Quimiometria, 2011, Arembepe-Camaçari/BA. II Workshop de Quimiometria, 2011.

4.3 BEZERRA, D. S. S.; MACHADO, M. C.; MARCHI, M. R. R. Comparação da análise de estrógenos utilizando coluna core-shell e convencionais em HPLC-FLU. In: XVI Encontro Nacional de Química Analítica - ENQA, 2011, Campos do Jordão/SP. XVI Encontro Nacional de Química Analítica - 2011.

4.4 LEME, D. M.; OLIVEIRA, D.P. ; FERRAZ, E.R.A. ; GRUMMT, T. ; REINEL, S. ; MARCHI, M.R.R. ; MACHADO, M. C. ; MARIN-MORALES, M. A. The quality assessment of diesel and biodiesel polluted waters. In: XIV Congreso Latinoamericano de Genética - ALAG, 2010, Vinã del Mar, Chile.

4.5 LEME, D. M.; GRUMMT, T.; SHER, A.; HEINZE, R.; MARCHI, M.R.R.; MACHADO, M. C.; OLIVEIRA, D.P.; MARIN-MORALES, M.A . Citotoxicity os waters contaminated with diesel and biodiesel using three different metohds. In: XIV Congreso Latinoamericano de Genética - ALAG, 2010, Vinã del Mar, Chile.

4.6 LEME, D. M.; GRUMMT, T.; SHER, A.; MARCHI, M. R. R.; MACHADO, M. C.; OLIVEIRA, D.P.; MARIN-MORALES, M.A. Mutagenicity assessment of water polluted by diesel and biodiesel blends using the flow cytometric in vitro MN assay. In: XIV Congreso Latinoamericano de Genética - ALAG, 2010, Vinã del Mar, Chile.

4.7 MACHADO, M. C.; CAPELA, J. M. V.; CAPELA, M. V.; MARCHI, M. R. R ; CRISTALE, J. Análise estatística do processo de validação para determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em material particulado por HPLC-FLU. In: 17º Encontro Regional da SBQ, 2009, Araraquara/SP. Livro de Resumos - 17º Encontro da SBQ Regional, 2009.

4.8 MACHADO, M. C.; CAPELA, J. M. V.; CAPELA, M. V.; MARCHI, M. R. R. Análise preliminar na determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em material particulado atmosferico. In: XXI CIC - Congresso de Iniciação Científica da UNESP, 2009, São José do Rio Preto/SP. CD - Resumos XXI CIC-UNESP, 2009.

4.9 MACHADO, M. C.; CRISTALE, J. ; CAPELA, J. M. V.; MARCHI, M. R. R. Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em material particulado fino PM 2,5: validação metodológica e dados ambientais preliminares. In: XX Congresso de Iniciação Científica UNESP, 2008, São José dos Campos/SP. CD – Resumos XX Congresso de Iniciação Científica - UNESP, 2008.

Dedico este trabalho.

Aos meus pais, Carlos e Rita,

Pelo amor e carinho de todas as horas;

Aos meus queridos irmãos Luiz Renato e Rafael;

A toda minha querida família;

E a todos os amigos do Instituto de Química.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela força, pelas oportunidades oferecidas e pelo conforto nos momentos obscuros.

À minha família, meu pai Carlos, minha Mãe Rita, meus irmãos Luis Renato e Rafael, aos meus avôs (*in memoriam*), minhas avós, tios e tias, primos e primas, que tanto me incentivaram, que sempre foram um porto seguro de carinho e amor para qualquer momento, sempre com conversas bem humoradas, inteligentes e sinceras.

À Professora Mary Rosa e a Professora Marisa, pela orientação neste trabalho, pela amizade, e pelo exemplo profissional, sem os quais o trabalho não seria desenvolvido.

Aos amigos do GRESCO, pelo incentivo e oportunidades de colaboração e aprendizagem. Em especial ao Guilherme e ao Flávio.

A minha amiga-irmã Adriana, pela amizade verdadeira, pelos conselhos (alguns bem doloridos e diretos, mas necessários e enriquecedores) e acima de tudo por fazer-se presente em toda e qualquer situação, alegre ou triste, no presente e certamente nas futuras.

A meu amigo-irmão Alex (Michelin), que tive a satisfação de conviver durante vários anos, repletos de momentos de descontração, conversas inteligentes e pelo incentivo acadêmico e profissional.

As minhas grandes amigas Maísa (pelos nossos devaneios e assuntos aleatórios, às vezes sérios outros nem tanto) e Muryeli (única amizade que possui na minha cidade natal), mesmo distantes estão sempre presentes no meu dia-a-dia.

Aos amigos do Instituto de Química. Seria complicado listar todos, tamanha é minha sorte em conhecer pessoas tão especiais, cada um com sua maneira de ser, mas que me agregaram muito. Enfim, a todos com que tive o prazer de conviver durante estes anos em Araraquara e que tem um lugar todo especial no meu coração...

MUITO OBRIGADO!

"O futuro pertence àqueles que acreditam na beleza dos seus sonhos".

(Eleanor Roosevelt)

"Nenhuma grande vitória é possível sem que tenha sido precedida de pequenas vitórias sobre nós mesmos".

(L. M. Leonov)

MACHADO, M. C. *Estudo e sistematização estatística e quimiométrica na determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) por HPLC-FLU*. Araraquara, 2012. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química de Araraquara – UNESP.

RESUMO

A análise da literatura aponta para um crescente número de trabalhos em matrizes ambientais que buscam identificar e quantificar diversas substâncias poluentes. O estudo destas substâncias resulta em grandes conjuntos de dados, que necessitam ser devidamente analisados para a interpretação mais confiável possível. Por outro lado, os métodos analíticos utilizados nestas determinações envolvem diversas etapas e parâmetros que podem influenciar na confiabilidade analítica. Resultados analíticos sem confiabilidade identificada podem levar a tomada de decisões totalmente equivocadas na área ambiental. Neste contexto, é fundamental que os laboratórios disponham de meios e critérios objetivos para demonstrar que os métodos de ensaio que executam conduzem a resultados confiáveis e adequados à qualidade pretendida. Este trabalho teve como objetivo o estudo de procedimentos estatísticos e quimiométricos na determinação dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) empregando a cromatografia líquida de alta performance com detecção por fluorescência (HPLC-FLU), enfocando a otimização estatística de procedimentos para validação do método para obtenção e tratamento de sinais analíticos dos HPAs, bem como o estudo do comportamento dos analitos em diferentes matrizes ambientais. Neste sentido foram utilizadas ferramentas quimiométricas, como análise de componentes principais, análise hierárquica de agrupamentos e técnicas de planejamento experimental para análise exploratória dos dados e indicação das similaridades cromatográficas entre os HPAs e do perfil destes em matrizes ambientais. Também foram realizados testes estatísticos inferenciais e descritivos cujas ferramentas foram implementadas em planilhas de cálculo para utilização em procedimentos necessários a parâmetros de validação, como estabilidade de soluções, linearidade, limites de detecção e quantificação, recuperação e efeito matriz. Para estudos em HPAs determinou-se como ideal a utilização de 5 replicatas, a utilização de padrões de trabalho por um período máximo de 30 dias e a elaboração de curvas analíticas na matriz.

Palavras-chave: HPAs, confiabilidade analítica, validação.

ABSTRACT

The literature review points to a growing number of studies in environmental matrices which identify and quantify various pollutants. The study of these substances results in large data sets that need to be properly considered for the interpretation to be as more reliable as possible. On the other hand, the analytical methods used in these determinations involve several steps and parameters that can influence the analytical reliability. Analytical results that do not identify reliability can lead to completely flawed decision-making in the environmental area. In this context, it is essential laboratories to have adequate and objective criteria to demonstrate that the test methods performed lead to reliable results and appropriate to the desired quality. This work aimed to study the statistical and chemometric procedures for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by liquid chromatography high performance with fluorescence detection (HPLC-FLU). It focuses on the optimization of statistical procedures for validating the method for obtaining and processing signals from analytical PAH as well as the study of the behavior of different analytes in environmental matrices. In this sense were used chemometric tools, such as principal component analysis, hierarchical cluster analysis and experimental design techniques for exploratory data analysis, indicating the similarities between PAH and chromatographic profile in environmental matrices. Tests were made descriptively and use of inferential statistical tools which have been implemented in spreadsheets for use in procedures required for validation parameters, such as stability of solutions, linearity, limits of detection and quantification, recovery and matrix effect. For studies on PAHs was determined as the optimal use of 5 replicates, the use of labor standards for a maximum period of 30 days and the development of analytical curves in the matrix.

Keywords: PAHs, analytical reliability, validation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Esquemática dos componentes de um cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC)	21
Figura 2 -	Representação de uma curva analítica e correspondente região de aceitação	23
Figura 3 -	Distribuição de erros sistemáticos e aleatórios para uma distribuição de frequência	26
Figura 4 -	Região de aceitação para um intervalo de confiança de 95%	28
Figura 5 -	Sistematização para análise estatística descritiva	38
Figura 6 -	Sistematização para análise estatística inferencial relativa ao número de grupos de variáveis	39
Figura 7 -	Fluxograma de procedimentos para teste t para uma média \bar{x}	40
Figura 8 -	Fluxograma de procedimentos para para comparação do valor de uma amostra x_0 com um valor conhecido μ_0	40
Figura 9 -	Fluxograma para teste t de comparação de duas médias	41
Figura 10 -	Gráficos de <i>Loadings</i> gerado a partir da PCA	45
Figura 11 -	Gráficos de escores gerado pela PCA e os respectivos grupos de HPAs formados	46
Figura 12 -	Gráfico tridimensional dos escores em relação aos 3 primeiros componentes principais	47
Figura 13 -	Cromatograma obtido no estudo para demonstração das observações anteriores	48
Figura 14 -	Dendograma de similaridades das propriedades físico-químicas	48
Figura 15 -	Dendograma de similaridade para os HPAs	49
Figura 16 -	Comparativo da variância das replicatas	53
Figura 17 -	Magnitude da incerteza em relação ao número de replicatas	55
Figura 18 -	Superfície de resposta para verificação de estabilidade das soluções-padrão	56
Figura 19 -	Sequência para realização do teste de Huber e detecção de <i>outliers</i>	59

Figura 20 -	Teste de Huber realizado para o fenantreno e para o indeno[1,2,3-cd]pireno	59
Figura 21 -	Curva analítica para o Fenatreno	60
Figura 22 -	Curva analítica para o indeno[1,2,3-cd]pireno	61
Figura 23 -	Gráficos de resíduos para o fenantreno (a) e para o indeno[1,2,3-cd]pireno (b)	63
Figura 24 -	Fluxograma para o procedimento de extração de HPAs em solo via dispersão da matriz em fase sólida	67
Figura 25 -	Fluxograma para o procedimento de extração de HPAs em água via SPE	68
Figura 26 -	Interações entre os fatores utilizados no planejamento experimental	70
Figura 27 -	Gráfico de pareto para efeitos significativos dos fatores envolvidos no planejamento experimental	71
Figura 28 -	Comparação da sensibilidade analítica em função das soluções padrão e dos extratos de solo	72
Figura 29 -	Comparação da sensibilidade analítica em função das soluções padrão e dos extratos em água	72
Figura 30 -	Sequência de cálculos para comparação de médias e verificação de efeito da matriz	73
Figura 31 -	Teste de Huber para o naftaleno	82
Figura 32 -	Curva analítica para o naftaleno	82
Figura 33 -	Gráfico de resíduos para o naftaleno	82
Figura 34 -	Teste de Huber para o acenafteno	83
Figura 35 -	Curva analítica para o acenafteno	83
Figura 36 -	Gráfico de resíduos para o acenafteno	83
Figura 37 -	Teste de Huber para o fluoreno	84
Figura 38 -	Curva analítica para o fluoreno	84
Figura 39 -	Gráfico de resíduos para o fluoreno	84
Figura 40 -	Teste de Huber para o antraceno	85
Figura 41 -	Curva analítica para o antraceno	85
Figura 42 -	Gráfico de resíduos para o antraceno	85
Figura 43 -	Teste de Huber para o fluoranteno	86

Figura 44 -	Curva analítica para o fluoranteno	86
Figura 45 -	Gráfico de resíduos para o fluoranteno	86
Figura 46 -	Teste de Huber para o pireno	87
Figura 47 -	Curva analítica para o pireno	87
Figura 48 -	Gráfico de resíduos para o pireno	87
Figura 49 -	Teste de Huber para o benzo[a]antraceno	88
Figura 50 -	Curva analítica para o benzo[a]antraceno	88
Figura 51 -	Gráfico de resíduos para o benzo[a]antraceno	88
Figura 52 -	Teste de Huber para o criseno	89
Figura 53 -	Curva analítica para o criseno	89
Figura 54 -	Gráfico de resíduos para o criseno	89
Figura 55 -	Teste de Huber para o benzo[b]fluoranteno	90
Figura 56 -	Curva analítica para o benzo[b]fluoranteno	90
Figura 57 -	Gráfico de resíduos para o benzo[b]fluoranteno	90
Figura 58 -	Teste de Huber para o benzo[k]fluoranteno	91
Figura 59 -	Curva analítica para o benzo[k]fluoranteno	91
Figura 60 -	Gráfico de resíduos para o benzo[k]fluoranteno	91
Figura 61 -	Teste de Huber para o benzo[a]pireno	92
Figura 62 -	Curva analítica para o benzo[a]pireno	92
Figura 63 -	Gráfico de resíduos para o benzo[a]pireno	92
Figura 64 -	Teste de Huber para o dibenzo[a,h]antraceno	93
Figura 65 -	Curva analítica para o dibenzo[a,h]antraceno	93
Figura 66 -	Gráfico de resíduos para o dibenzo[a,h]antraceno	93
Figura 67 -	Teste de Huber para o benzo[g,h,i-cd]perileno	94
Figura 68 -	Curva analítica para o benzo[g,h,i-cd]perileno	94
Figura 69 -	Gráfico de resíduos para o benzo[g,h,i-cd]perileno	94
Figura 70 -	Planilha de cálculo para detecção e rejeição de <i>outliers</i> via teste de Huber	99
Figura 71 -	Planilha de cálculo para verificação de parâmetros da curva analítica e figuras de desempenho	102

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	HPAs prioritários pela EPA e respectivas fórmulas moleculares (FM) e fórmulas estruturais (FE)	19
Tabela 2 -	Valores demonstrados para cálculo de análise de variância	32
Tabela 3 -	Propriedades físico-químicas dos HPAs	43
Tabela 4 -	Porcentagem de variação da Análise de Componentes Principais	44
Tabela 5 -	Concentrações da solução estoque de HPAs	51
Tabela 6 -	Parâmetros cromatográficos utilizados	52
Tabela 7 -	Tabela de análise de variância verificação da variância obtido via análise dos dados no software <i>Statistica 7.0</i>	53
Tabela 8 -	Tabela para aceitação de áreas cromatográficas para estudo de estabilidade elaborada em planilha de cálculo	57
Tabela 9 -	Tabela de análise de variância para significância da regressão	62
Tabela 10 -	Parâmetros para as curvas analíticas calculados via planilha elaborada para os HPAs em estudo	64
Tabela 11 -	Fórmulas para cálculo do limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)	65
Tabela 12 -	Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) calculados para os HPAs em estudo	65
Tabela 13 -	Planejamento experimental realizado e intervalos de recuperação calculados para os HPAs em estudo	69
Tabela 14 -	Tabela de análise de variância para as interações no planejamento	70
Tabela 15 -	Cálculos para aceitação da recuperação	76
Tabela 16 -	Resultado das recuperações para fortificação anterior ao processo de extração	95
Tabela 17 -	Resultado das recuperações para fortificação posterior ao processo de extração	96
Tabela 18 -	Desvios obtidos para os HPAs em função do número de replicatas	97

Tabela 19 -	Desvios obtidos para os HPAs em função do número de replicatas	98
Tabela 20 -	Detalhamento das funções presentes na planilha de cálculo para teste de Huber	100
Tabela 21 -	Detalhamento das funções presentes na planilha de cálculo para verificação de parâmetros da curva analítica e figuras de desempenho	103

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
1.1	Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos - HPAs	18
1.1.1	Análise de HPAs no ambiente	20
1.1	Cromatografia líquida com detecção por fluorescência	20
1.3	Confiabilidade analítica	21
1.4	Validação analítica	22
1.4.1	Crítérios de desempenho: Figuras de mérito	23
1.4.1.1	Linearidade e calibração	23
1.4.1.1.1	Detecção de <i>outliers</i>	24
1.4.1.2	Limites de Detecção e quantificação	24
1.4.1.3	Exatidão experimental: testes de recuperação	25
1.5	Métodos estatísticos e química analítica	25
1.5.1	Erros nas medições químicas	26
1.5.2	Tratamento estatístico dos resultados	27
1.5.3	Estatística descritiva	27
1.5.4	Estatística inferencial	27
1.5.4.1	Intervalos de confiança	27
1.5.4.2	Testes de hipótese	29
1.5.4.3	P-valor	30
1.5.4.4	Testes de comparação de médias e desvios padrão	30
1.5.4.5	Testes de variância	31
1.5.4.6	Testes de verificação da normalidade	32
1.5.5	Estatística multivariada: Quimiometria	33
1.5.5.1	Análise de Componentes Principais	34
1.5.5.2	Análise de agrupamentos hierárquicos	34
2	OBJETIVOS	36
3	APRESENTAÇÃO DO TRABALHO	36
3.1	Estudo e sistematização das técnicas e modelos a serem utilizados	37
3.2	Análise multivariada de classificação e indicação de similaridades para os HPAs	42
3.3	Obtenção e tratamento estatístico de dados analíticos	49

3.3.1	Materiais e Equipamentos	50
3.3.1.1	Limpeza da vidraria	50
3.3.1.2	Preparação das soluções estoque	51
3.3.1.3	Condições Cromatográficas	51
3.3.2	Influência do número de replicatas: repetibilidade experimental	52
3.3.3	Estudo da estabilidade das soluções padrão	55
3.3.4	Estudo da linearidade	59
3.3.4.1	Curvas analíticas	61
3.3.4.2	Teste de significância da regressão	62
3.3.4.3	Validade da regressão: Análise dos resíduos da regressão	63
3.3.5	Determinação dos limites de detecção e quantificação	65
3.3.6	Testes de recuperação em matrizes ambientais	67
3.3.6.1	Método para extração de HPAs em solo	67
3.3.6.3	Método para extração de HPAs em água	68
3.3.6.3	Planejamento experimental para a fortificação	71
3.3.6.4	Significância do efeito matriz	74
3.3.6.5	Avaliação dos limites de recuperação	76
4	CONCLUSÕES	78
5	PERSPECTIVAS FUTURAS	78
	REFERÊNCIAS	79
	APÊNDICE A – Testes de Huber, curvas analíticas e gráficos de resíduos para os HPAs em estudo	83
	APÊNDICE B – Resultados do planejamento experimental para as recuperações dos HPAs	96
	APÊNDICE C – Desvios obtidos na análise dos HPAs para estudo da influência do número de replicatas	98
	APÊNDICE D – Detalhamento das planilhas de cálculo para parâmetros de validação	100
	ANEXO A – Tabela de valores críticos para teste F	106
	ANEXO B – Tabela de valores críticos para teste t	107

1 INTRODUÇÃO

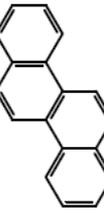
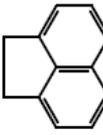
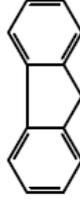
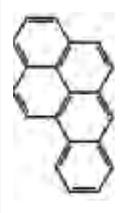
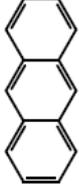
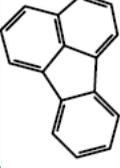
1.1 Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos - HPAs

Nos últimos anos tem havido uma crescente preocupação com o aumento da ocorrência ambiental de alguns poluentes orgânicos, portanto há grande necessidade de obter informações dos mesmos e o seu impacto ambiental. Estes poluentes orgânicos incluem uma grande variedade de compostos químicos com diferentes estruturas, propriedades, funções e origens, que podem produzir diversos danos para o ecossistema e os seres humanos (MAS et al., 2010).

Uma classe destes poluentes é constituída pelos Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) que são poluentes orgânicos que possuem dois ou mais anéis aromáticos fundidos em sua estrutura, formados por átomos de hidrogênio e carbono que constituem uma subclasse dos compostos policíclicos aromáticos (CPAs). A formação desses compostos tem origem na combustão incompleta de matéria orgânica, origem esta influenciada principalmente por fatores como temperatura e pressão que direcionam o perfil constituinte de HPAs que podem ser emitidos por fontes naturais ou antropogênicas (PAGE et al., 1999; JACQUES et al., 2007; SILVA, 2011).

Os HPAs pertencem a um grupo de substâncias carcinogênica e/ou mutagênicas e por esta razão devem ser constantemente monitorados. A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos considera 16 HPAs como principais agentes carcinogênicos e/ou mutagênicos (ENVIRONMENTAL..., 1990): acenafteno, acenaftileno, antraceno, benzo[a]antraceno, criseno, benzo[a]pireno, benzo[b]fluoranteno, benzo[g,h,i]perileno, benzo[k]fluoranteno, dibenzo[a,h]antraceno, fenantreno, fluoranteno, fluoreno, indeno[1,2,3cd]pireno, naftaleno e pireno. A Tabela 1 ilustra a estrutura química dos 16 HPAs prioritários pela EPA.

Tabela 1 - HPAs prioritários pela EPA e respectivas fórmulas moleculares (FM) e fórmulas estruturais (FE).

	HPA	FM	FE		HPA	FM	FE
1	Naftaleno	C ₁₀ H ₈		9	Benzo[a]antraceno	C ₁₈ H ₁₂	
2	Acenaftileno	C ₁₂ H ₈		10	Criseno	C ₁₈ H ₁₂	
3	Acenafteno	C ₁₂ H ₁₀		11	Benzo[e]acefenantrileno	C ₂₀ H ₁₂	
4	Fluoreno	C ₁₃ H ₁₀		12	Benzo[k]fluoranteno	C ₂₀ H ₁₂	
5	Fenantreno	C ₁₄ H ₁₀		13	Benzo[a]pireno	C ₂₀ H ₁₂	
6	Antraceno	C ₁₄ H ₁₀		14	Benzo[g,h,i]perileno	C ₂₂ H ₁₂	
7	Fluoranteno	C ₁₆ H ₁₀		15	Indeno[1,2,3-cd]pireno	C ₂₂ H ₁₂	
8	Pireno	C ₁₆ H ₁₀		16	Dibenzo[a,h]antraceno	C ₂₂ H ₁₄	

Fonte: Elaborado pelo autor

1.1.1 Análise de HPAs no ambiente

O transporte de HPAs no ambiente ocorre principalmente na atmosfera associado a material particulado fino, o que permite ampla distribuição desses compostos. Uma vez emitidos na atmosfera, esses poluentes podem ser depositados sob a forma seca ou úmida em sistemas aquáticos e terrestres (GARBAN et al., 2002; ROSE & RIPPEY, 2002).

A dificuldade na análise quantitativa destas substâncias está ligada a complexidade das matrizes naturais e aos baixos níveis dos analitos a serem quantificados. Mesmo com a sofisticação crescente das técnicas instrumentais, os resultados geralmente não são obtidos diretamente, mas sim por sinais que podem ser analisados (após a extração e isolamento dos analitos de interesse) por intermédio de uma técnica analítica adequada para uma possível quantificação das várias espécies presentes (MAS et al., 2010).

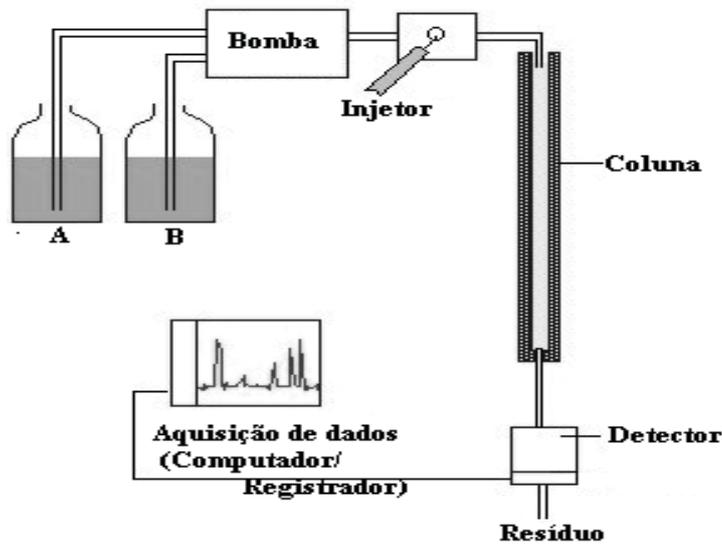
A determinação dos HPAs é amplamente realizada através de técnicas cromatográficas combinadas com sistemas de detecção seletivos, sendo que a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada com detector de fluorescência (HPLC-FLU) é uma das mais empregadas por possuir alta sensibilidade e seletividade a estas substâncias (WISE et al., 1993).

1.2 Cromatografia líquida com detecção por fluorescência

O processo de separação, empregando-se técnicas cromatográficas, está baseado na distribuição dos analitos entre uma fase móvel (FM) e uma fase estacionária (FE). A FM percola pela FE, carreando os analitos em diferentes processos de interações com a FE. A retenção relativa dos analitos, e a consequente separação entre os mesmos, ocorre devido à diferença entre os coeficientes de distribuição de componentes distintos entre as duas fases (COLLINS et al., 1997).

A Figura 1 esquematiza os principais constituintes de um cromatógrafo líquido de alta eficiência.

Figura 1 - Esquematização dos componentes de um cromatografo liquido de alta eficiência (HPLC).



Fonte: Adaptado de Collins et al., 1997.

A detecção e quantificação dos HPAs por fluorescência é facilitada pela seletividade do mesmo, uma vez que apenas são detectadas as moléculas que fluorescem nos comprimentos de onda de excitação e emissão selecionados. Moléculas aromáticas, como os HPAs, possuem estrutura rígida com ligações duplas conjugadas, têm menos graus de liberdade vibracional que as moléculas alifáticas e são a classe de compostos que mais freqüentemente apresentam fluorescência (SHARMA & SCHULMAN, 1999).

1.3 Confiabilidade analítica

A presença de HPAs em matrizes de interesse ambiental exige métodos de detecção que sejam capazes de avaliar corretamente a extensão de problemas observados e servir como orientação à tomada de decisões.

Em qualquer processo que envolva análises químicas é necessário assegurar a qualidade dos dados gerados para que a tomada de decisão a partir dos mesmos não seja equivocada. O conjunto de procedimentos utilizado para a avaliação da confiabilidade analítica é frequentemente denominada validação analítica.

1.4 Validação analítica

O processo de validação consiste em demonstrar objetivamente que o método analítico empregado é adequado aos propositos do estudo pretendido, incluindo (HUBER, 2005):

- definição dos parâmetros analíticos necessários para determinada aplicação;
- avaliação dos resultados obtidos;
- confirmação da adequação do desempenho obtido para os parâmetros definidos anteriormente

Uma forma de assegurar a aplicabilidade e o alcance de um método durante o processo de validação é estabelecer os limites e a significância destes parâmetros por meio da estimativa de indicadores quantitativos ou critérios de desempenho, conhecidos como figuras de mérito. Encontram-se na literatura diversos guias (INSTITUTO..., 2010; INTERNATIONAL..., 1996; THOMPSON & WOOD, 1995) voltados a demonstrar como obter as figuras de mérito, como por exemplo: ajuste da curva analítica, faixa de linearidade, sensibilidade do método, limites de detecção (LD) e quantificação(LQ), recuperação, precisão e exatidão, bem como estabelecer os valores aceitáveis para estes parâmetros.

Os critérios de validação podem ser aplicados nas seguintes situações (WOOD, 1999):

- na avaliação da capacidade de um laboratório obter resultados em conformidade com aqueles obtidos em laboratórios certificados;
- na avaliação da capacidade de um método em determinar o analito em novas matrizes;
- na avaliação de instrumentos modificados ou recém adquiridos.

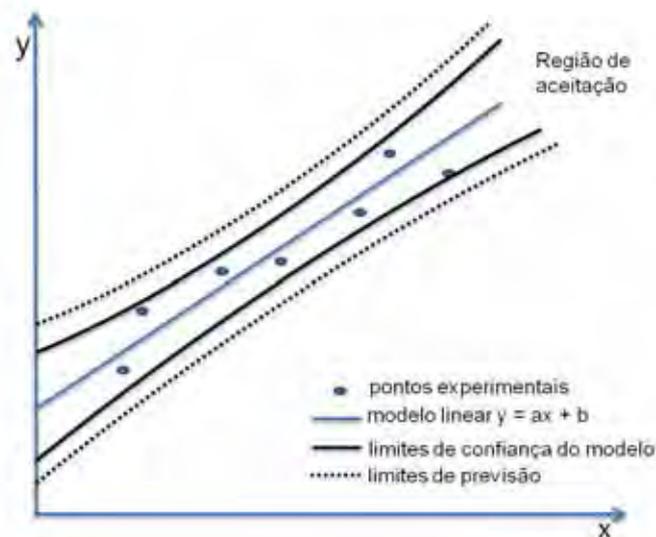
Nenhum guia, dos citados, estabelece uma ordem de execução ou de apresentação dos parâmetros utilizados, no entanto, cada critério de desempenho tem como objetivo demonstrar a capacidade de adequação metodológica em atender exigências específicas de confiabilidade e aceitação. São poucos os trabalhos na literatura que demonstram quais critérios foram utilizados, e quando o fazem deixam de demonstrar quais parâmetros foram utilizados quanto a significância de seus resultados. Idealmente, cada laboratório deve elaborar sua rotina de validação conforme a área em que atue.

1.4.1 Critérios de desempenho: Figuras de mérito.

1.4.1.1 Linearidade e calibração.

A linearidade corresponde a capacidade de um método analítico gerar sinais diretamente proporcionais à concentração do analito em uma amostra, relacionando o valor de uma variável dependente y através do conhecimento da variável independente x (RIBEIRO et al., 2008). Esta relação de variáveis estabelece uma curva analítica ou curva de calibração, onde a relação linear é representada por uma equação de regressão $y = ax + b + \varepsilon$, onde “ a ” (coeficiente angular) e “ b ” (coeficiente linear) são obtidos através de método numérico dos mínimos quadrados e “ ε ” representa um erro aleatório associado a determinação de y (PIMENTEL & BARROS NETO, 1996). Estes coeficientes, quando conhecidos através de cálculos efetuados, podem ser utilizados para prever a concentração da espécie de interesse em novas amostras a partir do seu sinal analítico. O modelo linear encontra-se inserido em uma região de confiança que fica distinguível na Figura 2.

