

UNIVERSIDADE DE COIMBRA

FACULDADE DE MEDICINA

**ANÁLISE DE SUBSTÂNCIAS VOLÁTEIS COM INTERESSE FORENSE.
VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO ANALÍTICO POR GC-FID.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de
Coimbra para obtenção de Grau de Mestre em Medicina Legal

Orientador: Mestre João Miguel Gouveia Franco

Co-orientador: Professor Doutor Francisco Corte Real Gonçalves

CARLA MARIA PINTO MONTEIRO

COIMBRA 2012

RESUMO

O uso de substâncias orgânicas voláteis encontra-se amplamente disseminado nas sociedades atuais. Desde uma extensa variedade de produtos de utilização doméstica até muitos componentes de uso industrial têm substâncias voláteis na sua constituição. A escassa literatura científica sobre os procedimentos analíticos a seguir nas situações de intoxicação por muitas das substâncias voláteis, bem como a particularidade da sua fácil evaporação, associada aos fenómenos de redistribuição *post mortem*, originam frequentemente dificuldades interpretativas no estudo destes casos.

O objetivo deste trabalho foi a otimização e validação de procedimentos analíticos sensíveis e rápidos para a deteção e quantificação de alguns compostos orgânicos voláteis (acetaldeído, acetato de etilo, acetona, acetonitrilo, 1-butanol, clorofórmio, éter, metanol, 2-propanol, tolueno e p-xileno) em diferentes matrizes (sangue, urina e humor vítreo) utilizando um cromatógrafo de gás Agilent 6890N equipado com um detetor de ionização de chama e acoplado a um injetor de *headspace* de volume fixo (1 mL) Agilent G1888 (HS-GC/FID).

As substâncias em estudo foram divididas e agrupadas de acordo com a sua solubilidade e gama de trabalho. Assim, as substâncias com elevada solubilidade em água foram agrupadas numa mesma solução mistura (acetaldeído, acetato de etilo, acetona, acetonitrilo, 1-butanol, éter, metanol, 2-propanol), enquanto as restantes, caracterizadas pela sua elevada insolubilidade em água mas apresentando uma boa solubilidade em metanol, foram divididas de acordo com as respetivas gamas de trabalho.

Antes da análise cromatográfica, todas as amostras, incluindo os calibradores, foram diluídas. Para tal, 100 µL de urina, humor vítreo ou sangue foram diluídos em 1 ml de solução aquosa de n-propanol (100 mg/L), utilizado como padrão interno. A separação cromatográfica foi realizada utilizando duas colunas capilares com diferentes polaridades, a fim de garantir o cumprimento dos critérios de identificação recomendados para este tipo de análise. Todos os compostos estudados, incluindo o n-propanol (padrão interno), eluíram num intervalo de tempo de 15 minutos e todos apresentaram uma boa resolução sem interferência de metabolitos, produtos de degradação ou outras substâncias.

O estudo incidiu sobre todos os parâmetros referidos no procedimento de validação de métodos quantitativos em vigor no Serviço de Toxicologia Forense da Delegação do Centro do Instituto Nacional de Medicina Legal, I.P., o que incluiu o estudo da seletividade, linearidade, limites de deteção e quantificação, precisão, robustez, estabilidade e exatidão. Após a análise dos resultados obtidos foi possível concluir pela adequabilidade do método analítico desenvolvido, tendo sido aplicado a casos reais.

PALAVRAS-CHAVE

Toxicologia forense; substâncias orgânicas voláteis; cromatografia gasosa; *headspace*; validação.

ABSTRACT

The use of volatile organic substances is widespread in contemporary societies. A wide variety of products for household use until many components for industrial use have volatile substances in its constitution. The sparse literature on the analytical procedures to be followed in cases of poisoning by many of the volatile substances, as well as the particularity of its easy evaporation, associated with the phenomena of post mortem redistribution, create interpretive difficulties in the study of these cases.

The purpose of this work was the optimization and validation of sensitive and rapid analytical procedures to the detection and quantification of some volatile organic compounds (acetaldehyde, ethyl acetate, acetone, acetonitrile, 1-butanol, chloroform, ether, methanol, 2-propanol, toluene and p-xylene) in different matrices (blood, urine and vitreous humor) using a gas chromatograph Agilent 6890N, equipped with a flame ionization detector coupled to a headspace injector of fixed volume (1 mL) Agilent G1888 (HS-GC/FID).

The substances under study were divided and grouped according to their solubility and working range. For substances with high water solubility it was created a mixture solution (acetaldehyde, ethyl acetate, acetone, acetonitrile, 1-butanol, ether, methanol, 2-propanol), while the others, characterized by high water insolubility but with good solubility in methanol, were divided according to the respective working range.

Before the gas chromatography analysis, all specimens, including the calibrators, were diluted. With this purpose 100 μ L of urine, vitreous humor or blood were

diluted with 1 mL aqueous solution of n-propanol (100 mg/L), used as internal standard.

The chromatographic separation was performed using two capillary columns with different polarities, in order to ensure fulfillment of the identification criteria recommended for this type of analysis. All compounds studied, including n-propanol (internal standard), eluted in a run time of 15 minutes and were all well resolved with no interference of metabolites, degradation products or other substances.

The study focused on all parameters included in the validation procedure for quantitative methods, in place at the forensic toxicology laboratory of Centre Branch – Portuguese National Institute of Legal Medicine and Forensic Sciences, I.P., which included the study of selectivity, linearity, limits of detection and quantification, stability, precision, accuracy, robustness. After analyzing the results we concluded the suitability of the analytical method developed, and used it in real casework.

KEYWORDS

Forensic toxicology; volatile organic substances; gas chromatography; headspace; validation.

ÍNDICE GERAL

Resumo	i
Abstract	iii
Índice de Figuras	ix
Índice de Tabelas	x
Lista de símbolos, unidades e abreviaturas	xii
Parte I – INTRODUÇÃO	1
1.1 Justificação do tema	3
1.2 Objetivos	6
Parte II – REVISÃO DA LITERATURA	7
2.1 Substâncias voláteis em análise	9
2.1.1 Acetaldeído	12
2.1.2 Acetato de etilo	13
2.1.3 Acetona	14
2.1.4 Acetonitrilo	16
2.1.5 1-Butanol	17
2.1.6 Clorofórmio	18
2.1.7 Éter	20
2.1.8 Metanol	22
2.1.9 2-Propanol	23
2.1.10 Tolueno	25
2.1.11 Xileno	27
2.2 Cromatografia gasosa com detetor de ionização de chama e sistema de injeção de <i>headspace</i> (HS-GC/FID)	29

2.2.1 Cromatografia gasosa (GC)	29
2.2.2 Detetor de ionização de chama (FID)	30
2.2.3 Sistema de <i>headspace</i> (HS)	31
2.3 Matrizes biológicas	32
2.4 Validação de métodos analíticos	35
2.4.1 Introdução	35
2.4.2 Definição dos parâmetros de validação	36
2.4.2.1 Seletividade /especificidade	36
2.4.2.2 Modelo de calibração	38
2.4.2.3 Linearidade	39
2.4.2.4 Gama de trabalho	40
2.4.2.5 Precisão	41
2.4.2.6 Exatidão	42
2.4.2.7 Limites de detecção e de quantificação	42
2.4.2.8 Robustez	43
2.4.2.9 Estabilidade	44
Parte III – TRABALHO EXPERIMENTAL	45
3.1 Introdução	47
3.2 Material e métodos	47
3.2.1 Substâncias estudadas	47
3.2.2 Amostras biológicas	48
3.2.3 Padrões, reagentes e material	48
3.2.3.1 Padrões	48
3.2.3.2 Reagentes	49
3.2.3.3 Material	49

3.2.4. Equipamentos	49
3.2.3.1 Aparelhos de uso comum	49
3.2.3.2 Pipetas e doseadores	50
3.2.3.3 Instrumentos analíticos	50
3.2.5 Procedimento analítico	50
3.2.5.1 Preparação das soluções	50
3.2.5.2 Preparação das amostras de ensaio	56
3.2.5.3 Preparação das curvas de calibração	56
3.2.5.4 Preparação das amostras de controlo de qualidade interno	58
3.2.6 Análise instrumental (HS-GC/FID)	60
3.3 Resultados e discussão	61
3.3.1 Desenvolvimento do método analítico	61
3.3.2 Identificação das substâncias	63
3.3.3 Validação do método analítico desenvolvido	63
3.3.3.1 Especificidade/seletividade	64
3.3.3.2 Linearidade	70
3.3.3.3 Limites de deteção e de quantificação	72
3.3.3.4 Repetibilidade do equipamento	74
3.3.3.5 Precisão intermédia	75
3.3.3.6 Exatidão	78
3.3.3.7 Robustez	81
3.3.3.8 Avaliação dos fenómenos de arrastamento (carryover)	81
3.3.3.9 Teste ao limiar analítico de quantificação	82
3.3.3.10 Estabilidade	84

Parte IV – APLICAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO EM AMOSTRAS REAIS	85
Parte V – CONCLUSÕES	91
Parte VI – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97
Parte VII – ANEXOS- Resultados do Procedimento de Validação	107
7.1 Experiência efetuada à temperatura do injetor	109
7.2 Linearidade	110
7.3 Limites de deteção e quantificação	125
7.4 Repetibilidade do equipamento	140
7.5 Precisão intermédia	142
7.6 Exatidão	151
7.7 Teste ao limite de quantificação	155
Agradecimentos	159

Índice de Figuras

Figura 1	Esquema do sistema de cromatografia gasosa (adaptado de Moffat et al., 2004).	30
Figura 2	Esquema do detetor FID (adaptado de Moffat et al., 2004).	31
Figura 3	Cromatograma da análise das substâncias a 1000 mg/L.	62
Figura 4	Cromatograma da amostra 8A de urina, não fortificada.	68
Figura 5	Cromatograma da amostra 8B de urina, fortificada.	69

Índice de Tabelas

Tabela 1	Substâncias voláteis usualmente utilizadas (Esmail et al., 1993).	9
Tabela 2	Principais características do sistema HS-GC/FID utilizado.	50
Tabela 3	Agrupamento das substâncias por solubilidade e gama de trabalho.	51
Tabela 4	Preparação da curva de calibração- mistura II.	57
Tabela 5	Preparação da curva de calibração- mistura III.	57
Tabela 6	Preparação da curva de calibração- clorofórmio.	58
Tabela 7	Preparação dos CQI- mistura II.	59
Tabela 8	Preparação dos CQI- mistura III.	59
Tabela 9	Preparação dos CQI- clorofórmio.	59
Tabela 10	Parâmetros de validação em função do tipo de método utilizado.	64
Tabela 11	Informação sobre as amostras de sangue/urina usadas para constituir as misturas (<i>pools</i>).	65
Tabela 12	Informação sobre as amostras de humor vítreo usadas para constituir as misturas (<i>pools</i>).	66
Tabela 13	Resultados obtidos no estudo da especificidade/seletividade.	69
Tabela 14	Resultados obtidos no estudo da linearidade.	71
Tabela 15	Resultados obtidos no estudo dos limiares analíticos.	73
Tabela 16	Resultados obtidos para o controlo baixo (100 e 250 mg/L).	74
Tabela 17	Resultados obtidos para o controlo alto (750, 800 e 1500 mg/L).	75
Tabela 18	Tabela ANOVA (fator único).	76

Tabela 19	Cálculo das estimativas da precisão intermédia e da repetibilidade.	76
Tabela 20	Estudo da repetibilidade e da precisão intermédia do método analítico.	77
Tabela 21	Resultados obtidos para a exatidão.	79
Tabela 22	Resultados obtidos para o teste ao LOQ em amostras de sangue.	82
Tabela 23	Resultados obtidos para o teste ao LOQ em amostras de urina.	83
Tabela 24	Resultados obtidos para o teste ao LOQ em amostras de humor vítreo.	83
Tabela 25	Apresentação dos casos reais analisados.	88

Lista de símbolos, unidades e abreviaturas

ADH	Álcool Desidrogenase
AE	Amostra de ensaio
AP	Amostra primária
CQI	Controlo de qualidade interno
CV	Coefficiente de Variação
DFSA	Drug facilitated sexual assault
DP	Desvio padrão
et al.	<i>et alii</i> , e outros
e.g.	<i>exempli gratia</i> , por exemplo
FID	Detetor de ionização em chama
GC	Cromatografia gasosa
GC/MS	Cromatografia gasosa / espectrometria de massa
HS	<i>Headspace</i>
HS-GC/FID	Cromatografia gasosa com detetor de ionização de chama e sistema de injeção de <i>headspace</i>
ICH	International Conference on Harmonisation
INML	Instituto Nacional de Medicina Legal, I.P.
ISO	International Organization for Standardization
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
LC/MS	Cromatografia líquida / espectrometria de massa
LOD	Limite de deteção
LOQ	Limite de quantificação
MEFS	Micro-extração em fase sólida
MS	Espectrometria de massa

PI	Padrão interno
RSD	Desvio padrão relativo
SOFT	Society of Forensic Toxicologists
STF	Serviço de toxicologia forense
TRR	Tempo de retenção relativo
m	metro
µL	microlitro
min	minuto
mm	milímetro
mg/L	miligrama por litro
L	Litro
°C	graus Celsius
r	Coefficiente de correlação
r²	Coefficiente de determinação
<	menor que...
>	maior que...

Parte I – INTRODUÇÃO

1.1 Justificação do tema

A análise de substâncias orgânicas voláteis no âmbito de intoxicações com interesse forense constitui um importante e, muitas vezes, difícil desafio colocado à Toxicologia Forense. Além do etanol, cujo procedimento analítico se encontra já amplamente validado em múltiplos laboratórios e, por isso, não incluído no presente trabalho, substâncias como a acetona, o tolueno, o xileno, o isopropanol ou o metanol entre outras, podem surgir envolvidas em situações onde a sua determinação se revela essencial para o respetivo enquadramento médico-legal.

O isopropanol e o metanol são álcoois amplamente utilizados na indústria: o isopropanol pode ser encontrado em produtos de limpeza ou na indústria gráfica e o metanol constitui um ingrediente habitual de muitos solventes, entre outras aplicações. O acetaldeído é utilizado no fabrico de plásticos, corantes ou resinas. A acetona é utilizada frequentemente como solvente, em tintas ou vernizes, bem como em múltiplas áreas industriais. Em resumo, as substâncias orgânicas voláteis são constituintes de uma grande variedade de produtos de utilização doméstica ou industrial, estando em contacto frequente com os seres humanos e podendo, por essa circunstância, originar intoxicações de forma acidental devido a uma exposição mais ou menos prolongada.

Uma outra forma de intoxicação por substâncias voláteis surge em resultado da sua utilização abusiva e voluntária, com vista à obtenção de efeitos psicoativos. Esta prática pode encontrar explicação no facto de se tratar de compostos presentes em produtos baratos e de fácil acesso. Esta realidade constitui um quadro motivador de solicitações para a realização de análises toxicológicas por parte dos laboratórios de

toxicologia forense, as quais podem assumir uma grande relevância em alguns países.

Tais substâncias podem ser analisadas não apenas no contexto de uma investigação de natureza forense, podendo o seu estudo revelar-se igualmente de grande utilidade no âmbito clínico. A título de exemplo, a acetona, tal como o acetaldeído, é um composto volátil cuja deteção e quantificação pode ser usada como biomarcador de doenças e/ou intoxicações.

Não obstante a sua ampla utilização, os compostos referidos possuem toxicidade reconhecida que se traduz no aparecimento frequente de situações com interesse forense.

Contudo, os estudos científicos publicados relativos à validação dos procedimentos analíticos necessários para a determinação destas substâncias são relativamente escassos, evidenciando, por vezes, dificuldades interpretativas que importa considerar. Tais problemas interpretativos resultam, em grande parte, da complexidade dos procedimentos analíticos subjacentes à determinação de substâncias que se evaporam com muita facilidade, implicando requisitos específicos que variam entre alguns destes compostos.

Assim, e tendo em consideração a pesquisa bibliográfica efetuada, o presente trabalho incluiu o estudo dos procedimentos necessários à determinação de acetaldeído, acetato de etilo, acetona, acetonitrilo, 1-butanol, clorofórmio, éter, metanol, 2-propanol, tolueno e xileno, pelo facto de estas substâncias voláteis poderem estar facilmente envolvidas em situações de interesse forense e/ou clínico e, por isso, a sua identificação e quantificação poderem ser requeridas a um laboratório de toxicologia. A sua disponibilidade para uso comum, a nível

doméstico, industrial e laboratorial, justificou também a opção pelo estudo destes compostos.

A escolha das matrizes biológicas utilizadas no presente trabalho teve em consideração a sua representatividade relativamente às amostras recebidas num laboratório de toxicologia forense, bem como as suas características específicas: o sangue constitui a matriz de eleição para a realização de análises toxicológicas forenses; a acumulação de substâncias tóxicas e respetivos metabolitos a nível da urina costuma ser um fator facilitador da sua deteção; o humor vítreo está usualmente menos sujeito a contaminações bacterianas ou fúngicas, possuindo condições estéreis que facilitam as análises em fases mais avançadas da decomposição.

A utilização de um cromatógrafo de gases *Agilent®* 6890N equipado com um detetor de ionização de chama e acoplado a um injetor *headspace Agilent* G1888 (HS-GC/FID) teve como justificação a circunstância de ser esta a tecnologia disponível no Serviço de Toxicologia Forense da Delegação do Centro do INML para a realização de análises de alcoolémia e, também, por ser considerada adequada para a análise de substâncias voláteis.

1.2 Objetivos

O presente estudo teve como propósito o desenvolvimento de um método analítico que permitisse a detecção e quantificação de um grupo de substâncias voláteis com interesse forense, em diversas matrizes biológicas (sangue, urina e humor vítreo).