Figura 2 - Representação de uma curva analítica e correspondente região de aceitação.



Fonte: Elaborado pelo autor.

O intervalo de trabalho corresponde a faixa que se estende do menor ao maior nível de concentração que possa ser determinado com precisão e exatidão usando a linearidade do método (BRITO et al., 2003). Para melhores resultados, faz-se necessária a utilização de métodos que possibilitem a exclusão de observações que possam desviar o modelo da linearidade, para tal são empregados testes de detecção de *outliers*.

1.4.1.1.1 Detecção de *outliers*.

Diversos testes podem ser realizados para detecção e consequente exclusão de pontos anômalos que influenciam o modelo de regressão por mínimos quadrados, como os testes de Dixon e Grubbs (MILLER & MILLER, 2010). Outro teste relatado na literatura, teste de Huber, apresenta-se mais robusto estatisticamente uma vez que permite a visualização do intervalo de trabalho linear além da existência de observações anômalas. Neste, estabelece-se um valor central (mediana, para que não haja interferência no valor representativo da série) e acima e abaixo (\pm desvio absoluto) deste valor encontra-se o intervalo de confiança que define quais dados são aceitáveis em função de um fator de abrangências k arbitrário que assume valores entre 2 e 8. Quanto menor for o valor de k mais restritivo é o critério de linearidade adotado, na maioria dos casos utiliza-se o valor de $k = 2$ correspondente ao estabelecimento do nível de confiança de aproximadamente 95% (MEIER, 2000).

1.4.1.2 Limites de Detecção e quantificação

O limite de detecção (LD) corresponde a menor concentração do analito que pode ser detectada sob as condições experimentais estabelecidas. Já o limite de quantificação (LQ) corresponde a menor concentração do analito que pode ser quantificada com exatidão e precisão aceitável (RIBANI et al, 2004). Ambos os limites podem ser calculados de três maneiras distintas: método visual, método relação sinal/ruído e o método baseado em parâmetros da curva analítica.

Para a determinação dos limites pelo método visual pode ser utilizado o teste de Huber, onde o primeiro ponto a figurar entre o intervalo de confiança calculado é tido como o limite de quantificação e o valor anterior (fora do intervalo calculado) é

dado como o limite de detecção. Quando utiliza-se a determinação pelo método sinal/ruído compara-se os sinais medidos da amostra em baixas concentrações do analito com as análises do branco, estabelecendo-se a concentração mínima na qual o analito seja detectado. A razão sinal/ruído com valor 3 é geralmente considerada para estimar o limite de detecção, e com valor 10 para estimar o limite de quantificação (MILLER & MILLER, 2010).

Os métodos baseados nos parâmetros da curva analítica incorporam os desvios associados a estes, e podem ser calculados aliados a processos estatísticos para um determinado intervalo de confiança. Esta incorporação reflete em resultados mais fidedignos e significativos em relação ao método analítico empregado (MEIER, 2000).

1.4.1.3 Exatidão experimental: testes de recuperação.

Testes de recuperação são realizados para avaliar a quantidade de um analito extraído da matriz de interesse, estando esta contida ou adicionada a mesma, gerando fenômenos de diminuição ou ampliação do sinal instrumental. Estes estudos podem ser utilizados para avaliação da exatidão experimental, pois refletem a quantidade de determinado analito recuperado no processo, em relação à quantidade real presente na amostra (BRASIL, 2011).

Os testes de recuperação consistem em fortificar uma amostra (adicionando soluções com diferentes concentrações do analito de interesse) para posterior processamento (etapas de extração) para determinar a concentração do analito adicionado. A porcentagem de recuperação é dada pela seguinte fórmula:

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{valor obtido}}{\text{valor adicionado}} \cdot 100$$

1.5 Métodos estatísticos e química analítica

Para o cálculo e a correta interpretação dos critérios de desempenho torna-se necessário a utilização e o entendimento de ferramentas estatísticas e matemáticas aos procedimentos utilizados (MILLER & MILLER, 2010).

1.5.1 Erros nas medições químicas

A presença de desvios é inerente à natureza quantitativa da Química Analítica, desta maneira, o conhecimento destes desvios é fundamental na interpretação dos dados obtidos e para os processos de validação, no entanto o estabelecimento dos desvios é tarefa muita vezes complexa, principalmente pela dificuldade na compreensão e aplicação de alguns conceitos estatísticos importantes (MILLER & MILLER, 2010).

No que se refere à medição analítica, admite-se que o valor x , fornecido pelo método de análise consiste em três termos: o valor real do parâmetro μ , um erro sistemático (bias) Δ , e ainda um erro aleatório ϵ , conforme equação:

$$x = \mu + \Delta + \epsilon$$

Erros aleatórios influenciam na precisão experimental, uma vez que compreendem os desvios de replicatas em relação a um valor médio. Já os erros sistemáticos correspondem a uma tendência de deslocamento em relação ao valor médio, desviando o resultado quanto à sua exatidão. A Figura 2 ilustra os desvios explicitados anteriormente.

Figura 3 - Distribuição de erros sistemáticos e aleatórios para uma distribuição de frequência.



Fonte: Adaptado de Rowe, 2007.

1.5.2 Tratamento estatístico dos resultados.

A presença de desvios torna necessária a utilização de tratamentos matemáticos que permitam corroborar para a avaliação de quão confiável é o conjunto de dados obtidos experimentalmente, utilizando para isso métodos descritivos e inferenciais de análise estatística.

1.5.3 Estatística descritiva

A estatística descritiva tem como objetivo básico agrupar uma série de valores de mesma natureza, permitindo dessa forma que se tenha uma visão global da variação desses valores, organizando e descrevendo os dados de três maneiras: por meio de tabelas, de gráficos e de medidas descritivas, resumindo as informações contidas nesses dados, através medidas de tendência central e dispersão dos dados, como média, mediana, variância, desvio padrão, coeficiente de variação (ou desvio padrão relativo), etc. (ROWE, 2007). Na Química Analítica, as ferramentas da estatística descritiva permitem agrupar os dados assumindo na maioria dos casos uma distribuição normal onde os valores possuem uma distribuição de frequências em uma curva gaussiana.

1.5.4 Estatística inferencial

Os testes inferenciais são amplamente utilizados na avaliação de resultados como evidência de igualdade ou não de valores experimentais. Estes podem ser definidos como um conjunto de ferramentas que torna possível a estimativa de uma característica relacionada a um conjunto de dados ou, ainda, a tomada de decisão com base na teoria de probabilidade, através da estimativa de parâmetros e testes de hipóteses em um dado intervalo de confiança (ROWE, 2007).

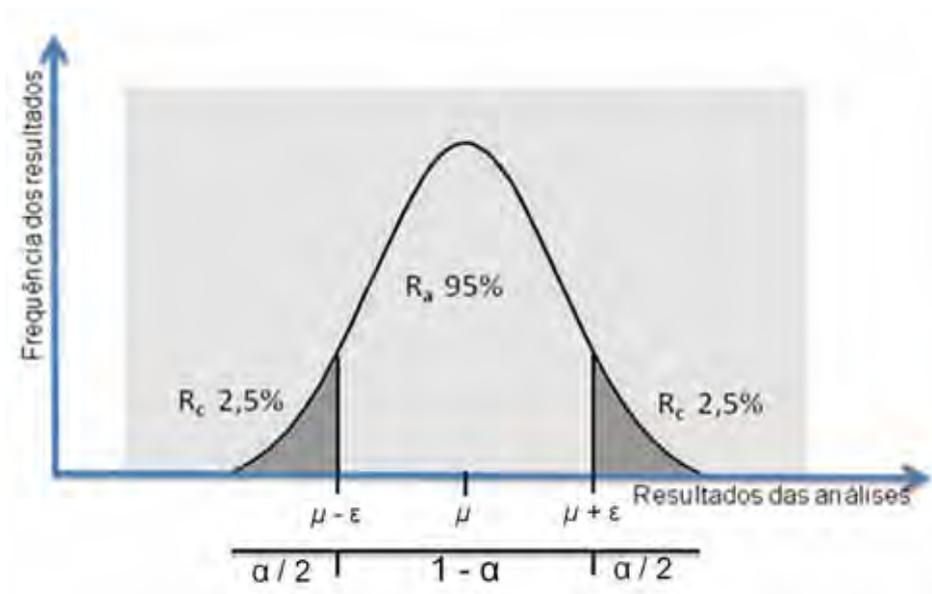
1.5.4.1 Intervalos de confiança

O valor verdadeiro de um conjunto de dados pode ser estimado em relação a média e sua dispersão em n resultados independentes, contudo, esta informação é limitada quanto ao desempenho metodológico. Para assegurar a confiabilidade é empregado um intervalo de confiança, que consiste na probabilidade do valor

verdadeiro situar-se dentro de uma região da distribuição dos resultados experimentais. Quanto maior o intervalo de confiança, maior será a probabilidade de conter o valor verdadeiro em relação a uma região de aceitação.

A região de aceitação é dada por $(1 - \alpha) \times 100\%$ (intervalo de confiança), onde α expressa o nível de significância, que corresponde a região que não contém o valor dado como verdadeiro para uma distribuição em relação a um valor médio. Os níveis de significância mais utilizados são de 5%, 1% e 0,1%, quanto maior o valor, mais restritivo será o teste quanto a região de aceitação. A região de rejeição, ou crítica, é dada por $\alpha/2$. A Figura 4 ilustra uma distribuição de frequências e o intervalo de confiança, para uma média μ e seus erros ε , demonstrando uma região de aceitação (R_a) de 95% onde o valor pode ser considerado verdadeiro e outras duas regiões (R_c) que correspondem às regiões críticas para as quais os valores são rejeitados (ROWE, 2007).

Figura 4 - Região de aceitação para um intervalo de confiança de 95%.



Fonte: Elaborada pelo autor.

O intervalo de confiança para um valor médio, pode ser calculado utilizando a seguinte fórmula:

$$\bar{x} \pm t_{n-1} \frac{s}{\sqrt{n}}$$

Onde: \bar{x} = valor médio amostral, t_{n-1} = estatística t, com n-1 graus de liberdade, S = desvio-padrão, n = números de replicatas utilizadas. Os cálculos realizados geram o limite superior e inferior de aceitação do valor para um dado nível de significância.

1.5.4.2 Testes de hipóteses

Os testes de hipóteses correspondem a uma regra de decisão utilizada para aceitar ou rejeitar afirmação estatística com base em elementos amostrais. Envolve a comparação de duas hipóteses: H_0 , que corresponde a hipótese nula e H_1 como hipótese alternativa. Geralmente a hipótese alternativa (H_1) representa a suposição que o pesquisador quer provar, sendo a hipótese nula (H_0) formulada com o exposto propósito de ser rejeitada. A significância do teste, com base na frequência estatística, corresponde a probabilidade de rejeitar a hipótese nula quando ela é efetivamente verdadeira a um nível de significância α (HIBBERT & GOODING, 2006).

Se houver a rejeição de H_0 , a hipótese alternativa (H_1) terá de ser aceita, sendo possível a obtenção de evidências estatísticas para aceitação da hipótese inicial do pesquisador.

A sequência a seguir demonstra as etapas para um teste de hipóteses de comparação entre duas médias μ e μ_0 :

(I) Enunciar as hipóteses $H_0: \mu = \mu_0$ contra $H_1: \mu \neq \mu_0$ para teste bilateral, ou então ou $\mu < \mu_0$ contra $\mu > \mu_0$ para teste unilateral;

(II) Fixar o nível de significância α e identificar a função estatística apropriada ao teste;

(III) Determinar a região crítica (região de rejeição de H_0) em função do α e dos graus de liberdade relativos ao experimento;

(IV) Calcular a estatística do teste;

(V) Comparação do resultado obtido com um valor de referência tabelado para o nível de significância α .

Na comparação, a hipótese nula (H_0) deve ser rejeitada se o valor calculado para a estatística de teste for maior que o valor crítico tabelado. Entretanto, a hipótese nula (H_0) deve ser aceita se o valor calculado para a estatística de teste for menor que o valor crítico tabelado.

1.5.4.3 P-valor

Devido a facilidade do uso de computadores, outro procedimento também é adotado para verificação da região crítica. Consiste em determinar o p-valor, que corresponde a probabilidade na qual o parâmetro medido (médias ou desvios, por exemplo) encontra-se no conjunto de dados testado, assumindo que a hipótese nula seja verdadeira. Um p-valor de 0,05 por exemplo, indica que existe uma probabilidade de 5% de que o valor testado possa ser rejeitado, assumindo que a hipótese nula é verdadeira. Em situações de maior exigência é usado um valor p inferior a 0,05. A aceitação da hipótese nula, pela observação do p-valor dá-se pelos seguintes critérios (para $\alpha = 0,05$) (BROWN et al., 2009):

- p-valor < 0,05 - Indicador de que a hipótese nula é falsa (grande significância estatística);
- p-valor > 0,05 - Não há evidência suficiente para rejeitar a hipótese nula (baixa significância estatística).

1.5.4.4 Testes de comparação de médias e desvios padrão

Estes testes são utilizados quando há o interesse na avaliação de resultados para uma determinada hipótese em um nível de significância α preconizado. Para tal podem ser utilizadas metodologias baseadas na distribuição *t* de *Student* para comparação de médias e, portanto, detectar erros sistemáticos. Estes testes baseiam-se no cálculo de um valor que é comparado a um valor tabelado para aceitação da hipótese levantada. As comparações podem ser realizadas em relação a um valor conhecido, entre um valor médio, ou ainda entre duas médias. No decorrer do trabalho serão apresentadas as metodologias aplicadas para a escolha dessas comparações.

Para a verificação de erros aleatórios, pode-se avaliar quando dois métodos diferem em sua precisão (como por exemplo a comparação de uma nova metodologia com um método padrão) através de testes F, confrontando seus desvios padrão (HIBBERT & GOODING, 2006). O teste F dá-se pela seguinte equação:

$$F_{\text{cal}} = \frac{s_1^2}{s_2^2}$$

Onde: s_1^2 e s_2^2 representam as variâncias das replicatas, sendo o maior valor no numerador. O valor de F_{cal} é comparado a um valor tabelado (F_{tab}) para verificação da aceitabilidade da hipótese formulada. O valor tabelado é dado por $F_{tab, \alpha, v_1, v_2}$, onde $\alpha = 0,05$ (nível de significância de 5%), $v_1 =$ número de replicatas “n-1” no numerador e $v_2 =$ números de replicatas “n-1” no denominador.

1.5.4.5 Testes de variância

Dados as variâncias de n experimentos (normalmente maior que 2 grupos de variáveis), pode-se avaliar a distribuição de seus valores através de testes em um determinado nível de significância e testar as hipóteses de igualdade ou não das mesmas, como por exemplo a comparação de um conjunto de dados obtidos por dois métodos analíticos diferentes e verificar se a dispersão de valores é significativa.

Dado um certo conjunto de variáveis, cada observação X_{ij} pode ser decomposta em (BROWN et al., 2009):

$$X_{ij} = \mu + T_i + \epsilon_{ij} \quad i = 1, \dots, I \quad e \quad j = 1, \dots, J$$

Onde: μ = média geral, T_i = efeito do i -ésimo tratamento e ϵ_{ij} = erro associado ao tratamento (supondo que sejam independentes e igualmente distribuídos).

Para testar a diferença entre as médias dos tratamentos, utiliza-se as seguintes hipóteses:

$$H_0 : \mu_1 = \mu_2 = \dots \mu_n$$

$$H_1 : \mu_1 \neq \mu_2 \neq \dots \mu_n$$

O resultado destes testes comparam a variância total decompondo-a em duas partes:

- a) entre as amostras (quadrado médio dos tratamentos);
- b) entre cada tratamento (quadrado médio do erro experimental - resíduos).

A análise de variância, ANOVA, utiliza a razão entre estes quadrados, através da estatística F, para testar a hipótese H_0 , onde os dados são sumarizados na Tabela 2, de resultados da variância.

Tabela 2 - Valores demonstrados para cálculo de análise de variância.

Causas de Variação	Graus de liberdade	Soma de Quadrados	Quadrados médios	F calculado	p-valor
Tratamentos	$I - 1$	SQTrat	QMTrat	QMTrat / QMRes	< ou > que " α "
Resíduos	$I(J - 1)$	SQRes	QMRes		
Total	$I.J - 1$	SQTotal			

Fonte: Adaptado de Miller & Miller, 2010.

Caso o valor F calculado seja maior que o valor F tabelado, rejeita-se a hipótese nula, evidenciando que há significativas diferenças entre pelo menos um dos pares testados. O resultado também pode ser avaliado utilizando o p-valor frente a um nível de significância α .

Como requisito à utilização da ANOVA devem ser realizados testes de verificação da homogeneidade das variâncias. Em casos onde os parâmetros de normalidade são seguidos, utiliza-se o teste de Bartlett. Caso a hipótese de normalidade seja violada, utiliza-se o teste de Levene para verificação da homocedasticidade das variâncias. Quando o interesse é testar as combinações "par a par" entre grupos, utiliza-se o teste de Tukey de comparações múltiplas (BROWN et al., 2009).

1.5.4.6 Testes de verificação da normalidade

Atenta-se, nesta seção, que a maioria das metodologias estatísticas descritas anteriormente, somente são aplicadas se atenderem pressupostos de parametricidade quanto a normalidade. Para verificação desta condição podem ser realizados testes que baseiam-se na seguintes hipóteses (ROWE, 2007):

H_0 : distribuição normal dos dados

H_1 : distribuição não normal dos dados

A aceitação da hipótese nula de distribuição normal dos dados pode ser realizada através dos testes de Anderson-Darling ou Kolmogorov-Smirnov. Estes testes baseiam-se na comparação do conjunto de dados em relação a seu valor médio e seus desvios.

Caso ocorra a rejeição da hipótese nula, são realizados testes não paramétricos para análise de variância, como Mann-Whitney (para comparação de dois conjuntos de dados) ou o teste de Kruskal-Wallis (para conjuntos de dados maiores que 2).

1.5.5 Estatística multivariada: Quimiometria

O termo quimiometria refere-se a utilização de técnicas multivariadas no estudo de fenômenos químicos. Atualmente muita ênfase tem sido dada aos sistemas multivariados, nos quais pode-se analisar muitas variáveis simultaneamente em uma amostra qualquer (HAIR et al., 2009).

A utilização de diversas respostas instrumentais para prever o comportamento de analitos em amostras ambientais explica porque métodos quimiométricos tornaram-se ferramentas analíticas muito poderosas, uma vez que podem revelar padrões relevantes e fontes de variação em grandes conjuntos de dados. A necessidade de compreensão das relações entre as diversas variáveis faz com que as análises multivariadas apresentem maior complexidade permitindo:

- redução de dados ou simplificação estrutural: o fenômeno sob estudo é representado da maneira mais simples possível, sem sacrificar informações valiosas e facilitando as interpretações;
- ordenação e agrupamento: agrupamento de objetos ou variáveis similares, baseados em dados amostrais ou experimentais;
- investigação da dependência e influência entre variáveis.

Para a realização de testes multivariados, primeiramente é necessária a avaliação dos dados uma vez que em função da natureza dos mesmos, podem ser necessários tratamentos prévios, como transformações aos que apresentem

grandezas diferentes, neste caso podem ser realizados processamentos como (RIBEIRO, 2001):

- centrar os dados na média: a média de cada variável é subtraída de cada elemento do conjunto de dados, seguindo de disposição dos valores calculados;
- escalonamento da variância: utilizado quando as variáveis apresentam grande discrepância. Os valores são divididos pelo seu desvio padrão e, deste forma, as variáveis apresentam pesos equivalentes;
- autoescalonamento: junção das técnicas anteriores, permitindo média igual a zero e variância igual a um, possibilitando a mesma importância para as variáveis, independente da sua dimensão.

1.5.5.1 Análise de Componentes Principais

A Análise de Componentes Principais (*Principal component analysis* - PCA) é utilizada para reduzir a dimensionalidade original e fornecer uma visão estatisticamente privilegiada do conjunto de dados permitindo transformar um conjunto de variáveis originais, inter-correlacionadas, em um novo conjunto para descrever estes dados e que mantém ao máximo a variabilidade do conjunto, os componentes principais (BROWN et al., 2009). Estes são ortogonais entre si e ordenados em termos de quantidade de variância explicada pelos dados, sendo que o primeiro componente principal encontra-se na direção da maior variância. O objetivo mais imediato da PCA é identificar as variáveis mais importantes no espaço das componentes principais. Sintetizando, a análise de componentes principais consiste em reescrever as variáveis originais em novas variáveis denominadas componentes principais, através de uma transformação de coordenadas, onde cria-se um novo conjunto de novas variáveis linearmente independentes para a descrição dos dados.

1.5.5.2 Análise de agrupamentos hierárquicos

A análise de agrupamentos hierárquicos (*Hierarchical cluster analysis* - HCA) examina as relações entre amostras, de forma que os elementos de um mesmo agrupamento se assemelham entre si e se diferenciam dos restantes. A similaridade

entre duas amostras é expressa em função da distância entre os dois pontos representativos destas amostras no espaço n-dimensional, com isso reduz-se o número de variáveis através da combinação de características semelhantes, examinando as distâncias interpontuais entre todas as amostras do conjunto de dados e representando essa informação na forma de um dendrograma, que representam diagramas onde a similaridade entre os grupos de amostras é avaliada (RIBEIRO, 2001; MILLER & MILLER, 2010).

2 OBJETIVOS

Objetivo geral:

- Estudar questões relativas ao emprego e interpretação estatística e químiométrica em diversos procedimentos utilizados na validação metodológica para análise de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs).

Como objetivos específicos têm-se:

- Estudo e avaliação das características dos Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos na presença de matrizes ambientais com base em métodos multivariados;
- Estudo e sistematização de métodos estatísticos e químiométricos para utilizar na análise de dados experimentais obtidos em parâmetros de validação analítica.

3 APRESENTAÇÃO DO TRABALHO

Para facilitar a leitura desta dissertação, as etapas de desenvolvimento do trabalho estão apresentadas da seguinte maneira:

- 1º) Estudo e sistematização das ferramentas estatísticas a serem utilizadas;
- 2º) Análise exploratória multivariada para classificação e indicação de similaridades para os HPAs;
- 3º) Obtenção e tratamento de dados analíticos considerando os parâmetros de validação e de confiabilidade analítica desejados.

3.1 Estudo e sistematização das técnicas e modelos a serem utilizados

Esta etapa preliminar é importante para o entendimento de como os dados são recolhidos, organizados, sistematizados e interpretados, bem como quais testes são utilizados.

Salienta-se o fato de que muitos destes testes devem ser realizados se atenderem pressupostos paramétricos quanto a normalidade e igualdade da variância, por isso, previamente à utilização de quaisquer ferramenta estatística, devem ser realizadas verificações quanto a aceitação ou não destes pressupostos.

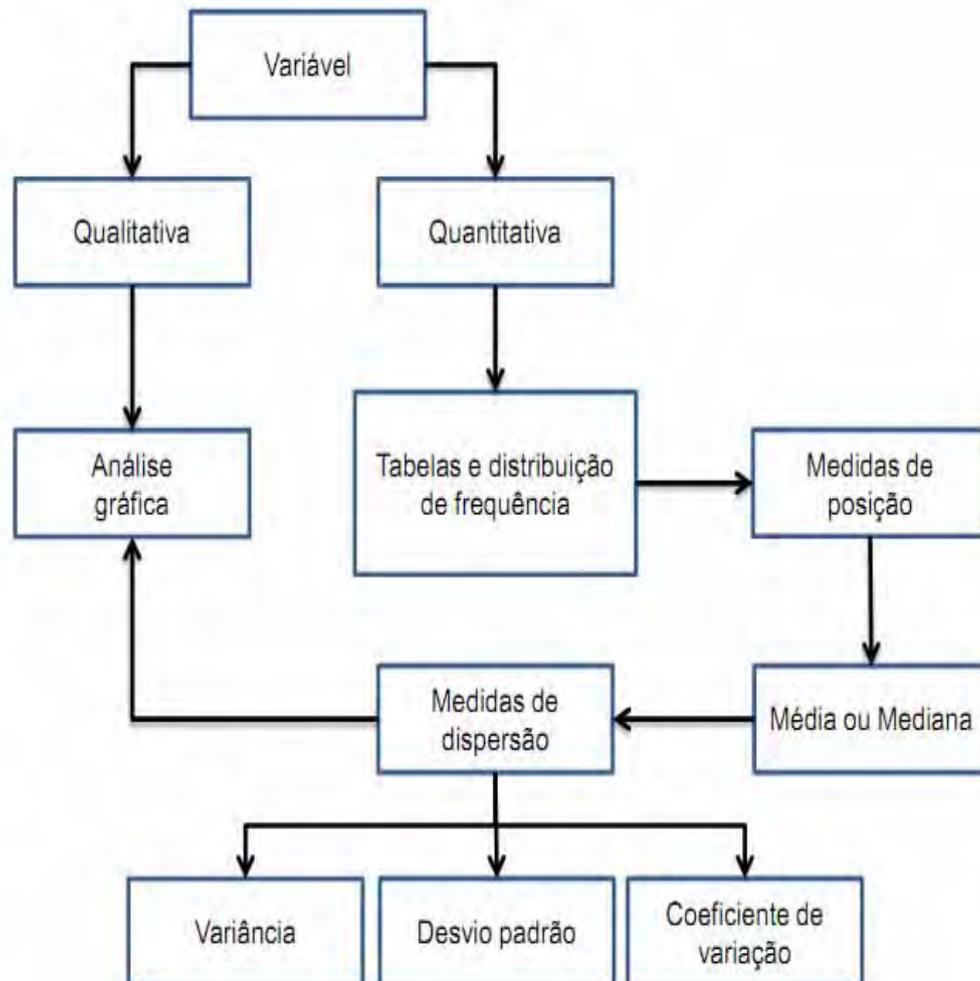
Os principais conceitos estudados e sistematizados para análise constituem em estimação de parâmetros; testes de hipóteses e relação entre duas ou mais variáveis.

A Figura 5 representa uma rotina para análise estatística descritiva dos dados, onde as variáveis podem ser qualitativas (que representam a classificação dos dados em categorias, sejam elas ordinais ou nominais) e quantitativas (valores expressos numericamente sejam estes discretos ou contínuos). Após a elaboração de tabelas, realizam-se tratamentos estatísticos (para as variáveis quantitativas) a fim de estimar o grau de dispersão em relação a posição deste valores, e os resultados por estes gerados podem ser expressos graficamente (gráfico de barras, colunas, áreas, superfícies, etc). A análise gráfica é de grande importância, pois proporciona a visualização de tendências e comportamentos do conjunto de dados, fornecendo elementos úteis à fase de análise dos mesmos.

Após a descrição dos dados, avalia-se o comportamento dos mesmos intra e inter grupos através de testes inferenciais, permitindo a estimativa de parâmetros (como homogeneidade de variância, normalidade dos dados, etc) para um intervalo de confiança. A Figura 6 representa a sistematização para análise estatística inferencial, nesta encontra-se uma sequência de testes que podem ser realizados (variância, comparação de médias, etc) em relação ao número de grupos de variáveis envolvidos na análise estatística. Para exemplificar os cálculos efetuados em testes de comparação de médias baseados na estatística t de *Student*, são demonstrados nas Figuras 7, 8 e 9 os fluxogramas de testes para uma média, de comparação de um valor médio com um valor conhecido e os testes para comparação de duas médias, respectivamente.

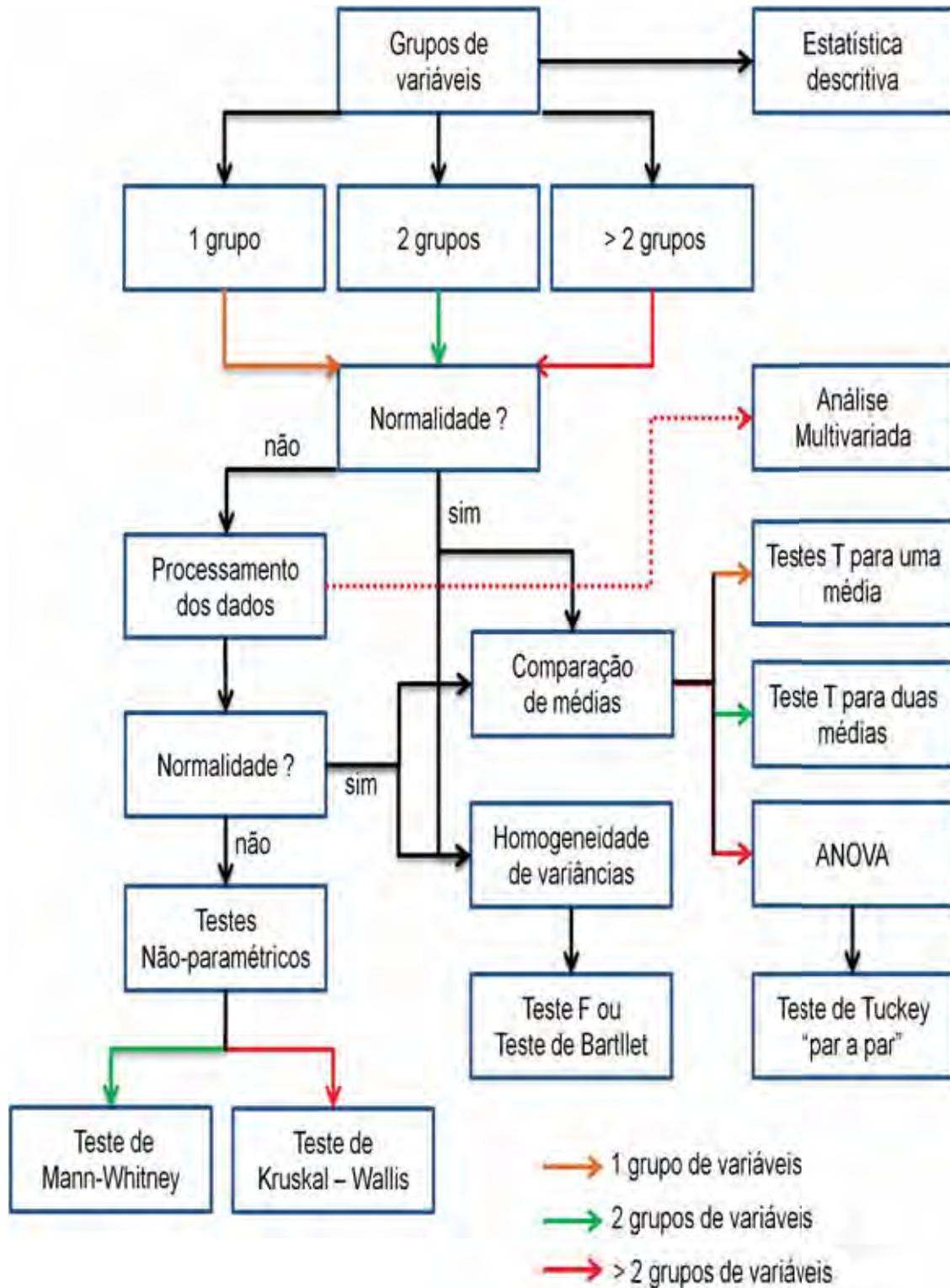
As rotinas computacionais desses procedimentos, e de outros que foram estudados durante esta etapa do trabalho foram implementadas em planilhas de cálculo no Microsoft Excel[®]. A utilização deste software é facilitada pela ampla disponibilidade do mesmo em comparação com outros pacotes estatísticos. Também foram utilizados softwares específicos como XLStat[®] e *Statistica*[®] 7.0.