Para o desenvolvimento do respetivo método pretendeu-se utilizar a tecnologia disponível no laboratório e considerada adequada para a análise do tipo de substâncias envolvidas, nomeadamente um cromatógrafo gasoso equipado com um detetor de ionização de chama, sendo as amostras injetadas no sistema através de um injetor de *headspace*.

A confirmação da presença das substâncias de interesse seria baseada, após a seleção de um padrão interno adequado, na comparação entre os tempos de retenção relativos obtidos para os picos cromatográficos presentes nas amostras suspeitas e os de padrões analíticos analisados contemporaneamente e nas mesmas condições analíticas.

Assim, constituiu objetivo específico a validação do método atrás referido no equipamento utilizado na rotina do Serviço de Toxicologia Forense da Delegação do Centro do INML, um cromatógrafo gasoso *Agilent® 6890N*, dotado de um detetor de ionização de chama, acoplado a um injetor de *headspace* de volume fixo (*loop*) *Agilent G1888*.

Por último, pretendeu-se aplicar o método desenvolvido e validado a casos reais, nos quais houvesse suspeita da presença de uma ou mais das substâncias envolvidas neste estudo.

Parte II – REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Substâncias voláteis em análise

O uso de substâncias orgânicas voláteis encontra-se amplamente disseminado nas sociedades atuais. Desde uma extensa variedade de produtos de utilização doméstica até muitos componentes de uso industrial têm substâncias voláteis na sua constituição. Diversos produtos de limpeza bem como tintas ou diluentes, colas, isqueiros, aerossóis, extintores, corretores de escrita, agentes desengordurantes, cosméticos, combustíveis, entre muitos outros, possuem na sua constituição produtos voláteis (Tabela 1).

Tabela 1- Substâncias voláteis usualmente utilizadas (Esmail et al., 1993).

<i>Product</i>	<i>Volatile component</i>
Adhesives	
Contact adhesives	Toluene mostly
PVC cement	Trichloroethylene
Balsa wood cement	Ethylene acetate mostly
Cycle tyre repair kit	Toluene and xylene
Latex	White spirit
Super Glue	No significant products
Aerosols	
Air freshener	Propellant 11 and 12
Deodorants	Propellant 11 and 12
Fly spray	Propellant 11 and 12 and butane
Hair lacquer	Propellant 11 and 12
Local analgesic spray	Propellant 11 and 12
Paint	Propellant 11 and 12 and esters
Anaesthetic agents	
Liquid	Halothane
Gaseous	Nitrous oxide
Local	Propellant 11 and 12
Cosmetics	
Nail varnish remover	Acetone and esters
Dry cleaning agents	Tetrachloroethylene
Degreasing agents	1,1,1-trichloroethylene
Fire extinguishers	Bromochlorodifluoromethane, propellant 11 and 12
Fuel gases	
Cigarette lighter refills	n-butane and isobutane
Butane	n-butane and isobutane
Propane	Propane and butane isomers
Paint stripper	Dichloromethane, toluene
Spot removers and dry cleaners	
General	1,1,1-trichloroethane, tetrachloroethylene, trichloroethylene
Tar remover	White spirit
Typewriter correcting fluid and thinners	1,1,1-trichloroethane

Uma forma relativamente comum de intoxicação por substâncias voláteis consiste na sua inalação voluntária com vista à produção de efeitos sobre o sistema nervoso central, designadamente sensação de prazer, desinibição, euforia e alucinações (*glue sniffing*). O abuso de substâncias voláteis com o objetivo de produzir efeitos psicoativos pode constituir, por isso, um problema similar ao do uso de drogas ilícitas. Pelo facto de serem produtos baratos e de fácil acesso, as substâncias voláteis são frequentemente utilizadas com fins abusivos pelos adolescentes em diversos países. Dependendo da quantidade inalada, algumas destas substâncias produzem efeitos depressores no sistema nervoso central semelhantes ao etanol ou aos barbitúricos, podendo provocar, também, fenómenos de dependência psicológica. Apesar de esta forma de intoxicação constituir um problema de saúde pública em diversos países, muitas vezes não se conhece devidamente o alcance deste fenómeno, pelo que é frequentemente desvalorizado. O problema assume particular complexidade pela circunstância de não existirem medidas de controlo aduaneiro para muitas destas substâncias voláteis apesar de terem sido aprovadas algumas normas relativamente à acetona, ao dietileter ou ao tolueno com vista à prevenção da sua utilização na síntese ou purificação de drogas ilícitas (Ramsey et al., 1989; Flanagan et al., 1997; Gaulier et al., 2003; Wu et al., 2006; Baydala et al., 2010).

A intoxicação pode ocorrer, com maior frequência, de forma acidental por exposição mais ou menos prolongada a estas substâncias ou na sequência do seu uso deliberado. Apesar de existirem muito menos intoxicações fatais do que não fatais, a exposição aguda a substâncias voláteis poderá ter efeitos cardiovasculares e pulmonares, tais como arritmias, hipotensão ou hipoxemia, entre outros, podendo originar a morte. As alterações de consciência provocadas poderão também

favorecer a ocorrência de acidentes. A exposição crônica a algumas destas substâncias, de forma deliberada ou involuntária, pode provocar um conjunto de sinais e sintomas relacionados com a sua ação nefasta sobre a mielina e membranas neuronais. Os efeitos neurológicos poderão incluir diversos tipos de disfunção cerebral e alterações motoras e sensitivas. Poderá ser observado tremor, irritabilidade, ataxia, nistagmo, discurso arrastado, diminuição da acuidade visual e surdez. Poderão ainda ser observadas alterações cardíacas, respiratórias, renais, hepáticas ou a nível da medula óssea, entre outras (Marjot et al., 1989; Rinsky, 1989; Esmail et al., 1993; Meadows et al., 1996; Garnier, 2000; Brouette et al., 2001; Baselt, 2002; Rosenberg et al., 2002; Baydala et al., 2010).

Nas intoxicações por este tipo de substâncias é fundamental um cuidadoso exame do local, pois os achados autópticos são normalmente inespecíficos. Por este motivo, os exames complementares toxicológicos adquirem igualmente uma relevância crucial para o conhecimento etiológico da intoxicação, sendo frequentemente a única forma de comprovar a causa da morte (Steffee et al., 1996).

Refira-se também que é importante efetuar um diagnóstico diferencial com situações de natureza clínica, dado que algumas destas substâncias constituem biomarcadores de diversas doenças.

A escassa literatura científica sobre os procedimentos analíticos a seguir nas situações de intoxicação por muitas das substâncias voláteis, bem como a particularidade da sua fácil evaporação, associada aos fenómenos de redistribuição *post mortem*, originam frequentemente dificuldades interpretativas no estudo destes casos.

2.1.1 Acetaldeído

O acetaldeído ou etanal possui a fórmula química C_2H_4O . É um líquido incolor e volátil utilizado no fabrico de vários produtos sintéticos, incluindo certos plásticos, corantes e resinas.

Os seres humanos estão, frequentemente, expostos ao acetaldeído, quer pela simples presença deste no ar quer como contaminante de alimentos e bebidas alcoólicas (Helena Pontes et al., 2009). O acetaldeído é o principal metabolito do etanol, apresentando no entanto uma toxicidade superior (Moffat et al., 2004). Os níveis endógenos de acetaldeído no sangue não apresentam, regra geral, valores superiores a 0,2 mg/L. Após a ingestão, por parte de voluntários, de doses elevadas de etanol, verificou-se a produção de concentrações sanguíneas de acetaldeído na ordem dos 0,9-1,3 mg/L, enquanto para alcoólicos crónicos estes níveis variaram entre 1,7-2,5 mg/L (Korsten et al., 1975). Em 2002 (Zuba et al., 2002) foi demonstrada a presença de níveis mensuráveis de acetaldeído, metanol, acetona e isopropranol em amostras de sangue de alcoólicos crónicos. De acordo com alguns autores (TIAFT, 2012) são consideradas tóxicas as concentrações de acetaldeído superiores a 100 mg/L.

Para além de ser um metabolito de várias substâncias o acetaldeído sofre um metabolismo adicional de oxidação em ácido acético e, eventualmente, em dióxido de carbono e água.

O interesse forense na determinação de acetaldeído assenta, para além do facto de ser metabolito do etanol, na sua utilização como marcador de putrefação das amostras (Feltraco et al., 2009).

Ao longo dos anos têm sido apresentadas diversas técnicas para a determinação do acetaldeído, tais como a espectrofotometria de ultravioleta, a cromatografia gasosa por injeção direta de *headspace* ou ainda a cromatografia líquida após derivatização, em matrizes como o sangue e a urina (Baselt, 2004). Mais recentemente foi demonstrada a utilização de técnicas de micro-extração em fase sólida para a análise desta substância (MEFS) (Feltraco et al., 2009).

2.1.2 Acetato de etilo

O acetato de etilo, um éster simples de etanol e ácido acético, é um composto orgânico de fórmula $\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_3$. À temperatura ambiente apresenta-se como um líquido incolor com um odor característico doce. No passado foi usado em medicina como um antiespasmódico. Atualmente é utilizado como solvente para vernizes, revestimentos, plásticos, lacas e produtos farmacêuticos.

A exposição ao acetato de etilo provoca irritação nos olhos, membranas das mucosas, gengivas e trato respiratório. Os sintomas de irritação podem também surgir ao nível da pele. Outros sintomas associados a intoxicações por acetato de etilo incluem distúrbios gastrointestinais, náuseas, cefaleias e vômitos. A exposição crônica por inalação pode causar danos nos pulmões e coração, assim como alterações renais ou hepáticas. A exposição a concentrações elevadas pode causar sonolência, perda de consciência, narcose e depressão do sistema nervoso central.

Encontram-se descritos alguns casos associados a intoxicações letais por acetato de etilo. Um deles remonta a 1931, quando um operário foi encontrado morto no interior de um tanque que possuía uma tinta contendo acetato de etilo entre outros constituintes. A morte terá resultado de narcose ou anoxia. Um outro caso refere-se

à morte de um indivíduo de 39 anos de idade, que foi encontrado no interior de um tanque contendo acetato de etilo (Coopman et al., 2004).

Sob o ponto de vista forense, importa considerar que o acetato de etilo é um constituinte comum de diluentes, podendo ser encontrado conjuntamente com outras substâncias, como será o caso do tolueno. O acetato de etilo apresenta propriedades anestésicas e excitatórias, razão pela qual se tornou um problema social relacionado com o abuso por inalação intencional em jovens adolescentes.

Os intervalos de referência para a concentração de acetato de etilo no sangue, considerando situações de exposição normal e tóxica, não se encontram ainda estabelecidos, de acordo com a bibliografia consultada.

As metodologias analíticas referenciadas na literatura para a determinação de acetato de etilo incluem a cromatografia gasosa acoplada a diferentes detetores (e.g. FID, MS) (Moffat et al., 2004; Coopman et al., 2004).

2.1.3 Acetona

A acetona ou 2-propanona, com a fórmula química CH_3COCH_3 , é um composto orgânico que se apresenta como um líquido incolor de odor característico e que se evapora facilmente à temperatura ambiente, sendo frequentemente utilizada como solvente e reagente intermediário na produção química. Além disso, também é produzida endogenamente no homem ou encontrada como um metabolito do isopropanol (Baselt, 2004).

Relativamente a outros compostos voláteis, a acetona (endógena) é o que pode ser encontrado em concentrações mais elevadas nos seres humanos, sendo a sua presença considerada como normal para valores até 10 mg/L (Baselt, 2004). A sua

concentração é habitualmente mais elevada no sangue e urina de pessoas diabéticas estando, no sangue de diabéticos controlados, usualmente presente em concentrações até 30 mg/L (Jones et al., 1993; Baselt, 2004; TIAFT, 2012). Nas situações de cetoacidose diabética, ou até mesmo em jejum prolongado, as concentrações sanguíneas de acetona podem variar entre 100 e 700 mg/L (Baselt, 2004; TIAFT, 2012). A presença de acetona como consequência de cetoacidose diabética pode originar um quadro clínico semelhante ao da intoxicação alcoólica, sendo a sua determinação importante para o diagnóstico diferencial (Feltraco et al., 2009).

Pelo facto de a acetona ser um componente de um elevado número de produtos de limpeza (e.g. remoção de verniz de unhas) a sua ingestão constitui um elevado risco para a saúde das crianças (Gamis et al., 1988). No entanto, a acetona é considerada como uma substância pouco tóxica, quando ingerida. Zetting refere o caso de um homem que conseguiu sobreviver, após beber 800 mL de acetona e ter apresentado no soro e urina concentrações de 2000 e 2300 mg/L, respetivamente (Zetting et al., 1997). Em situações de intoxicação leve os sintomas são caracterizados por sonolência e discurso incoerente. Nos casos mais graves pode chegar a ocorrer coma profundo (Ramu et al., 1978).

A acetona é referenciada como podendo ser utilizada de forma abusiva (*glue-sniffing*), essencialmente devido à sua fácil obtenção. Esta utilização pode provocar efeitos tóxicos graves, que têm sido associados a concentrações sanguíneas num intervalo de 200 a 300 mg/L (Moffat et al., 2004; TIAFT, 2012). Foi descrito um caso letal que apresentava uma concentração sanguínea de 550 mg/L (Moffat et al., 2004).

A acetona é metabolizada, por oxidação, em acetato e formiato. Quando presente no sangue em doses mais elevadas a excreção é feita em grande parte através da respiração e, em menor grau, pela urina (Baselt, 2004; Moffat et al., 2004).

Widmark descreveu um método de titulação suficientemente sensível para a medição de acetona em fluidos biológicos (Widmark, 1919). Desde aí têm sido publicados trabalhos com referência à utilização de diferentes métodos analíticos, com maior incidência nos que fazem uso de técnicas cromatográficas.

2.1.4 Acetonitrilo

O acetonitrilo é um composto químico com a fórmula molecular CH_3CN , sendo um líquido incolor no seu estado natural. É utilizado como solvente em análise laboratorial e como intermediário em reações de síntese química. Para além da sua utilização laboratorial ou industrial o acetonitrilo pode ser encontrado como um ingrediente de produtos de utilização geral (e.g. produtos para remoção de colas).

Uma parte muito significativa da toxicidade exibida pelo acetonitrilo resulta da sua bioconversão em cianeto, podendo decorrer várias horas até ao surgimento dos sintomas, devido ao facto da metabolização em cianeto ser relativamente lenta.

Swanson publicou um artigo em que descreveu um caso letal e um levantamento bibliográfico com referência a 11 casos relacionados com situações de intoxicação motivadas por esta substância, cinco deles fatais (Swanson et al., 1994). Um dos casos referidos foi o de uma criança de 16 meses de idade que ingeriu entre 15-30 mL de acetonitrilo presente num removedor de unhas artificiais. Embora o centro de apoio ao tratamento de intoxicações tenha sido contactado o produto foi assumido como sendo essencialmente constituído por acetona e, por isso, dotado de

relativamente pouca toxicidade. Por esse motivo a criança foi colocada a dormir sem qualquer tratamento adicional, acabando por falecer passadas algumas horas. A concentração média de acetonitrilo determinada nas amostras de sangue colhidas em vítimas de intoxicação fatal, por ingestão acidental ou por inalação prolongada de vapor, foi de 573 mg/L (num intervalo de 160-800 mg/L) e de 6,2 mg/L (num intervalo de 2,4-15 mg/L) para o cianeto (Baselt, 2004).

O acetonitrilo, como já anteriormente referido, sofre biotransformação em cianeto sendo posteriormente metabolizado em tiocianato. Estima-se que pelo menos 12% de uma dose inalada de acetonitrilo é metabolizada desta maneira, sendo uma porção substancial eliminada na forma inalterada pela respiração (Swanson et al., 1994; Baselt, 2004).

A análise do acetonitrilo pode ser realizada em amostras biológicas por cromatografia gasosa com detetores de ionização de chama ou de espectrometria de massa. Alguma dificuldade analítica prende-se com a circunstância de alguns métodos de cromatografia gasosa não serem capazes de distinguir o acetonitrilo do etanol. Em dois casos fatais provocados por ingestão de acetonitrilo, relatados por Jones (Jones et al., 1992), o agente da intoxicação foi inicialmente identificado erroneamente como etanol, devido ao facto de os tempos de retenção destas duas substâncias serem muito semelhantes e apesar de as respetivas análises terem sido efetuadas com recurso a duas colunas analíticas de polaridade distinta.

2.1.5 1-Butanol

O butanol (1-butanol, n-butanol), ou álcool butílico, é um álcool primário com a fórmula molecular C_4H_9OH . O butanol é largamente utilizado como um solvente

industrial e também como intermediário químico em reações de síntese industrial. Alguns relatórios médicos da década de 1950 referem que esta substância chegou a ser utilizada em vítimas de cancro e pacientes cirúrgicos, através de injeções intramusculares, para o alívio da dor (Baselt, 2004).

Este álcool pode ser absorvido através da pele, pulmões e trato gastrointestinal. Estudos efetuados em animais de laboratório revelaram que o n-butanol é metabolizado de forma extensa no prazo de 24 horas. Após uma dose oral única cerca de 83% foi convertido em dióxido de carbono, 4% foi excretado na urina e cerca de 12% da dose permaneceu no organismo (Baselt, 2004).

À semelhança de outros álcoois o butanol é considerado tóxico e mais potente do que o etanol ou o isopropanol em termos de efeitos depressores do sistema nervoso. A exposição a concentrações de 50-200 ppm de n-butanol no ar pode causar irritação nos olhos, nariz e garganta, visão turva, dor de cabeça e tonturas (Baselt, 2004).

Kintz e colaboradores (Kintz et al., 1997) descreveram o caso de uma mulher encontrada morta em casa, suspeitando-se ter ocorrido a ingestão de n-butanol com intenção suicida. A respetiva análise ao sangue revelou a presença de 1530 mg/L de n-butanol.

A determinação desta substância em amostras biológicas é habitualmente feita com recurso a técnicas de cromatografia em fase gasosa.

2.1.6 Clorofórmio

O triclorometano, vulgarmente conhecido por clorofórmio e com a fórmula química CHCl_3 , é um líquido incolor e volátil tendo sido sintetizado pela primeira vez em 1831. No passado foi largamente utilizado como anestésico por inalação embora atualmente seja considerada obsoleta a sua utilização com esta finalidade. O clorofórmio também fazia parte de muitas preparações farmacêuticas mas depois de vários estudos realizados em animais de laboratório terem demonstrado o seu potencial carcinogénico a sua utilização em seres humanos ou animais foi proibida nos Estados Unidos (Baselt, 2004; Gaillard et al., 2006). Atualmente a sua principal utilização é como solvente podendo ainda ser encontrado na indústria como intermediário químico.

No homem o clorofórmio sofre uma considerável biotransformação originando a formação de dióxido de carbono e ácido clorídrico. Fry (Fry et al., 1972) refere que uma média de 43% (intervalo de 18-67%) de uma dose única é eliminada na sua forma inalterada através do ar expirado, com menos de 0,01% da dose a ser encontrada na urina após 8 horas. Esta substância é extremamente lipossolúvel e tende, por isso, a acumular-se no tecido adiposo (Vogt et al., 1980).

O principal efeito do clorofórmio é a depressão do sistema nervoso central, podendo uma exposição aguda a este composto resultar em morte devido a insuficiência respiratória. Este efeito marcadamente depressor do sistema nervoso central motivou a sua utilização com fins suicidas ou para facilitar a concretização de assaltos e homicídios (Kim et al., 1996; Risse et al., 2001; Gaillard et al., 2006; Flanagan et al., 2010). Podem ser encontrados na literatura médica, pelo menos desde 1848, relatos que referem justamente a ingestão, inalação ou injeção intencional de clorofórmio com o objetivo de induzir alterações no humor ou provocar o suicídio. Os relatos da utilização de clorofórmio com fins homicidas são

menos comuns, existindo, no entanto, referências frequentes da sua utilização para neutralizar vítimas de assalto (Nashelsky et al., 1995). Gaillard descreve um caso de um crime sexual facilitado por drogas (DFSA), que levou à morte da jovem vítima de estupro e depois ao suicídio do estuprador por envenenamento com clorofórmio (Gaillard et al., 2006).

Alguns autores referem a presença no sangue de concentrações de clorofórmio até aos 50 mg/L, encontradas em consequência de utilizações terapêuticas ou após situações de intoxicação (DiMaio et al., 2001; Molina, 2010; TIAFT, 2012). As concentrações referidas na bibliografia como potencialmente letais são bastante variadas, referindo a TIAFT, por exemplo, um valor de 390 mg/L.

Em 1951 o clorofórmio foi identificado por Morris em amostras biológicas com recurso a uma técnica colorimétrica adaptada a partir da reação de Fujiwara (Morris et al., 1951). Atualmente são utilizadas diversas técnicas de cromatografia gasosa para detetar e quantificar o clorofórmio (Kim et al., 1996; Risse et al., 2001; Gaillard et al., 2006; Flanagan et al., 2010).

2.1.7 Éter

O éter (éter dietílico, éter etílico) é um líquido volátil, altamente inflamável e de odor característico, com a fórmula molecular $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_3$. Foi introduzido como agente anestésico em 1842 por Crawford Williamson Long, a fim de permitir que as cirurgias pudessem ser realizadas de forma indolor, após o que esta sua aplicação se alargou a muitos países. Contudo, devido à sua elevada solubilidade nos fluidos corporais e tecidos, provocava uma indução de anestesia lenta e um tempo de recuperação longo (Ward et al., 1997; Baselt, 2004; Cox et al., 2006;

Monticelli et al., 2011). Atualmente o éter dietílico é utilizado sobretudo como solvente industrial, sendo também encontrado como componente de muitos produtos comerciais.

A inalação de éter dietílico pode causar irritação do nariz e da garganta e uma exposição a concentrações elevadas pode mesmo provocar depressão do sistema nervoso central, surgindo náuseas, respiração irregular e diminuição da temperatura corporal e da frequência cardíaca. Concentrações sanguíneas compreendidas entre 100 e 500 mg/L podem produzir analgesia mas não são suficientes para provocar um estado de inconsciência (Foulconer, 1952). A anestesia para fins cirúrgicos, atrás referida, ocorre para concentrações de éter no sangue na ordem dos 500-1500 mg/L. Cerca de 90% de uma dose de éter é eliminada na sua forma inalterada através dos pulmões e uma pequena quantidade através da urina. Embora em menor grau, também ocorre a sua biotransformação em acetaldeído (Moffat et al., 2004; Baselt, 2004; Cox et al., 2006).

Na literatura científica podem ser encontrados alguns relatos de fatalidades relacionadas com a utilização de éter. Campbell refere quatro casos fatais relacionados com a utilização de éter para induzir a anestesia, tendo sido encontradas concentrações sanguíneas entre 190-3750 mg/L (Campbell, 1960). Um outro trabalho relatou três casos em que o éter foi utilizado com o propósito de incapacitar vítimas de homicídio por estrangulamento e afogamento (Ward et al., 1997). Em dois destes últimos casos as concentrações de éter foram estimadas em 90 e 1700 mg/L, respetivamente. Mais recentemente, Monticelli descreveu um caso de morte por asfixia com recurso a um saco plástico e utilização simultânea de éter (Monticelli, 2011).

A cromatografia em fase gasosa, com recurso a detetores FID ou MS, constitui a técnica mais frequentemente utilizada na análise de éter em amostras biológicas. Em alguns casos, o éter pode coeluir com a acetona dificultando a sua identificação (Baselt, 2004).

2.1.8 Metanol

O metanol, também conhecido como álcool metílico, é um composto químico com a fórmula molecular CH_3OH . É largamente utilizado como solvente e anticongelante em diversos tipos de indústrias mas também se encontra presente em bebidas alcoólicas como um produto secundário da fermentação (Baselt, 2004). Depois de ingerido ou inspirado o metanol é rapidamente absorvido para a corrente sanguínea e metabolizado em formaldeído e em ácido fórmico pelas enzimas álcool desidrogenase e aldeído desidrogenase, respetivamente. Numa segunda fase, estas substâncias são biotransformadas em água e dióxido de carbono (Klaassen et al., 1996).

Os efeitos iniciais do metanol são muito mais suaves do que os efeitos tóxicos do etanol e geralmente só são visíveis depois de um período de latência de 8 a 36 h. (Moffat et al., 2004). A maior parte da toxicidade resultante do consumo de metanol provém da ação dos seus metabolitos, nomeadamente do ácido fórmico, o qual provoca alguns dos sintomas característicos da intoxicação por metanol: dor abdominal aguda, distúrbios visuais que resultam muitas vezes em cegueira permanente, acidose metabólica e coma prolongado que pode culminar na morte por insuficiência respiratória (Baselt, 2004).

A concentração mínima de metanol no sangue considerada letal está descrita como sendo próxima de 400 mg/L para indivíduos que não tenham recebido tratamento médico (DiMaio et al., 2001; Baselt, 2004). No entanto, Bennet relatou que onze pacientes com concentrações sanguíneas entre 0-3900 mg/L (média de 1300 mg/L) conseguiram sobreviver e que sete pessoas morreram durante o tratamento, apresentando concentrações entre 0-4000 mg/L (média de 1600 mg/L) (Bennet et al., 1953). Harger em 1938 e Wu em 1985 referiram ainda que as concentrações do metanol encontradas no organismo humano são em muito similares às encontradas para o etanol (Harger et al., 1938; Wu Chen et al., 1985).

Ao longo dos anos têm sido publicados diversos trabalhos que descrevem diferentes metodologias para a determinação do metanol e, à semelhança do etanol, incluem as técnicas enzimáticas e a cromatografia gasosa.

2.1.9 2-Propanol

Álcool isopropílico e isopropanol são outras designações habituais para o 2-propanol. O isopropanol é um álcool secundário, de fórmula química $\text{CH}_3\text{CHOHCH}_3$, caracterizado por ser incolor e ter um forte odor à temperatura ambiente. É um produto químico amplamente utilizado em laboratório mas que também pode estar disponível comercialmente sob a forma de solução aquosa a 70%.

O isopropanol é rapidamente absorvido no trato gastrointestinal embora a absorção também possa ocorrer, de forma passiva, através da pele. A sua capacidade enquanto depressor do sistema nervoso central é superior à do etanol mas inferior à apresentada pelo metanol ou pelo etileno glicol (Baselt 2004, Silvillotti, 2004). A

toxicidade do isopropanol fica a dever-se à sua atividade e não, ao contrário de outros compostos (e.g. metanol), à ação de metabolitos. O isopropanol é em grande parte metabolizado pela álcool desidrogenase (ADH) em acetona, a qual é lentamente eliminada através dos pulmões e da urina. A acetona pode ainda ser metabolizada em dióxido de carbono e formiato de etilo (Moffat et al., 2004).

A detecção simultânea de acetona e isopropanol em amostras biológicas pode indiciar uma exposição a esta última substância (Davis et al., 1984; Jenkins et al., 2008). Vários autores têm também sugerido e demonstrado que a conversão de acetona em isopropanol explica a presença simultânea de ambas as substâncias em amostras biológicas *post mortem*, sobretudo no caso de diabéticos ou mortes originadas por hipotermia ou abuso de álcool (Baily, 1990; Jones et al., 2000; Collison, 2005; Molina, 2010). Molina, em 2010, após fazer um estudo sobre a caracterização das fontes de isopropanol e ter investigado exaustivamente as causas de morte, concluiu que poderiam ser aplicadas algumas regras para ajudar a explicar a presença de isopropanol. Assim, os casos de intoxicações por isopropanol tendem a ter concentrações elevadas (> 1000 mg/L) enquanto as situações de formação de isopropanol apresentarão concentrações mais baixas (< 1000 mg/L). Além disso, a avaliação integrada dos resultados também pode ajudar a esclarecer a origem do isopropanol: casos em que haja uma exposição ao isopropanol tendem a ter rácios isopropanol/acetona > 1 e casos de produção de isopropanol *ante mortem* tendem a ter rácios isopropanol/acetona < 1 .

No entanto, Alexander, num trabalho realizado em 1982, salientou que em 31 mortes atribuídas exclusivamente ao envenenamento por álcool isopropílico as concentrações sanguíneas *post mortem* variaram entre 100 e 2500 mg/L, para o álcool isopropílico, e entre 400 e 3000 mg/L para a acetona. Na literatura são

descritos vários episódios de intoxicação que acabaram por não ser fatais principalmente devido ao sucesso do tratamento com recurso à hemodiálise (Alexander et al., 1982).

O isopropanol e o seu metabolito são habitualmente determinados com recurso a métodos de cromatografia gasosa.

2.1.10 Tolueno

O tolueno, ou metil benzeno, é um hidrocarboneto aromático amplamente utilizado como solvente industrial e como reagente intermédio na produção de muitos produtos químicos tais como combustíveis, diluentes, tintas e colas. É um líquido incolor e volátil com odor doce característico quando à temperatura ambiente. A sua fórmula química é $C_6H_5CH_3$.

Foram realizados diversos estudos para avaliar o tipo e grau de absorção do tolueno após a sua inalação ou ingestão. Após atingir a corrente sanguínea este hidrocarboneto é distribuído por todo o organismo, apresentando uma elevada afinidade para o tecido adiposo e para outros órgãos ricos em lípidos como o cérebro, fígado e pulmões, a partir dos quais é lentamente libertado. Cerca de 80% de uma dose inalada é oxidada em ácido benzoico, o qual é conjugado com a glicina dando origem ao ácido hipúrico. Estes produtos são excretados através da urina. Cerca de 20% de uma dose é excretada na forma inalterada através do ar expirado e menos de 0,1% através da urina (Moffat et al., 2004; Baselt, 2004; Argo et al., 2010).

O tolueno é um depressor do sistema nervoso central e tem efeitos semelhantes aos provocados por uma intoxicação alcoólica. À excitação inicial segue-se um estado

caracterizado por cefaleias, tonturas, visão turva, arritmias e depressão respiratória podendo evoluir para convulsões, coma e morte em casos de intoxicação aguda (Hobara et al., 2000; Martinez et al., 2006; Argo et al., 2010). Lush refere, num estudo realizado a 53 jovens abusadores de tolueno, que indivíduos com concentrações sanguíneas de tolueno inferiores a 1,0 mg/L deram provas da utilização desta substância apenas pelo odor químico libertado através da sua respiração; os que apresentavam concentrações compreendidas entre 1,0-2,5 mg/L já apresentavam alguns sinais de intoxicação e metade dos indivíduos com níveis situados entre 2,5-10 mg/L foram hospitalizados devido à presença de sintomas típicos de uma intoxicação grave, como alucinações; por fim, os que apresentaram concentrações superiores a 10 mg/L ficaram inconscientes ou acabaram por falecer (Lush et al., 1979). O tolueno é frequentemente utilizado com fins abusivos pelos adolescentes ou até mesmo por adultos devido aos seus efeitos intoxicantes, através da inalação dos vapores de tintas e colas.

Esta substância também foi associada a casos de crimes sexuais facilitados por drogas (DFSA). Encontra-se descrito o caso de uma jovem de 13 anos, encontrada pelas autoridades num estado de confusão mental e após ter sido sequestrada por dois indivíduos que lhe colocaram sobre o rosto um pano embebido em solvente. Ela referiu ter passado algumas horas numa sala, onde perdeu a consciência, vindo a acordar seminua na rua e com perda de memória. A análise toxicológica ao sangue revelou a presença de 7,6 mg/L de benzeno, 24,8 mg/L de tolueno e 0,6 mg/L de xileno (Martinez et al., 2006). O marcante efeito depressor do sistema nervoso central, associado a uma fácil aquisição, torna este tipo de substâncias potencialmente atraentes para serem utilizadas como agentes facilitadores de agressões sexuais ou outras.

No que diz respeito à análise do tolueno em matrizes *post mortem* têm sido propostos vários métodos, em particular os que fazem uso da cromatografia gasosa acoplada a diferentes detetores (e.g. FID, MS).

2.1.11 Xileno

O xileno (dimetilbenzeno) é um hidrocarboneto aromático com múltiplas aplicações comerciais e industriais, nomeadamente na produção de solventes. Este composto pode ser encontrado em tintas, diluentes, colas, lacas, agentes de limpeza, pesticidas, combustíveis e outros produtos suscetíveis de serem utilizados para fins domésticos.

O xileno, ou xilol como é vulgarmente conhecido, é constituído por três isómeros de dimetilbenzeno, possuindo a fórmula $C_6H_4(CH_3)_2$. Os isómeros são distinguidos pelas designações orto- (o-), meta- (m-) e para- (p-), que indicam respetivamente a que carbonos do anel benzeno se encontram ligados os grupos metilo. Tal como os isómeros individuais, a mistura resultante é incolor e possui um cheiro adocicado. Trata-se de um produto altamente inflamável.

O xilol pode ser absorvido através do aparelho gastrointestinal, pele e pulmões. Os três isómeros são metabolizados numa primeira fase através da oxidação de um grupo metilo, transformando-se assim no correspondente ácido o-, m- e p-toluico. Após conjugação com a glicina surge o ácido o-, m- e p- metil-hipúrico. Em média, cerca de 70% de uma dose absorvida é excretada na urina num intervalo de 18 horas sob a forma destes metabolitos. A hidroxilação dos xilenos nos correspondentes xilenóis resulta na respetiva excreção, sob a forma de conjugados, através da urina. Apenas cerca de 5% de uma dose é excretada na forma inalterada

através da respiração e menos de 0,01% na urina (Moffat et al., 2004; Baselt, 2004; Argo et al., 2010).

Os indivíduos expostos a baixas concentrações de xilol podem apresentar irritações da pele e membranas mucosas. Após uma exposição prolongada poderão surgir distúrbios gastrointestinais consideráveis, náuseas e vômitos. Alguns estudos realizados em seres humanos e animais mostram que o sistema nervoso central constitui um dos alvos principais dos xilenos, constatando-se também que os diferentes isômeros provocam efeitos nocivos equivalentes (Ragheb et al., 1986; Baselt, 2004; Martinez et al., 2009; Argo et al., 2010). A ingestão de uma dose de 15 mL pode ser suficiente para provocar a morte de um indivíduo. Em 3 casos fatais devido à ingestão de gasolina ou outros produtos contendo xileno as concentrações sanguíneas de xileno variaram entre 3-40 mg/L. Num outro caso de um adulto que ingeriu intencionalmente uma grande quantidade de xileno a análise revelou uma concentração sanguínea *post mortem* de 110 mg/L (Ragheb et al., 1986).

Para além dos diversos casos publicados sobre a associação desta substância a suicídios (Ragheb et al., 1986; Sevcik et al., 1992; Wiśiewski et al., 2007; Martínez et al., 2009; Argo et al., 2010) também se constata interesse forense na pesquisa desta substância devido à sua potencial utilização em crimes de natureza sexual (DFSA) (Martínez et al., 2006).

Têm sido publicados diversos trabalhos que descrevem diferentes metodologias para a determinação do xileno, sendo na sua maioria coincidentes com as descritas para os hidrocarbonetos aromáticos (e.g. tolueno), alternando entre técnicas de cromatografia gasosa e líquida com diferentes métodos de extração.

2.2 Cromatografia gasosa com detetor de ionização de chama e sistema de injeção de *headspace* (HS-GC/FID)

2.2.1 Cromatografia gasosa (GC)

A cromatografia gasosa (GC) é uma das técnicas analíticas com maior aplicabilidade no campo da toxicologia, uma vez que permite a separação de um elevado número de substâncias com interesse nesta área. De facto, qualquer composto cuja volatilidade permita que as suas moléculas fiquem na fase de vapor, sem se decomporem, até temperaturas de 400 °C, muito provavelmente pode ser analisado por GC (Dawling, 2008).