Figura 5 - Sistematização para análise estatística descritiva.



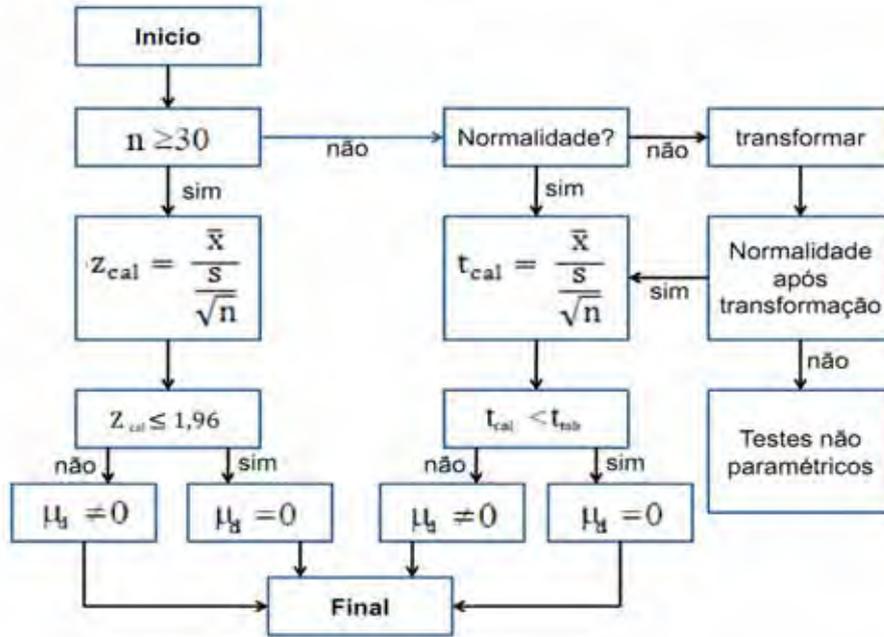
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 6 - Sistematização para análise estatística inferencial relativa ao número de grupos de variáveis.



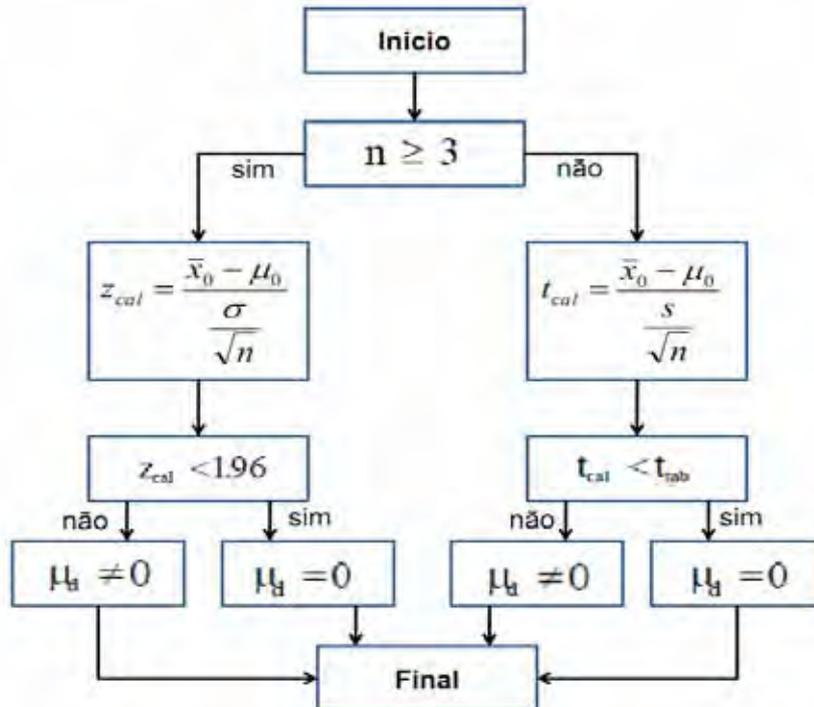
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 7 - Fluxograma de procedimentos para teste t para uma média \bar{x} .



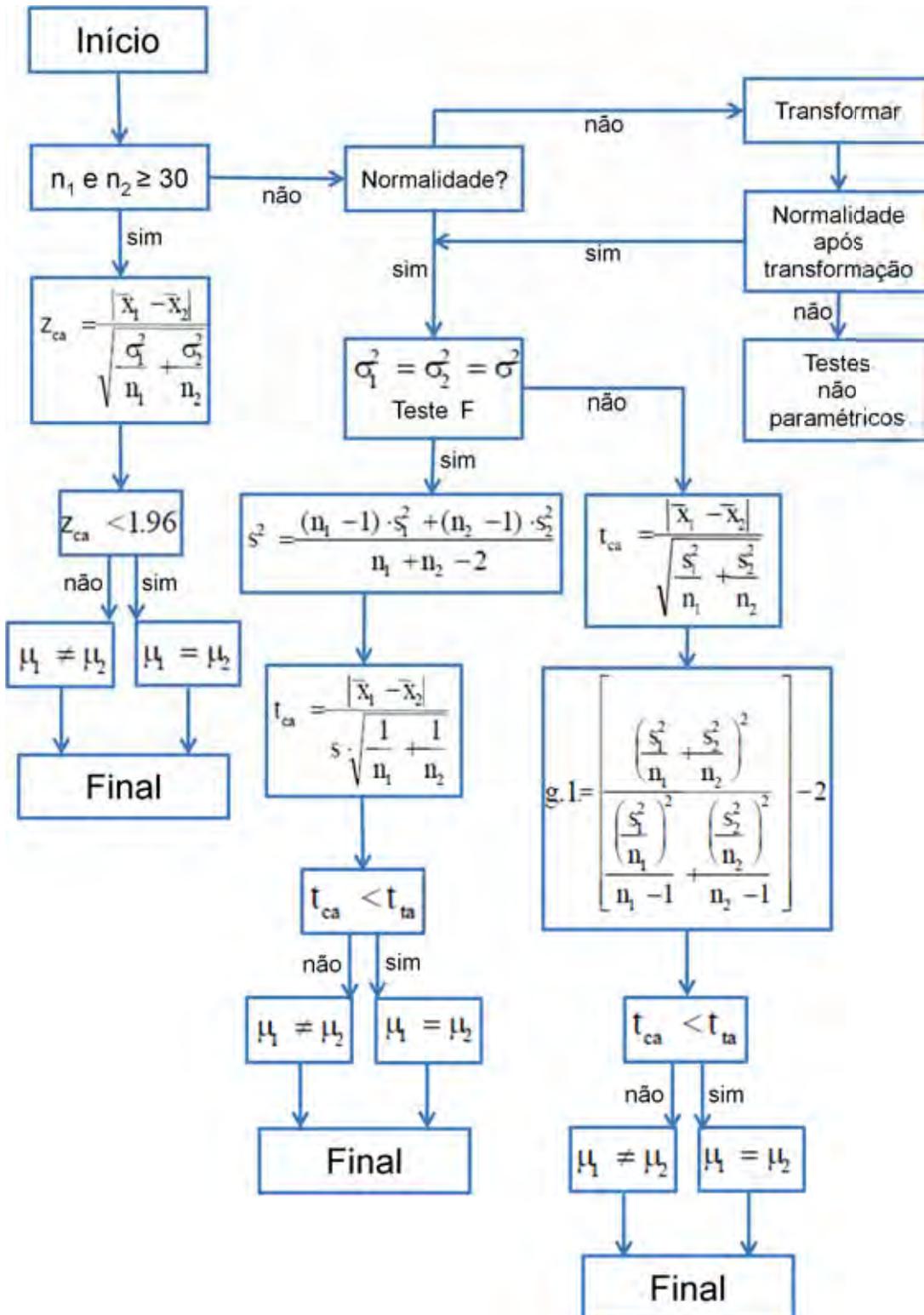
Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 8 - Fluxograma de procedimentos para comparação do valor de uma amostra x_0 com um valor conhecido μ_0 .



Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 9 - Fluxograma para teste t de comparação de duas médias.



Fonte: Elaborado pelo autor

3.2 Análise multivariada de classificação e indicação de similaridades para os HPAs

A análise multivariada foi efetuada para que sejam demonstradas características relativas aos HPAs que justifiquem o comportamento em determinadas etapas do processo de validação analítica. Para avaliação das ferramentas empregadas nesta etapa, realizou-se levantamento de algumas características físico-químicas dos HPAs (Tabela 3) e através deste realizaram-se procedimentos para averiguar como estas características se comportam no modelo multivariado e quais interpretações podem fornecer quanto aos HPAs.

Tabela 3 - Propriedades físico-químicas dos HPAs.

HPA	Massa Molar (g mol ⁻¹)	PF (°C)	PE (°C)	Solubilidade em água a 25°C (mg L ⁻¹)	Pressão de vapor (torr a 20°C)	Log. K _{ow}	Constante de Henry (atm M ⁻¹ 10 ⁻⁵)	Fugacidade	Volume Molar (cm ³ mol)	Área molecular (Å ²)	Volume molecular (Å ³)
Naftaleno	128,17	80,20	218,00	32,00	4,92. 10 ⁻²	3,37	43,01	0,28	147,60	155,80	126,90
Acenaftileno	15220	92,50	270,00	3,93	2,90. 10 ⁻²	4,00	8,40	0,22	165,70	193,60	133,00
Acenafteno	154,21	93,40	277,50	4,00	2,00. 10 ⁻²	3,92	12,17	0,20	173,00	180,80	148,80
Fluoreno	166,22	115,00	295,00	1,90	1,30. 10 ⁻²	4,18	7,87	0,13	188,00	194,00	160,30
Fenantreno	178,23	99,20	339,00	1,30	6,80. 10 ⁻⁴	4,50	4,00	0,18	199,00	198,00	169,40
Antraceno	178,23	215,00	340,00	0,60	1,96. 10 ⁻⁴	4,50	3,96	0,01	197,00	202,20	170,20
Fluoranteno	202,26	108,00	375,00	2,60. 10 ⁻¹	6,00. 10 ⁻⁶	5,10	1,04	0,14	217,00	198,00	187,70
Pireno	202,26	151,00	360,00	1,40. 10 ⁻¹	6,85. 10 ⁻⁷	4,90	0,92	0,05	214,00	213,00	186,00
Benzo[a]antraceno	228,29	167,00	435,00	1,00. 10 ⁻²	5,00. 10 ⁻⁹	5,90	0,58	0,05	248,00	244,30	212,80
Criseno	228,29	258,00	407,00	2,00. 10 ⁻³	6,30. 10 ⁻⁷	1,65	0,86	0,01	251,00	241,00	212,00
Benzo[e]acefenantrileno	252,32	168,00	481,00	1,20. 10 ⁻³	5,00. 10 ⁻⁷	5,80	0,02	0,04	268,90	250,00	230,30
Benzo[k]fluoranteno	252,32	217,00	481,00	5,50. 10 ⁻³	5,00. 10 ⁻⁷	6,00	0,02	0,01	268,90	266,00	231,10
Benzo[a]pireno	252,32	177,00	495,00	3,90. 10 ⁻³	5,00. 10 ⁻⁷	6,00	0,05	0,03	263,00	256,00	228,50
Benzo[g,h,i]perileno	268,34	222,00	500,00	2,60. 10 ⁻⁴	1,00. 10 ⁻¹⁰	6,50	0,08	0,00	277,00	266,90	244,30
Indeno[1,2,3-cd]pireno	276,33	164,00	536,00	6,20. 10 ⁻²	1,00. 10 ⁻¹⁰	6,40	0,00	0,00	277,00	276,00	250,00
Dibenzo[a,h]antraceno	278,35	262,00	524,00	5,00. 10 ⁻⁴	1,00. 10 ⁻¹⁰	6,50	0,00	0,04	300,00	286,50	255,40

PF = ponto de fusão; PE = ponto de ebulição; Log K_{ow} = Logaritmo do coeficiente de partição octanol/água;

Fonte: (MANOLE & SAMARA, 1999; DABESTANI & IVANOV, 1999)

Para processamento das variáveis da Tabela 3 utilizou-se o software *Statistica 7.0*. O pré-tratamento das variáveis (auto-escalamento) é realizado automaticamente pelo software e então é dada a apresentação dos resultados em função do método.

Para avaliar o comportamento das variáveis, utilizou-se o método de Análise de Componentes Principais (PCA). Os cálculos foram efetuados sem rotações ou restrição do número de componentes.

Os 4 primeiros componentes principais gerados representam 97,88% da variabilidade total (conforme Tabela 4). O restante dos componentes principais está em uma proporção muito pequena da variabilidade e não são significativamente importantes.

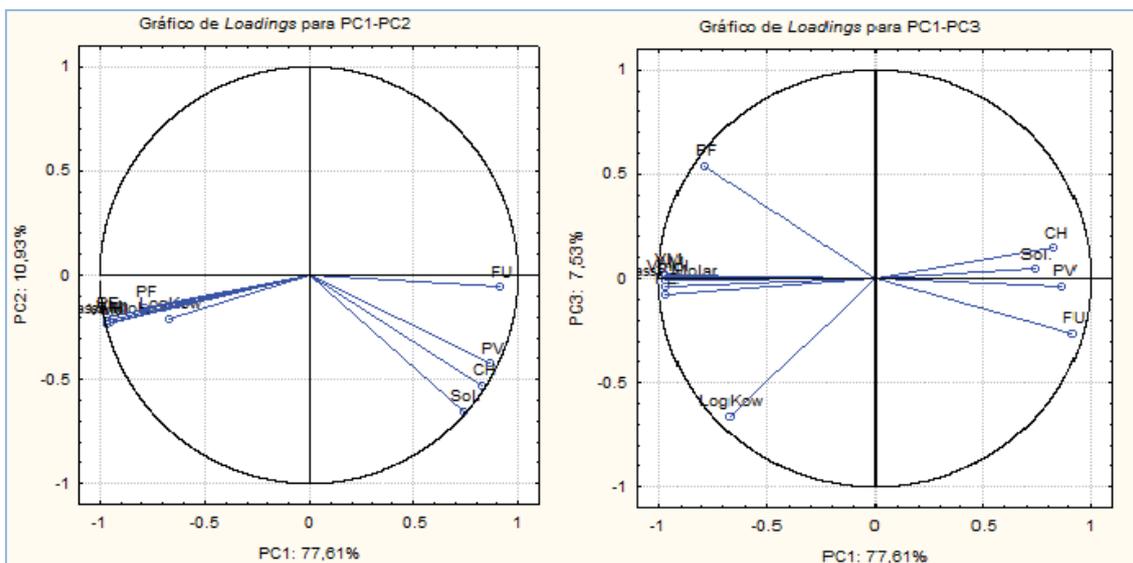
Tabela 4 - Porcentagem de variação da Análise de Componentes Principais.

	PC1	PC2	PC3	PC4
Variabilidade (%)	77,61	10,93	7,53	1,81
% acumulada	77,81	88,54	96,07	97,88

Fonte: Elaborada pelo autor

Os cálculos possibilitaram a construção de gráficos de *Loadings* entre as variáveis envolvidas nos componentes principais para a combinação PC1 – PC2 e PC1 – PC3, os resultados são apresentados em um círculo de correlação ao longo dos eixos, cujos valores variam de -1 a 1.

Figura 10 - Gráficos de *Loadings* gerado a partir da PCA.

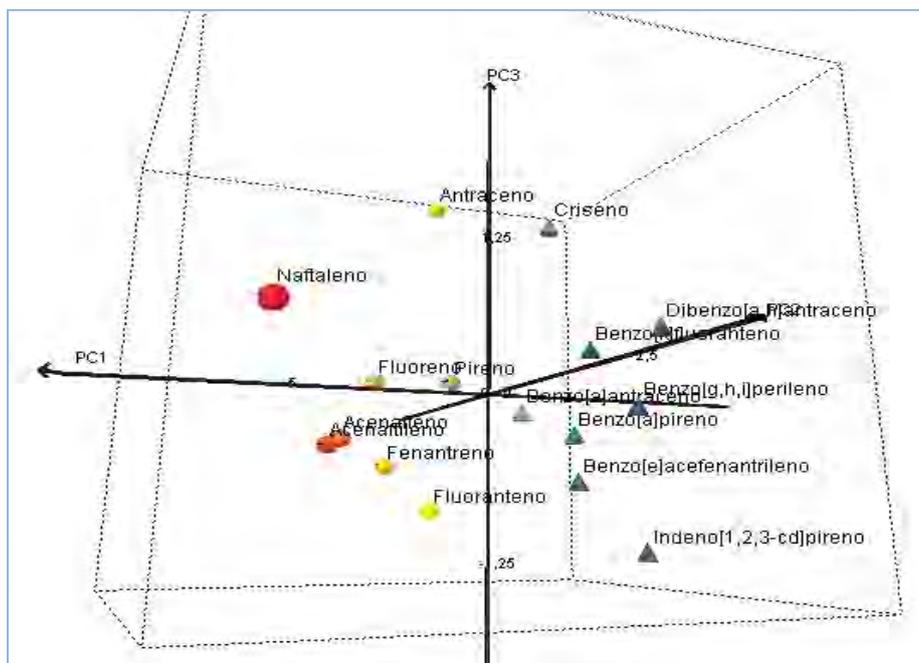


Fonte: Elaborado pelo autor.

A análise da Figura 10 demonstra dois grupos colineares inversamente relacionados (correlação negativa) entre si ao longo do eixo correspondente ao primeiro componente principal, o aumento de valores ao longo do eixo de um dos grupos acarreta no decréscimo do segundo. Apresentam contribuições similares pressão de vapor (PV), constante da lei de Henry (CH), fugacidade (FU) e solubilidade em água (Sol) assim como outro grupo onde se encontram massa molar (MM), Log.Kow, volume molar (VM), área molecular (AM) e volume molecular (VMo). Os agrupamentos demonstrados ocorrem porque as propriedades estão intrinsecamente relacionadas.

Na Figura 11, observa-se distribuição dos HPAs ao longo das combinações entre os 4 primeiros componentes principais. Os pontos gráficos contidos na espiral verde, correspondem os HPAs com 2 e 3 anéis aromáticos (acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno) exceção feita ao pireno, que apesar de apresentar 4 anéis aromáticos, apresenta volume molar próximo a este grupo. Os pontos correspondentes a espiral em laranja representam os HPAs com 4 ou 5 anéis, (benzo[a]antraceno, criseno, benzo[e]acefenantrileno, benzo[k]fluoranteno, benzo[a]pireno, benzo[g,h,i]perileno, indeno[1,2,3-cd]pireno, dibenzo[a,h]antraceno). O naftaleno (circulo azul) apesar de conter 2 anéis aromáticos, se afasta dos

Figura 12 - Gráfico Tridimensional dos escores em relação aos 3 primeiros componentes principais.

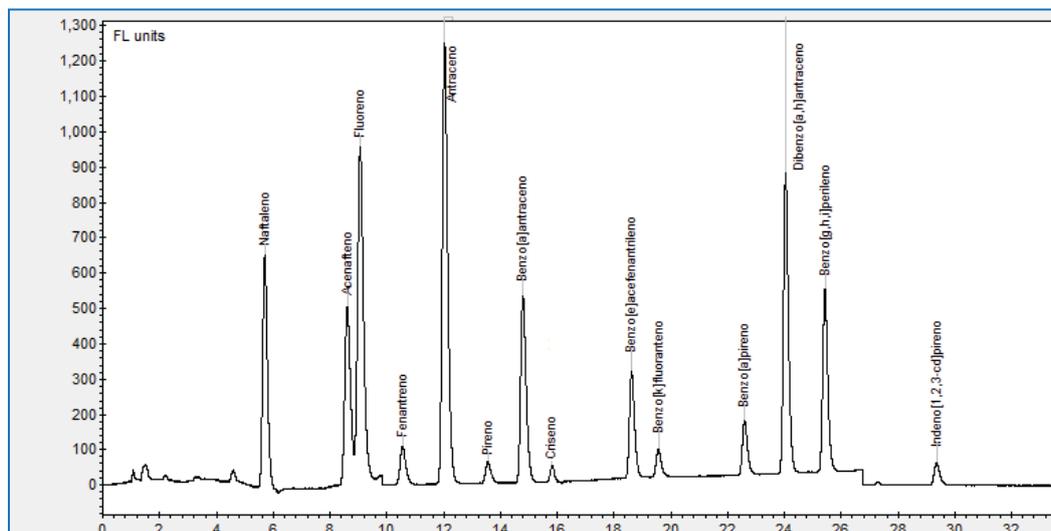


Fonte: Elaborado pelo autor.

Pode-se, através da Figura 12 demonstrar como são as interações e como se comportam os grupos observados, distribuindo-se principalmente ao longo do primeiro componente principal (responsável por 77,81 % da variabilidade) e relacionando com a distribuição encontrada nos gráficos de loadings (Figura 10). Pode-se avaliar, por exemplo, que a volatilidade dos HPAs aumenta ao longo do primeiro componente, assim como a solubilidade dos mesmos, uma vez que ocorrem decréscimos da massa molar desses compostos. Na análise cromatográfica a retenção em uma coluna de fase reversa em HPLC é dependente da massa/volume molar que por sua vez também definem a solubilidade e a volatilidade dos analitos. A detecção por fluorescência, utilizada neste trabalho, terá maior dependência do sistema de conjugação de duplas ligações, o que confere aos HPAs similaridade quanto à absorvidade molar. Esta condição é evidenciada quando demonstrada na Figura 13, onde temos um cromatograma obtido para os HPAs utilizando HPLC-Flu, onde os HPAs de grupos semelhantes são detectados em tempos de retenção mais próximos dos demais devido aos sistemas de interação entre

os analitos e a coluna cromatográfica serem parecidas, assim como se distanciam dos HPAs de características diferentes.

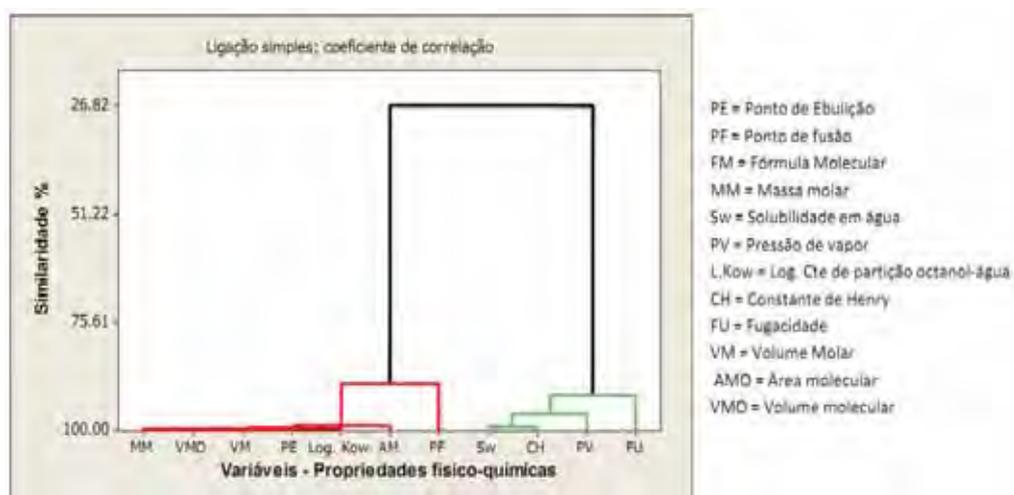
Figura 13 – Cromatograma obtido na análise de HPAs via HPLC-Flu.



Fonte: Elaborado pelo autor

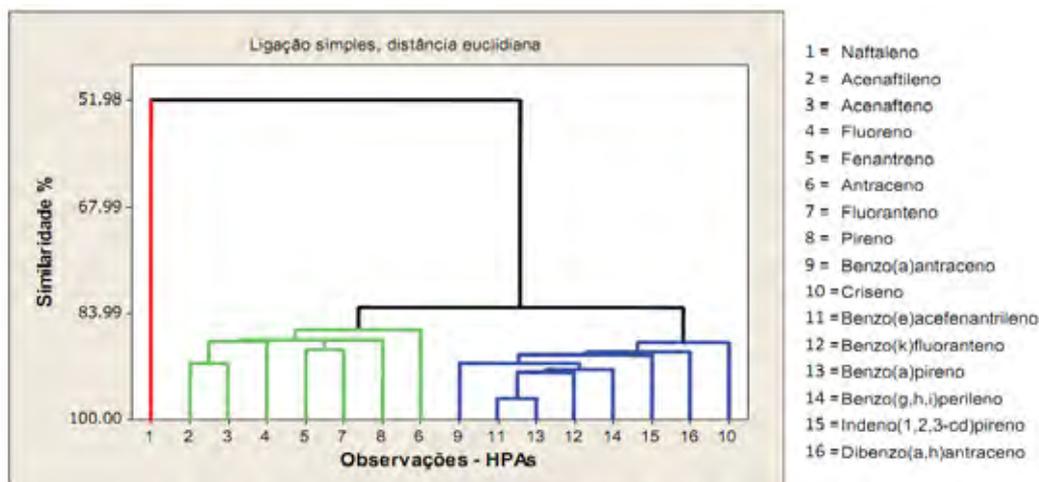
Para atestar a similaridade entre os grupos citados, realizou-se a análise de agrupamentos hierárquicos (HCA). Para tal teste, e geração gráfica, utilizou-se o método de ligação simples utilizando a distância euclidiana, para construção do dendograma relativo às similaridades dos HPAs e utilizando coeficiente de correlação para relacionar a similaridade das variáveis envolvidas. As Figuras 13 e 14 representam os dendogramas gerados.

Figura 14 - Dendograma de similaridade das propriedades físico-químicas.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 15 - Dendograma de similaridade para os HPAs.



Fonte: Elaborado pelo autor.

A observação dos dendogramas evidencia a presença de grupos distintos de HPAs, confirmando o comportamento distinto do naftaleno, situação já esperada visto suas propriedades físico-químicas. Através dos dendogramas também se avalia o nível de similaridade entre os grupos relacionados as propriedades físico-químicas.

3.3 Obtenção e tratamento estatístico de dados analíticos

Uma vez caracterizados os grupos de HPAs e como podem ser influenciados pelas variáveis estudadas, deu-se sequência no trabalho com a obtenção e tratamento de dados experimentais, levando em consideração parâmetros estatísticos aplicados a etapas do processo de validação analítica.

Os testes utilizados nesta etapa, para assegurar a confiabilidade, são encontrados na literatura específica para processos de validação (INSTITUTO..., 2010; INTERNATIONAL..., 1996), bem como fazem parte de metodologias estatísticas contidas nas sistematizações apresentadas anteriormente. A maioria delas fundamenta-se na distribuição em relação a um valor médio, cuja significância pode ser atestada através de cálculos e confronto com hipóteses formuladas.

3.3.1 Materiais e Equipamentos

- Padrões sólidos individuais de HPAs (pureza > 98%) obtidos do laboratório Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Alemanha) com exceção do benzo[k]fluoranteno e benzo[g,h,i]perileno (pureza>99%) que foram fornecidos pela Sigma-Aldrich Brasil Ltda;
- Acetonitrila, Metanol, n-Hexano, Acetona, Diclorometano, Acetato de Etila; grau HPLC, da MALLINKRODT Chemicals e TEDIA Company Inc.;
- Água Deionizada obtida do sistema Milli-Q plus (MILLIPORE);
- Hidróxido de Potássio, KOH, SIGMA ALDRICH;
- Sílicagel C₁₈, 70-230 mesh, 60Å, PHENOMENEX;
- Florisil, 60-100 mesh, SIGMA ALDRICH;
- Alumina ativada, 150 mesh, 58Å, SIGMA ALDRICH;
- Micropipetas 20-200mL/100 -1000mL, EPPENDORF;
- Balança METTLER TOLEDO AG245, ± 0,1mg;
- Cartuchos para extração em fase sólida Sampliq C18 Agilent Technologies em prolipropileno com 200 mg de sorvente e capacidade de 3mL de reservatório;
- HPLC modelo LC-920 VARIAN com detector de Fluorescência VARIAN;
- Coluna SUPELCOSIL LC PAH (250mm x 4,6 mm x 5µm) – SUPELCO.

3.3.1.1 Limpeza da vidraria

Toda a vidraria, previamente a sua utilização, foi imersa em solução alcalina de detergente Extran por um período de 12 horas, ultrassonificado por uma hora, sendo enxaguado em água corrente e, em seguida, empregando água deionizada. Por fim, uma etapa de enxague utilizando acetona, proveniente do Laboratório de Apoio Técnico do IQ/UNESP. A secagem da vidraria foi efetuada em estufa à temperatura de 90° C, a exceção da vidraria volumétrica, seca a temperatura ambiente.

3.3.1.2 Preparação das soluções estoque

Foram preparadas soluções estoque dos HPAs utilizando padrões sólidos individuais de HPAs, em concentrações descritas na Tabela 5, utilizando acetonitrila como solvente. A partir das soluções-estoque, foram preparadas soluções de trabalho mistas através de diluições em concentrações no intervalo de 0,1 a 25,0 ng mL⁻¹.

Tabela 5 - Concentrações da solução estoque de HPAs.

HPAs	Concentração (mg.mL ⁻¹)
Naftaleno	0,032
Acenafteno	0,028
Fluoreno	0,024
Fenantreno	0,036
Antraceno	0,036
Fluoranteno	0,032
Pireno	0,024
Benzo(a)antraceno	0,022
Criseno	0,022
Benzo(k)fluoranteno	0,018
Benzo(a)pireno	0,024
Benzo(g,h,i)perileno	0,022
Indeno(1,2,3-cd)pireno	0,020
Dibenzo(a,h)antraceno	0,020

Fonte: Elaborado pelo autor.

3.3.1.3 Condições Cromatográficas

Para a realização das medições empregou-se um cromatógrafo líquido Varian – LC 920, equipado com *autosampler*, detector de fluorescência e forno para colunas. As condições cromatográficas utilizadas foram as otimizadas anteriormente neste mesmo grupo de pesquisa por Silva (2011), e estão sumarizadas na Tabela 6.

Tabela 6 - Parâmetros cromatográficos utilizados.

Parâmetro	Condição Instrumental
Coluna	SUPELCOSIL LC PAH (250mm x 4,6 mm x 5µm)
Vazão	1.5 mL min ⁻¹
Composição da fase móvel	Acetonitrila : Água, modo gradiente 60% ACN (5 min) ---- 20 min ---- 100% ACN (15 min)
Comprimentos de onda (excitação e emissão)	220 --- 322 nm (0 - 10 min) 240 --- 398 nm (10 - 32 min) 300 --- 498 nm (32 - 40 min)

Fonte: Elaborado pelo autor.

3.3.2 Influência do número de replicatas: repetibilidade experimental

Estudou-se nesta etapa do trabalho a influência do número de replicatas na determinação dos HPAs. A literatura sugere como necessária a utilização de um número ≥ 7 replicatas (INSTITUTO..., 2010). Para testar este parâmetro, realizou-se a análise cromatográfica (via condições da Tabela 6) das soluções mistas de HPAs utilizando 7, 5 e 3 replicatas, utilizando 3 concentrações (1, 15 e 25 ng mL⁻¹).

As áreas obtidas para todos os HPAs foram agrupadas em matrizes de dados para a realização de testes estatísticos que visam verificar qual conjunto de replicatas apresenta variância significativa em relação aos outros.

Para tal análise inicialmente verificou-se a normalidade do conjunto de dados para evidenciar quais testes de análise de variância poderiam ser utilizados. Para comprovar a condição de normalidade dos dados, aplicou-se o teste de Anderson-Darling para um $\alpha = 0,05$ empregando o software *Statistica* 7.0, para as seguintes hipóteses:

H_0 : o conjunto de dados segue distribuição normal

H_1 : o conjunto de dados não segue uma distribuição normal

O resultado do teste indicou um p-valor $< 0,001$, como o p-valor calculado é menor que o nível de significância rejeita-se a hipótese nula H_0 , indicando que o conjunto não apresenta distribuição normal.

Uma vez verifica tal condição, utilizou-se o teste de Levene para verificação de comportamento homocedástico de variância. Este procedimento consiste em realizar uma transformação dos dados originais e aplicar aos dados transformados o teste da ANOVA assumindo as seguintes hipóteses (BROWN, 2009):

H_0 : igualdade das variâncias

H_1 : ao menos uma das variâncias apresenta-se diferente

O resultado do teste esta sintetizado na Tabela 7.

Tabela 7 - Tabela de análise de variância verificação da variância obtido via análise dos dados no software *Statistica 7.0*.

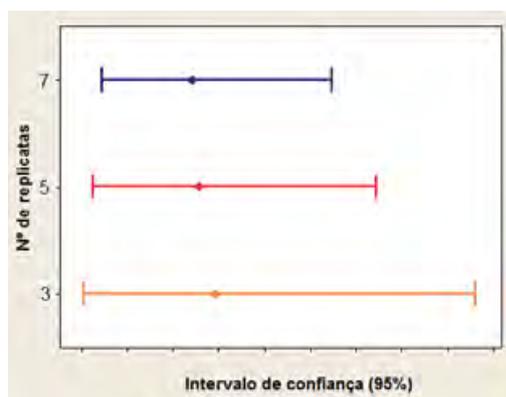
ANOVA – Teste de Levene				
Fonte da variação	Soma dos Quadrados	Graus de liberdade	Média dos Quadrados	P-valor
Entre grupos	72,57	2	36,28	0,997
Dentro dos grupos	1284369,04	115	11168,43	
Total	1284441,61	117		

Fonte: Elaborado pelo autor.

Verifica-se que o p-valor possui valor igual a 0,997, e como é maior que o nível de significância $\alpha = 0,05$ não rejeita-se a hipótese nula H_0 , ou seja, os grupos relativos ao conjunto de dados com 7, 5 ou 3 replicatas apresentam igualdade de variância.

A Figura16 demonstra graficamente as variâncias em relação ao número de replicatas para um intervalo de confiança de 95%.

Figura 16 - Comparativo da variância das replicatas.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Testou-se então o grau de correlação entre os conjuntos de dados das replicatas, utilizando o teste de correlação de Pearson, indicando que o método com 7 replicatas possui 95,6% de relação com o método com 5 replicatas, já em relação ao método em triplicata, verifica-se 89,5% de correlação. Para o conjunto 5 e 3 replicatas temos 92,3% de correlação.

Em adição aos testes realizados acima, calculou-se o erro padrão (incerteza tipo A) de cada conjunto de replicatas para todos os HPAs, nas concentrações citadas anteriormente. Este cálculo indica a variação de um grandeza para uma série de n medições relacionando o desvio padrão (medida de dispersão) com o número de replicatas, aliado a estatística “t”, este permite demonstrar a significância do resultado dentro de um intervalo de confiança (95%). Para tal utilizou-se a fórmula abaixo:

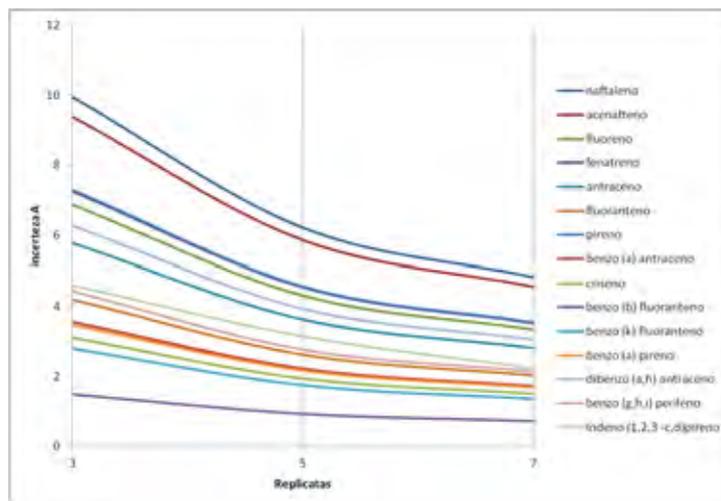
$$\Delta = \frac{t \cdot s}{\sqrt{n}}$$

Onde: t = estatística t para “n” replicatas e desvio-padrão “s”.

Para este cálculo, foram consideradas as médias dos desvios padrões de cada análise de HPA nos conjuntos de replicatas (Tabelas 18 e 19, **APÊNDICE C**), e valores tabelados de t (**ANEXO B**) de 3,18, 2,57 e 2,37 para os conjuntos de 3, 5 e 7 replicatas, respectivamente para um $\alpha=0,05$.

A partir de 5 replicatas verifica-se uma tendência de diminuição e linearização do erro relativo, situação mais claramente demonstrada na Figura 17.

Figura 17 - Magnitude da incerteza em relação ao número de replicatas.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Em função dos testes realizados estabeleceu-se o número de 5 replicatas para a análise dos HPAs, pois a variação torna-se menos significativa a partir deste conjunto de replicatas dentro do intervalo de confiança preconizado no trabalho (95%), apresentando repetibilidade estatística aceitável.

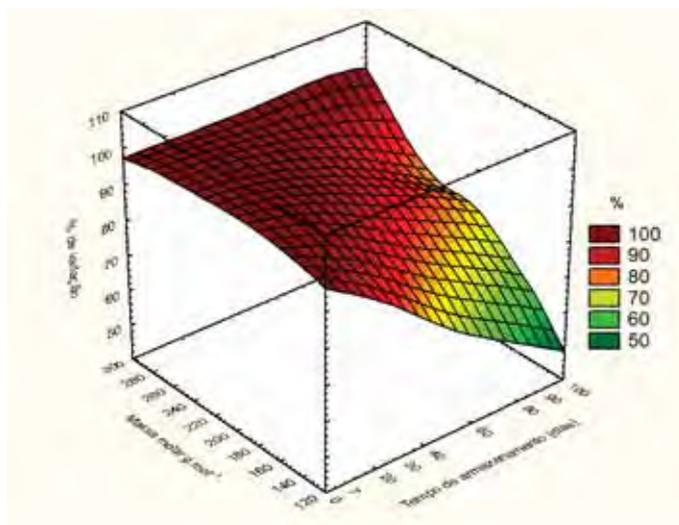
3.3.3 Estudo da estabilidade das soluções padrão

A estabilidade das soluções mistas de HPAs preparadas em concentrações já mencionadas foi investigada para que seja estabelecido o tempo de validade de tais soluções, ou seja o tempo de armazenamento máximo para então apresentarem desvios significativos (CASSIANO et al., 2009). Os resultados gerados por estes testes são importantes para estabelecer quais valores obtidos experimentalmente são significativos e qual o tempo que podem ser utilizados para a determinação dos HPAs.

As soluções mistas dos HPAs foram armazenadas em freezer ($T = -20^{\circ}\text{C}$) e analisadas em períodos de tempo previamente determinados (1, 7, 30, 45, 90 dias) em 3 concentrações (1, 15 e 25 ng mL^{-1}) utilizando o HPLC-Flu nas condições descritas na Tabela 6. Os resultados obtidos das 5 replicatas (conforme escolha realizada na seção anterior) demonstram que a estabilidade aumenta em função da massa molar dos HPAs (característica

demonstrada na análise multivariada dos componentes principais), decréscimos maiores ocorrem em HPAs com 2 e 3 anéis aromáticos, conforme Figura 18, onde construiu-se uma superfície de resposta, utilizando como variáveis o tempo de armazenamento, a massa molar do HPAs e a % de variação calculada com as análises.

Figura 18 - Superfície de resposta para verificação de estabilidade.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Para estabelecer qual o tempo de utilização e estabilidade das soluções, avaliou-se a precisão dos dados obtidos, para verificar o quão disperso encontram-se para um nível de confiança de 95%. O cálculo efetuado leva em consideração o intervalo de confiança da média das áreas cromatográficas obtidas para os HPAs, estatística $t = 2,57$ para $\alpha=0,05$ (**ANEXO B**).

Foram testados todos os períodos de tempo mencionados, e verificou-se que a partir de 45 dias de armazenamento os valores obtidos cromatograficamente para os HPAs com 2 e 3 anéis aromáticos eram rejeitados. O tempo de armazenamento correspondente a 30 dias atendeu ao intervalo de confiança, não apresentando valores rejeitados para as concentrações utilizadas, sendo este o prazo de armazenamento máximo utilizado nas etapas seguintes do trabalho.

A tabela 8 ilustra a planilha de cálculo elaborada e os resultados obtidos para aceitação ou rejeição em relação a um intervalo de confiança.

Tabela 8 - Tabela para aceitação de áreas cromatográficas para estudo de estabilidade elaborada em planilha de cálculo.

HPAs	Dias de Armazenamento														
	1			7			30			45			90		
	Área média	Teste de aceitação	Intervalo de aceitação	Área média	Intervalo de aceitação	Intervalo de aceitação	Área média	Intervalo de aceitação	Intervalo de aceitação	Área média	Intervalo de aceitação	Intervalo de aceitação	Área média	Intervalo de aceitação	Intervalo de aceitação
Naftaleno	81,0	Aceitar	Aceitar	81,0	Aceitar	Aceitar	79,0	Aceitar	Aceitar	63,2	Rejeitar	Rejeitar	49,9	Rejeitar	Rejeitar
Acenafteno	107,1	Aceitar	Aceitar	107,1	Aceitar	Aceitar	103,8	Aceitar	Aceitar	90,9	Rejeitar	Rejeitar	76,4	Rejeitar	Rejeitar
Fluoreno	73,0	Aceitar	Aceitar	73,0	Aceitar	Aceitar	71,2	Aceitar	Aceitar	61,4	Rejeitar	Rejeitar	50,7	Rejeitar	Rejeitar
Fenantreno	123,5	Aceitar	Aceitar	123,5	Aceitar	Aceitar	117,5	Aceitar	Aceitar	109,3	Aceitar	Aceitar	80,9	Rejeitar	Rejeitar
Antraceno	96,7	Aceitar	Aceitar	96,7	Aceitar	Aceitar	95,3	Aceitar	Aceitar	80,0	Rejeitar	Rejeitar	74,4	Rejeitar	Rejeitar
Fluoranteno	82,4	Aceitar	Aceitar	82,0	Aceitar	Aceitar	80,8	Aceitar	Aceitar	75,2	Rejeitar	Rejeitar	69,9	Rejeitar	Rejeitar
Pireno	56,3	Aceitar	Aceitar	56,2	Aceitar	Aceitar	55,4	Aceitar	Aceitar	52,4	Aceitar	Aceitar	45,5	Rejeitar	Rejeitar
Benzo[a]antraceno	54,4	Aceitar	Aceitar	53,3	Aceitar	Aceitar	52,5	Aceitar	Aceitar	46,8	Aceitar	Aceitar	38,8	Rejeitar	Rejeitar
Criseno	19,6	Aceitar	Aceitar	19,5	Aceitar	Aceitar	19,4	Aceitar	Aceitar	19,2	Aceitar	Aceitar	15,7	Rejeitar	Rejeitar
Benzo[e]acefenantrileno	27,0	Aceitar	Aceitar	26,9	Aceitar	Aceitar	26,8	Aceitar	Aceitar	26,5	Aceitar	Aceitar	22,0	Rejeitar	Rejeitar
Benzo[k]fluoranteno	49,3	Aceitar	Aceitar	49,3	Aceitar	Aceitar	49,1	Aceitar	Aceitar	48,5	Aceitar	Aceitar	41,8	Rejeitar	Rejeitar
Benzo[a]pireno	42,0	Aceitar	Aceitar	42,0	Aceitar	Aceitar	41,8	Aceitar	Aceitar	40,5	Aceitar	Aceitar	35,7	Rejeitar	Rejeitar
Benzo[g,h,i]perileno	48,8	Aceitar	Aceitar	48,8	Aceitar	Aceitar	48,6	Aceitar	Aceitar	47,9	Aceitar	Aceitar	42,2	Rejeitar	Rejeitar
Indeno[1,2,3-cd]pireno	82,8	Aceitar	Aceitar	82,8	Aceitar	Aceitar	82,4	Aceitar	Aceitar	81,4	Aceitar	Aceitar	79,0	Rejeitar	Rejeitar
Dibenzo[a,h]antraceno	56,5	Aceitar	Aceitar	55,4	Aceitar	Aceitar	55,1	Aceitar	Aceitar	54,5	Aceitar	Aceitar	51,9	Rejeitar	Rejeitar

Fonte: Elaborado pelo autor.

3.3.4 Estudo da linearidade

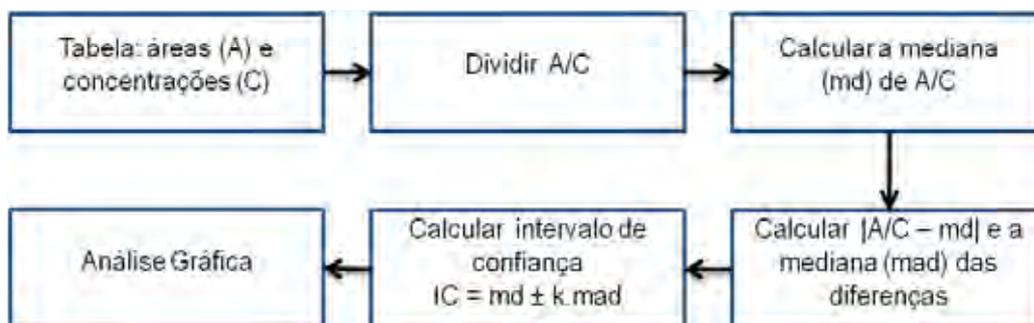
A próxima etapa corresponde à verificação, adequação e ajuste da linearidade, assim como a análise do processo de regressão. Este parâmetro é fundamental para assegurar a confiabilidade experimental, uma vez que a resposta analítica é obtida em função da concentração do analito, a qual deve ser estudada em um intervalo de concentração apropriado, ou seja, dentro da linearidade (MILLER & MILLER, 2010).

Para a construção das curvas analíticas e determinação do intervalo de trabalho, os resultados obtidos a partir das injeções das soluções mistas de HPAs foram tratados em planilhas de cálculo elaboradas utilizando o software Excel, onde os únicos dados inseridos na planilha correspondem aos valores das variáveis x (concentrações da curva analítica) e y (áreas cromatográficas). No **APÊNDICE D** encontra-se a figura da planilha, bem como o detalhamento dos cálculos efetuados e interpretações por estes gerados para os resultados demonstrados na sequência.

Através de condicionais elaboradas foi permitida a verificação de diversos parâmetros importantes para o melhor ajuste linear, tais como desvio padrão, coeficiente de variação (relacionada à precisão analítica, obtendo valores de 0,3% a 15,2%, sendo os HPAs com menor massa molecular os que apresentam maiores desvios), erro relativo, intervalo de confiança da média (valores para os quais se pode afirmar que os resultados apresentam significância estatística) entre outros, levando-se em consideração o nível de confiança desejado. As planilhas também fornecem testes relativos à detecção e rejeição de *outliers* baseados no teste de Huber.

A sequência de cálculos para o teste de Huber encontra-se em seguida, na Figura 19.

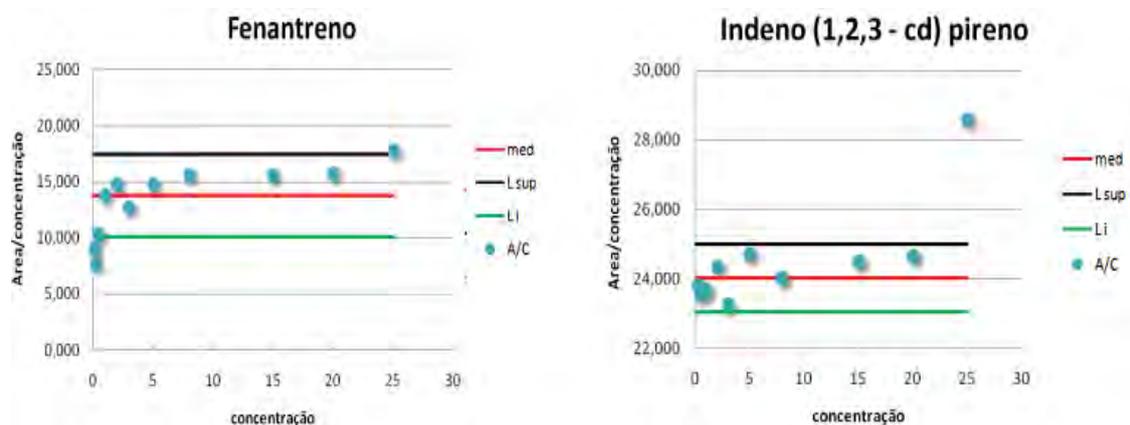
Figura 19 - Sequência para realização do teste de Huber para detecção de *outliers*.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Calcularam-se, através das áreas cromatográficas obtidas em função das concentrações os elementos apresentados na Figura 19 (medianas e limites) e construíram-se gráficos onde são observados os valores centrais e os limites inferiores e superiores de aceitação dos resultados experimentais (Figura 20).

Figura 20 - Teste de Huber realizado para o fenantreno e o indeno(1,2,3 - cd)pireno.



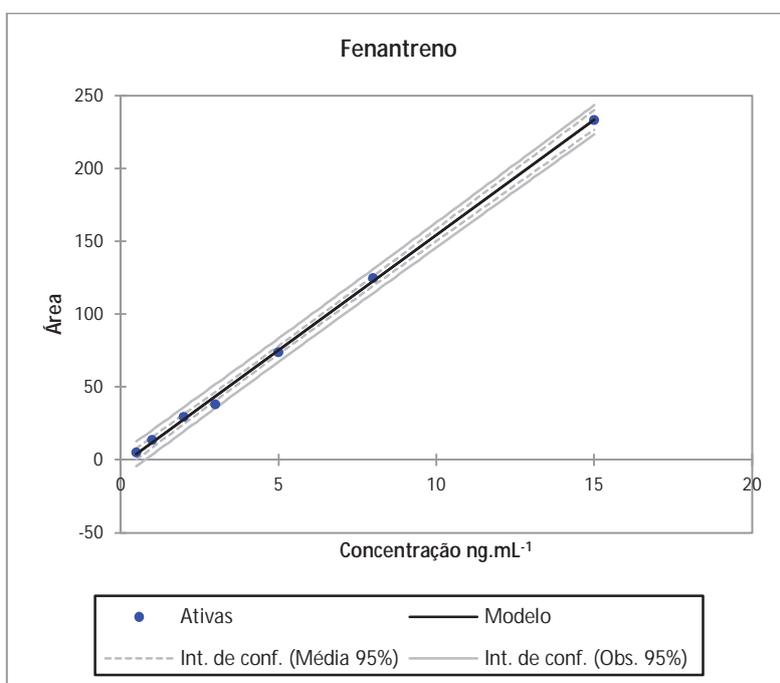
Fonte: Elaborado pelo autor.

A Figura 20 representa os parâmetros calculados através do Teste de Huber. Os pontos localizados acima do limite superior e abaixo do limite inferior são considerados *outliers* e não são levados em consideração na elaboração da curva analítica. Os termos localizados dentro deste limite constituem a faixa linear de aplicação. A aceitação ou rejeição dos pontos dá-se automaticamente através das condicionais elaboradas.

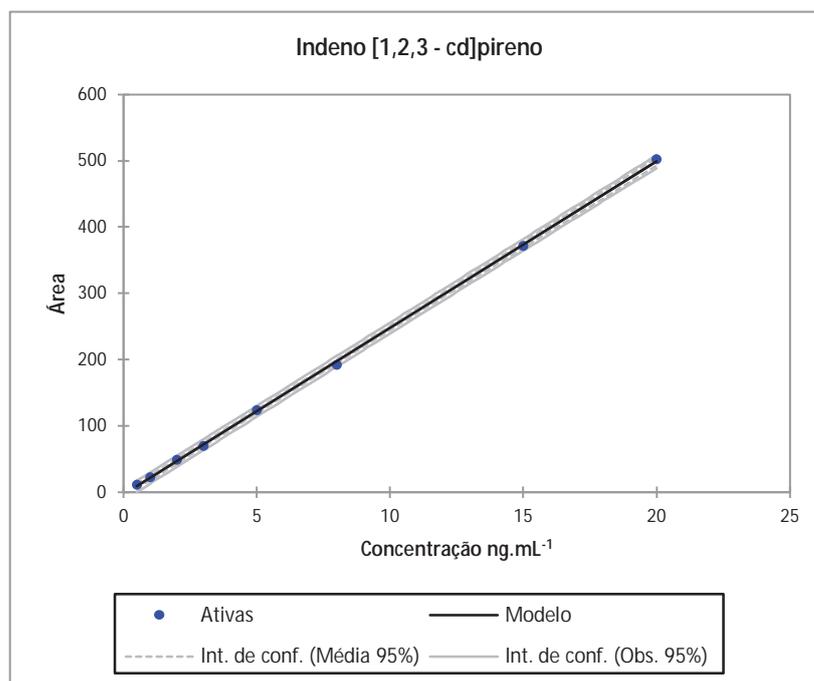
3.3.4.1 Curvas analíticas

Uma vez calculados e aceitos os pontos que melhor descrevem o modelo de regressão foram construídas as curvas analíticas para os HPAs em estudo. Nas Figuras 21 e 22 encontram-se as curvas analíticas para o fenatreno e para o indeno[1,2,3,cd]pireno. Nas mesmas temos os pontos dados como aceitos nos testes de linearidade em relação aos desvios para o intervalo de confiança de 95%. Nota-se que as linhas dos desvios estão bem próximas ao modelo de regressão, indicando que os testes realizados apresentam o melhor ajuste para a curva.

Figura 21 - Curva analítica para o Fenatreno.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 22 - Curva analítica para o indeno[1,2,3-cd]pireno.

Fonte: Elaborado pelo autor.

3.3.4.2 Teste de significância da regressão

Realiza-se nesta etapa um teste F de significância, onde a hipótese levantada corresponde que a inclinação da reta não é nula, ou seja $a \neq 0$ (hipótese alternativa, contrastando com a hipótese nula de $a = 0$). Quanto maior for o F calculado, maior será a evidência de relação entre x e y. (CASSIANO et al., 2009).

Na Tabela 9, encontram-se os resultados da análise de variância para a curva analítica do fenantreno, verifica-se que o p-valor apresenta resultado $< 0,0001$, o que leva a rejeição da hipótese nula. Os cálculos realizados são demonstrados e interpretados no **APÊNDICE D**.

Tabela 9 - Tabela de análise de variância para significância da regressão.

Fonte	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Média dos Quadrados	F _{cal}	p-valor
Modelo	1	39513,59	39513,590	4621,91	< 0,0001
Erro	5	42,74	8,549		
Total corrigido	6	39556,34			

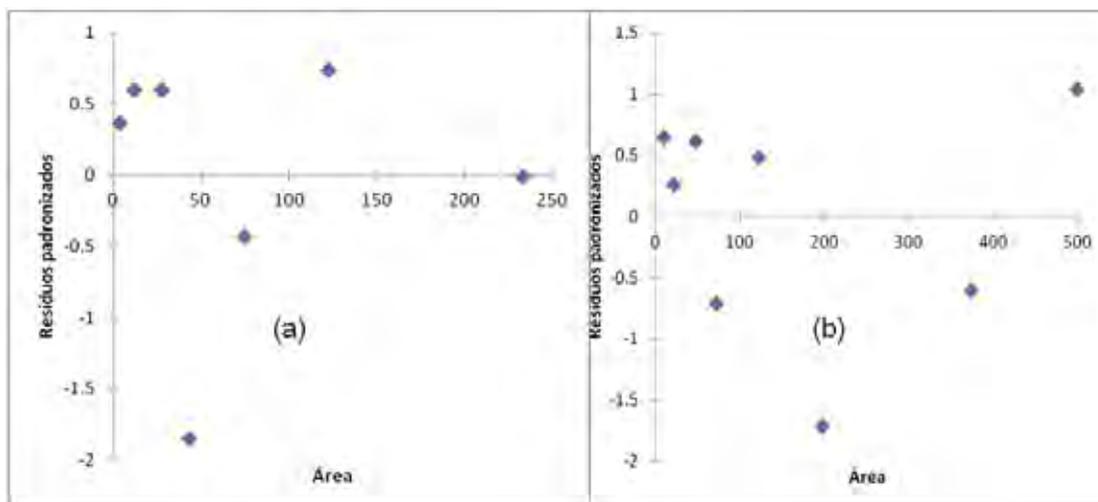
Fonte: Elaborado pelo autor.

3.3.4.3 Validade da regressão: Análise dos resíduos da regressão

Um fator importante a ser observado é o diagnóstico da análise dos resíduos, que corresponde a diferença entre os valores medidos e os valores previstos pelo modelo de regressão. (MILLER & MILLER, 2010). A verificação de que a função de regressão é adequada aos dados pode ser feita através do gráfico dos resíduos versus valores ajustados, onde a aleatoriedade de distribuição dos resíduos confirma o modelo linear. Para verificação estatística da condição de homogeneidade das variâncias utilizou-se inicialmente o teste de Anderson-Darling para verificação da normalidade. Para os resíduos da regressão relativos ao fenantreno e ao indeno[1,2,3-cd]pireno, obteve-se um p-valor de 0,068 e 0,231, respectivamente. Os valores são maiores que $\alpha = 0,05$, então aceita-se a hipótese de distribuição normal dos resíduos.

Comprovada a normalidade, testou-se a homogeneidade das variâncias utilizando o teste de Bartlett, fornecendo p-valor de 0,999 e 1,000, respectivamente para o fenantreno e ao indeno[1,2,3-cd]pireno, evidenciando que a hipótese de homogeneidade de variância não é rejeitada, condição que é demonstrada na Figura 23.

Figura 23 - Gráficos de resíduos para o fenantreno (a) e para o indeno(1,2,3-cd)pireno (b).



Fonte: Elaborado pelo autor.

Os resultados para todos os demais HPAs foram semelhantes a estes, validando a linearidade.

Para todas as curvas analíticas obtidas, foram computados na planilha elaborada, parâmetros como os coeficientes lineares e angulares bem como os seus desvios em função da incerteza residual da regressão (a 95% de intervalo de confiança). Outro fator importante corresponde ao coeficiente de correlação (r), que indica o grau de ajuste para o modelo variável/resposta, sendo a eficiência da regressão obtida a partir do cálculo do r^2 (coeficiente de determinação), valores menores que 0,95 indicam que a regressão não é eficiente (CHUI et al., 2001; THOMPSON & WOOD, 1995). Os valores calculados para os parâmetros citados encontram-se na Tabela 10.

Tabela 10 - Parâmetros para as curvas analíticas calculados via planilha elaborada para os HPAs em estudo.