A separação cromatográfica das substâncias ocorre numa coluna, designada por coluna capilar devido ao seu reduzido diâmetro interno (e.g. 0,32 mm), colocada no interior de um forno de temperatura controlada. O método consiste na introdução da amostra vaporizada num fluxo de um gás adequado e habitualmente inerte (e.g. hélio), denominado de fase móvel ou gás de arraste. Este fluxo de gás contendo a amostra vaporizada atravessa a coluna cromatográfica permitindo a ocorrência de interações entre os analitos presentes na fase móvel e a fase estacionária, conseguindo-se, desta forma, a separação cromatográfica entre os compostos. Se a fase estacionária é constituída por um componente sólido o processo designa-se por cromatografia gás-sólido. A velocidade a que os compostos se deslocam através da coluna varia consoante a afinidade destes para com a fase estacionária. Os componentes que têm a maior interação com a fase estacionária são retidos por mais tempo e, portanto, atingem mais tarde o respetivo detetor. Por outro lado, quanto mais volátil for o analito mais se difunde na fase móvel e mais rapidamente eluirá da coluna. Embora este critério seja aplicável a compostos com grupos

funcionais similares, não pode ser considerado um princípio universal. Os compostos sofrem um processo dinâmico de adsorção-desorção com a fase estacionária, enquanto a fase gasosa apenas serve para conduzir as moléculas de soluto que não estejam adsorvidas até ao detetor (Dawling, 2008).

À medida que as substâncias eluem da coluna a sua presença pode ser registada em função de sinais gerados por um detetor sob a forma de um cromatograma, o qual consiste na representação dos sinais analíticos obtidos ao longo do tempo. Toda esta informação pode então ser processada com recurso a *hardware* e *software* específicos para o efeito.

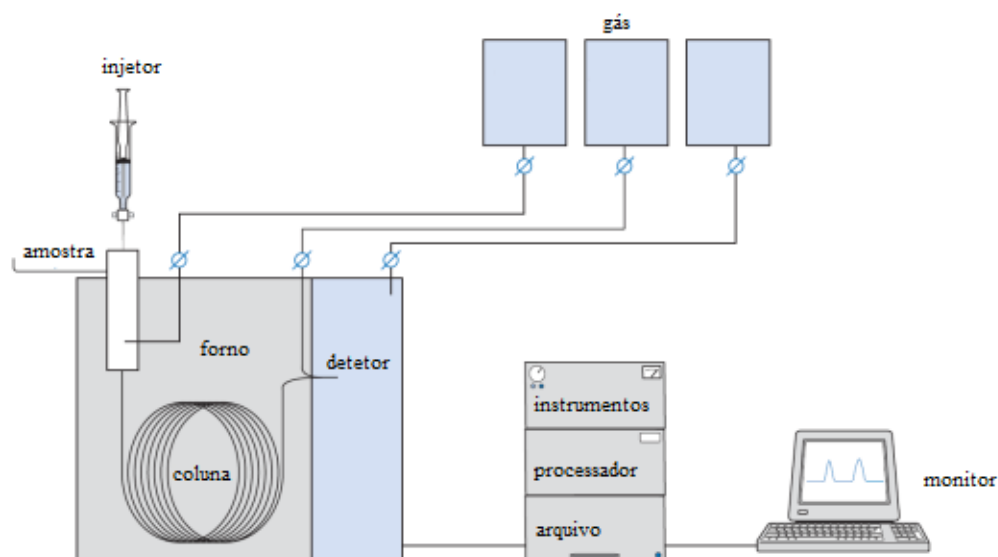


Figura 1- Esquema do sistema de cromatografia gasosa (adaptado de Moffat et al., 2004).

2.2.2 Detetor de ionização de chama (FID)

O detetor de ionização de chama (FID) é um dos mais utilizados em cromatografia gasosa, devido ao facto de responder praticamente a todos os compostos orgânicos com elevada sensibilidade. De um modo geral não responde às impurezas mais

comuns presentes no gás de arraste nem a alterações moderadas das condições analíticas (e.g. fluxo, pressão, temperatura).

O detetor é formado, no essencial, por uma chama gerada por ignição de uma mistura gasosa constituída por hidrogénio e ar. O efluente da coluna do GC interage com esta chama formando-se iões ou seja, espécies químicas carregadas eletricamente. Estas espécies químicas são coletadas por um eléctrodo, resultando daí um acréscimo de corrente eléctrica directamente proporcional à quantidade de matéria orgânica que tenha estado em contacto com a chama. Pode afirmar-se, desta forma, que o princípio do funcionamento do detetor se baseia na geração de um sinal eléctrico a partir da combustão da amostra. Uma das limitações deste detetor é a destruição da amostra que não pode assim ser recuperada para outros fins.

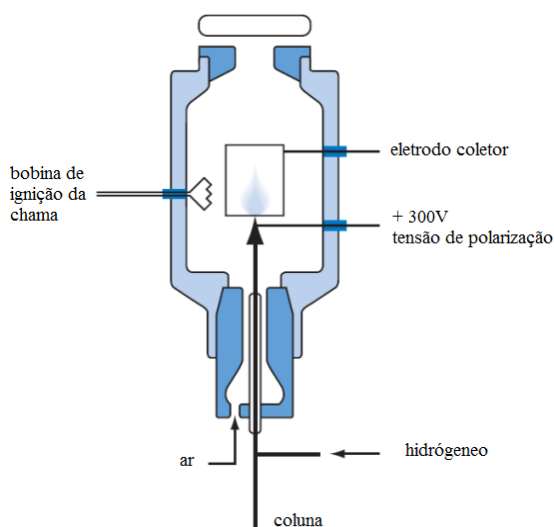


Figura 2- Esquema do detetor FID (adaptado de Moffat et al., 2004).

2.2.3 Sistema de headspace (HS)

A análise de *headspace* é, para muitos investigadores, a técnica preferida para a determinação de substâncias voláteis, por oferecer a vantagem de proteger a coluna cromatográfica da presença dos constituintes não voláteis da amostra. Esta

característica oferece, por isso, algumas vantagens, entre as quais uma redução nas atividades de manutenção preventivas (e.g. manutenção do injetor) e uma significativamente maior vida útil da coluna analítica. Também o facto de a determinação dos compostos ser feita de forma direta, sem a necessidade de procedimentos adicionais de purificação, conduz a um aumento da produtividade.

A técnica de injeção de *headspace* consiste na transferência de uma porção da fase gasosa, libertada a partir da amostra, para o cromatógrafo. A amostra de *headspace* é obtida mantendo a amostra que se pretende analisar (e.g. sangue) fechada num recipiente de dimensão adequada até que seja atingido um equilíbrio térmico e gasoso. A temperatura de incubação pode variar consoante as características da amostra e dos compostos que se pretendem analisar.

A utilização desta técnica para a realização de análises quantitativas torna necessários alguns cuidados adicionais, no sentido de se eliminar ou atenuar potenciais efeitos provocados pela matriz. Assim, e como medida preventiva, poder-se-á diluir a amostra (e.g. 1:10) utilizando a própria solução que contém o padrão interno (Kugelberg et al., 1997).

2.3 Matrizes biológicas

Existe atualmente uma grande variedade de amostras biológicas que podem ser utilizadas para efeitos de realização de análises toxicológicas. Conforme se trate de uma colheita realizada *in vivo* ou *post mortem* podemos nos deparar com diferentes tipos ou mesmo quantidades de amostras biológicas. Na maioria dos casos *post mortem* pode ser colhida uma multiplicidade de amostras para análise toxicológica, sendo contudo muito importante conhecer quais as mais apropriadas para o tipo de

pesquisa pretendida bem como efetuar uma adequada interpretação dos resultados obtidos. No entanto, nem sempre é possível a colheita de todos os tipos de amostra. Por exemplo, em situações em que os fenómenos de decomposição já estão instalados e não é possível recolher o sangue, poderá ser viável a recolha de humor vítreo ou de cabelo. Nos casos de vítimas de traumatismos muito violentos (e.g. acidentes aeronáuticos, explosões) o toxicologista pode ser confrontado com a necessidade de analisar amostras ainda mais complexas como músculo ou osso (Jones et al., 2004; Molina et al., 2010).

Habitualmente, a colheita, o acondicionamento e o transporte das amostras até ao laboratório não é da responsabilidade deste. Contudo, o laboratório deve fornecer informação detalhada acerca do tipo e da quantidade de amostra necessária, tendo em consideração o tipo de análise pretendida, bem como a maneira de identificar corretamente uma amostra (Society of Forensic Toxicology/American Academy of Forensic Sciences, 2002). A este propósito, o STF tem recomendações específicas quanto às normas de colheita e acondicionamento de amostras em toxicologia forense (NP-INML-009), devendo o perito médico-legal assegurar que a colheita é feita de modo adequado, de acordo com a análise pretendida, nunca esquecendo que o envio para análise de amostras inadequadamente colhidas ou mal acondicionadas pode colocar em causa o valor médico-legal de um resultado analítico.

Seguidamente descrevem-se as principais características das amostras utilizadas neste trabalho.

Sangue

O sangue, desde que disponível, constitui a amostra de eleição para ser utilizada na realização de análises toxicológicas forenses. Em situações de colheita *in vivo*, os

níveis detetados de uma determinada substância estão diretamente correlacionados com a sua concentração sanguínea nesse local. Contudo, quando estamos perante um caso de colheita *post mortem*, os problemas poderão ser mais complexos, pois pode haver uma variação de concentração relacionada com os fenómenos de redistribuição *post mortem*. Devem assim ser tomadas precauções adicionais na interpretação de resultados quando uma amostra de sangue, colhida *post mortem*, vem identificada apenas como sangue e não a acompanha qualquer informação sobre o local anatómico da colheita. Outro fator de risco é o da contaminação da amostra de sangue por outros líquidos biológicos (e.g. conteúdo gástrico). Nestes casos, a análise de uma amostra de sangue periférico pode ser crucial para avaliar o impacto que a substância teve na vítima. Recomenda-se, assim, e sempre que possível, a obtenção de pelo menos duas amostras de sangue colhidas em locais distintos (NP-INML-009). Infelizmente, em casos de trauma grave ou decomposição, esta prática pode não ser possível.

Urina

A urina é uma matriz importante tendo em consideração alguns tipos de métodos analíticos habitualmente utilizados. O facto de conter na sua composição cerca de 99% de água torna-a particularmente adequada para a análise com recurso a métodos imuno-enzimáticos e também, naturalmente, cromatográficos (Jones et al., 2008). A urina, quando presente, é uma amostra de fácil colheita durante a autópsia, pelo que pode ser útil para fornecer informação qualitativa sobre a exposição a uma determinada substância. A acumulação de substâncias tóxicas e respetivos metabolitos nesta matriz facilita também a respetiva deteção. No entanto, as concentrações encontradas para as diversas substâncias na urina não refletem necessariamente as concentrações sanguíneas correspondentes. De facto, uma

concentração encontrada na urina pode refletir o uso de determinada substância durante muitas horas e, por vezes, até dias, antes da sua morte. Desta forma, a urina pode ser usada como uma segunda amostra para a confirmação da presença de determinada substância ou, o que acontece com frequência, para orientar a pesquisa no sangue.

Humor vítreo

Pelo facto de o humor vítreo estar localizado no interior do globo ocular, fica menos sujeito a contaminações bacterianas ou fúngicas, quando comparado com o sangue. Mesmo na presença de concentrações elevadas de glucose a fermentação não ocorre devido às condições estéreis do meio, inclusive em fases mais avançadas de decomposição. O uso limitado de humor vítreo nas análises prende-se com o facto de o volume disponível ser reduzido e subsistir alguma dificuldade na interpretação dos resultados, nomeadamente a correlação com as respetivas concentrações sanguíneas.

2.4 Validação de métodos analíticos

2.4.1 Introdução

A necessidade de mostrar a qualidade e confiança de determinado método analítico é, cada vez mais, reconhecida e exigida por toda a comunidade científica. A fiabilidade dos resultados analíticos é uma questão de grande importância em toxicologia forense e clínica, uma vez que constitui um pré-requisito para a interpretação correta dos resultados toxicológicos. Resultados não fiáveis podem conduzir a decisões incorretas não apenas a nível clínico como, também, a nível

judicial. No sentido de garantir que um novo método analítico origina, a propósito de análises realizadas, informações interpretáveis e fiáveis, o mesmo deve ser submetido a um processo avaliativo usualmente designado por validação.

A validação é a confirmação, através de exame e apresentação de evidência objetiva, de que os requisitos específicos relativos a uma dada utilização são satisfeitos. O laboratório deve validar métodos não normalizados, métodos concebidos ou desenvolvidos pelo próprio laboratório, métodos normalizados utilizados fora do seu âmbito de utilização e extensões ou modificações de métodos normalizados, com o objetivo de confirmar que os métodos são adequados à utilização prevista (ISO/IEC 17025, 1999).

Nos últimos anos tem sido amplamente discutida a forma de harmonizar os parâmetros necessários a uma validação, assim como a definição de critérios de aceitação dos respetivos resultados. Embora exista algum consenso quanto ao tipo de estudos a realizar no decorrer de uma validação subsiste uma grande diversidade de opiniões quanto à forma de os abordar. A seletividade/especificidade, modelo de calibração, linearidade, estabilidade, precisão (repetibilidade, reprodutibilidade, precisão intermédia) e exatidão, limites de deteção e quantificação, eficiência de extração e gama de trabalho são, regra geral, parâmetros a avaliar.

2.4.2 Definição dos parâmetros de validação

2.4.2.1 Seletividade/especificidade

A seletividade pode ser definida como sendo a capacidade que um método analítico possui para diferenciar e determinar inequivocamente a substância de interesse, diferenciando-a de componentes da matriz, impurezas, produtos de degradação ou

metabolitos. Um método seletivo deve garantir que um determinado sinal analítico é gerado exclusivamente em resposta à presença na amostra do composto de interesse. Se a seletividade não estiver assegurada, parâmetros como a linearidade, a exatidão e a precisão ficam, naturalmente, comprometidos (Ribani et al., 2004).

Os termos seletividade e especificidade são utilizados, com alguma frequência, como conceitos sobreponíveis, o que pode gerar alguma confusão. Um método analítico capaz de gerar uma resposta em função da presença de uma única substância de interesse pode ser classificado como específico, enquanto um método capaz de produzir uma resposta analítica perante a presença de várias substâncias que partilhem características comuns (e.g. determinados grupos químicos) poderá ser qualificado como seletivo. Como existem poucos métodos capazes de identificar uma única substância o termo seletividade talvez seja o mais adequado. A seletividade deve ser um dos primeiros aspetos a estudar no processo de validação de um método. Deverá, no entanto, ser reavaliada continuamente, uma vez que eventos como a degradação das amostras podem gerar novos compostos não considerados inicialmente e capazes de originar problemas ao nível da identificação ou quantificação (e.g. coeluição com as substâncias alvo) (Ribani et al., 2004). Embora seja desejável a total ausência de interferentes na análise este objetivo é frequentemente difícil de atingir, sobretudo quando se pesquisam substâncias em amostras biológicas complexas, como o sangue. Na prática, será necessário considerar o facto de ter de se aceitar a presença de pequenos interferentes desde que tal não comprometa a identificação e/ou quantificação do composto alvo (Dadgar et al., 1995; Hartmann et al., 1998).

Existem, naturalmente, diferentes formas de abordar o estudo da seletividade. Uma delas consiste em evidenciar a ausência de sinais analíticos interferentes, analisando

um mínimo de 6 amostras brancas diferentes (ICH Q2 B, 1996, Causon, 1997). Uma alternativa assenta na análise de um número razoável (e.g. 10 a 20) de amostras brancas, fortificadas com a substância a estudar a uma determinada concentração. A obtenção de resultados concordantes permite evidenciar a inexistência de compostos significativamente interferentes.

2.4.2.2 Modelo de calibração

A seleção de um modelo de calibração devidamente ajustado ao desempenho de um método analítico é um passo essencial do processo de avaliação da respetiva aptidão para fornecer resultados quantitativos fiáveis. Assim, deve ser cuidadosamente analisada a relação existente entre a concentração do analito na amostra e a resposta do detetor, não se devendo, *a priori*, optar por um determinado modelo apenas porque é o mais usual (e.g. linear). Para tal, são fortificadas amostras com concentrações conhecidas da substância que se pretende quantificar (calibradores) e procede-se à respetiva análise instrumental de acordo com um procedimento analítico definido. Para cada um destes calibradores o equipamento irá gerar um sinal proporcional à concentração da substância. A partir destes dados será então possível elaborar uma representação gráfica, habitualmente designada por curva da calibração. Para tal, as respostas analíticas são representadas no eixo *y* e as correspondentes concentrações no eixo *x*. Por interpolação será então possível estimar a concentração da substância de interesse numa amostra desconhecida. Como referido atrás, a decisão quanto ao modelo de calibração (e.g. reta, curva) a utilizar, com o objetivo de relacionar respostas analíticas com concentrações do analito na amostra, requer uma avaliação cuidada, pois a respetiva decisão terá

repercussões não apenas na estimativa das concentrações mas também nos valores dos limites de quantificação e detecção do método analítico (Miller, 1991).

2.4.2.3 Linearidade

A linearidade de um método analítico, numa determinada gama de concentrações, consiste na sua capacidade para fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância a pesquisar (ICH Q2 B, 1996). A ICH recomenda um mínimo de cinco níveis de concentração para a verificação da linearidade, referindo também que a utilização de um número diferente deve ser justificada. Para além desta recomendação particular constata-se que a maioria das diretrizes estabelece um mínimo de cinco a oito níveis de concentração (EURACHEM, 1998; Lindner et al., 1998), considerando ainda alguns autores que se deve usar, pelo menos, dois a seis replicados por nível de concentração (Hartmann et al., 1998).