HPA	Coefficiente angular	Coefficiente linear	R ²	Faixa linear (ng.mL ⁻¹)
Naftaleno	14,32 ± 1,14	-(0,04 ± 0,11)	0,9999	0,50 - 20,0
Acenafteno	18,50 ± 4,86	1,84 ± 0,68	0,9996	0,50 - 15,0
Fluoreno	22,01 ± 5,12	-(3,60 ± 0,54)	0,9994	0,50 - 20,0
Fenantreno	15,92 ± 3,46	-(4,15 ± 0,36)	0,9995	0,50 - 20,0
Antraceno	29,76 ± 2,78	-(0,79 ± 0,40)	0,9999	0,10 - 15,0
Fluoranteno	7,07 ± 1,93	-(0,75 ± 0,16)	0,9996	1,00 - 25,0
Pireno	9,93 ± 2,68	-(0,15 ± 0,22)	0,9998	1,00 - 25,0
Benzo(a)antraceno	5,30 ± 1,37	-(0,36 ± 0,15)	0,9996	0,25 - 20,0
Criseno	7,13 ± 0,73	-(0,44 ± 0,07)	0,9999	0,50 - 20,0
Benzo(b)fluoranteno	2,18 ± 0,78	-(0,68 ± 0,07)	0,9993	1,00 - 25,0
Benzo(k)fluoranteno	2,92 ± 1,00	0,14 ± 0,08	0,9997	1,00 - 25,0
Benzo(a)pireno	7,00 ± 1,03	-(0,01 ± 0,09)	0,9999	1,00 - 25,0
Dibenzo(a,h)antraceno	1,63 ± 1,63	0,14 ± 0,14	0,9999	1,00 - 25,0
Benzo(g,h,i)perileno	14,95 ± 1,73	0,21 ± 0,24	0,9999	0,50 - 15,0
Indeno(1,2,3-cd)pireno	24,48 ± 2,38	-(1,25 ± 0,36)	0,9998	0,25 - 15,0

Fonte: Elaborado pelo autor.

3.3.5 Determinação dos limites de detecção e quantificação

Após a elaboração das curvas analíticas e estimativa de parâmetros relativos aos coeficientes linear e angular, bem como seus respectivos desvios, foram calculados os valores dos limites de detecção e quantificação.

Este trabalho utilizou critérios baseados na curva analítica, uma vez que baseiam-se em cálculos diretamente ligados ao processo de regressão e sua significância. Na Tabela 11 observam-se as equações utilizadas e também inseridas nas planilhas de cálculo. O método 1 considera a análise do branco e seu desvio padrão em relação ao desvio da inclinação (MILLER & MILLER, 2010), já o método 2, mais robusto estatisticamente, leva em consideração a estimativa dos desvios associados aos coeficientes (angular e linear) bem como o intervalo de confiança (RIBEIRO et al., 2008; MEIER, 2000), verifica-se que esta incorporação remete a valores menores dos limites (Tabela 11), fato que apresenta bastante relevância, dados às baixas concentrações dos HPAs no ambiente.

Tabela 11 - Fórmulas para cálculo do limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ).

Método 1	Método 2
$LD = 3,3 \cdot \frac{s}{S_{xy}}$	$LD = 2 \cdot \frac{s_y \cdot t}{a_1} \cdot \sqrt{\left(\frac{1}{n}\right) + 1 + \frac{(y_c - \bar{y})^2}{a_1^2 \cdot \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}$
$LQ = 10 \cdot \frac{s}{S_{xy}}$	$LQ = \left(\frac{y_h - b}{a_1}\right) + \left(\frac{s_y \cdot t}{a_1}\right) \cdot \sqrt{\left(\frac{1}{n}\right) + 1 + \frac{(y_h - \bar{y})^2}{a_1^2 \cdot \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}$

S_{xy} = desvio da inclinação, s = desvio padrão do branco, s_y = desvio da inclinação, n = número de replicatas, a_1 = coeficiente angular, b = coeficiente linear, y_c = desvio de a_0 , y_h = desvio de a_1

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 12 - Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) calculados para os HPAs em estudo.

HPA	L. detecção (ng.mL ⁻¹)		L. Quantificação (ng.mL ⁻¹)	
	LD ₁	LD ₂	LQ ₁	LQ ₂
Naftaleno	0,18	0,12	0,58	0,47
Acenafteno	0,42	0,27	1,39	1,23
Fluoreno	0,55	0,24	1,43	1,21
Fenantreno	0,52	0,37	1,74	1,34
Antraceno	0,22	0,08	0,72	0,56
Fluoranteno	0,52	0,4	1,72	1,44
Pireno	0,49	0,23	1,64	1,39
Benzo(a)antraceno	0,46	0,41	1,55	1,21
Criseno	0,22	0,31	0,75	0,60
Benzo(b)fluoranteno	0,77	1,3	2,57	2,04
Benzo(k)fluoranteno	0,85	0,48	1,59	1,46
Benzo(a)pireno	0,31	0,27	1,05	0,84
Dibenzo(a,h)antraceno	0,23	0,16	0,77	0,62
Benzo(g,h,i)perileno	0,21	0,12	0,71	0,60
Indeno(1,2,3-cd)pireno	0,23	0,11	0,76	0,60

LD₁ / LQ₁ e LD₂ / LQ₂ = limites calculados respectivamente para os métodos 1 e 2 (Tabela 11)

Fonte: Elaborado pelo autor.

3.3.6 Testes de recuperação em matrizes ambientais

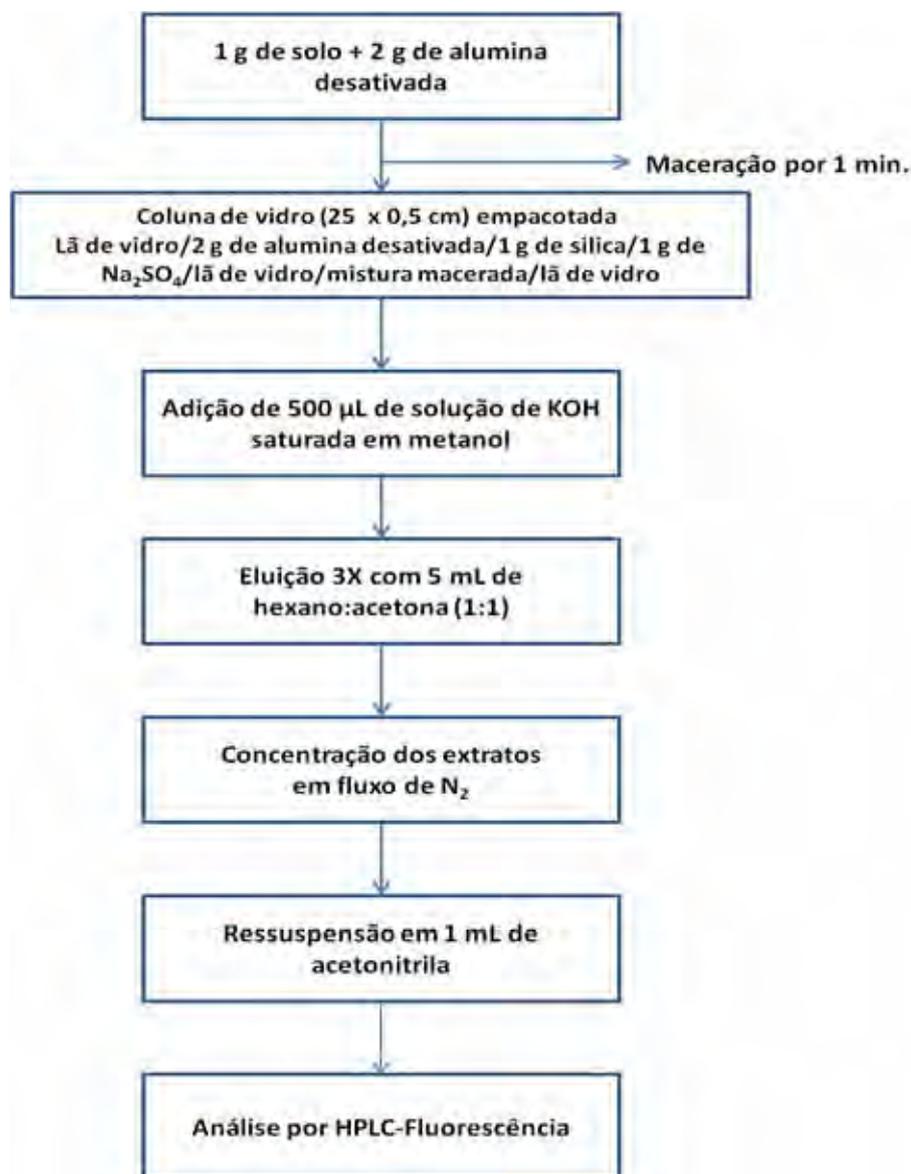
Uma vez verificados os limites da faixa linear, os limites de detecção e quantificação e como os HPAs comportam-se, realizaram-se testes de recuperação em matrizes ambientais para verificar a influência das mesmas na determinação dos analitos. O estudo baseou-se em fortificar amostras de solo e água com 3 níveis de concentrações das soluções mistas pertencentes a faixa linear obtida para os HPAs, onde o primeiro nível corresponde ao limite de quantificação calculado, o segundo a um nível intermediário de 5 ng mL^{-1} , e um terceiro correspondente ao último ponto do intervalo linear de cada HPA.

3.3.6.1 Método para extração de HPAs em solo

Utilizou-se o método de dispersão da matriz em fase sólida (MSPD) otimizado por Fujita (2009). Essa técnica consiste na dispersão da amostra sólida ou em um adsorvente apropriado englobando a extração e *cleanup* dos extratos em uma única etapa. O solo utilizado nos experimentos foi proveniente de uma área do Horto de Plantas Tóxicas e Medicinais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP (FCF/UNESP, Campus de Araraquara).

A amostra foi introduzida em um recipiente contendo um suporte sólido (sorvente), misturada até a homogeneização e esse material (matriz + sorvente) é transferido para uma coluna de vidro onde procedeu-se a eluição dos analitos de interesse com um solvente adequado. A Figura 24 demonstra o procedimento para extração dos HPAs em amostras de solo.

Figura 24 – Fluxograma para o procedimento de extração de HPAs em solo via dispersão da matriz em fase sólida.



Fonte: Elaborado pelo autor

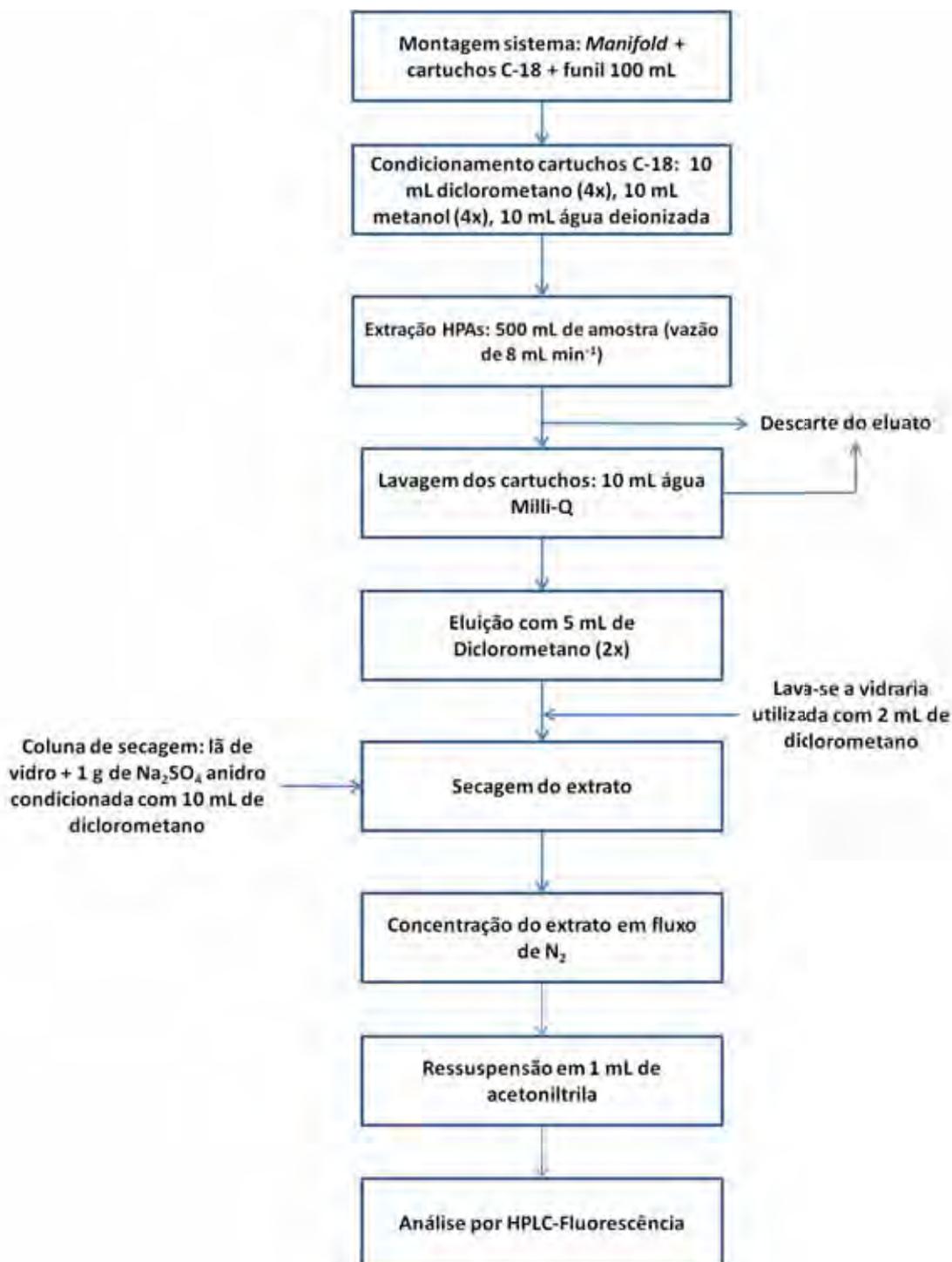
3.3.6.2 Método para extração em água

Utilizou-se para este estudo o método proposto pela *U.S. Environmental Protection Agency* para análise de HPAs em água (método EPA 550.1) (ENVIRONMENTAL..., 1990).

As amostras de água foram obtidas do sistema de poços artesianos Instituto de Química – UNESP. Para a fortificação utilizou-se 500 mL de água, fortificadas nas condições do planejamento experimental nos 3 níveis de

concentração estabelecidos. A Figura 25 esquematiza o processo de extração utilizado.

Figura 25 – Fluxograma para o procedimento de extração de HPAs em água via SPE.



Fonte: Elaborado pelo autor.

3.3.6.3 Planejamento experimental para a fortificação

Para os experimentos de fortificação efetuou-se um planejamento fatorial completo, utilizando 3 fatores: matriz (solo e água), tempo de “aging” (6h e 12h) e adição das soluções mistas as matrizes (utilizou-se duas rotas para a adição: uma corresponde a fortificação anterior ao processo de “aging” e outra à fortificação posterior ao método de extração, no planejamento utilizou-se os símbolos + e – respectivamente para cada rota de fortificação).

A ordem dos experimentos (e das replicatas) deu-se de maneira randomizada proporcionando condições idênticas para cada tratamento, possibilitando que se houver algum erro este seja atribuído ao acaso, ou seja, não tendencioso (BARROS NETO et al., 2010).

O planejamento efetuado assim como os intervalos de recuperação calculados encontram-se na Tabela 13. Os resultados gerados para todos os HPAs encontra-se no APÊNDICE B.

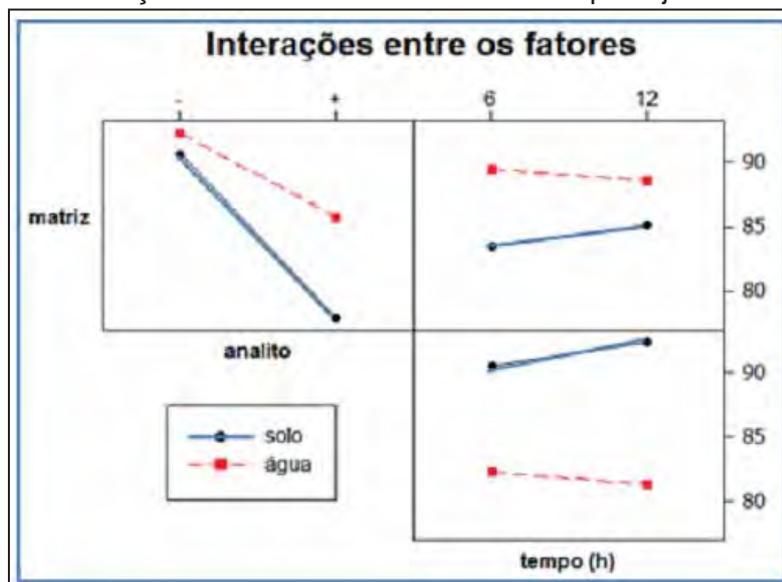
Tabela 13 - Planejamento experimental realizado e intervalos de recuperação calculados para os HPAs em estudo.

Matriz	Adição do analito	Tempo (h)	Intervalo de recuperação (%)
solo	-	6	77,3 – 101,3
solo	+	12	41,9 – 94,5
água	-	12	83,6 – 101,9
água	+	6	54,1 – 87,1
solo	+	6	39,8 – 91,2
água	+	12	56,9 – 89,9
solo	-	12	81,4 – 102,6
água	-	6	83,7 – 99,7

Fonte: Elaborado pelo autor.

Através dos resultados encontrados foi possível elaborar a Figura 26, que demonstra as interações entre os fatores utilizados.

Figura 26 - Interações entre os fatores utilizados no planejamento experimental.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Para evidenciar quais fatores possuem efeitos significativos na recuperação, efetuou-se a análise de variância aos dados do planejamento experimental utilizando o software *Statistica 7.0*, onde valores de p-valor abaixo do nível de significância de 0,05 apresentam significativas contribuições ao experimento. O resultado do teste ANOVA é dado na Tabela 14.

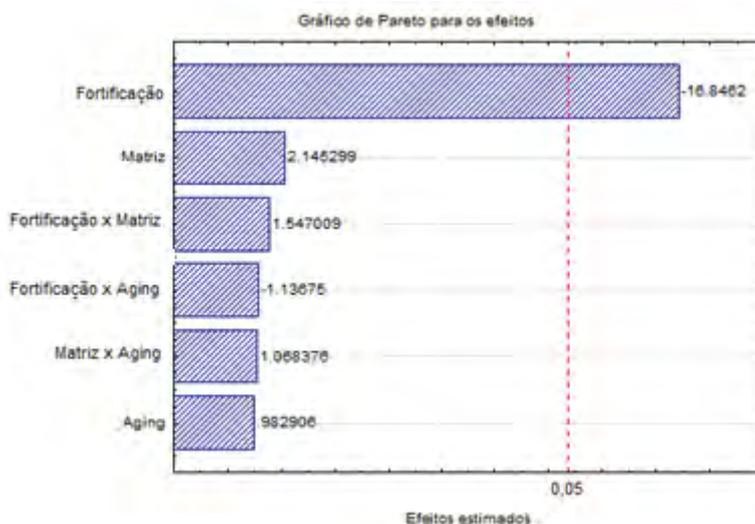
Tabela 14 - Tabela de análise de variância para as interações no planejamento.

ANOVA - Planejamento Experimental					
Fator	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média dos quadrados	F_{cal}	p-valor
Matriz	19,69	1	19,69	4,60	0,278
Fortificação	1214,01	1	1214,01	283,80	0,038
Aging	4,13	1	4,13	0,97	0,505
Matriz X Fortificação	10,24	1	10,24	2,40	0,365
Matriz X Aging	5,53	1	5,53	1,29	0,459
Fortificação x Aging	4,88	1	4,88	1,14	0,478
Erro	4,28	1	4,28		
Total	1262,76	7			

Fonte: Elaborado pelo autor.

Verifica-se que o fator “Fortificação” apresenta p-valor de 0,038 indicando que contribui significativamente no experimento, fato ilustrado pela análise do gráfico de Pareto onde os fatores que possuem contribuição além da linha pontilhada (para $\alpha = 0,05$) apresenta significância estatística no estudo, conforme a Figura 27.

Figura 27 - Gráfico de Pareto para efeitos significativos dos fatores envolvidos no planejamento experimental.



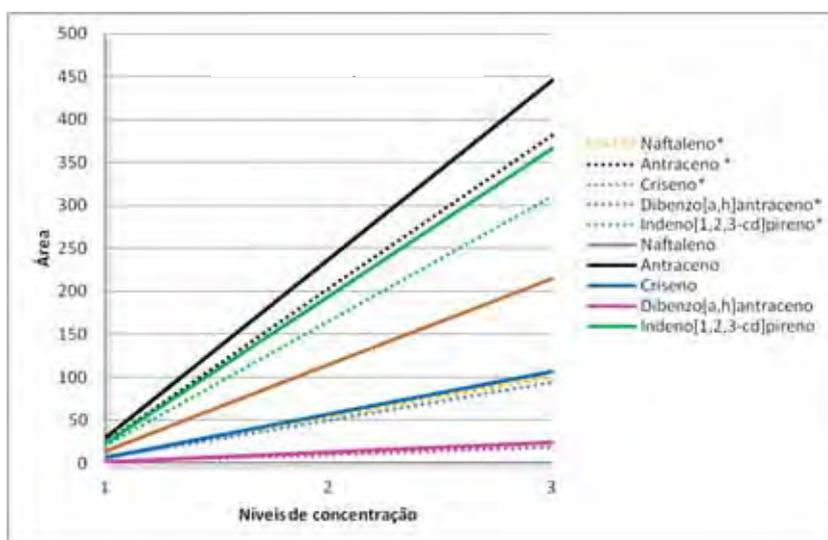
Fonte: Elaborado pelo autor.

Os processos de extração (utilizando fortificação anterior ou posterior como etapa significativa no processo) influenciam na recuperação dos HPAs, devido às características físico-químicas e possíveis interações na matriz e pelas perdas de analito inerentes ao processo. As variações em água são menores devido à baixa solubilidade dos HPAs. Já em solo tem-se maior interação com os componentes orgânicos presentes nesse bem como decréscimos maiores relativos à perda por volatilização dos HPAs no processo, principalmente ao HPAs que contem 2 ou 3 anéis aromáticos, colineares nos componentes principais Este fato que não ocorre (tão pronunciadamente) nas recuperações obtidas com adição dos analitos após os processos de extração, pois não são afetados pelo processo de extração.

O decréscimo nos resultados decorrentes às recuperações também pode ser verificado na comparação entre as curvas obtidas com as soluções padrão e das curvas obtidas com os extratos após a realização dos experimentos da Tabela 13.

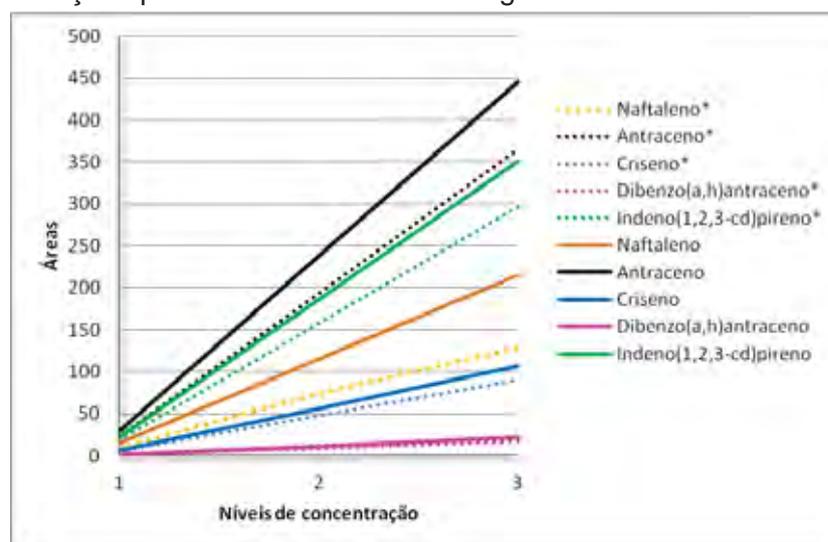
As linhas “contínuas” representam a curva padrão, enquanto as linhas “pontilhadas”, as curvas obtidas no extrato. Observa-se diferença da inclinação das mesmas, decorrente da queda da sensibilidade causada pelo efeito da matriz e pelos processos de extração.

Figura 28 - Comparação da sensibilidade analítica em função das soluções padrão e dos extratos de solo.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 29 - Comparação da sensibilidade analítica em função das soluções padrão e dos extratos em água.

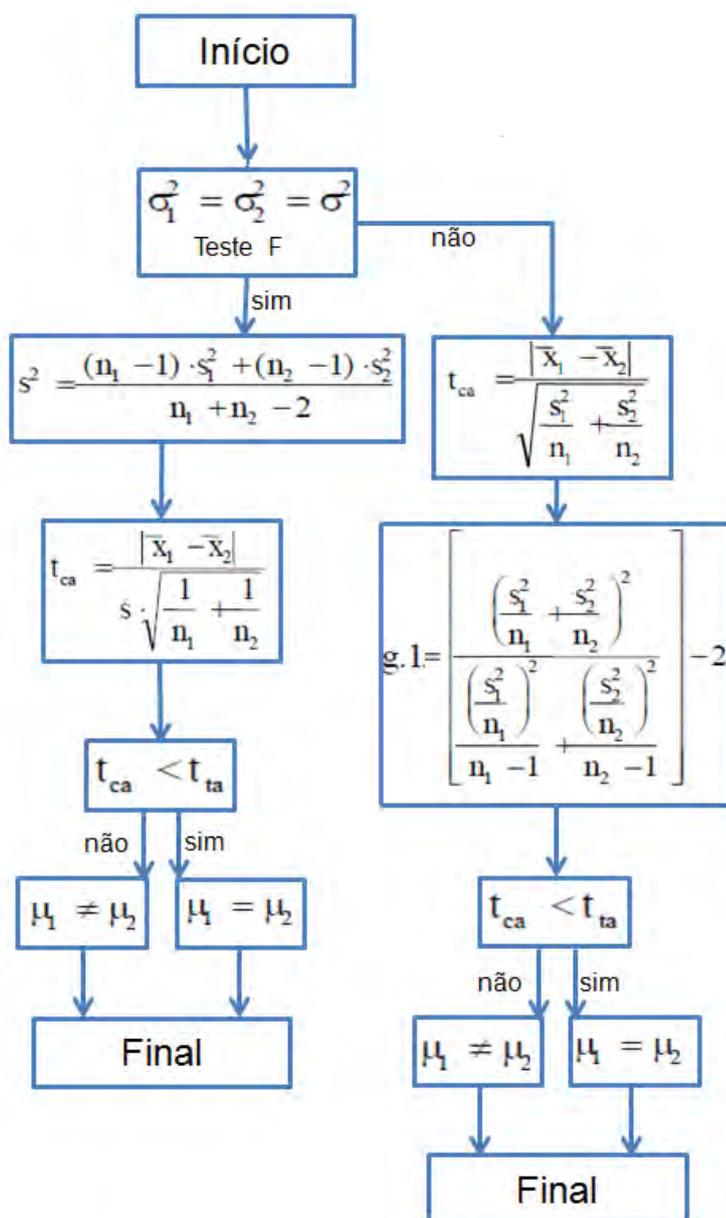


Fonte: Elaborado pelo autor.

3.3.6.4 Significância do efeito matriz

Para atestar estatisticamente o efeito matriz, procurou-se nesta etapa relacionar e estabelecer as diferenças entre as curvas em solvente, e as curvas na matriz, através da comparação das variâncias e utilização de testes t, conforme sistematização realizada em etapas anteriores deste trabalho para testes de comparação de duas médias. Para tal, aplicaram-se os seguintes cálculos para cada nível de concentração (fortificação) conforme Figura 30.

Figura 30 - Sequência de cálculos para comparação de médias e verificação de efeito da matriz.



Fonte: Elaborado pelo autor.

A sequência de cálculos inicia-se com um teste F para determinar a homogeneidade de variâncias para que sejam considerados estatisticamente iguais, indicando se a precisão instrumental é afetada pelo efeito da matriz.

Caso seja aceita a condição de igualdade de variâncias realizam-se testes de comparação de médias, utilizando as médias das concentrações dos analitos nas amostras com e sem matriz (\bar{x}_1 e \bar{x}_2 , respectivamente) através de uma variância agrupada (s^2) para $n_1 + n_2 - 2$ graus de liberdade (sendo n_1 e n_2 o número de replicatas utilizadas). Caso a hipótese de igualdade de variância seja violada, altera-se o cálculo do número de graus de liberdade (g.l.) para verificação do valor tabelado para o teste F, conforme Figura 28.

Em ambos os casos (igualdade ou não de variâncias), se o t_{ca} for menor que o t_{tab} , conclui-se que a matriz não afeta significativamente o ensaio, caso contrário, evidencia-se estatisticamente o efeito da matriz na determinação dos analitos.

Na sequência foram realizados testes para avaliar estatisticamente o efeito matriz (solo e água) na determinação dos HPAs, através dos ensaios de recuperação.

Iniciou-se com o teste F com as seguintes hipóteses:

H_0 : variâncias equivalentes

H_1 : variâncias não equivalentes

Todos os testes realizados (para todos os HPAs) indicaram um p-valor $> 0,05$ o que leva a aceitação da hipótese nula, ou seja, os dados apresentam igualdade de variância, evidenciando que a presença da matriz não altera a precisão instrumental. Uma vez confirmada a homocedasticidade de variâncias, deu-se sequência na comparação das médias, levantando as seguintes hipóteses:

H_0 : matriz não afeta os ensaios

H_1 : matriz tem efeito significativo sobre os ensaios

Em contraposição ao teste realizado anteriormente, o p-valor calculado para todas as combinações de médias apresentou valor $< 0,05$, levando a rejeição da hipótese nula, as matrizes tem grande significância sobre os ensaios para a determinação dos HPAs, indicando que a elaboração da curva na matriz deve ser utilizada para resultados mais confiáveis.

3.3.6.5 Avaliação dos limites de recuperação

Para avaliação de quais limites de recuperação seriam aceitos (preconizando um intervalo de confiança de 95%), utilizou-se um critério baseado no intervalo de predição de resultados no menor nível reportado da (ENVIRONMENTAL..., 2004) com algumas modificações. Este critério é bastante interessante, pois permite relacionar a porcentagem de recuperação dentro de um intervalo de confiança (99% ou outro mais restritivo como 95%) associado a valores de precisão. Isto implica na afirmação, ou não, de que o valor encontrado apresenta significância e exatidão aceitáveis. Para análises ambientais este fato é de grande importância, pois assegura estatisticamente o resultado para níveis baixos de concentração.

Para o cálculo dos limites de confiança utilizou-se novamente o conceito de intervalo de confiança para a média. Este cálculo também expressa a precisão do método utilizado (RIBANI et al., 2004).

Para exemplificação do uso deste conceito, calculou-se o intervalo de confiança para as recuperações de todos os HPAs no estudo de recuperação em solo, no primeiro nível de fortificação (representando o mínimo nível reportado).

Tabela 15 - Cálculos para aceitação da recuperação.

HPAs	concentração (ng.g ⁻¹)	% rec. Média	Desvio padrão	C.V %	Valor calculado	L. Superior	L. Inferior	Aceitação
Naftaleno	1.00	39.75	0.82	2.05	5.44	45.20	34.31	recusar
Acenafteno	1.50	39.76	0.96	2.41	3.09	42.85	36.67	recusar
Fluoreno	1.50	43.24	1.26	2.90	4.07	47.31	39.17	recusar
Fenantreno	1.50	60.44	1.89	3.13	9.13	69.57	51.31	aceitar
Antraceno	1.00	84.79	1.73	2.04	5.70	90.49	79.09	aceitar
Fluoranteno	2.00	87.70	1.13	1.29	8.04	95.74	79.66	aceitar
Pireno	1.50	78.40	2.02	2.58	13.04	91.44	65.35	aceitar
Benzo(a)antraceno	1.50	80.46	1.20	1.49	15.06	95.52	65.40	aceitar
Criseno	1.00	87.42	0.50	0.58	7.18	94.60	80.24	aceitar
Benzo(b)fluoranteno	2.50	77.35	0.72	0.93	14.30	91.66	63.05	aceitar
Benzo(k)fluoranteno	2.00	90.15	1.42	1.57	22.59	112.74	67.56	aceitar
Benzo(a)pireno	1.00	79.02	0.76	0.96	10.34	89.36	68.68	aceitar
Dibenzo(a,h)antraceno	2.00	74.45	0.73	0.98	20.37	94.83	54.08	aceitar
Benzo(g,h,i)perileno	1.00	77.16	1.23	1.60	7.75	84.90	69.41	aceitar
Indeno(1,2,3-cd)pireno	1.00	84.00	1.00	1.19	4.10	88.10	79.89	aceitar

Fonte: Elaborado pelo autor.

Na última coluna é verificada (via condicional na planilha gerada) se a recuperação para determinado HPAs pode ou não ser aceita. Os intervalos de aceitação a serem utilizados, levam em consideração a complexidade analítica e das amostras. Para este trabalho foi utilizado o intervalo de 40% – 120% (BRITO et al., 2003). Valores abaixo de 40% e acima de 120% são rejeitados, pois não apresentam exatidão satisfatória em relação ao intervalo preconizado. Também avalia-se a precisão via coeficiente de variação (valores < 20%).

4 CONCLUSÕES

Os procedimentos estatísticos e quimiométricos utilizados possibilitaram demonstrar critérios objetivos, do ponto de vista metodológico, que auxiliam na determinação e classificação experimental dos Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em matrizes ambientais. O trabalho indica a utilização de 5 replicatas para análise dos HPAs, a utilização das soluções de trabalho por um período máximo de 30 dias e a elaboração das curvas analíticas na matriz.

Além do processo de validação de métodos, propõem-se realizar em conjunto, processos de validação estatística, valendo-se de conceitos como testes de hipóteses, intervalos de confiança, nível de significância, assim como outros estudados ao longo desta pesquisa. Salienta-se o fato de que apesar de serem ferramentas conhecidas, não foram encontrados trabalhos na literatura que os utilizem para alguns dos parâmetros trabalhados, tais como estabilidade das soluções e influência do número de replicatas. Ressalta-se também, que foi possível demonstrar critérios de aceitabilidade estatística para os outros parâmetros de validação empregados.

Do ponto de vista prático, este trabalho apresenta uma rotina experimental que teve como estudo de caso os HPAs, mas que é aplicável a outras substâncias poluentes.

5 PERSPECTIVAS FUTURAS

Para dar continuidade a este trabalho faz-se necessário:

- Realizar estudo de estabilidade das soluções estoque de HPAs, submetendo-as a diferentes ciclos de congelamento e descongelamento, assim como diferentes condições de diluição;
- Realizar estudo de estabilidade de amostras ambientais baseados nos conceitos empregados.
- Estender os conteúdos sistematizados a outros analitos e matrizes ambientais.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, S. J. **Investigação sobre a composição química e avaliação da mutagenicidade do material particulado atmosférico sob a influência da fuligem da queima de cana-de-açúcar**. 2004. 120 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2004.

BARROS NETO, B.; BRUNS, R. E.; SCARMINIO, I. S. **Como fazer experimentos**: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. 4. ed. Campinas: Ed. UNICAMP, 2010. p. 86-146.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Guia de validação e controle de qualidade analítica**: fármacos em produtos para alimentação e medicamentos veterinários. Brasília, 2011. 72 p.

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

BROWN, S.; TAULER, R.; WALCZAK, B. (Ed.). **Comprehensive chemometrics**: chemical and biochemical data analysis. Amsterdam: Elsevier, 2009. p. 2-73.

CASSIANO, N. M. et al. Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 1021-1030, 2009.

CHUI, Q. S. H. et al. Qualidade de medições em química analítica. Estudo de caso: determinação de cádmio por espectrofotometria de absorção atômica com chama. **Química Nova**, v. 24, n. 3, p. 374-380, 2001.

COLLINS, C. H. et al. **Introdução a métodos cromatográficos**. 7. ed. Campinas: Ed. UNICAMP, 1997. 280 p.

DABESTANI, R.; IVANOV, I. N. A compilation of physical, spectroscopic and photophysical properties of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Photochemistry and Photobiology**, v. 70, n. 1, p. 10-34, 1999.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Method 550.1**: determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in drinking water by liquid-solid extraction and HPLC with coupled ultraviolet and fluorescence detection, 1990. Disponível em: <http://www.accustandard.com/asi/pdfs/epa_methods/550_1.pdf>. Acesso em: 20 jan. 2012.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Method TO-13A**: compendium of methods for organic air pollutants, 1999. Disponível em: <<http://www.epa.gov/ttnamti1/files/ambient/airtox/to-13arr.pdf>>. Acesso em: 15 abr. 2011.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Statistical protocol for the determination of the single-laboratory lowest concentration Minimum**

reporting level (LCMRL) and validation of laboratory performance, 2004.

Disponível em:

<http://www.epa.gov/ogwdw/methods/pdfs/methods/methods_lcmrl.pdf>.

Acesso em: 20 jan. 2012.

FUJITA, C. K. **Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em solo:**

validação de método e avaliação da influência da queima de cana-de-açúcar na região de Araraquara. 2009. 180 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2009.

GARBAN, B. et al. Atmospheric bulk deposition of PAHs onto France: trends from urban to remote sites. **Atmospheric Environment**, v. 36, p. 5395-5403, 2002.

HAIR, J. et al. **Análise multivariada de dados**. 6. ed. Porto Alegre: Bookman, 2009. 688 p.

HIBBERT, D. B.; GOODING, J. J. **Data analysis for chemistry:** an introductory guide for students and laboratory scientists. New York: Oxford University Press, 2006. p. 39-97.

HUBER, L. **Validation and qualification in analytical laboratories**. 2nd ed. New York: Informa Healthcare, 2007. p. 125-155.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. **Orientação de validação de métodos de ensaios químicos**, 2010. Disponível em:

<http://www.inmetro.gov.br/Sidog/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_03.pdf>. Acesso em: 20 jan. 2012.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION. **Methodology Q2B:**

validation of analytical procedures, 1996. Disponível em:

<<http://www.fda.gov/cder>>. Acesso em: 20 jan. 2012.

JACQUES, R. J. S. et al. Bioremediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons. **Ciência Rural**, v. 37, n. 4, p. 1192-1201, 2007.

MANOLE, E.; SAMARA, C. Polycyclic aromatic hydrocarbons in natural waters: source, occurrence and analysis. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 18, n. 6, p. 417-428, 1999.

MAS, S. et al. Application of chemometric methods to environmental analysis of organic pollutants: a review. **Talanta**, v. 80, p. 1052-1067, 2010.

MEIER, Z. **Statistical in analytical chemistry**. 2nd ed. Hoboken: Wiley Inter Science, 2000. 431p.

MILLER, J. N.; MILLER, J. C. Basic statistical methods for analytical chemistry part 1, statistics of repeated measurements: a review. **Analyst**, v. 113, p. 1351-1356, 1988.

MILLER, J. N.; MILLER, J. C. **Statistics and chemometrics for analytical chemistry**. 6th ed. Harlow: Pearson Education, 2010. p. 1-104.

NATIONAL INSTITUTE FOR OCCUPATIONAL SAFETY AND HEALTH. **Method 5506**: polynuclear aromatic hydrocarbons by HPLC. 4th ed. 1998. Disponível em:
<<http://www.cdc.gov.pugwash.lib.warwick.ac.uk/niosh/nmam/pdfs/5506.pdf>>. Acesso em: 17 out. 2011.

OTTO, M. **Chemometrics**: statistics and computer application in analytical chemistry. Weinheim: Wiley-VCH, 2007. p. 20-102.

PAGE, D. S. et al. Pyrogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments record past human activity: a case study in Prince William Sound, Alaska. **Marine Pollution Bulletin**, v. 38, p. 247-266, 1999.

PASSARI, L. M. Z. G. et al. Estatística aplicada à química: dez dúvidas comuns. **Química Nova**, v. 34, n. 5, p. 888-892, 2011.

PIMENTEL, M. T.; BARROS NETO, B. Calibração: uma revisão para químicos analíticos. **Química Nova**, v. 19, n. 3, p. 268-277, 1996.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RIBEIRO, F. A. L. **Aplicação de métodos de análise multivariada no estudo de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos**. 2001. 196 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2001.

RIBEIRO, F. A. L. et al. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar as figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Química Nova**, v. 31, n. 1, p. 164-171, 2008.

ROSE, N. L.; RIPPEY, B. The historical record of PAH, PCB, trace metal and fly-ash particle deposition at a remote lake in north-west Scotland. **Environmental Pollution**, v. 117, p. 121-132, 2002.

ROWE, P. **Essential statistics for the pharmaceutical sciences**. Chichester: Wiley, 2007. p. 9-167.

SHARMA, A.; SCHULMAN, S. G. **Introduction to fluorescence spectroscopy**. New York: John Wiley and Sons, 1999. 173 p.

SILVA, F. S. **Influência da queima da palha de cana de açúcar na constituição do material particulado atmosférico (MP_{2,5} e MP₁₀) e as suas implicações potenciais sobre a saúde humana**. 2011. 141 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2011.

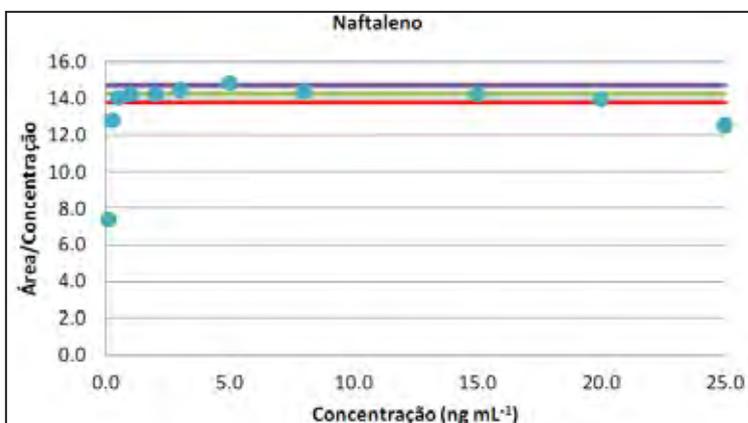
THOMPSON, M.; WOOD, R. Harmonized guidelines for internal quality control in analytical chemistry. **Pure and Applied Chemistry**, v. 67, n. 4, p. 649-666, 1995.

WISE, S. A. et al. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons by liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 642, p. 32-349, 1993.

WOOD, R. How to validate analytical methods. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 18, n. 9-10, p. 624-632, 1999.

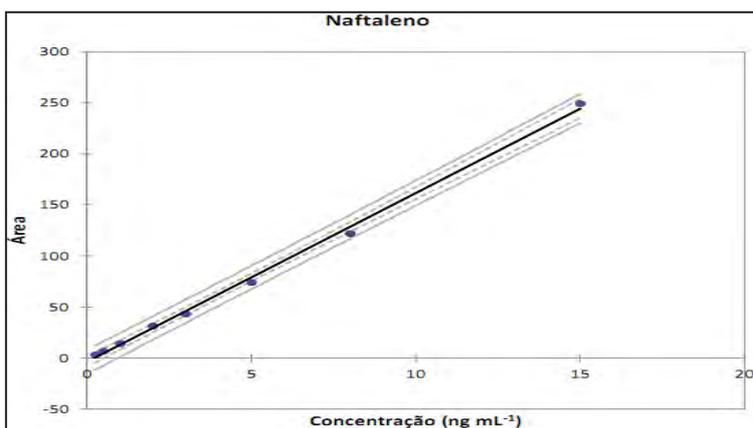
APÊNDICE A – Testes de Huber, curvas analíticas e gráficos de resíduos para os HPAs em estudo.

Figura 31 – Teste de Huber para o naftaleno.



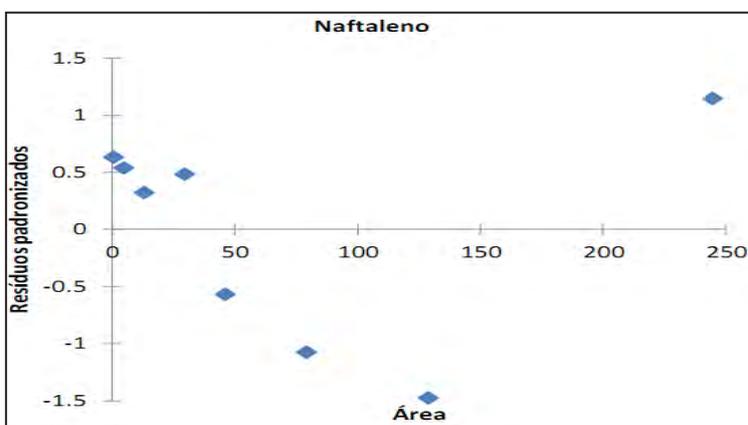
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 32 – Curva analítica para o naftaleno.



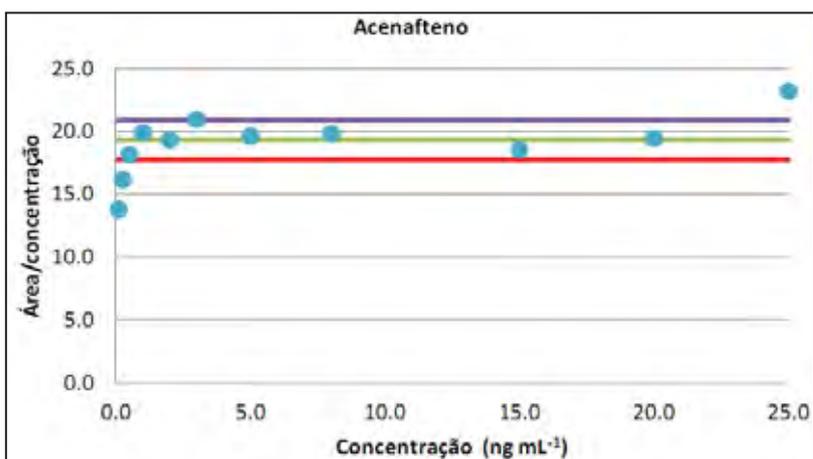
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 33 – Gráfico de resíduos para o naftaleno.



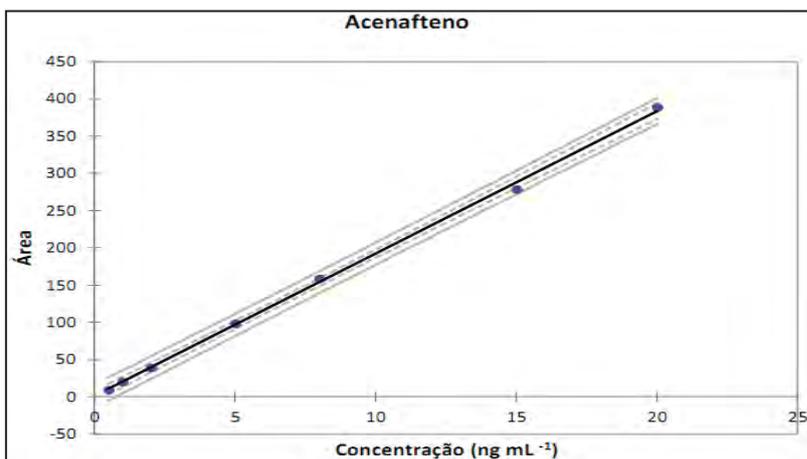
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 34 -Teste de Huber para o acenafteno.



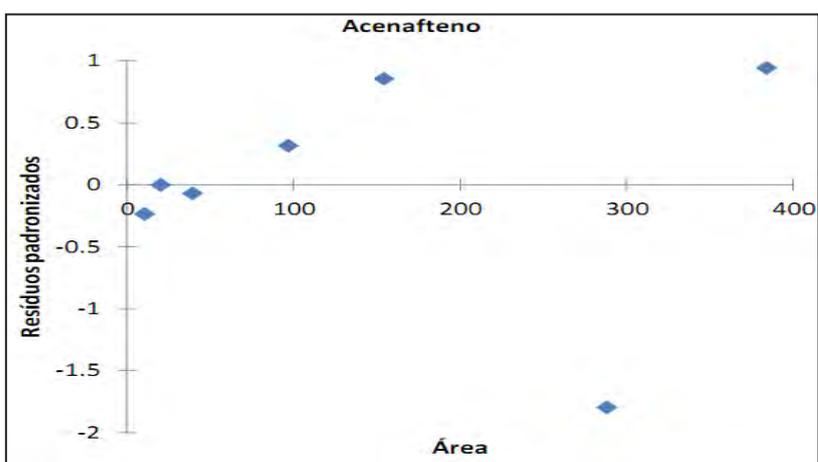
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 35 - Curva analítica para o acenafteno.



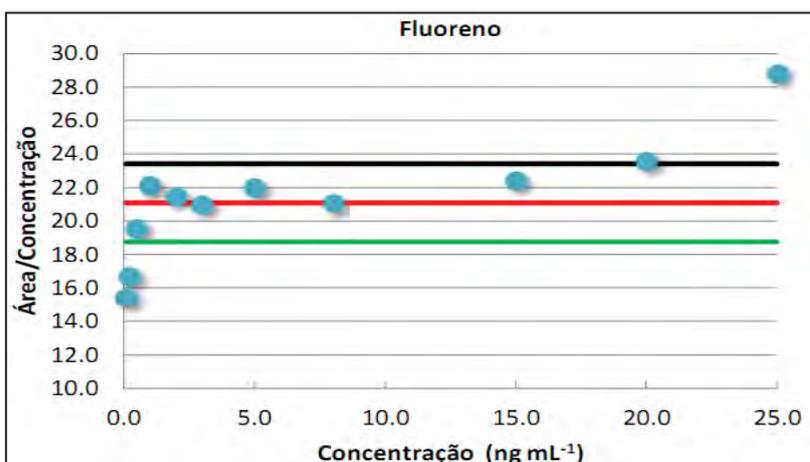
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 36 - Gráfico de resíduos para o acenafteno.



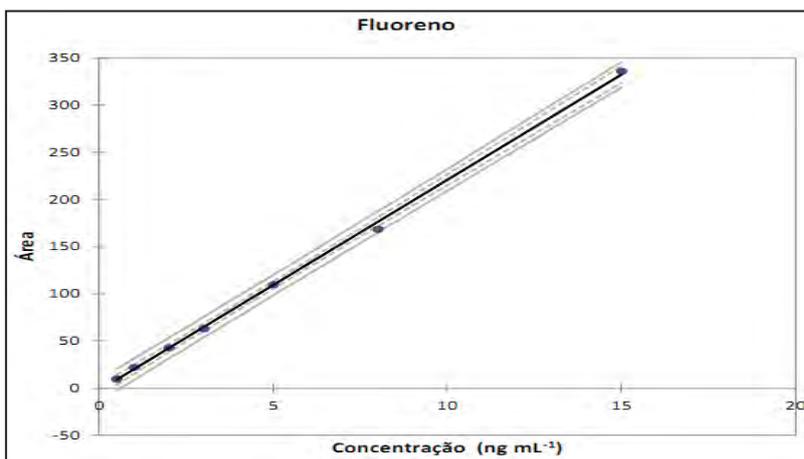
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 37 - Teste de Huber para o fluoreno.



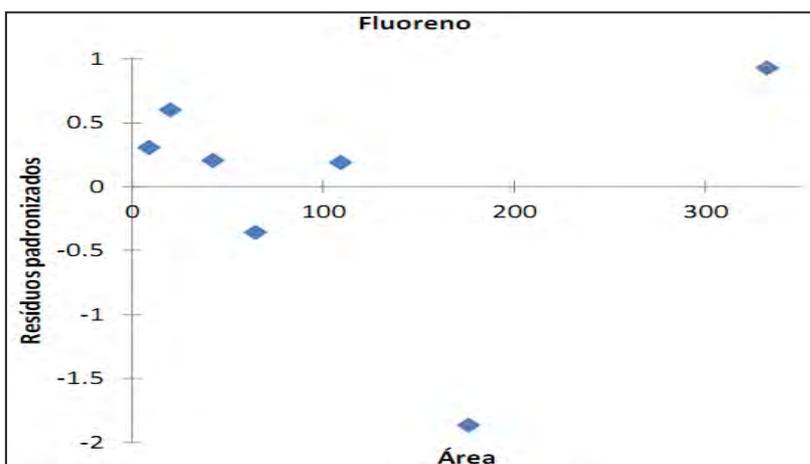
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 38 - Curva analítica para o fluoreno.



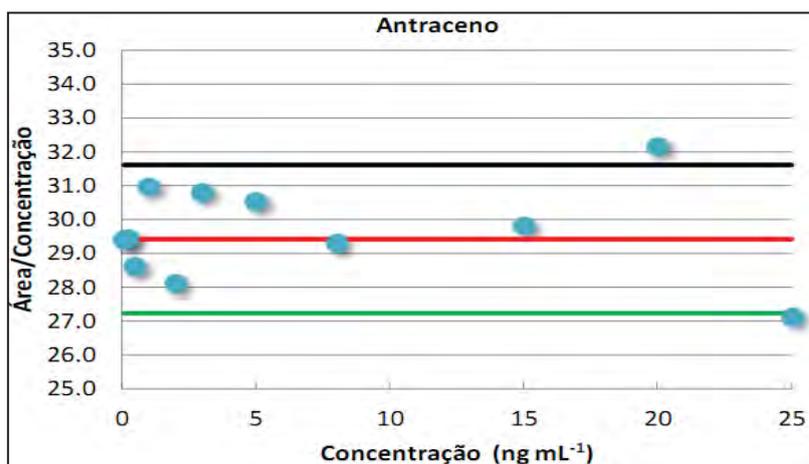
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 39 - Gráfico de resíduos para o fluoreno..



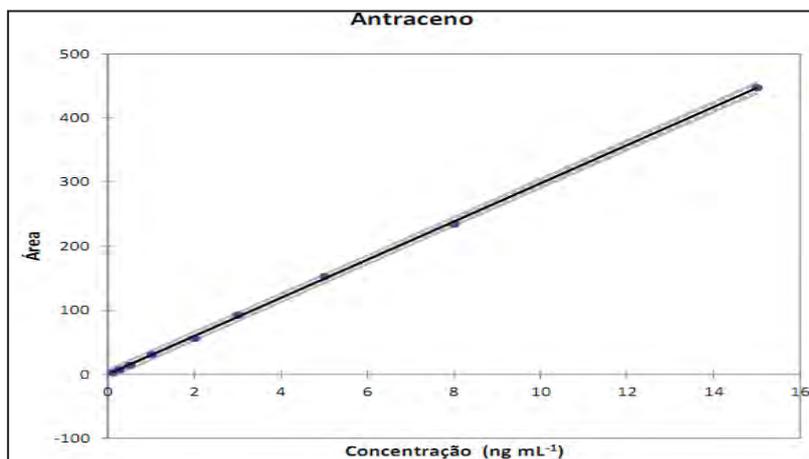
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 40 - Teste de Huber para o antraceno.



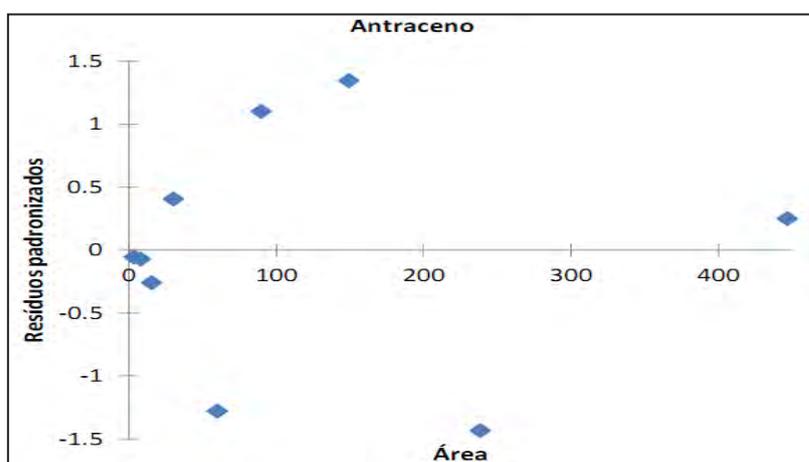
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 41 - Curva analítica para o antraceno.



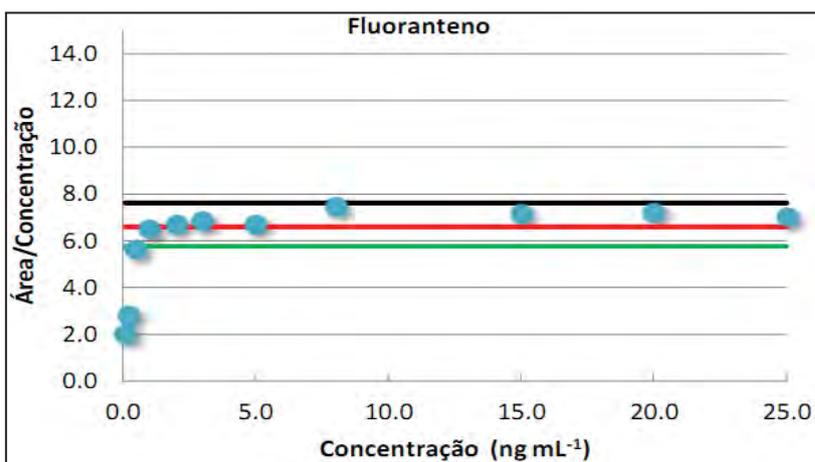
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 42 – Gráfico de resíduos para o antraceno.



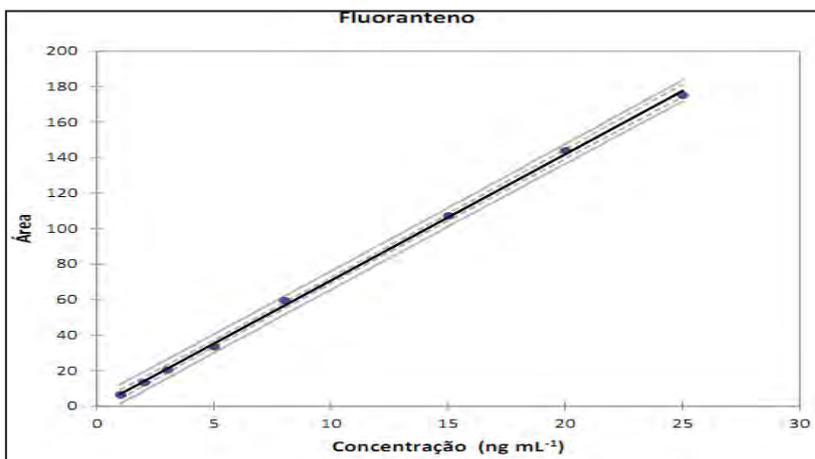
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 43 - Teste de Huber para o fluoranteno.



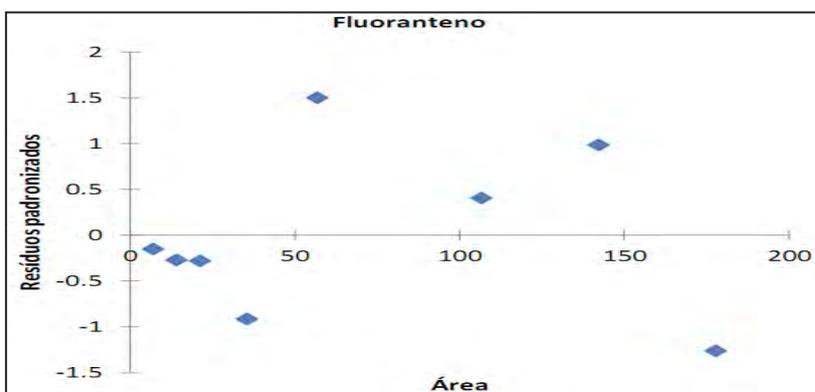
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 44 - Curva analítica para o fluoranteno.



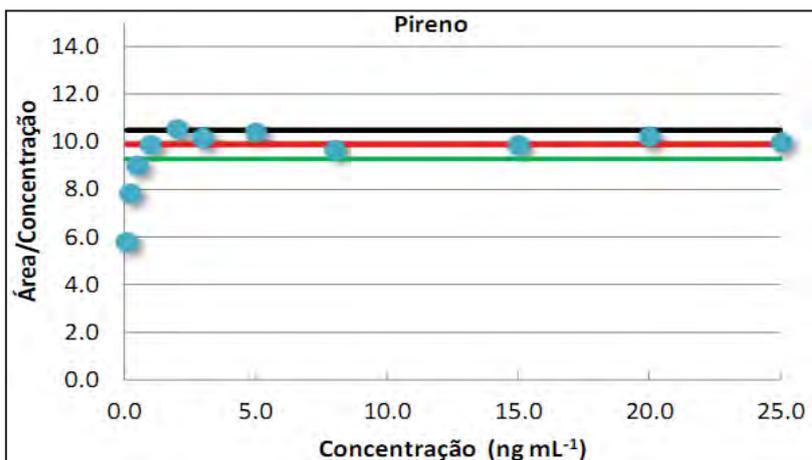
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 45 - Gráfico de resíduos para o fluoranteno.