Os critérios de aceitação da respetiva calibração, independentemente de quais sejam, devem estar bem definidos. A linearidade é frequentemente testada utilizando o coeficiente de correlação, r (em que $-1 \leq r \leq +1$). Na hipotética situação em que $r = -1$, todos os pontos do gráfico iriam cair numa linha reta perfeita, de declive negativo; se $r = +1$, todos os pontos estariam exatamente numa linha de declive positivo; no oposto, $r = 0$ indicaria a ausência de correlação linear entre x e y . Contudo, verifica-se a ocorrência de situações em que, apesar de os pontos poderem desenhar uma ligeira curva, é possível obter para $|r|$ valores elevados e aproximados de 1 (ou -1). Constata-se desta forma que a magnitude de r , considerada de forma isolada, pode ser um fraco indicador da linearidade. Por esta razão, recomenda-se a representação gráfica e o estudo dos resíduos de y , uma

forma simples de avaliar se uma representação linear dos dados é de facto a mais adequada (Miller et al., 1991)

Apesar disso, alguns autores consideram que um coeficiente de correlação superior a 0,999 constitui uma evidência de ajuste ideal (Ribani et al., 2004).

Recomenda-se, igualmente, que a avaliação do valor de r seja acompanhada da verificação de que a interceção da reta na origem inclui o valor zero, para um grau de confiança de 95%.

2.4.2.4 Gama de trabalho

Considera-se que a gama de trabalho corresponde ao intervalo entre a concentração mais baixa da substância a analisar e a concentração mais alta (incluindo estas concentrações) para a qual seja possível documentar valores de precisão, exatidão e linearidade aceitáveis (ICH, Q2 R1, 2005).

Na quantificação de uma substância, qualquer tipo de extrapolação deve ser evitada, no entanto, em análises biológicas é aceitável quer diluir as amostras quer extrair do dobro do volume para permitir o cálculo de concentrações por interpolação, desde que fique demonstrado, nestes casos, a ausência de efeito de matriz (Hartmann et al., 1998; SOFT/AAFS, 2002). Caso não se justifique a quantificação exata de um analito presente em concentrações baixas, o resultado deve ser expresso como sendo inferior à concentração do calibrador mais baixo, em alternativa à expressão “concentração vestigial”.

Deve referir-se que a gama de trabalho não tem de coincidir obrigatoriamente com a gama de concentrações dos calibradores usados na elaboração da curva de calibração.

2.4.2.5 Precisão

A precisão do método analítico corresponde ao grau de concordância entre resultados de medidas independentes em torno de um valor central, efetuadas várias vezes numa amostra homogénea. A precisão traduz-se na medida do erro aleatório de determinado método, sendo expressa pelo desvio padrão relativo (RSD) ou pelo coeficiente de variação em percentagem (CV). Este parâmetro pode ser avaliado através de três níveis diferentes: repetibilidade, precisão intermédia e reprodutibilidade (ICH Q2A, 1994).

A repetibilidade, ou precisão intra-ensaio, representa a concordância entre os resultados obtidos em condições de trabalho idênticas (e.g. mesmo analista, mesmo equipamento analítico e lotes de reagentes) e num curto intervalo de tempo. A precisão intermédia corresponde à variação dos resultados observados quando um ou mais fatores (e.g. dias diferentes, diferentes analistas, equipamentos e lotes de reagentes) são modificados. Por seu lado, a reprodutibilidade corresponde à variabilidade obtida quando diferentes laboratórios analisam a mesma amostra (e.g. ensaios interlaboratoriais). A este propósito refira-se que a IUPAC não aconselha a que se retirem conclusões a partir de dados obtidos em ensaios interlaboratoriais com menos de cinco participantes, referindo como indicação a participação mínima de oito laboratórios (Thompson et al., 2002). No entanto, mais importante que o número de laboratórios envolvidos é que a reprodutibilidade seja avaliada comparando-se resultados obtidos em laboratórios cujos métodos analíticos e, principalmente, o tipo de tecnologia (e.g. LC/MS, GC/MS), sejam similares.

2.4.2.6 Exatidão

A exatidão do método analítico corresponde ao grau de concordância entre os resultados da concentração medida pelo método e um valor aceite como referência, sendo afetada pelos componentes do erro sistemático e do erro aleatório. Isto é, a exatidão indica a capacidade que o método analítico possui de proporcionar resultados o mais próximo possível do valor verdadeiro. O número de ensaios a conduzir varia consoante a diretriz adotada e também com as características do estudo. A ICH, a título de exemplo, recomenda um mínimo de nove ensaios distribuídos por diferentes níveis de concentrações (ensaios em triplicado e para três níveis de concentração). Os processos mais frequentemente utilizados para avaliar a exatidão de um método são o uso de materiais de referência, a participação em ensaios interlaboratoriais, a realização de ensaios de recuperação e a adição de padrão (Ribani et al., 2004).

2.4.2.7 Limites de detecção e de quantificação

O limite de detecção (LOD) de um método analítico corresponde à menor concentração do analito numa amostra que pode ser detetada mas não necessariamente quantificada com razoável certeza estatística. O cálculo deste limite pode ser feito de diferentes formas. Uma delas baseia-se na estimativa da razão sinal/ruído (S/R) para os picos de interesse, a qual naturalmente só poderá ser aplicada a procedimentos analíticos cuja resposta seja apresentada sob a forma de cromatogramas. O sinal e o ruído podem então ser definidos como a altura do pico do analito (sinal) e a amplitude entre o ponto mais alto e o mais baixo da linha de base (ruído) numa área do cromatograma situada ao redor do sinal de análise (Franco, 2006). A razão sinal-ruído deve ser pelo menos igual a 3. Outra forma de

calcular este limite é através de dados obtidos de curvas de calibração construídas a partir da análise de amostras fortificadas no intervalo inferior da gama de trabalho (ICH Q2B, 1996; Peters et al., 2002). O LOD pode então ser encontrado a partir da seguinte equação:

$$LOD = \frac{3,3xS_{y/x}}{b}$$

Em que S e b representam, respetivamente, o desvio padrão residual e o declive da reta de calibração.

Por seu lado, o limite de quantificação (LOQ) define-se como sendo a menor concentração do analito na amostra que pode ser determinada e quantificada com uma precisão e exatidão adequadas ao âmbito de aplicação do respetivo método. O cálculo do limite de quantificação pode ser obtido seguindo a metodologia aplicada ao limite de deteção, com as seguintes modificações: a relação sinal-ruído deve ser pelo menos igual a 10 e, no caso de se optar pela utilização dos dados da calibração, a fórmula utilizada passa a ter a seguinte representação:

$$LOQ = \frac{10xS_{y/x}}{b}$$

2.4.2.8 Robustez

A robustez de um método analítico traduz-se na sua capacidade para suportar ligeiras variações nas respetivas condições analíticas. Assim, a robustez de um método pode ser avaliada procedendo-se de forma intencional a pequenas alterações que se considerem plausíveis de ocorrer durante a sua utilização em condições de rotina. As alterações podem incluir, no caso de métodos que utilizem

a cromatografia gasosa, o fluxo do gás de arraste e a temperatura da coluna, o volume de injeção, a composição da fase móvel, entre outras possibilidades. A validação de um método não tem obrigatoriamente de incluir este parâmetro mas considera-se que a sua avaliação, por exemplo numa fase de pré-validação, pode ser bastante útil ao permitir detetar antecipadamente problemas que poderiam afetar posteriormente o processo de validação ou a própria utilização do método já em rotina (Peters et al., 2002).

2.4.2.9 Estabilidade

A estabilidade do analito durante as diversas fases do procedimento analítico, sem descurar a duração e respetivas condições de armazenamento, constitui um pré-requisito para a obtenção de resultados válidos e reprodutíveis. A validação de um método deve, por isso, incluir experiências que de alguma forma possam evidenciar que durante este processo não ocorre degradação da substância de interesse. Entre outros aspetos, e a título de exemplo, pode ser avaliada a influência da temperatura de conservação (e.g. ciclos de congelação/descongelação) e respetiva duração, as condições de colheita da toma de amostra, a resistência às temperaturas a que a substância fica sujeita durante a análise cromatográfica.

No decorrer destes estudos deve estar garantido que as amostras são sujeitas a condições equivalentes às da rotina.

Parte III – TRABALHO EXPERIMENTAL

3.1 Introdução

A seleção de um método analítico adequado para a identificação e quantificação de substâncias em amostras biológicas constitui um passo fundamental para a garantia de resultados fiáveis e reprodutíveis. Procurou-se, com este trabalho, desenvolver um método com recurso a cromatografia gasosa com detetor de ionização de chama e injeção de amostras de *headspace* (HS-GC/FID), para identificar e quantificar um grupo de onze substâncias voláteis com interesse forense. Após o respetivo desenvolvimento procedeu-se à sua validação de acordo com o procedimento em vigor no Serviço de Toxicologia Forense da Delegação do Centro do INML.

3.2 Material e métodos

3.2.1 Substâncias estudadas

A seleção do grupo de substâncias voláteis assentou essencialmente em dois aspetos: a sua relevância no contexto clínico/forense e, naturalmente, a disponibilidade em tempo útil dos respetivos padrões analíticos.

Assim, no que diz respeito à sua importância do ponto de vista clínico/forense, e tendo naturalmente em consideração a diversa informação bibliográfica analisada e já referida em capítulo anterior, foram selecionadas as seguintes substâncias: acetaldeído, acetato de etilo, acetona, acetonitrilo, 1-butanol, clorofórmio, éter, metanol, 2-propanol, tolueno e p-xileno.

3.2.2 Amostras biológicas

As amostras biológicas necessárias à realização deste projeto foram selecionadas de modo a serem, tanto quanto possível, representativas da realidade do laboratório de toxicologia forense.

As amostras de sangue e urina utilizadas no estudo foram obtidas a partir de colheitas efetuadas *in vivo* e *post mortem*, durante o ano de 2009. As amostras obtidas *in vivo* foram colhidas no âmbito da legislação aplicável à condução rodoviária (Código da Estrada) ou de exames periciais realizados no serviço de clínica forense da Delegação do Centro do INML, I.P.. As amostras *post mortem* foram colhidas no decorrer de autópsias realizadas no serviço de patologia forense da referida instituição ou em gabinetes médico-legais da sua área de atuação.

As amostras de humor vítreo foram colhidas no âmbito de autópsias realizadas no serviço de patologia forense da Delegação do Centro do INML, I.P., no período compreendido entre o último trimestre de 2011 e o primeiro semestre de 2012.

Até serem analisadas, todas as amostras foram mantidas à temperatura de -20 °C.

3.2.3 Padrões, Reagentes e Material

3.2.3.1 Padrões

Os padrões selecionados para o presente estudo foram adquiridos às marcas comerciais Merck (acetaldeído, acetona, acetonitrilo, 2-propanol, metanol e p-xileno), Riedel-de-Haën (acetato de etilo, éter dietílico, clorofórmio e tolueno) e Aldrich Chemistry (1-butanol) apresentando uma pureza média superior a 99,5%.

O padrão interno utilizado foi o n-propanol, adquirido à firma Merck por este apresentar propriedades físico-químicas e comportamentos cromatográficos semelhantes aos das substâncias em estudo.

3.2.3.2 Reagentes

Os solventes utilizados na preparação de soluções foram os seguintes:

- Água ultra pura Milli-Q obtida com sistema Millipore (França);
- Metanol *LiChrosolv*[®] adquirido a Merck (Darmstadt, Germany).

3.2.3.3 Material

- Balões volumétricos de 10, 1000 e 5000 mL;
- Frascos de vidro âmbar de 12 e 1000 mL;
- Pipetas de vidro graduadas de 10, 25 e 50 mL;
- Suportes para vials;
- Cápsulas de alumínio para vials;
- Vials de 10 mL.

3.2.4 Equipamentos

3.2.4.1 Aparelhos de uso comum

- Agitador magnético Heidolph REAX 2000;
- Bomba de vácuo Millipore e filtros 0,2 µm, Schleicher & Schuell;
- Homogeneizador de amostras;
- Hote Kottermann AP 800.

3.2.4.2 Pipetas e Doseadores

- Pipeta automática de 100 µL Eppendorf Research 428574;
- Pipeta automática de 200 µL Gilson Pipetman neo BG68111;
- Pipeta automática de 200 – 1000 µL Gilson Pipetman SS548501;
- Doseador de mão Eppendorf Multipette Plus com *combitips* de 25 mL.

3.2.4.3 Instrumentos Analíticos

Foi utilizado um sistema cromatográfico HS-GC/FID da marca *Agilent®* 6890N, dotado de um detetor de ionização de chama, acoplado a um injetor de *headspace* de volume fixo (*loop*) *Agilent* G1888.

Tabela 2- Principais características do sistema HS-GC/FID utilizado.

Componente	Principais características
Injetor automático	Injeção de <i>headspace</i> (<i>loop</i> de 1 mL)
Cromatógrafo gasoso	Coluna analítica 1: DB-ALC2 30 m x 0,320 mm x 1,2 µm (Agilent 123-9234)
	Coluna analítica 2: DB-ALC1 30 m x 0,320 mm x 1,8 µm (Agilent 123-9134)
Detetor	Ionização de chama

3.2.5 Procedimento analítico

3.2.5.1 Preparação das soluções

As substâncias em estudo foram divididas e agrupadas de acordo com a sua solubilidade e gama de trabalho (Tabela 3). Para as substâncias com elevada

solubilidade em água preparou-se uma mistura designada por mistura II. As restantes substâncias, cuja solubilidade em água era reduzida mas apresentavam uma boa solubilidade em metanol, foram divididas de acordo com as gamas de trabalho. Para a gama de 5 a 1000 mg/L, preparou-se uma mistura III e à substância clorofórmio corresponde a gama de 50 a 1000 mg/L. Os parâmetros estudados na validação do método foram analisados individualmente para cada um destes grupos.

Tabela 3- Agrupamento das substâncias por solubilidade e gama de trabalho.

Composto	Solubilidade em água	Gama de trabalho	Nome
Acetaldeído	Solúvel		
Acetato de Etilo	83 g/L		
Acetona	Solúvel		
Acetonitrilo	Solúvel	50-2000 mg/L	Mistura II
1-Butanol	90 g/L		
2-Propanol	Solúvel		
Éter	60 g/L		
Metanol	Solúvel		
Tolueno	0,47 g/L	5-1000 mg/L	Mistura III
p-Xileno	Insolúvel		
Clorofórmio	8 g/L	50-1000 mg/L	Clorofórmio

3.2.5.1.1 Soluções de armazenamento

3.2.5.1.1.1 Solução contendo 20 000 mg/L (Mistura II)

Diluir 28 mL de éter, 22 mL de acetato de etilo e 25 mL das soluções acetaldeído, metanol, 2-propanol, 1-butanol, acetona e acetonitrilo em água milli-Q até perfazer um volume de 1000 mL.

3.2.5.1.1.2 Solução contendo 10 000 mg/L (Mistura II)

Diluir 14 mL de éter, 11 mL de acetato de etilo e 12.5 mL das soluções acetaldeído, metanol, 2-propanol, 1-butanol, acetona e acetonitrilo em água milli-Q até perfazer um volume de 1000 mL.

3.2.5.1.1.3 Solução contendo 10 000 mg/L (Mistura III)

Diluir 116 µL de tolueno e p-xileno em metanol até perfazer um volume de 10 mL.

3.2.5.1.1.4 Solução contendo 14 700 mg/L de clorofórmio

Diluir 100 µL de clorofórmio em metanol até perfazer um volume de 10 mL.

A solução deve ser medida com o clorofórmio refrigerado (2-8 °C), devido à sua elevada volatilidade.

3.2.5.1.1.5 Solução contendo 10 000 mg/L de n-propanol

Diluir 12,5 mL de n-propanol em água milli-Q até perfazer um volume de 1000 mL.

3.2.5.1.2 Soluções de trabalho de padrões de referência (calibradores, controles e solução de trabalho de PI)

3.2.5.1.2.1 Soluções das substâncias voláteis da mistura II

a. Solução contendo 2 000 mg/L

Diluir em água milli-Q 1000 μL da solução descrita em **3.2.5.1.1.1** até perfazer um volume de 10 mL.

b. Solução contendo 1 500 mg/L

Diluir em água milli-Q 750 μL da solução descrita em **3.2.5.1.1.1** até perfazer um volume de 10 mL.

c. Solução contendo 1 000 mg/L

Diluir em água milli-Q 1000 μL da solução descrita em **3.2.5.1.1.2** até perfazer um volume de 10 mL.

d. Solução contendo 500 mg/L

Diluir em água milli-Q 500 μL da solução descrita em **3.2.5.1.1.2** até perfazer um volume de 10 mL.

e. Solução contendo 250 mg/L

Diluir em água milli-Q 250 μL da solução descrita em **3.2.5.1.1.2** até perfazer um volume de 10 mL.

f. Solução contendo 50 mg/L

Diluir em água milli-Q 50 μL da solução descrita em **3.2.5.1.1.2** até perfazer um volume de 10 mL.

3.2.5.1.2.2 Soluções das substâncias voláteis da mistura III

a. Solução contendo 1 000 mg/L

Diluir em metanol 1000 μL da solução descrita em **3.2.5.1.1.3** até perfazer um volume de 10 mL.

b. Solução contendo 800 mg/L

Diluir em metanol 800 μL da solução descrita em **3.2.5.1.1.3** até perfazer um volume de 10 mL.

c. Solução contendo 750 mg/L

Diluir em metanol 750 μL da solução descrita em **3.2.5.1.1.3** até perfazer um volume de 10 mL.

d. Solução contendo 500 mg/L

Diluir em metanol 500 μL da solução descrita em **3.2.5.1.1.3** até perfazer um volume de 10 mL.

e. Solução contendo 250 mg/L

Diluir em metanol 250 μL da solução descrita em **3.2.5.1.1.3** até perfazer um volume de 10 mL.

f. Solução contendo 100 mg/L

Diluir em metanol 100 μL da solução descrita em **3.2.5.1.1.3** até perfazer um volume de 10 mL.

g. Solução contendo 5 mg/L

Diluir em metanol 50 μL da solução descrita em **3.2.5.1.2.2 a.** até perfazer um volume de 10 mL.

3.2.5.1.2.3 Soluções da substância clorofórmio

a. Solução contendo 1 000 mg/L

Diluir em metanol 680 μL da solução descrita em **3.2.5.1.1.4** até perfazer um volume de 10 mL.

b. Solução contendo 750 mg/L

Diluir em metanol 510 μL da solução descrita em **3.2.5.1.1.4** até perfazer um volume de 10 mL.

c. Solução contendo 500 mg/L

Diluir em metanol 340 μL da solução descrita em **3.2.5.1.1.4** até perfazer um volume de 10 mL.

d. Solução contendo 250 mg/L

Diluir em metanol 170 μL da solução descrita em **3.2.5.1.1.4** até perfazer um volume de 10 mL.

e. Solução contendo 100 mg/L

Diluir em metanol 1000 μL da solução descrita em **3.2.5.1.2.3 a.** até perfazer um volume de 10 mL.

f. Solução contendo 50 mg/L

Diluir em metanol 500 μL da solução descrita em **3.2.5.1.2.3 a.** até perfazer um volume de 10 mL.

3.2.5.1.2.4 Solução contendo 100 mg/L de n-propanol

Diluir em água milli-Q 50 mL da solução descrita em **3.2.5.1.1.5** até perfazer um volume de 5000 mL.

3.2.5.2 Preparação das amostras de ensaio

As amostras laboratoriais foram tratadas de acordo com o procedimento em vigor no STF, tendo sido descongeladas e homogeneizadas através de agitação suave durante pelo menos 10 minutos, até atingirem a temperatura ambiente. Em cada vial foi inscrita de forma bem legível a identificação da toma de ensaio (e.g. código interno da amostra).

A preparação das amostras foi efetuada misturando, em vials de 10 mL, 1 mL de padrão interno e 100 µL da amostra.

Tendo em consideração as características das substâncias estudadas, em particular a sua volatilidade, os vials foram fechados logo após a preparação da amostra a ensaiar de modo a impedir a perda de material. Sempre que não foi possível proceder de imediato à análise os vials foram mantidos refrigerados a uma temperatura compreendida entre 2 e 8 °C.

3.2.5.3 Preparação das curvas de calibração

Os calibradores foram preparados tal como descritos no ponto 3.2.5.2, substituindo o volume de amostra por um volume equivalente da respetiva solução de trabalho de acordo com as tabelas 4, 5 e 6.

Tabela 4- Preparação da curva de calibração- mistura II

	Solução de trabalho de padrões de referência	Solução 100 g/L n-propanol (PI)
Calibrador 1 (2000 mg/L)	3.2.5.1.2.1 a.	1 mL
Calibrador 2 (1500 mg/L)	3.2.5.1.2.1 b.	1 mL
Calibrador 3 (1000 mg/L)	3.2.5.1.2.1 c.	1 mL
Calibrador 4 (500 mg/L)	3.2.5.1.2.1 d.	1 mL
Calibrador 5 (50 mg/L)	3.2.5.1.2.1 f.	1 mL

Tabela 5- Preparação da curva de calibração- mistura III

	Solução de trabalho de padrões de referência	Solução 100 g/L n-propanol (PI)
Calibrador 1 (1000 mg/L)	3.2.5.1.2.2 a.	1 mL
Calibrador 2 (750 mg/L)	3.2.5.1.2.2 c.	1 mL
Calibrador 3 (500 mg/L)	3.2.5.1.2.2 d.	1 mL
Calibrador 4 (250 mg/L)	3.2.5.1.2.2 e.	1 mL
Calibrador 5 (5 mg/L)	3.2.5.1.2.2 g.	1 mL

Tabela 6- Preparação da curva de calibração- clorofórmio

	Solução de trabalho de padrões de referência	Solução 100 g/L n-propanol (PI)
Calibrador 1 (1000 mg/L)	3.2.5.1.2.3 a.	1 mL
Calibrador 2 (750 mg/L)	3.2.5.1.2.3 b.	1 mL
Calibrador 3 (500 mg/L)	3.2.5.1.2.3 c.	1 mL
Calibrador 4 (250 mg/L)	3.2.5.1.2.3 d.	1 mL
Calibrador 5 (50 mg/L)	3.2.5.1.2.3 f.	1 mL

3.2.5.4 Preparação das amostras de controlo de qualidade interno

O controlo de qualidade interno foi constituído por uma amostra branca (controlo negativo) e dois controlos positivos. A análise das amostras controlo positivas serve para estabelecer os intervalos de tempo de retenção relativo (TRR) das substâncias voláteis e avaliar, em cada série analítica, a exatidão do método de ensaio. A amostra controlo negativa permite avaliar, em cada sequência analítica, o efeito de matriz ou a presença de substâncias interferentes inesperadas (e.g. provenientes de contaminações das soluções utilizadas). Estas amostras devem ser preparadas e analisadas em simultâneo com as amostras de rotina.

Para tal foram utilizadas duas amostras contendo 100 µL da solução de trabalho de padrões de referência e uma terceira na qual a amostra foi substituída por uma porção equivalente de água milli-Q (amostra branca), de acordo com as tabelas 7, 8 e 9.

Tabela 7- Preparação dos CQI- mistura II.

	Solução de trabalho de padrões de referência	Solução 100 g/L n-propanol (PI)
Controlo positivo (1500 mg/L)	3.2.5.1.2.1 b.	1 mL
Controlo positivo (250 mg/L)	3.2.5.1.2.1 e.	1 mL
Branco de Reagentes	—	1 mL

Tabela 8- Preparação dos CQI- mistura III

	Solução de trabalho de padrões de referência	Solução 100 g/L n-propanol (PI)
Controlo positivo (800 mg/L)	3.2.5.1.2.2 b.	1 mL
Controlo positivo (100 mg/L)	3.2.5.1.2.1 f.	1 mL
Branco de Reagentes	—	1 mL

Tabela 9- Preparação dos CQI- clorofórmio

	Solução de trabalho de padrões de referência	Solução 100 g/L n-propanol (PI)
Controlo positivo (750 mg/L)	3.2.5.1.2.3 b.	1 mL
Controlo positivo (100 mg/L)	3.2.5.1.2.3 e.	1 mL
Branco de Reagentes	—	1 mL

3.2.6 Análise Instrumental (HS-GC/FID)

As amostras foram analisadas no equipamento descrito em 3.2.4.3. A separação cromatográfica foi realizada com recurso a duas colunas capilares de polaridades distintas, com o objetivo de garantir o cumprimento dos critérios de identificação recomendados para este tipo de análises. A coluna DB-ALC2 adquirida a Agilent (Santa Clara, Califórnia), com as dimensões 30 m x 0,320 mm x 1,2 µm, foi utilizada para identificar e quantificar as substâncias voláteis. A utilização de uma segunda coluna Agilent, DB-ALC1, com as dimensões 30 m x 0,320 mm x 1,8 µm, teve por objetivo confirmar a presença das respetivas substâncias.

As condições analíticas do ponto de vista cromatográfico foram as seguintes: uma temperatura inicial do forno de 40 °C, mantida durante 5 min, seguindo-se uma subida até aos 130 °C com um gradiente de 10 °C/min. No fim de cada corrida foi retomada a temperatura inicial, mantida durante 3 min. A temperatura do injetor foi mantida a 150 °C e utilizada uma razão de *split* de 4:1. Os detetores foram mantidos a 250 °C. Os fluxos utilizados para os gases foram os seguintes: hidrogénio — 40,0 mL/min, ar — 450,0 mL/min e nitrogénio — 45,0 mL/min. O fluxo de hélio foi mantido constante (2,7 mL/min) e o volume de injeção foi de 1mL.

A temperatura do forno do injetor automático de *headspace* foi mantida a 80 °C, o respetivo *loop* a 85 °C e a linha de transferência a 90 °C. Antes da injeção da amostra de *headspace* os vials foram incubados durante 20,0 min. No total, cada ciclo analítico teve uma duração de 18,2 min.

O processamento dos dados analíticos foi feito com recurso a *software* específico (Agilent ChemStation Rev B.03.01 [317]).

3.3 Resultados e discussão

3.3.1 Desenvolvimento do método analítico

O desenvolvimento do método analítico baseou-se, numa fase inicial, na consulta de bibliografia (incluindo manuais técnicos) e na experiência adquirida resultante da utilização de métodos analíticos entretanto desenvolvidos para a determinação da alcoolemia. Uma vez que um dos objetivos consistia no desenvolvimento de um método para aplicação na rotina do laboratório, todo o desenvolvimento do projeto teve por base a utilização do equipamento analítico, incluindo as respetivas colunas analíticas, disponível no serviço de toxicologia forense.

A significativa amplitude de características físico-químicas das onze substâncias estudadas — pesos moleculares entre 32,04 g/mol (metanol) e 119,38 g/mol (clorofórmio) e temperaturas de ebulição entre 20,2 °C (acetaldeído) e 138,5 °C (p-xileno) — tornou necessário o desenvolvimento de um método analítico cromatográfico mais complexo e a introdução de um gradiente térmico com o objetivo de melhorar os resultados obtidos. Neste sentido, o desenvolvimento do método foi iniciado com uma série de injeções das substâncias estudadas a uma concentração de 1000 mg/L. Tendo em consideração que o critério de identificação seria baseado nos valores de TRR o método foi considerado otimizado quando se alcançou uma adequada separação cromatográfica sem que tal se traduzisse num tempo de análise demasiado elevado (Figura 3).

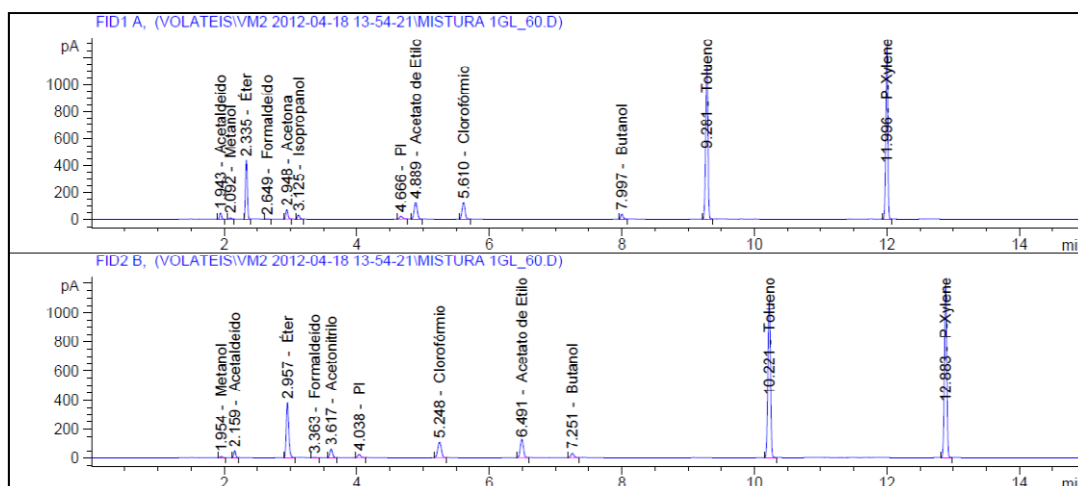


Figura 3- Cromatograma da análise das substâncias a 1000 mg/L.

Tendo sido introduzido, como já anteriormente referido, um gradiente térmico (10 °C/min até aos 130 °C) após uma primeira fase isotérmica (5 min a 40 °C) foi necessário introduzir um *post-run* de 3 min após serem retomadas as condições iniciais de temperatura. Caso contrário, constata-se que os tempos de retenção não se mantêm reproduzíveis em análises sequenciais devido ao tempo insuficiente para o reequilíbrio das condições iniciais de análise.

Para a otimização da temperatura do forno do injetor de *headspace* preparou-se uma mistura contendo as substâncias a estudar numa concentração de 1000, 100, 50 e 10 mg/L. Estas amostras foram injetadas variando-se a respetiva temperatura entre 40 e 80 °C, com incrementos de 10 °C. Como esperado, o incremento da temperatura de incubação da amostra traduziu-se num aumento da resposta analítica, fruto do enriquecimento do *headspace* relativamente às substâncias de interesse. De facto, e para as concentrações mais baixas, algumas substâncias não eram detetadas (e.g. 2-propanol) quando o forno do injetor era mantido a temperatura mais baixa (40 °C).

Os dados pormenorizados que suportam os efeitos obtidos são apresentados sob a forma de anexo, na parte final desta dissertação (Anexo 7.1).

No decorrer desta fase do estudo também foi possível constatar que determinadas substâncias (e.g. tolueno) não exibiam um comportamento reprodutível. Para avaliar as causas analisaram-se cinco amostras de cada uma das substâncias, em condições de repetibilidade (concentração e preparação idênticas). Da análise dos resultados foi possível concluir que as substâncias tolueno, p-xileno e clorofórmio não apresentavam estabilidade em termos de resposta analítica. Este facto poderia resultar da pouca ou praticamente nenhuma solubilidade em água, tendo-se optado por alterar o procedimento de preparação das respetivas soluções escolhendo-se um solvente adequado às características de solubilidade das substâncias afetadas.

3.3.2 Identificação das substâncias

Com o objetivo de definir os critérios de identificação, baseados como já referido na comparação de TRR, cada uma das substâncias foi injetada e analisada de acordo com as condições entretanto otimizadas. Preparou-se também uma mistura (II), com todas as substâncias, em concentrações de 10 e 1000 mg/L, as quais foram analisadas conjuntamente com o padrão interno (100 mg/L). Desta forma foi possível conhecer os tempos de retenção associados a cada uma das substâncias. Este estudo foi realizado de forma idêntica para a mistura III e para o clorofórmio.

3.3.3 Validação do método analítico desenvolvido

A tabela 10 descreve os parâmetros de validação estudados no âmbito do desenvolvimento do método analítico.

Tabela 10- Parâmetros de validação em função do tipo de método utilizado.

Parâmetro	Qualitativo	Quantitativo
Especificidade/seletividade	✓	✓
Limite de detecção	✓	✓
Limite de quantificação		✓
Linearidade		✓
Repetibilidade		✓
Precisão intermédia		✓
Exatidão		✓
Robustez	✓	✓
Carryover	✓	✓
Estabilidade	✓	✓

Descrevem-se, de seguida, os resultados obtidos para cada um dos parâmetros avaliados.

3.3.3.1 Especificidade/seletividade

Para o estudo da seletividade / especificidade utilizaram-se 40 amostras (urina, sangue e humor vítreo), a partir de um conjunto de processos selecionados para este estudo. Estas 40 amostras foram separadas, de forma aleatória, em grupos de quatro, originando *pools* de volume adequado ao pretendido para o estudo (Tabela 11 para o sangue e urina e Tabela 12 para o humor vítreo). Após homogeneização prepararam-se duas amostras de cada *pool*. A primeira foi preparada através da adição de 100 µL de sangue/urina/humor vítreo e 1 mL de padrão interno. A

segunda amostra foi adicionalmente fortificada com as substâncias em estudo numa concentração de 50 mg/L.

Tabela 11- Informação sobre as amostras de sangue/urina usadas para constituir as misturas (*pools*)

Caso	Idade	Sexo	Informação disponível	Análises solicitadas
1	49	M	Suicídio (Arma de fogo)	A/DA/MD
2	78	M	Lesões traumáticas	A/DA
3	19	M	Afogamento	A/DA
4	49	M	Causa desconhecida	A/DA/MD
5	79	M	--	A/DA
6	68	M	--	A/DA/MD/P
7	87	F	Causa desconhecida	A/DA/MD/P
8	66	M	Causa desconhecida	A/DA/MD/P
9	24	M	Asfixia mecânica	A/DA/MD
10	79	F	Causa desconhecida	A/DA/MD/P
11	50	M	Causa desconhecida	A/DA/MD
12	69	F	Asfixia mecânica	A/MD
13	64	M	Asfixia mecânica	A/MD
14	64	M	Causa desconhecida	A/MD
15	81	F	Acidente Doméstico (Queda)	A/MD
16	75	M	Asfixia mecânica	A
17	28	M	Acidente viação	A/DA
18	62	M	Suicídio (Asfixia mecânica)	A/DA/MD
19	--	M	Acidente Doméstico (Queda)	A/DA/MD/P
20	78	M	Morte natural	A/DA/MD
21	44	M	Morte natural	A/DA/MD
22	66	F	Causa desconhecida	A/DA/MD/P
23	41	M	Morte natural	A/DA/MD/P
24	18	M	Acidente viação	A/DA/MD

(continuação da Tabela 11)

Caso	Idade	Sexo	Informação disponível	Análises solicitadas
25	46	M	Causa desconhecida	A/DA/MD/P
26	80	M	Suicídio (Asfixia mecânica)	A/MD
27	90	M	Asfixia mecânica	A
28	17	F	Suicídio (Asfixia mecânica)	A/DA
29	87	M	Causa desconhecida	A/MD
30	73	M	Causa desconhecida	A/MD/P
31	58	M	Acidente Trabalho	A/DA/MD
32	49	M	Causa desconhecida	A/DA/MD/P
33	35	F	Causa desconhecida	A/DA/MD
34	32	M	Vítima de violação	A/DA
35	16	M	Avaliação Toxicodependente	A/DA
36	28	M	Avaliação Toxicodependente	DA
37	39	M	Avaliação Toxicodependente	DA
38	28	M	Avaliação Toxicodependente	DA
39	44	M	Avaliação Toxicodependente	DA
40	34	M	Avaliação Toxicodependente	DA

Abreviaturas utilizadas nesta tabela: M (Masculino); F (Feminino); A (Alcoolemia); DA (Drogas de Abuso); MD (Medicamentos); P (Pesticidas); -- (Informação não disponível).