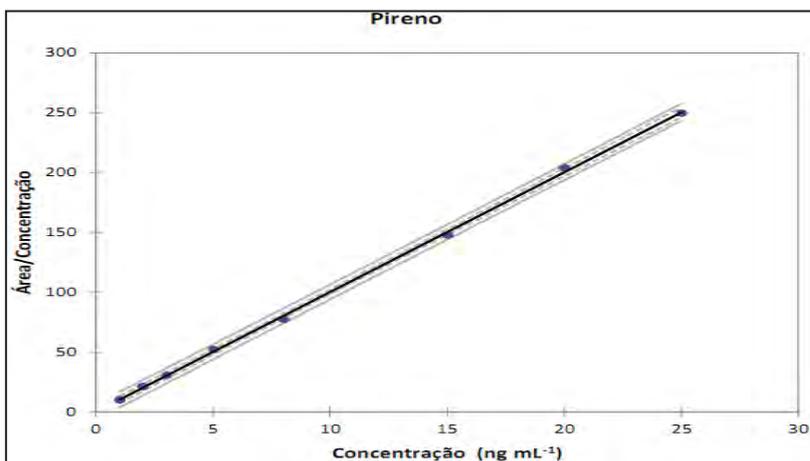
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 46 - Teste de Huber para o pireno.



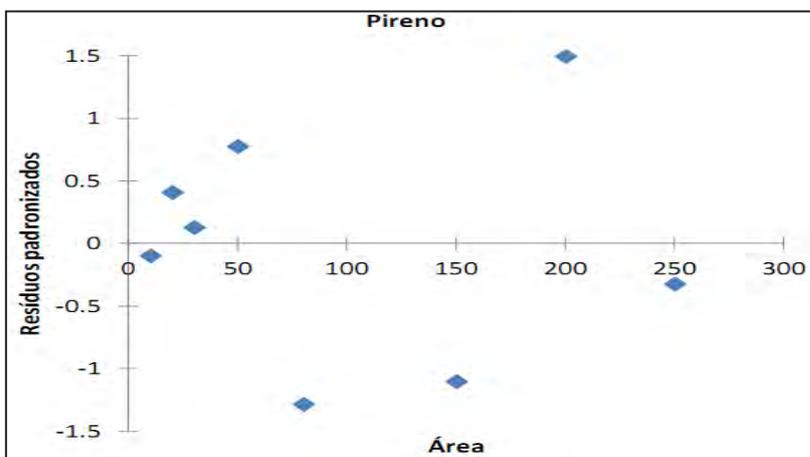
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 47 - Curva analítica para o pireno.



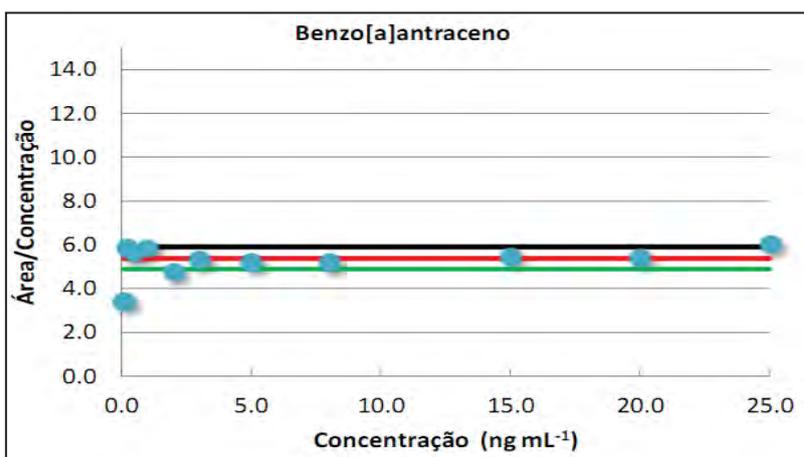
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 48 - Gráfico de resíduos para o pireno.



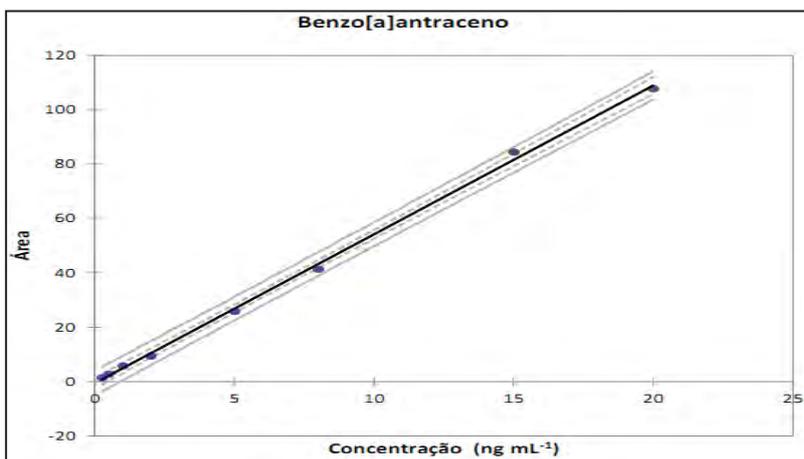
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 8



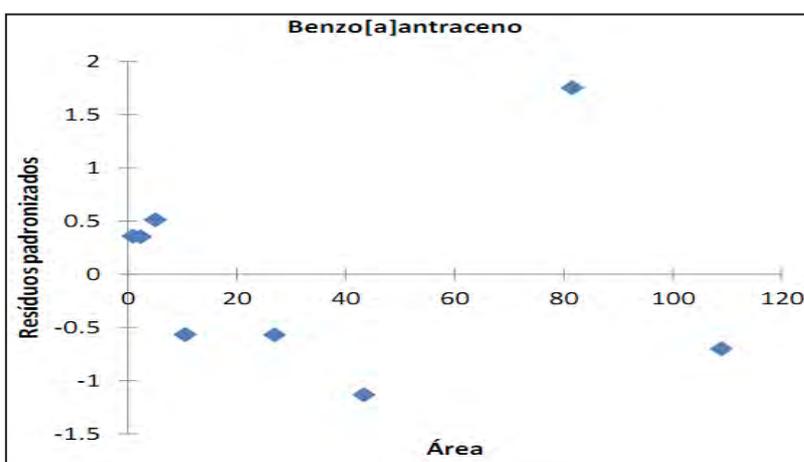
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 50 - Curva analítica para o benzo[a]antraceno.



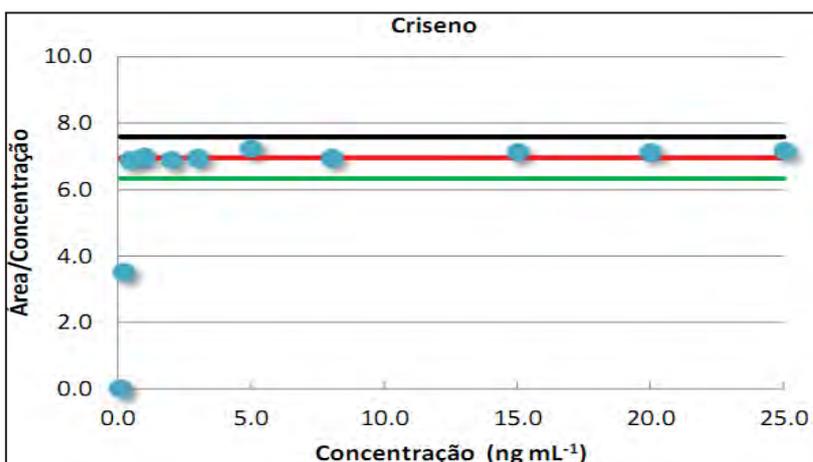
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 51 - Gráfico de resíduos para o benzo[a]antraceno.



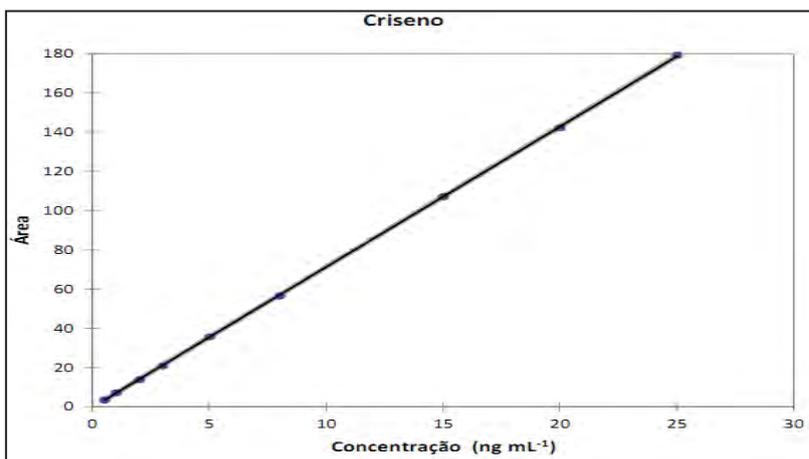
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 52 - Teste de Huber para o criseno.



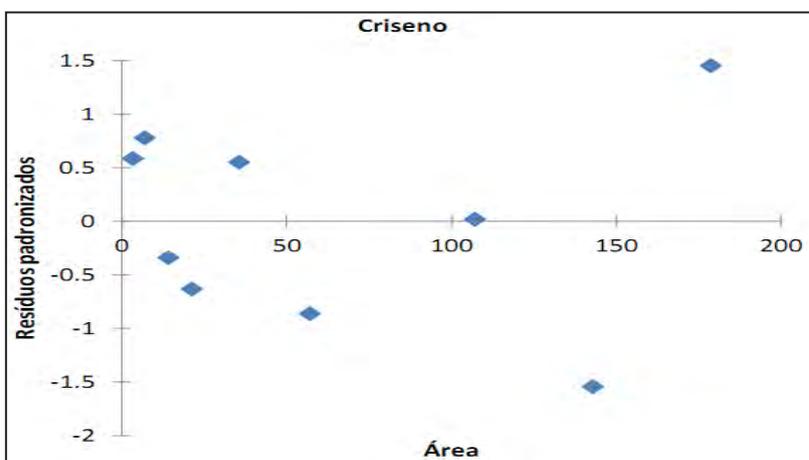
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 53 - Curva analítica para o criseno.



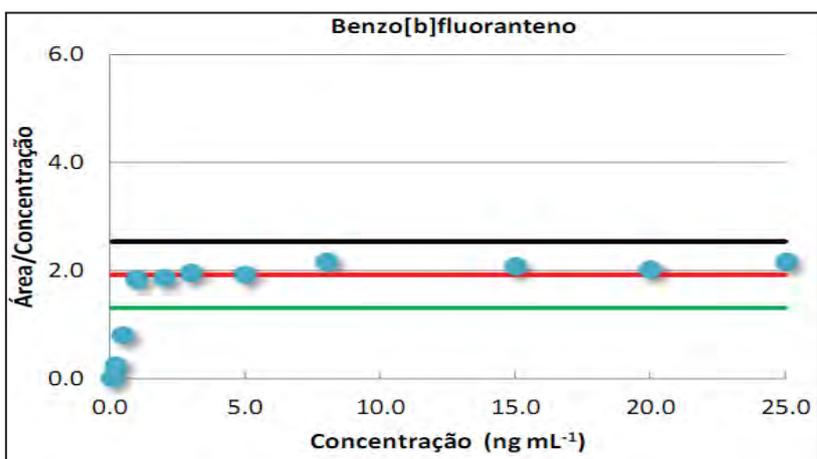
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 54 - Gráfico de resíduos para o criseno.



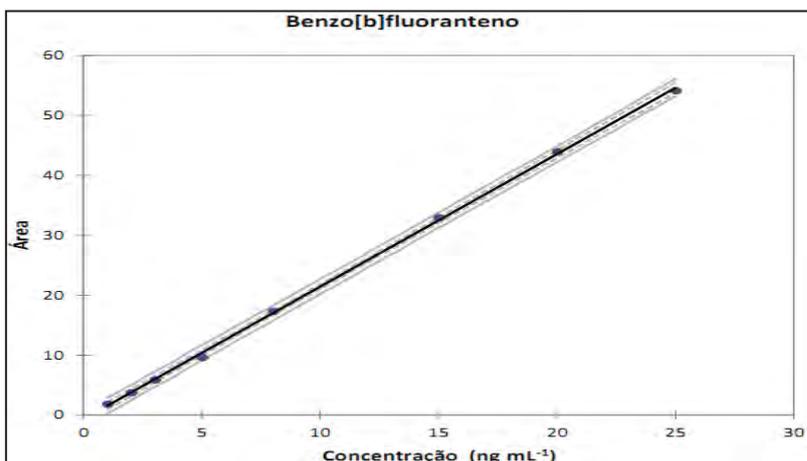
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 55 - Teste de Huber para o benzo[b]fluoranteno.



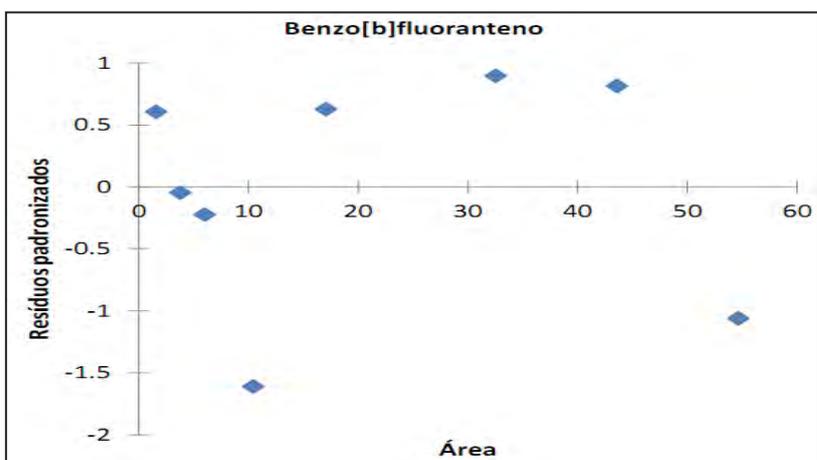
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 56 – Curva analítica para o benzo[b]fluoranteno.



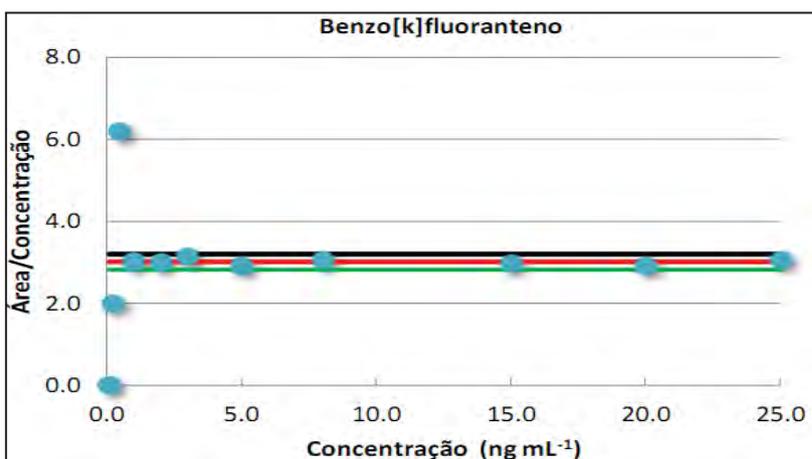
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 57 - Gráfico de resíduos para o benzo[b]fluoranteno.



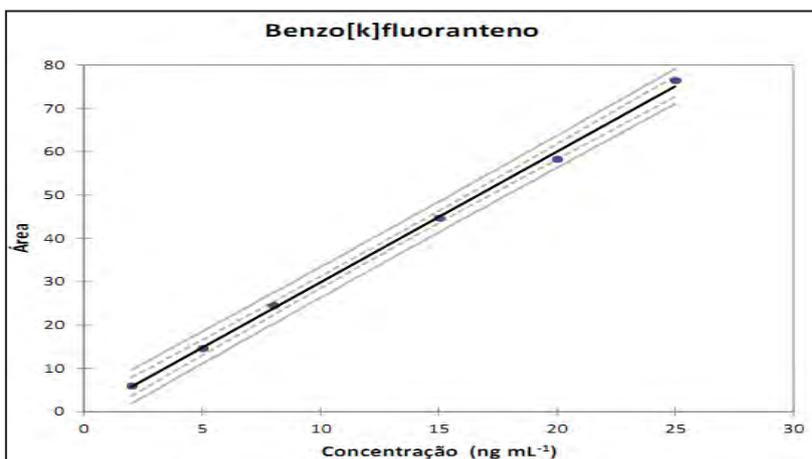
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 58 - Teste de Huber para o benzo[k]fluoranteno.



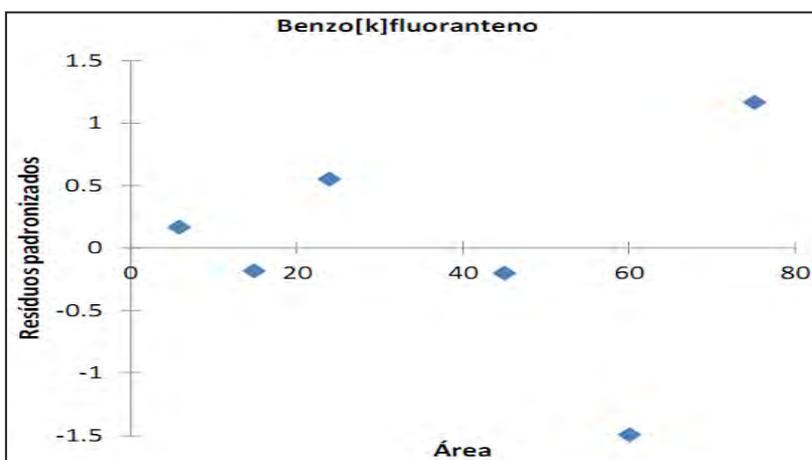
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 59 – Curva analítica para o benzo[k]fluoranteno.



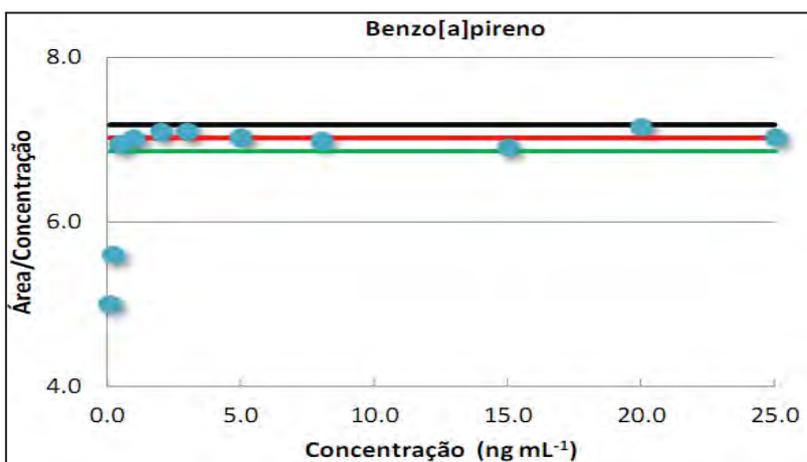
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 60 - Gráfico de resíduos para o benzo[k]fluoranteno.



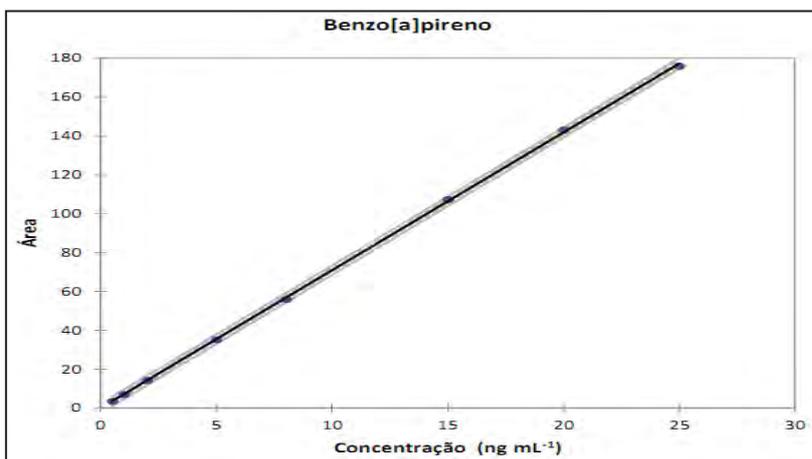
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 61 - Teste de Huber para o benzo[a]pireno.



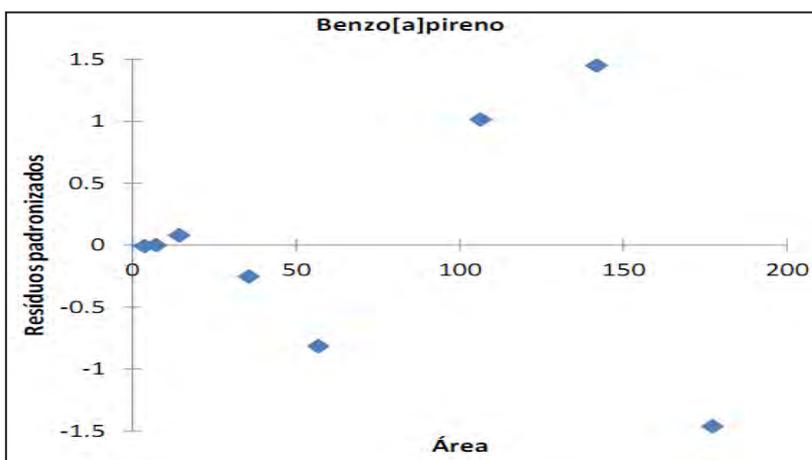
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 62 - Curva analítica para o benzo[a]pireno.



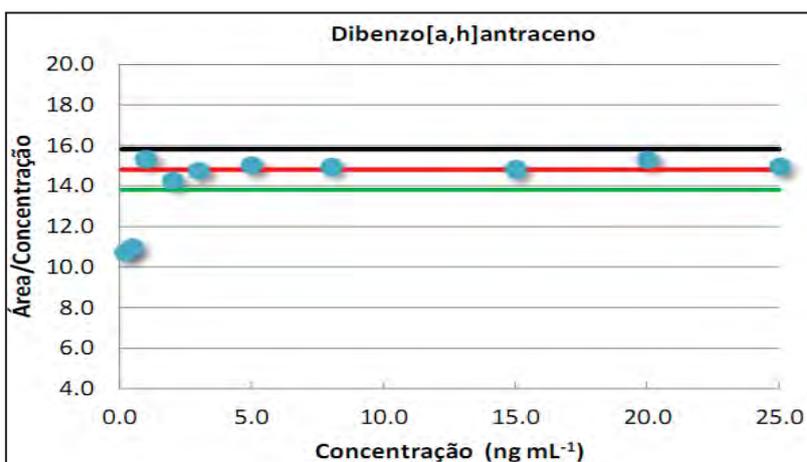
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 63 - Gráfico de resíduos para o benzo[a]pireno.



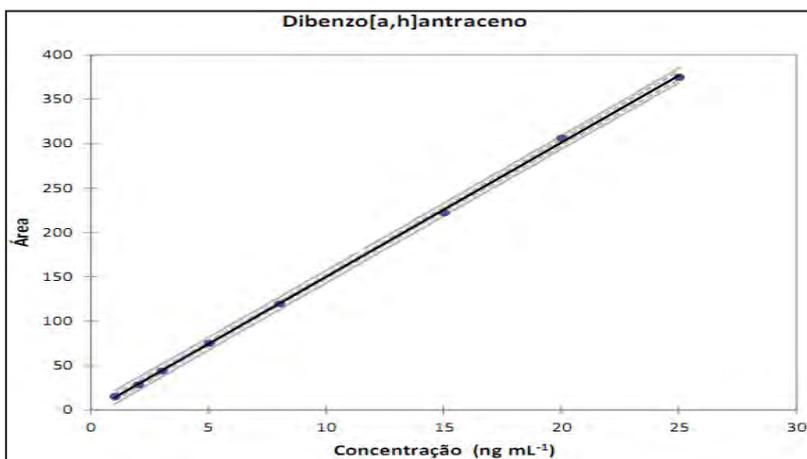
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 64 - Teste de Huber para o dibenzo[a,h]antraceno.



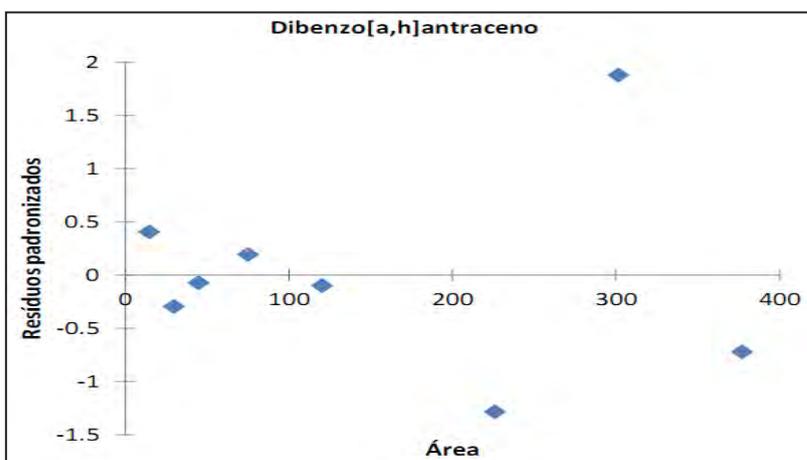
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 65 - Curva analítica para o dibenzo[a,h]antraceno.



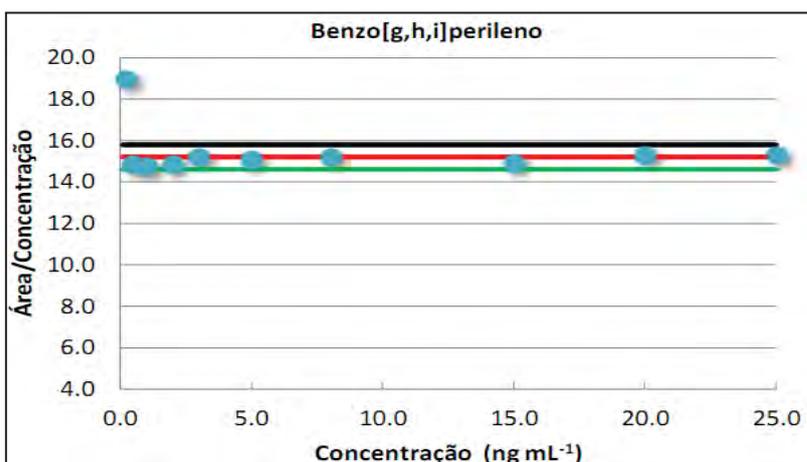
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 66 - Gráfico de resíduos para o dibenzo[a,h]antraceno.



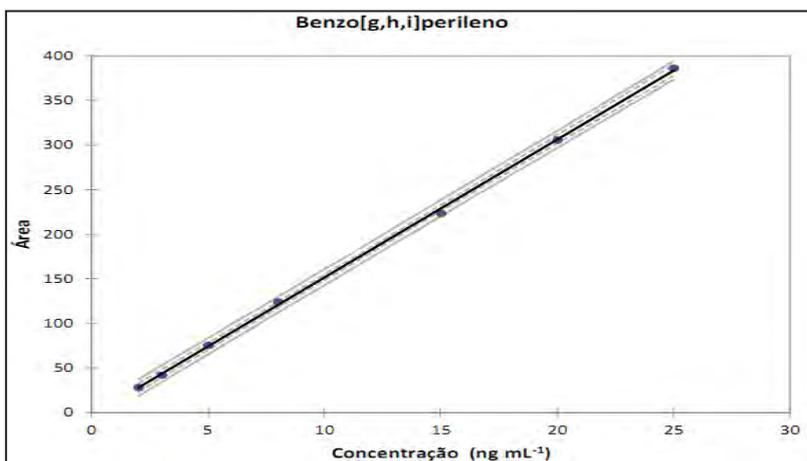
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 67 - Teste de Huber para o benzo[g,h,i]perileno.



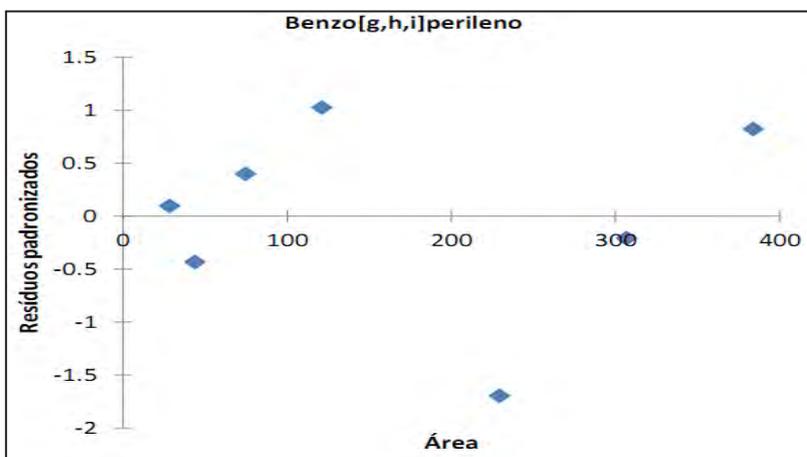
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 68 - Curva analítica para o benzo[g,h,i]perileno.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 69 - Gráfico de resíduos para o benzo[g,h,i]perileno.



Fonte: Elaborado pelo autor.

APENDICÉ B – Resultados do planejamento experimental para as recuperações dos HPAs.

Tabela 16 – Resultado das recuperações para fortificação anterior ao processo de extração.