Tabela 12- Informação sobre as amostras de humor vítreo usadas para constituir as misturas (*pools*)

Caso	Idade	Sexo	Informação disponível	Observações
1	44	M	Acidente Viação	SAT
2	71	M	Acidente Trabalho	A
3	50	M	Causa desconhecida	SAT
4	73	M	Causa desconhecida	SAT
5	72	M	--	A/MD
6	77	F	Suicídio	MD

(continuação da Tabela 12)

Caso	Idade	Sexo	Informação disponível	Observações
7	23	M	Acidente de Viação	A/DA
8	78	M	Suicídio	A/M/P
9	61	F	Causa desconhecida	SAT
10	59	M	Suicídio	A/DA/MD/P
11	57	M	Causa desconhecida	A/DA/MD/P
12	97	F	Causa desconhecida	SAT
13	77	F	--	SAT
14	72	M	Causa desconhecida	SAT
15	48	M	Afogamento	SAT
16	94	F	Causa desconhecida	SAT
17	67	F	Causa desconhecida	SAT
18	39	M	Causa desconhecida	A/DA/MD/P
19	45	M	Causa desconhecida	SAT
20	74	M	Tiro	SAT
21	45	M	Causa desconhecida	A/MD/P
22	68	M	Causa desconhecida	SAT
23	47	M	--	SAT
24	71	M	--	A/MD/P
25	46	F	--	A/DA/MD
26	58	M	Causa desconhecida	SAT
27	88	M	Enforcamento	SAT
28	74	F	Acidente de Viação	A/DA
29	73	F	Causa desconhecida	SAT
30	61	M	Causa desconhecida	SAT
31	83	M	Causa desconhecida	A/MD/P
32	53	M	--	SAT
33	47	F	Enforcamento	SAT
34	87	F	Causa desconhecida	SAT

(continuação da Tabela 12)

Caso	Idade	Sexo	Informação disponível	Observações
35	47	M	Suicídio	A/DA/MD/P
36	62	F	--	A/DA/MD/P
37	68	F	Causa desconhecida	A/MD/P
38	68	M	Causa desconhecida	A/MD/P
39	35	M	Acidente de Viação	A/DA
40	56	M	Suicídio	A/MD/P

Abreviaturas utilizadas nesta tabela: M (Masculino); F (Feminino); A (Alcoolemia); DA (Drogas de Abuso); MD (Medicamentos); -- (Informação não disponível). SAT (Sem análises toxicológicas).

Na avaliação dos resultados obtidos na análise das referidas amostras de sangue, urina e humor vítreo não foram observados quaisquer sinais analíticos capazes de interferir na correta identificação e quantificação das substâncias estudadas (Figuras 4 e 5). Assim, todas as amostras de sangue, urina e humor vítreo às quais não foram adicionadas as substâncias em estudo apresentaram resultados negativos. Por seu lado, todas as amostras às quais se adicionaram tais substâncias foram consideradas positivas. A percentagem de falsos positivos e de falsos negativos foi assim de 0%, cumprindo-se claramente o critério de aceitação em vigor (inferior a 10%).

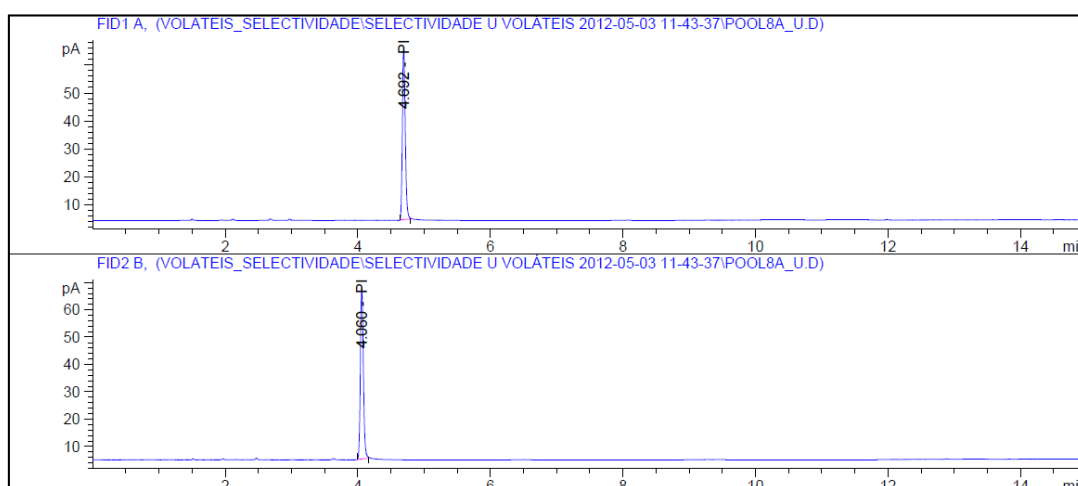


Figura 4- Cromatograma da amostra 8A de urina, não fortificada.

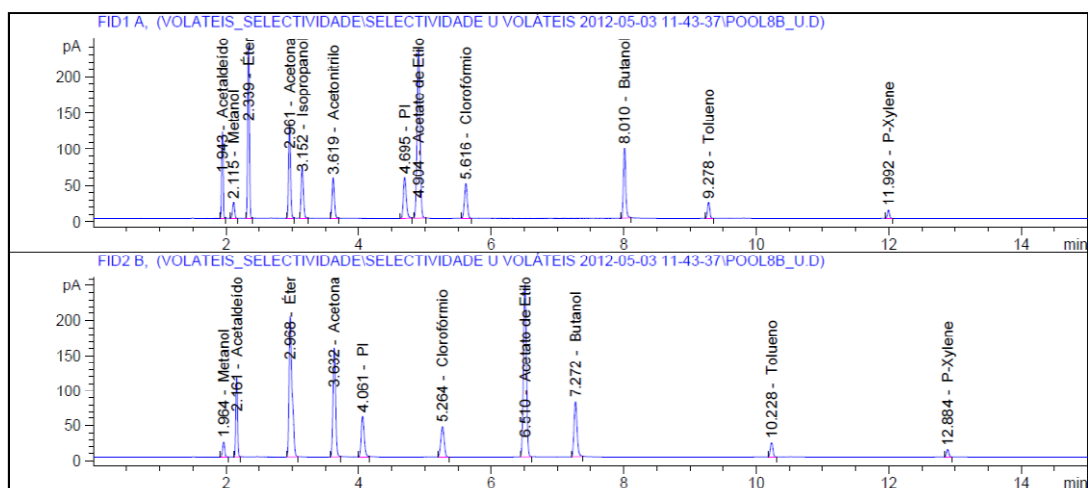


Figura 5- Cromatograma da amostra 8B de urina, fortificada.

Tabela 13- Resultados obtidos no estudo da especificidade/seletividade.

Parte I - Análise das amostras negativas		
Código da amostra	Resultados	Observações
Pool 1 - A1	Negativo	-----
Pool 2 - B1	Negativo	-----
Pool 3 - C1	Negativo	-----
Pool 4 - D1	Negativo	-----
Pool 5 - E1	Negativo	-----
Pool 6 - F1	Negativo	-----
Pool 7 - G1	Negativo	-----
Pool 8 - H1	Negativo	-----
Pool 9 - I1	Negativo	-----
Pool 10 - J1	Negativo	-----
Percentagem de falsos positivos		0%

(continuação da Tabela 13)

Parte II - Análise das amostras positivas		
Código da amostra	Resultados	Observações
Pool 1 - A2	Positivo	-----
Pool 2 - B2	Positivo	-----
Pool 3 - C2	Positivo	-----
Pool 4 - D2	Positivo	-----
Pool 5 - E2	Positivo	-----
Pool 6 - F2	Positivo	-----
Pool 7 - G2	Positivo	-----
Pool 8 - H2	Positivo	-----
Pool 9 - I2	Positivo	-----
Pool 10 - J2	Positivo	-----
Percentagem de falsos negativos		0%

3.3.3.2 Linearidade

A linearidade foi estudada através da análise, de acordo com o procedimento já descrito, de 10 amostras com concentrações distribuídas de maneira uniforme e preparadas a partir das soluções descritas no ponto 3.2.5.2 Assim, os calibradores estavam distribuídos entre 50 e 2000 mg/L, no caso da mistura II, entre 5 e 1000 mg/L para a mistura III, e entre 50 e 1000 mg/L para o clorofórmio.

A análise da linearidade foi avaliada através do estudo da regressão da curva de calibração obtida, tendo em consideração os seguintes critérios de aceitação:

- Coeficiente de determinação ($r^2 > 0,99$);
- Resíduos (análise visual da sua distribuição);

- Interceção da reta na origem, analisando-se a inclusão do valor zero tendo em consideração um grau de confiança de 95%.

A tabela 14 resume os resultados obtidos no decorrer do estudo da linearidade.

Tabela 14- Resultados obtidos no estudo da linearidade.

Composto	TR	Equações das retas	R ²	Intercetar a ordenada na origem	
				95%inf	95%sup
Acetaldeído	1.945	$Y = 0,0018x + 0,0473$	0,9962	- 0,0561	+ 0,1508
Acetato de Etilo	2.117	$Y = 0,0039x + 0,0759$	0,9974	- 0,1087	+ 0,2604
Acetona	2.952	$Y = 0,0016x + 0,0275$	0,9985	- 0,0297	+ 0,0847
Acetonitrilo	3.617	$Y = 0,0008x - 0,0022$	0,9989	- 0,0255	+ 0,0211
1-Butanol	8.00	$Y = 0,0015x - 0,0376$	0,9997	- 0,0608	- 0,0143
2-Propanol	3.127	$Y = 0,001x + 0,0087$	0,9993	- 0,0149	+ 0,0324
Éter	2.336	$Y = 0,0095x - 0,0672$	0,9977	- 0,5216	+ 0,3872
Metanol	2.096	$Y = 0,0003x + 0,0028$	0,9986	- 0,0069	+ 0,0124
Tolueno	9.275	$Y = 0,0176x - 0,0424$	0,9967	- 0,4510	+0,3661
p-Xileno	11.976	$Y = 0,0187x - 0,0942$	0,9971	-0,4987	+ 0,3103
Clorofórmio	5.613	$Y = 0,0016x - 0,0279$	0,9982	-0,0569	+ 0,0011

Para todas as substâncias voláteis estudadas, e dentro da respetiva gama de trabalho, foi obtida linearidade, encontrando-se sempre um coeficiente de determinação superior a 0,99. Verificou-se assim o cumprimento dos critérios de aceitação com exceção do 1-Butanol. Para esta substância não foi possível, mesmo

após repetição das análises, o cumprimento do critério de inclusão do valor zero na interseção da reta na origem.

Em anexo (Anexo 7.2) apresentam-se os dados obtidos e o respectivo tratamento estatístico.

3.3.3.3 Limites de detecção e de quantificação

A determinação dos limites de detecção e de quantificação foi efetuada através do estudo da curva de calibração. Para isso prepararam-se curvas de calibração utilizando amostras fortificadas com concentrações próximas do limite de detecção esperado e distribuídas uniformemente. Para a mistura II foram preparadas soluções de trabalho com concentrações entre 10 e 200 mg/L. O clorofórmio foi estudado numa curva de calibração entre 25 e 220 mg/L e a mistura III entre 0,7 e 30 mg/L. Cada uma das amostras foi preparada de acordo com o procedimento já descrito.

Uma vez obtidas as curvas de calibração após o respectivo processamento dos dados (Microsoft Office Excel 2007), para cada uma das substâncias, os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) foram calculados através das equações 1 e 2.

$$\text{Equação 1: } LOD = \frac{3,3xS_{y/x}}{b}$$

$$\text{Equação 2: } LOQ = \frac{10xS_{y/x}}{b}$$

onde $S_{y/x}$ representa o desvio padrão da curva de calibração e b o declive da reta.

Na tabela 15 apresentam-se os resultados obtidos para o limite de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) de todas as substâncias, bem como os dados mais relevantes das curvas de calibração.

Tabela 15- Resultados obtidos no estudo dos limiares analíticos.

Substância	Equação da reta	r^2	$S_{y/x}$	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)
Acetaldeído (10-170 mg/L)	$Y = 0,0021x - 0,0061$	0,9999	0,0010	2	5
Acetato de Etilo (10-170 mg/L)	$Y = 0,0042x - 0,0205$	0,9998	0,0033	3	8
Acetona (10-170 mg/L)	$Y = 0,0017x + 0,0018$	0,9999	0,0009	2	5
Acetonitrilo (20-150 mg/L)	$Y = 0,0008x - 0,0021$	0,9993	0,0020	8	25
1-Butanol (15-200 mg/L)	$Y = 0,0014x - 0,0068$	0,9994	0,0022	5	16
2-Propanol (15-200 mg/L)	$Y = 0,001x - 0,0034$	0,9998	0,0010	3	10
Éter (10-170 mg/L)	$Y = 0,0011x - 0,0861$	0,9984	0,0230	7	21
Metanol (20-170 mg/L)	$Y = 0,0003x + 0,0058$	0,9984	0,0006	7	22
Tolueno (0,8-30 mg/L)	$Y = 0,0159x - 0,0016$	0,9993	0,0044	1	3
p-Xileno (0,7-30 mg/L)	$Y = 0,0172x - 0,0024$	0,9995	0,0040	1	2
Clorofórmio (25-220 mg/L)	$Y = 0,0015x - 0,0032$	0,9982	0,0047	10	31

Em anexo (Anexo 7.3) apresentam-se os dados obtidos, as representações gráficas das curvas de calibração utilizadas no estudo dos limiares analíticos e o respectivo tratamento estatístico.

3.3.3.4 Repetibilidade do equipamento

A repetibilidade foi analisada conjuntamente com a precisão intermédia. Para tal, prepararam-se 5 replicados independentes fortificados nos níveis baixo e alto das gamas de concentração, para cada uma das misturas (250 e 1500 mg/L para a mistura II, 100 e 800 mg/mL para a mistura III e 100 e 750 mg/L para o clorofórmio).

Após a análise, e obtidas as áreas e os TRR para cada substância e para cada replicado, calculou-se a média das razões área da substância/área do PI, os desvios padrão e os coeficientes de variação.

As tabelas 16 e 17 resumem os resultados obtidos na avaliação deste parâmetro e para os dois níveis de concentração considerados. Em anexo apresentam-se os restantes dados e cálculos efetuados (anexo 7.4).

Tabela 16- Resultados obtidos para o controlo baixo (100 e 250 mg/L).

Substância	TRR	Controlo (mg/L)	Média	Desvio Padrão	CV%
Acetaldeído	0,414	250	0,466	0,006	1,3
Acetato de Etilo	1,045	250	0,972	0,014	1,4
Acetona	0,631	250	0,388	0,003	0,8
Acetonitrilo	0,772	250	0,178	0,001	0,6
1-Butanol	1,708	250	0,338	0,003	0,9
2-Propanol	0,672	250	0,228	0,002	0,8
Éter	0,498	250	2,264	0,053	2,4
Metanol	0,451	250	0,072	0,001	1,3
Tolueno	1,992	100	1,773	0,112	6,3
p-Xileno	2,579	100	1,805	0,116	6,4
Clorofórmio	1,197	100	0,142	0,006	4,1

Tabela 17- Resultados obtidos para o controlo alto (750, 800 e 1500 mg/L).

Substância	TRR	Controlo	Média	Desvio Padrão	CV%
Acetaldeído	0,414	1500	2,709	0,040	1,5
Acetato de Etilo	1,045	1500	5,924	0,112	1,9
Acetona	0,631	1500	2,361	0,026	1,1
Acetonitrilo	0,771	1500	1,102	0,003	0,2
1-Butanol	1,707	1500	2,155	0,011	0,5
2-Propanol	0,672	1500	1,395	0,009	0,6
Éter	0,498	1500	14,887	0,360	2,4
Metanol	0,451	1500	0,424	0,004	0,9
Tolueno	1,994	800	14,806	0,742	5
p-Xileno	2,581	800	15,426	0,773	5
Clorofórmio	1,197	750	1,171	0,051	4,3

Constatou-se que os valores de coeficientes de variação cumpriam, em todos os casos, o critério de aceitação utilizado ($CV < 10\%$).

3.3.3.5 Precisão intermédia

A avaliação da precisão intermédia foi determinada recorrendo a um número limitado de experiências. Para isso, procedeu-se à realização dos ensaios durante cinco dias diferentes, de forma a avaliar o impacto das alterações que são expectáveis que ocorram durante o normal funcionamento do laboratório (e.g. diferentes dias, calibrações, materiais e operadores).

Prepararam-se então distintas curvas de calibração ao longo de cinco dias e, simultaneamente, dois controlos com concentrações diferentes, consoante as substâncias em estudo (ver ponto 3.2.5.3 e 3.2.5.4).

Os dados obtidos para a precisão intermédia e repetibilidade do método analítico foram analisadas através da aplicação ANOVA (fator único), utilizando as equações abaixo representadas.

Tabela 18- Tabela ANOVA (fator único).

Fonte	Média quadrática (MQ)	Graus de Liberdade
Entre Grupos	$MS_r = \frac{n \sum_{i=1}^p (\bar{x}_i - \bar{\bar{x}})^2}{p-1}$	$p-1$
Dentro de grupos	$MS_r = \frac{\sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n (x_{ij} - \bar{x}_i)^2}{p(n-1)}$	$p(n-1)$
Total		$pn-1$

Tabela 19- Cálculo das estimativas da precisão intermédia e de repetibilidade.