HPAs	Recuperações obtidas para o planejamento experimental - Fortificação anterior ao processo de extração													
	Tempo de "aging" 6h						Tempo de "aging" 12h							
	% Rec. I	Desvio	% Rec. II	Desvio	% Rec. III	Desvio	% Rec. I	Desvio	% Rec. II	Desvio	% Rec. III	Desvio		
SOLO	Naftaleno	46,53	7,8	47,0	6,3	47,1	5,8	49,0	4,7	48,5	5,9	48,8	9,0	
	Acenafteño	39,8	3,9	40,2	4,9	40,2	3,3	41,9	6,5	41,5	8,3	41,7	8,4	
	Fluoreno	43,2	3,3	43,7	6,2	43,7	2,8	45,5	5,4	45,1	6,9	45,3	6,9	
	Fenantreno	60,4	2,3	61,0	4,8	61,1	1,6	63,6	3,8	63,1	4,8	63,3	4,8	
	Antraceno	84,8	12,7	85,6	8,3	85,8	1,7	89,3	1,9	88,5	2,5	88,9	2,5	
	Fluoranteno	87,7	6,1	88,6	1,1	88,7	1,9	92,4	3,0	91,5	3,8	91,9	3,8	
	Pireno	78,4	2,0	79,2	2,0	79,3	2,2	82,6	5,4	81,8	6,8	82,2	6,9	
	Benzo[<i>a</i>]antraceno	80,5	5,7	81,3	3,8	81,4	3,0	84,7	4,4	84,0	5,3	84,3	5,4	
	Criseno	87,4	4,8	88,3	5,6	88,4	1,3	92,1	1,3	91,2	2,3	91,6	2,5	
	Benzo[<i>b</i>]fluoranteno	74,4	4,7	75,1	2,3	75,2	6,9	78,3	4,6	77,6	5,5	77,9	5,5	
	Benzo[<i>k</i>]fluoranteno	90,2	2,4	91,1	4,8	91,2	2,2	94,9	3,8	94,1	4,5	94,5	4,5	
	Benzo[<i>a</i>]pireno	67,0	4,8	67,7	3,8	67,8	1,9	70,6	2,0	69,9	2,4	70,2	2,4	
	Dibenzo[<i>a,h</i>]antraceno	74,5	1,7	75,2	3,2	75,3	3,7	78,4	4,6	77,7	5,5	78,0	5,5	
	Benzo[<i>g,h,i</i>]perileno	77,2	1,2	77,9	3,7	78,0	2,2	81,2	3,3	80,5	3,9	80,9	4,0	
	Indeno[1,2,3- <i>cd</i>]pireno	84,0	3,5	84,8	2,8	85,0	3,7	88,4	2,7	87,6	3,2	88,0	3,2	
	ÁGUA	Naftaleno	63,3	5,4	65,2	11,4	60,0	9,8	66,6	5,7	67,3	11,8	67,6	11,8
		Acenafteño	54,1	7,7	55,7	15,2	56,0	15,3	56,9	8,1	57,5	15,7	57,8	12,8
		Fluoreno	58,8	6,3	60,6	6,2	60,9	6,3	61,9	6,6	62,6	6,4	62,9	6,5
		Fenantreno	66,5	4,4	68,5	4,4	68,8	4,4	70,0	4,7	70,7	4,5	71,1	4,5
Antraceno		79,1	1,4	81,5	1,4	81,9	1,4	83,3	1,5	84,2	1,4	84,5	1,5	
Fluoranteno		81,8	2,2	84,3	2,2	84,7	2,2	86,2	2,3	87,1	2,2	87,5	2,2	
Pireno		73,1	3,9	75,3	3,9	75,7	3,9	77,0	4,1	77,8	4,0	78,2	4,0	
Benzo[<i>a</i>]antraceno		75,1	3,2	77,3	3,2	77,7	3,2	79,1	3,4	79,9	3,3	80,2	3,3	
Criseno		81,6	3,2	84,0	1,9	84,4	1,9	85,9	3,4	86,8	8,0	87,2	4,8	
Benzo[<i>b</i>]fluoranteno		69,4	3,3	71,5	3,3	71,8	3,3	73,0	3,5	73,8	3,4	74,1	3,4	
Benzo[<i>k</i>]fluoranteno		84,1	2,7	86,6	2,7	87,1	2,7	88,6	2,9	89,5	2,8	89,9	2,8	
Benzo[<i>a</i>]pireno		75,9	1,5	78,2	6,3	78,6	5,8	80,0	1,5	80,8	6,5	81,2	6,5	
Dibenzo[<i>a,h</i>]antraceno		84,4	3,3	86,9	3,3	87,3	3,3	88,8	3,5	89,8	3,4	90,2	3,4	
Benzo[<i>g,h,i</i>]perileno		87,4	2,4	90,0	2,4	90,5	2,4	92,1	2,5	93,0	5,4	93,4	2,4	
Indeno[1,2,3- <i>cd</i>]pireno		92,6	4,2	95,4	5,1	95,9	6,1	97,6	4,4	98,6	5,3	99,0	5,3	

Fonte: Elaborado pelo autor

Tabela 17 – Resultado das recuperações para fortificação posterior ao processo de extração.

HPAS	Recuperações obtidas para o planejamento experimental - Fortificação posterior ao processo de extração													
	Tempo de "aging" 6h						Tempo de "aging" 12h							
	% Rec. I	Desvio I	% Rec. II	Desvio II	% Rec. III	Desvio III	% Rec. I	Desvio I	% Rec. II	Desvio II	% Rec. III	Desvio III		
SOLO	Naftaleno	81,1	12,5	81,3	10,1	84,6	13,8	85,4	7,3	84,0	7,5	84,3	9,1	
	Acenafteeno	77,3	7,7	77,4	7,7	80,6	12,8	81,4	9,6	80,0	10,0	80,3	12,0	
	Fluoreno	84,1	6,3	84,2	6,3	87,7	10,6	88,5	7,9	87,0	8,2	87,4	9,9	
	Fenantreno	99,4	4,5	99,5	4,5	103,6	7,4	104,6	5,6	102,8	5,8	103,3	6,9	
	Antraceno	97,0	1,4	97,1	1,4	101,2	2,4	102,1	4,7	100,3	4,9	100,8	5,8	
	Fluoranteno	100,3	2,2	100,5	2,2	104,6	3,7	105,6	2,8	103,8	2,8	104,3	2,6	
	Pireno	89,7	6,4	89,8	3,7	93,5	6,2	94,4	8,0	92,8	8,3	93,2	7,5	
	Benzo[a]antraceno	92,1	3,3	92,2	3,3	96,0	5,4	96,9	4,1	95,2	4,2	95,7	3,8	
	Criseno	100,0	1,0	100,2	1,0	104,3	1,6	105,3	3,9	103,5	4,0	103,9	3,6	
	Benzo[b]fluoranteno	85,1	3,3	85,2	3,3	88,7	5,6	89,6	4,2	88,0	4,3	88,4	4,8	
	Benzo[k]fluoranteno	103,1	2,8	103,3	2,8	107,6	4,6	108,6	3,4	106,7	3,5	107,2	3,9	
	Benzo[a]pireno	96,8	3,9	96,9	3,5	100,9	5,8	101,9	3,8	100,1	3,9	100,6	4,3	
	Dibenzof[a,h]antraceno	85,2	3,4	85,3	3,4	88,8	5,6	89,7	4,2	88,1	4,3	88,5	1,8	
	Benzo[g,h,i]perileno	88,3	2,4	88,4	2,4	92,1	4,0	92,9	3,1	91,3	3,2	91,7	6,5	
	Indeno[1,2,3-cd]pireno	96,1	4,7	96,2	1,9	91,0	3,2	101,2	4,2	99,4	5,4	99,9	4,8	
	AGUA	Naftaleno	80,1	12,3	79,3	13,1	93,0	8,2	94,1	11,7	89,2	9,8	90,3	7,9
		Acenafteeno	105,1	7,6	108,3	8,1	108,8	8,1	89,7	7,2	92,6	7,8	93,0	7,7
Fluoreno		97,5	6,2	100,4	6,6	100,9	6,7	92,9	5,9	96,0	6,4	96,4	6,5	
Fenantreno		102,4	6,0	105,5	6,4	106,0	6,4	97,6	5,7	100,9	6,2	101,3	6,2	
Antraceno		90,5	1,4	93,2	1,5	93,7	1,5	86,2	1,3	89,1	1,4	89,5	1,5	
Fluoranteno		93,6	2,2	96,4	2,3	96,9	2,3	89,2	2,0	92,2	2,2	92,6	2,2	
Pireno		83,7	6,3	86,2	6,7	86,6	6,8	79,7	6,0	82,4	6,5	82,7	6,5	
Benzo[a]antraceno		85,9	3,2	88,5	3,4	88,9	3,4	81,8	3,7	84,5	4,0	84,9	4,0	
Criseno		93,3	1,0	96,1	1,0	96,6	1,0	88,9	1,1	91,9	1,2	92,3	1,2	
Benzo[b]fluoranteno		79,4	3,3	81,7	3,5	82,2	3,5	75,6	3,8	78,1	4,1	78,5	4,1	
Benzo[k]fluoranteno		96,2	2,7	99,1	3,7	99,6	3,8	91,7	3,1	94,7	3,4	95,2	3,4	
Benzo[a]pireno		101,9	1,4	105,0	2,0	105,5	2,0	97,1	1,7	100,3	1,8	93,4	1,8	
Dibenzof[a,h]antraceno		88,0	3,3	90,6	4,6	91,1	4,6	83,8	3,8	86,6	4,1	87,0	4,2	
Benzo[g,h,i]perileno		100,0	2,4	103,0	3,2	103,5	3,3	95,3	2,7	98,5	3,0	98,9	3,0	
Indeno[1,2,3-cd]pireno		89,7	1,9	92,3	2,6	92,8	2,6	85,4	2,2	88,3	2,4	88,7	3,9	

Fonte: Elaborado pelo autor.

APÊNDICE C – Desvios obtidos na análise dos HPAs para estudo da influência do número de replicatas.

Tabela 18 – Desvios obtidos para os HPAs em função do número de replicatas.

	Desvios obtidos para os HPAs em função no número de replicatas									
	Concentração (ng mL ⁻¹)	Naftaleno	Acenafeno	Fluoreno	Fenantreno	Antraceno	Fluoranteno	Pireno	Benzo[<i>a</i>]antraceno	
3 Replicatas	0,1	0,25	0,53	0,20	0,29	0,18	0,16	0,32	0,28	
	0,3	0,71	0,24	0,48	0,23	0,21	0,38	0,40	0,13	
	0,5	3,02	0,39	0,46	0,18	1,12	0,11	0,34	0,14	
	1,0	1,02	1,63	0,83	0,63	1,27	0,48	0,71	0,41	
	2,0	3,09	3,31	1,27	1,78	1,84	0,39	2,74	0,28	
	3,0	2,12	3,06	1,50	2,12	2,08	1,27	2,02	0,46	
	5,0	4,58	2,92	2,04	2,91	1,78	1,96	3,84	2,06	
	8,0	3,31	1,49	1,11	2,63	2,99	1,65	2,82	1,55	
	15,0	3,63	10,84	1,08	5,39	4,95	2,16	1,91	1,17	
	25,0	8,77	5,07	12,65	6,66	--	2,66	3,35	2,67	
Média	3,13	2,95	2,16	2,28	1,82	1,32	2,29	1,12		
5 Replicatas	0,1	0,20	0,41	0,15	0,23	0,14	0,12	0,25	0,21	
	0,3	0,55	0,19	0,37	0,18	0,16	0,29	0,31	0,10	
	0,5	2,34	0,31	0,35	0,14	0,86	0,09	0,26	0,11	
	1,0	0,79	1,26	0,64	0,49	0,99	0,37	0,55	0,32	
	2,0	2,39	2,56	0,98	1,38	1,42	0,30	2,12	0,21	
	3,0	1,64	2,37	1,17	1,64	1,61	0,98	1,57	0,35	
	5,0	3,55	2,26	1,58	2,25	1,38	1,52	2,98	1,60	
	8,0	2,56	1,15	0,86	2,04	2,32	1,28	2,18	1,20	
	15,0	2,81	8,40	0,83	4,17	3,83	1,67	1,48	0,90	
	25,0	6,79	3,93	9,80	5,16	--	2,06	2,60	2,07	
Média	2,42	2,28	1,67	1,77	1,41	1,02	1,77	0,87		
7 Replicatas	0,1	0,17	0,35	0,13	0,19	0,12	0,10	0,21	0,18	
	0,3	0,17	0,16	0,31	0,15	0,14	0,25	0,26	0,09	
	0,5	1,98	0,26	0,30	0,11	0,73	0,07	0,22	0,09	
	1,0	0,67	1,07	0,54	0,41	0,83	0,31	0,46	0,27	
	2,0	2,02	2,17	0,83	1,16	1,20	0,26	1,80	0,18	
	3,0	1,39	2,00	0,99	1,39	1,36	0,83	1,32	0,30	
	5,0	3,00	1,91	1,34	1,90	1,16	1,29	2,51	1,35	
	8,0	2,17	0,97	0,73	1,72	1,96	1,08	1,84	1,01	
	15,0	2,38	7,10	0,70	3,53	3,24	1,41	1,25	0,76	
	25,0	5,74	3,32	8,28	4,36	--	1,74	2,19	1,75	
Média	2,56	1,93	1,42	1,49	1,19	0,86	1,50	0,73		

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 19 – Desvios obtidos para os HPAs em função do número de replicatas.

Concentração (ng mL ⁻¹)	Desvios obtidos para os HPAs em função no número de replicatas									
	Criseno	Benzo[<i>b</i>]fluoranteno	Benzo[<i>k</i>]fluoranteno	Benzo[<i>a</i>]pireno	Dibenz[<i>a,h</i>]antraceno	Benzo[<i>g,h,i</i>]perileno	Indeno[1,2,3- <i>cd</i>]pireno			
0,1	--	--	--	--	--	0,12	--			
0,3	0,29	0,08	--	0,21	0,31	0,19	0,22			
0,5	0,14	0,32	0,12	0,12	0,12	0,30	0,30			
1,0	0,26	0,07	0,20	0,33	0,26	0,33	1,13			
2,0	0,67	0,30	0,10	0,29	0,10	0,90	1,00			
3,0	0,79	0,40	0,39	1,50	1,93	1,05	1,04			
5,0	0,87	0,16	0,74	0,68	1,01	0,91	1,65			
8,0	1,11	0,52	1,12	1,59	4,58	2,92	3,30			
15,0	1,75	0,75	1,69	2,65	2,20	3,38	1,56			
20,0	1,20	1,12	1,11	1,30	2,86	3,09	1,99			
25,0	2,70	1,00	2,41	2,24	3,49	3,36	2,22			
Média	0,98	0,47	0,68	1,09	1,98	1,39	1,44			
0,1	--	--	--	--	--	0,09	--			
0,3	0,22	0,06	--	0,16	0,24	0,14	0,17			
0,5	0,11	0,24	0,10	0,09	0,31	0,18	0,23			
1,0	0,20	0,05	0,16	0,25	0,20	0,26	0,88			
2,0	0,52	0,23	0,08	0,23	1,18	0,70	0,78			
3,0	0,61	0,31	0,30	1,16	1,49	0,82	0,81			
5,0	0,68	0,12	0,57	0,52	0,79	0,71	1,28			
8,0	0,86	0,40	0,87	1,23	3,55	2,26	2,56			
15,0	1,36	0,58	1,31	2,05	2,62	1,70	1,21			
20,0	0,93	0,87	0,86	1,01	2,21	2,39	1,55			
25,0	2,09	0,77	1,87	1,74	2,70	2,60	1,72			
Média	0,76	0,36	0,68	0,84	1,53	1,08	1,22			
0,1	--	--	--	--	--	0,08	--			
0,3	0,19	0,05	--	0,14	0,21	0,12	0,15			
0,5	0,09	0,21	0,08	0,08	0,26	0,15	0,19			
1,0	0,17	0,04	0,13	0,21	0,17	0,22	0,74			
2,0	0,44	0,19	0,06	0,19	1,00	0,59	0,66			
3,0	0,52	0,26	0,25	0,98	1,26	0,69	0,68			
5,0	0,57	0,10	0,49	0,44	0,66	0,60	1,08			
8,0	0,73	0,34	0,74	1,04	3,00	1,91	2,16			
15,0	1,15	0,49	1,11	1,73	2,21	1,44	1,02			
20,0	0,79	0,73	0,73	0,85	1,87	2,02	1,31			
25,0	1,77	0,65	1,58	1,47	2,29	2,20	1,45			
Média	0,64	0,31	0,57	0,71	1,29	0,91	0,94			

Fonte: Elaborado pelo autor.

APÊNDICE D – Detalhamento das planilhas de cálculo para parâmetros de validação.

Figura 70 – Planilha de cálculo para detecção e rejeição de *outliers* via teste de Huber.

A	S	T	U	V	W	X	Y	Z	AA	AB	AC	AD	AE	AF	AG
		concentração (ng mL ⁻¹)	1ª	2ª	3ª	4ª	5ª	média	desvio padrão	CV %	Area/concentração	mediana	área/conc - med	valor absoluto	Teste de Huber
3	ponto 1	0,10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	/	0,00	24,20	-24,20	24,20	rejeitar
4	ponto 2	0,25	5,91	5,79	6,50	5,60	4,10	5,58	0,89	16,00	22,32	24,20	-1,88	1,88	rejeitar
5	ponto 3	0,50	11,70	12,00	12,30	11,10	13,40	12,10	0,85	7,04	24,20	24,20	0,00	0,00	aceitar
6	ponto 4	1,00	24,20	23,20	21,30	26,00	20,10	22,96	2,33	10,16	22,96	24,20	-1,24	1,24	aceitar
7	ponto 5	2,00	50,90	48,90	46,70	48,30	54,20	49,80	2,88	5,79	24,90	24,20	0,70	0,70	aceitar
8	ponto 6	3,00	67,80	72,10	69,10	70,00	65,10	68,82	2,60	3,78	22,94	24,20	-1,26	1,26	aceitar
9	ponto 7	5,00	120,20	127,20	123,40	123,50	120,40	122,94	2,86	2,32	24,59	24,20	0,39	0,39	aceitar
10	ponto 8	8,00	185,00	192,30	199,00	192,10	181,10	189,90	6,98	3,68	23,74	24,20	-0,46	0,46	aceitar
11	ponto 9	15,00	379,20	371,00	353,60	366,20	351,70	364,34	11,66	3,20	24,29	24,20	0,09	0,09	aceitar
12	ponto 10	20,00	503,00	504,80	488,00	476,30	476,30	489,68	13,85	2,83	24,48	24,20	0,28	0,28	aceitar
13	ponto 11	25,00	722,00	719,20	702,00	714,10	704,20	712,30	8,90	1,25	28,49	24,20	4,29	4,29	rejeitar
14															
15											Mediana (med)	k	intervalo de conf	limite superior	limite inferior
16										24,20	Mediana (mad)	2,00	1,40	25,60	22,80
											0,70				

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 20 - Detalhamento das funções presentes na planilha de cálculo para teste de Huber.

Intervalo na planilha	Dados inseridos/demonstrados	Interpretação
T3:T13	Valores das concentrações utilizadas nas soluções-padrão para elaboração da curva analítica	----
U3:Y13	Valores das áreas cromatográficas obtidas em relação as replicatas	----
Z3:Z13	Valores médios das áreas cromatográficas obtidas em relação as replicatas (Função Excel =MÉDIA)	----
AA3:AA13	Desvio padrão das replicatas (Função Excel =DESVPAD)	Medida que indica a dispersão em relação aos valores médios
AB3:AB13	Coeficiente de variação	Expressa a variabilidade percentual em relação ao valor médio
AC3:AC13	Valores calculados em função do valor médio das áreas/respectiva concentração	Fornece o fator de resposta para determinada concentração
AD3:AD13	Indicação do valor mediano (med) da coluna anterior	Valor utilizado no Teste de HUBER para <i>outliers</i>
AE3:AE13	Diferença entre os fatores de resposta e o valor mediano	----
AF3:AF13	Valor absoluto (módulo) da coluna anterior	----
AB16	Mediana (med)	Valor utilizado no Teste de HUBER para <i>outliers</i>
AC16	Mediana (mad) da coluna AF3:AF13	Valor utilizado no Teste de HUBER para <i>outliers</i>
AD16	Fator de abrangência “k”, que pode variar de 2 a 8	Valor utilizado no Teste de HUBER para <i>outliers</i> . Quanto menor o valor, mais restritivo o intervalo de confiança para a linearidade

Continuação Tabela 20

AE16	Desvio do intervalo de confiança: $mad * k$	Valor utilizado no Teste de HUBER para <i>outliers</i> .
AF16	Limite superior do intervalo de confiança: $med + (mad * k)$	Valor utilizado no Teste de HUBER para <i>outliers</i> . Valores maiores são rejeitados
AG16	Limite inferior do intervalo de confiança: $med - (mad * k)$	Valor utilizado no Teste de HUBER para <i>outliers</i> . Valores menores são rejeitados
AG3:AG13	Teste de Huber para <i>outliers</i> considerando os valores de área/concentração	Valores maiores que o limite superior ou menores que o limite inferior são rejeitados. Os valores não rejeitados serão utilizados para elaboração da curva analítica.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 21 - Detalhamento das funções presentes na planilha de cálculo para verificação de parâmetros da curva analítica e figuras de desempenho.

Intervalo na planilha	Dados inseridos/demonstrados	Interpretação
B2:B14	Valores das concentrações (variáveis independentes - X) dos pontos aceitos no Teste de Huber	----
C2:C14	Valores das concentrações dos pontos aceitos no Teste de Huber elevados ao quadrado	Somatório (C15) utilizado no cálculo do desvio-padrão da inclinação
D2:D14	Valores médios das áreas cromatográficas (variáveis dependentes – Y) dos pontos aceitos no Teste de Huber	----
E2:I14	Valores em função de X e Y para o processo de regressão por mínimos quadrados	Valores utilizados no cálculo do coeficiente linear e angular e também dos respectivos desvios. Somatório (H15) é utilizado no cálculo da ANOVA de significância da regressão
J2:J14	Resíduos dos pontos amostrais	Representam a diferença entre os valores obtidos experimentalmente e os valores previstos pelo modelo de regressão
K2:K14	Valor absoluto (módulo) dos resíduos	----
L2:L14	Valor absoluto (módulo) dos resíduos elevado ao quadrado	Somatório (L15) é utilizado no cálculo da ANOVA de significância da regressão
B17	Número de pontos utilizados na regressão	----
C19	Coefficiente angular da curva analítica (Função Excel =INCLINAÇÃO)	----
C20	Coefficiente linear da curva analítica (Função Excel =INTERCEPTO)	----

Continuação Tabela 21

C21	Coeficiente de correlação	Expressa o grau da correlação entre duas variáveis (X e Y)
C22	Coeficiente de determinação	Expressa o nível de variação explicada pelas variáveis (X e Y)
C23	Erro padrão ou desvio da linearidade	Indica o desvio do modelo de regressão em função dos resíduos e o número de pontos utilizados
G19	Indica o desvio-padrão do coeficiente angular	Quanto maior, menor o grau de ajuste do modelo de regressão.
G20	Indica o desvio-padrão do coeficiente linear	
G22:G26	Expressa os limites de detecção e quantificação calculados segundo as fórmulas apresentadas na seção 3.3.5 (pag X)	----
K:19	ANOVA para significância da regressão. Considera a Soma dos Quadrados do modelo de regressão ($J21 = H15 - L15$), soma dos quadrados dos resíduos ($J22 = L15$), a média dos quadrados do modelo ($K21 = J21/I21$) e a média dos quadrados dos resíduos ($K22 = J22/I22$). A razão destas médias $L21$ é comparada com um valor F tabelado (Tabela X, ANEXO A)	Se o valor calculado for maior que o valor tabelado, o teste indica que existe relação entre X e Y. Quanto maior for este valor, maior será a dependência entre as variáveis. O resultado também pode ser interpretado em relação ao p-valor, caso seja $< \alpha$, há indicação de relação entre X e Y.

Fonte: Elaborado pelo autor

ANEXO A – Tabela de valores críticos para teste F.

Tabela para teste F ($\alpha = 0,05$)																			
GL1/GL2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	15	20	24	30	40	60	120	INF
1	161,45	199,50	215,71	224,58	230,16	233,99	236,77	238,88	240,54	241,88	243,91	245,95	248,01	249,05	250,10	251,14	252,20	253,25	254,31
2	18,51	19,00	19,16	19,25	19,30	19,33	19,35	19,37	19,38	19,40	19,41	19,43	19,45	19,45	19,46	19,47	19,48	19,49	19,50
3	10,13	9,55	9,28	9,12	9,01	8,94	8,89	8,85	8,81	8,79	8,74	8,70	8,66	8,64	8,62	8,59	8,57	8,55	8,53
4	7,71	6,94	6,59	6,39	6,26	6,16	6,09	6,04	6,00	5,96	5,91	5,86	5,80	5,77	5,75	5,72	5,69	5,66	5,63
5	6,61	5,79	5,41	5,19	5,05	4,95	4,88	4,82	4,77	4,74	4,68	4,62	4,56	4,53	4,50	4,46	4,43	4,40	4,37
6	5,99	5,14	4,76	4,53	4,39	4,28	4,21	4,15	4,10	4,06	4,00	3,94	3,87	3,84	3,81	3,77	3,74	3,70	3,67
7	5,59	4,74	4,35	4,12	3,97	3,87	3,79	3,73	3,68	3,64	3,57	3,51	3,44	3,41	3,38	3,34	3,30	3,27	3,23
8	5,32	4,46	4,07	3,84	3,69	3,58	3,50	3,44	3,39	3,35	3,28	3,22	3,15	3,12	3,08	3,04	3,01	2,97	2,93
9	5,12	4,26	3,86	3,63	3,48	3,37	3,29	3,23	3,18	3,14	3,07	3,01	2,94	2,90	2,86	2,83	2,79	2,75	2,71
10	4,96	4,10	3,71	3,48	3,33	3,22	3,14	3,07	3,02	2,98	2,91	2,85	2,77	2,74	2,70	2,66	2,62	2,58	2,54
11	4,84	3,98	3,59	3,36	3,20	3,09	3,01	2,95	2,90	2,85	2,79	2,72	2,65	2,61	2,57	2,53	2,49	2,45	2,40
12	4,75	3,89	3,49	3,26	3,11	3,00	2,91	2,85	2,80	2,75	2,69	2,62	2,54	2,51	2,47	2,43	2,38	2,34	2,30
13	4,67	3,81	3,41	3,18	3,03	2,92	2,83	2,77	2,71	2,67	2,60	2,53	2,46	2,42	2,38	2,34	2,30	2,25	2,21
14	4,60	3,74	3,34	3,11	2,96	2,85	2,76	2,70	2,65	2,60	2,53	2,46	2,39	2,35	2,31	2,27	2,22	2,18	2,13
15	4,54	3,68	3,29	3,06	2,90	2,79	2,71	2,64	2,59	2,54	2,48	2,40	2,33	2,29	2,25	2,20	2,16	2,11	2,07
16	4,49	3,63	3,24	3,01	2,85	2,74	2,66	2,59	2,54	2,49	2,42	2,35	2,28	2,24	2,19	2,15	2,11	2,06	2,01
17	4,45	3,59	3,20	2,96	2,81	2,70	2,61	2,55	2,49	2,45	2,38	2,31	2,23	2,19	2,15	2,10	2,06	2,01	1,96
18	4,41	3,55	3,16	2,93	2,77	2,66	2,58	2,51	2,46	2,41	2,34	2,27	2,19	2,15	2,11	2,06	2,02	1,97	1,92
19	4,38	3,52	3,13	2,90	2,74	2,63	2,54	2,48	2,42	2,38	2,31	2,23	2,16	2,11	2,07	2,03	1,98	1,93	1,88
20	4,35	3,49	3,10	2,87	2,71	2,60	2,51	2,45	2,39	2,35	2,28	2,20	2,12	2,08	2,04	1,99	1,95	1,90	1,84
21	4,32	3,47	3,07	2,84	2,68	2,57	2,49	2,42	2,37	2,32	2,25	2,18	2,10	2,05	2,01	1,96	1,92	1,87	1,81
22	4,30	3,44	3,05	2,82	2,66	2,55	2,46	2,40	2,34	2,30	2,23	2,15	2,07	2,03	1,98	1,94	1,89	1,84	1,78
23	4,28	3,42	3,03	2,80	2,64	2,53	2,44	2,37	2,32	2,27	2,20	2,13	2,05	2,01	1,96	1,91	1,86	1,81	1,76
24	4,26	3,40	3,01	2,78	2,62	2,51	2,42	2,36	2,30	2,25	2,18	2,11	2,03	1,98	1,94	1,89	1,84	1,79	1,73
25	4,24	3,39	2,99	2,76	2,60	2,49	2,40	2,34	2,28	2,24	2,16	2,09	2,01	1,96	1,92	1,87	1,82	1,77	1,71
26	4,23	3,37	2,98	2,74	2,59	2,47	2,39	2,32	2,27	2,22	2,15	2,07	1,99	1,95	1,90	1,85	1,80	1,75	1,69
27	4,21	3,35	2,96	2,73	2,57	2,46	2,37	2,31	2,25	2,20	2,13	2,06	1,97	1,93	1,88	1,84	1,79	1,73	1,67
28	4,20	3,34	2,95	2,71	2,56	2,45	2,36	2,29	2,24	2,19	2,12	2,04	1,96	1,91	1,87	1,82	1,77	1,71	1,65
29	4,18	3,33	2,93	2,70	2,55	2,43	2,35	2,28	2,22	2,18	2,10	2,03	1,94	1,90	1,85	1,81	1,75	1,70	1,64
30	4,17	3,32	2,92	2,69	2,53	2,42	2,33	2,27	2,21	2,16	2,09	2,01	1,93	1,89	1,84	1,79	1,74	1,68	1,62
40	4,08	3,23	2,84	2,61	2,45	2,34	2,25	2,18	2,12	2,08	2,00	1,92	1,84	1,79	1,74	1,69	1,64	1,58	1,51
60	4,00	3,15	2,76	2,53	2,37	2,25	2,17	2,10	2,04	1,99	1,92	1,84	1,75	1,70	1,65	1,59	1,53	1,47	1,39
120	3,92	3,07	2,68	2,45	2,29	2,18	2,09	2,02	1,96	1,91	1,83	1,75	1,66	1,61	1,55	1,50	1,43	1,35	1,25
inf	3,84	3,00	2,60	2,37	2,21	2,10	2,01	1,94	1,88	1,83	1,75	1,67	1,57	1,52	1,46	1,39	1,32	1,22	1,00

Fonte: Adaptado de Meier, 2000.

ANEXO B – Tabela de valores críticos para teste t.

Tabela teste t			
GL	$\alpha = 0,05$	$\alpha = 0,01$	$\alpha = 0,001$
1	12.71	63.66	636.62
2	4.30	9.92	31.60
3	3.18	5.84	12.92
4	2.78	4.60	8.61
5	2.57	4.03	6.87
6	2.45	3.71	5.96
7	2.36	3.50	5.41
8	2.31	3.36	5.04
9	2.26	3.25	4.78
10	2.23	3.17	4.59
11	2.20	3.11	4.44
12	2.18	3.05	4.32
13	2.16	3.01	4.22
14	2.14	2.98	4.14
15	2.13	2.95	4.07
16	2.12	2.92	4.01
17	2.11	2.90	3.97
18	2.10	2.88	3.92
19	2.09	2.86	3.88
20	2.09	2.85	3.85
21	2.08	2.83	3.82
22	2.07	2.82	3.79
23	2.07	2.81	3.77
24	2.06	2.80	3.75
25	2.06	2.79	3.73

Fonte: Adaptado de Meier, 2000.