Precisão	Expressão
Repetibilidade (S_r)	$S_r = \sqrt{MS_r}$
Between-run precision (S_{run})	$S_{run} = \sqrt{\frac{MS_{run} - MS_r}{n}}$
Precisão intermédia (S_1)	$S_1 = \sqrt{(S_r^2) + (S_{run}^2)}$

Onde:

p é o número de sequências de análise para cada nível de concentração;

n é o número de replicados em cada sequência;

x_{ij} representa a concentração (replicado j) obtido na sequência i ;

\bar{x} representa a média da concentração de n replicados obtidos na sequência i ;

$\bar{\bar{x}}$ é a média das médias de p sequências.

Se os CV forem aproximadamente constantes ao longo da gama de trabalho, aplica-se a fórmula abaixo para calcular um CV ponderado.

$$CV_{pool} = \sqrt{\frac{(n_1 - 1) \times CV_1^2 + (n_2 - 1) \times CV_2^2 + \dots}{(n_1 - 1) + (n_2 - 1) + \dots}}$$

Na tabela 20 apresentam-se os resultados obtidos relativamente à repetibilidade e precisão intermédia, ao longo dos 5 dias e para os dois níveis de concentração considerados.

Tabela 20- Estudo da repetibilidade e de precisão intermédia do método analítico.

Substância	Concentração (mg/L)	Repetibilidade (S _r)	Precisão intermédia	CV%
Acetaldeído	250	4,0	8,7	3,3
	1500	16,2	37,5	2,6
Acetato de Etilo	250	4,5	10,4	3,9
	1500	25,6	39,4	2,3
Acetona	250	2,3	5,8	2,3
	1500	20,5	29,7	1,8
Acetonitrilo	250	1,2	5,0	2,0
	1500	14,7	16,1	0,8
1-Butanol	250	3,5	11,9	4,4
	1500	20,0	55,7	3,5
2-Propanol	250	1,5	5,9	2,3
	1500	18,2	20,7	1,0
Éter	250	7,1	14,0	4,9
	1500	30,4	52,6	3,2
Metanol	250	2,8	7,7	2,9
	1500	18,9	26,8	1,5
Tolueno	100	4,9	7,6	6,9
	800	37,8	38,9	3,8

(continuação da Tabela 20)

Substância	Concentração (mg/L)	Repetibilidade (S_r)	Precisão intermédia	CV%
p-Xileno	100	7,1	8,6	7,0
	800	34,3	37,4	4,5
Clorofórmio	100	3,0	4,9	5,4
	750	18,7	26,7	4,6

A avaliação deste parâmetro é feita com base no cálculo do coeficiente de variação (CV). Obtiveram-se valores que variam entre 0,8 % para o acetonitrilo (1500 mg/L) e 7,0 % para o p-xileno (100 mg/L) (tabela 20), valores esses muito inferiores ao critério de aceitação de 20 % recomendado na literatura.

Em anexo apresentam-se as tabelas resultantes dos cálculos efetuados para cada substância (Anexo 7.5).

3.3.3.6 Exatidão

A exatidão de um método analítico traduz a aproximação entre o resultado da medição, efetuada pelo método, e o valor verdadeiro da mensuranda.

Para avaliar este parâmetro estudou-se a recuperação do método (i.e. a razão entre o valor observado e o valor esperado), com o intuito de detetar a existência de erros sistemáticos, definir fatores de correlação e, se relevante, estimar a incerteza associada à recuperação do método U_R^- como dado de entrada do procedimento de cálculo de incertezas. A partir dos resultados obtidos para o cálculo da precisão intermédia, e das equações a seguir apresentadas, pode proceder-se ao cálculo do

$$U_R^-.$$

$$R_j = \frac{C_{Obsi}}{C_{Fortf}} \quad \bar{R} = \frac{\sum_{i=1}^p R_i}{p} \quad t_{Exp} = \frac{|1 - \bar{R}|}{U_{\%R}}$$

$$U_{\%R} = \frac{S_{Obs}}{\sqrt{P}} \quad U_{\bar{R}} = \frac{U_{\%R}}{\bar{R}} \quad U_{\bar{R}} = \frac{\sqrt{(U_{\%R})^2 + \left(\frac{1 - \bar{R}}{K}\right)^2}}{\bar{R}}$$

Onde ,

S_{Obs} é o desvio padrão de p valores de R_j obtidos em condições de precisão intermédia;

R_j é a recuperação média de n replicados obtidos em condições de repetibilidade;

Para cada nível de concentração foi aplicado um teste estatístico de forma a averiguar se a recuperação média era significativamente diferente de 100%: se $t_{exp} < t_{crit}$, então \bar{R} não é significativamente diferente de 100% e $U_{\bar{R}}$ é calculado com base na equação mais simples, em que t_{crit} é o valor crítico bi-caudal para $p-1$ graus de liberdade num intervalo de confiança de 95%.

Na tabela seguinte apresentam-se os resultados da exatidão do método.

Tabela 21- Resultados obtidos para a exatidão.

Substância	Concentração (mg/L)	Exatidão %
Acetaldeído	250	99,2
	1500	90,1
Acetato de Etilo	250	101,9
	1500	96,3

(continuação da Tabela 21)

Substância	Concentração (mg/L)	Exatidão %
Acetona	250	98,1
	1500	93,7
Acetonitrilo	250	99,6
	1500	96,2
1-Butanol	250	103,8
	1500	100,0
2-Propanol	250	100,9
	1500	96,5
Éter	250	104,9
	1500	96,6
Metanol	250	103,2
	1500	96,6
Tolueno	100	106,0
	800	95,8
p-Xileno	100	106,3
	800	97,6
Clorofórmio	100	96,7
	750	95,9

A exatidão do método em percentagem apresenta valores para o controle baixo entre 96,7% (clorofórmio) e 106,3% (p-xileno) e para o controle alto valores entre 90,1% (acetaldeído) e 100,0% (1-butanol).

As tabelas relativamente aos restantes cálculos associados ao parâmetro de exatidão encontram-se em anexo (Anexo 7.6).

3.3.3.7 Robustez

Para avaliar a robustez do método consideraram-se as seguintes alterações, representativas da sua utilização em condições de rotina:

- Substituição do tipo de *liner*;
- Execução por outro técnico;
- Substituição de coluna cromatográfica;
- Substituição da pré-coluna;
- Uso de pipetas diferentes.

O método analítico evidenciou sempre capacidade para produzir resultados fiáveis e reprodutíveis mesmo após a introdução das modificações acima referidas.

3.3.3.8 Avaliação dos fenómenos de arrastamento (carryover)

A avaliação de fenómenos de arrastamento foi feita em conjunto com a precisão intermédia. Para isso prepararam-se três amostras brancas que foram injetadas entre as amostras de concentração mais elevada, analisadas a propósito da avaliação da precisão intermédia.

Analisaram-se os cromatogramas obtidos na análise das amostras brancas a fim de pesquisar a presença de eventuais contaminações. Constatou-se a presença de um ligeiro sinal para a substância p-xileno embora não significativa e, por isso, sem impacto no resultado da análise da amostra seguinte. Esta conclusão resultou do facto de, durante o estudo da precisão intermédia, ter-se analisado uma amostra controlo com 100 mg/mL imediatamente a seguir ao último calibrador (1000 mg/L), sem que se tenham observado diferenças significativas no respetivo

resultado ao longo dos cinco dias do estudo. Na análise dos restantes resultados não se evidenciou a ocorrência de fenómenos de arrastamento.

3.3.3.9 Teste ao limiar analítico de quantificação

Tendo em conta a gama de valores obtidos para o limite de quantificação das substâncias em estudo decidiu-se testar o limite de quantificação a 25 mg/L para a mistura II, a 5 mg/L para a mistura III e a 35 mg/L para o clorofórmio. Para tal, prepararam-se 5 replicados independentes para sangue, urina e humor vítreo, a estas concentrações. Em simultâneo, preparou-se uma curva de calibração com 5 pontos para cada substância de acordo com o procedimento já descrito anteriormente para a determinação dos limites de deteção e quantificação.

Uma vez aplicado o procedimento de ensaio determinou-se o coeficiente de variação (CV%) e o erro em relação ao valor teórico dos replicados, para cada uma das amostras biológicas (Tabela 22, 23, 24).

Tabela 22- Resultados obtidos para o teste ao LOQ em amostras de sangue

Substância	LOQ	Concentração (mg/L)	Média	CV (%)	Erro (%)
Acetaldeído	12	25	23,1	4,8	7,7
Acetato de Etilo	14	25	22,0	7,8	12,0
Acetona	23	25	26,1	4,7	4,6
Acetonitrilo	15	25	26,2	7,1	5,0
1-Butanol	3	25	28,0	6,2	11,8
2-Propanol	10	25	21,9	8,5	12,6
Éter	25	25	20,2	6,2	19,1
Metanol	15	25	24,4	4,8	2,5
Tolueno	3	5	4,1	2,8	18,9
p-Xileno	2	5	4,0	2,4	19,5
Clorofórmio	31	35	27,0	8,7	22,8

Tabela 23- Resultados obtidos para o teste ao LOQ em amostras de urina

Substância	LOQ	Concentração (mg/L)	Média	CV (%)	Erro (%)
Acetaldeído	12	25	22,2	2,9	11,1
Acetato de Etilo	14	25	20,1	2,5	19,5
Acetona	23	25	25,9	2,5	3,6
Acetonitrilo	15	25	23,3	2,0	6,8
1-Butanol	3	25	20,1	2,5	19,5
2-Propanol	10	25	24,6	1,9	1,6
Éter	25	25	20,7	2,8	17,3
Metanol	15	25	27,7	5,2	10,7
Tolueno	3	5	5,4	7,9	7,9
p-Xileno	2	5	5,3	8,0	5,5
Clorofórmio	31	35	33,3	3,9	4,7

Tabela 24- Resultados obtidos para o teste ao LOQ em amostras de humor vítreo

Substância	LOQ	Concentração (mg/L)	Média	CV (%)	Erro (%)
Acetaldeído	12	25	24,8	1,7	0,9
Acetato de Etilo	14	25	20,5	0,8	18,0
Acetona	23	25	24,9	1,7	0,5
Acetonitrilo	15	25	23,3	2,8	6,7
1-Butanol	3	25	28,7	0,9	14,6
2-Propanol	10	25	24,7	1,1	1,2
Éter	25	25	20,7	2,1	17,3
Metanol	15	25	27,4	2,8	9,5
Tolueno	3	5	5,4	6,1	8,8
p-Xileno	2	5	5,5	6,7	9,2
Clorofórmio	31	35	28,9	3,5	17,4

Verificou-se que foram cumpridos os requisitos previstos para o teste efetuado ao LOQ para todas as substâncias estudadas, obtendo-se coeficientes de variação

inferiores a 20% com a exceção do clorofórmio, que apresentou um erro de cerca de 23% nas determinações efetuadas na amostra de sangue. Apesar disso, o respectivo coeficiente de variação manteve-se próximo de 9%.

Em anexo (Anexo 7.7), apresenta-se sob a forma de tabelas os resultados obtidos para cada uma das substâncias.

3.3.3.10 Estabilidade

A fim de verificar a estabilidade das substâncias em estudo procedeu-se, numa primeira fase, à avaliação das retas de calibração preparadas com os padrões à temperatura de trabalho do laboratório e com estes refrigerados, tendo-se constatado que para a substância clorofórmio apenas se cumpriam os critérios de aceitação quando as análises eram efetuadas com recurso à utilização de padrões refrigerados.

A estabilidade das amostras a ciclos de congelação/descongelação também foi avaliada para dois níveis de concentração (250 e 1500 mg/L para a mistura II, 100 e 800 mg/mL para a mistura III e 100 e 750 mg/L para o clorofórmio). Para tal, adicionaram-se os respetivos padrões das substâncias em estudo às amostras a analisar (sangue, urina e humor vítreo). Posteriormente foram congeladas e descongeladas ao fim de um e oito dias, respetivamente. As amostras foram analisadas de acordo com o procedimento descrito em 3.2.5.2 e os resultados obtidos foram comparados com os resultados das amostras preparadas e analisadas no mesmo dia. Não se verificaram diferenças significativas entre os resultados obtidos.

Parte IV – APLICAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO EM AMOSTRAS REAIS

Em capítulos anteriores apresentamos o desenvolvimento e validação de um método analítico por HS-GC/FID destinado a determinar, com exatidão, precisão e sensibilidade adequadas, onze substâncias voláteis. É de salientar o facto de este método utilizar apenas 100 µL de amostra e de se mostrar sensível na quantificação destas substâncias para valores que variam entre 2 mg/L para o p-xileno e 31 mg/L para o clorofórmio.

Constituía um dos objetivos deste trabalho aplicar o método desenvolvido e validado a casos reais, nos quais tivesse sido solicitada a pesquisa de uma ou mais das substâncias envolvidas neste estudo.

Assim sendo, após a sua validação, o método foi aplicado a todos os casos reais em que houve suspeita da presença de substâncias voláteis, relativos ao Serviço de Toxicologia Forense da Delegação do Centro do INML, durante o período correspondente ao ano letivo 2011/2012 (Tabela 25). Em seis dos treze casos analisados tinha sido solicitada a pesquisa de substâncias voláteis. Nos restantes casos, apesar de não ter sido solicitado este tipo de análise mas tendo-se constatado, após a realização da determinação de alcoolémia, a presença de picos desconhecidos, decidiu-se aplicar este ensaio. É ainda de salientar que, dos seis casos, cinco foram analisados de imediato por GC-HS/FID; no outro aplicou-se a metodologia GC-MS, com recurso à qual foi possível detetar a presença de tolueno em sangue. *A posteriori*, e no âmbito deste trabalho, procedeu-se à quantificação deste composto por GC-HS/FID.

Tabela 25- Apresentação dos casos reais analisados.

Caso	S	I	Inf.	Análises Solicitadas	Resultados Voláteis (mg/L)		
					Sangue	Urina	Humor vítreo
1	F	80	MN	A/MD/P/V	Acetona_Negativa	Acetona <50*	S/Amostra
2	M	73	AV	A/DA/MD/V	Negativo**	Negativo**	S/Amostra
3	M	53	S	DA/MD/V	Tolueno = 41	S/Amostra	S/Amostra
4	F	--	AS	A/MD/P/V	Éter_Negativo	Éter_Negativo	S/Amostra
5	M	19	D	A/DA/MD/P	Acetona=553 Isopropanol=67	Acetona=558 Isopropanol=50	Acetona=433 Isopropanol<50*
6	M	62	D	A/DA/MD/P	Acetona=160	Acetona = 595	S/Amostra
7	F	53	D	A/MD/V	Negativo**	Negativo**	Negativo**
8	M	69	D	A/MD/V	Acetona <50* Acetaldeído <50* Metanol <50*	Acetona <50* Acetaldeído<50* Metanol = 60	S/Amostra
9	M	84	D	A/MD	Acetona = 148 Isopropanol <50* Acetaldeído <50*	Acetona = 152 Isopropanol< 50 Acetaldeído<50*	S/Amostra
10	M	46	MN	A/MD	Acetona=470	S/Amostra	S/Amostra

(continuação da Tabela 25)

Caso	S	I	Inf.	Análises Solicitadas	Resultados Voláteis (mg/L)		
					Sangue	Urina	Humor vítreo
11	M	59	D	A/DA/MD/P	Acetona=394 Isopropanol <50* Acetaldeído <50* Metanol <50*	Acetona = 352 Isopropanol<50* Metanol <50*	S/Amostra
12	M	56	D	A/MD	Acetona=245 Isopropanol=152 Acetaldeído=71	Acetona=373 Isopropanol=82 Acetaldeído<50*	S/Amostra
13	M	64	MN	A/AD/MD	S/Amostra	Acetona <50* Acetaldeído<50*	S/Amostra

Abreviaturas utilizadas nesta tabela: M (Masculino); F (Feminino); MN (Morte Natural); S (Suicídio); D (Causa desconhecida); AS (Abuso Sexual); AV (Acidente de Viação); A (Alcoolemia); DA (Drogas de Abuso); MD (Medicamentos); P (Pesticidas); V (Voláteis); -- (Informação não disponível); S/ Amostra (Sem Amostra).

* <1° Calibrador

** Negativo para as substâncias pesquisadas

Parte V – CONCLUSÕES

A detecção, identificação e quantificação de substâncias voláteis é de grande relevância quer no âmbito clínico quer no âmbito forense. Com esse objetivo, desenvolveu-se um procedimento com recurso à tecnologia HS-GC/FID, a qual possibilitou uma maior abrangência no número de substâncias voláteis detetadas e quantificadas.

Os resultados obtidos na determinação e validação do método permitem concluir o seguinte:

- O método desenvolvido e validado com recurso a um cromatógrafo de gases, equipado com um detetor de ionização de chama e acoplado a um injetor de *headspace*, para a detecção, identificação, confirmação e quantificação de onze substâncias voláteis (acetaldeído, acetato de etilo, acetona, acetonitrilo, 1-butanol, clorofórmio, éter, metanol, 2-propanol, tolueno e p-xileno), em diferentes amostras biológicas (sangue, urina e humor vítreo), provou ser específico e sensível, com valores adequados de precisão e exatidão. Os resultados obtidos para os limites de detecção e quantificação também se revelaram apropriados, apresentando respostas analíticas lineares para as gamas de trabalho estudadas.
- Esta metodologia provou ser pouco morosa, comparativamente à maioria das técnicas utilizadas na determinação de um elevado número de substâncias, uma vez que todos os compostos estudados, incluindo o n-propanol (padrão interno), eluíram num intervalo de tempo de 15 minutos.
- É de salientar que o método provou ser seletivo e sensível para um reduzido volume de amostra (100 µL), o que constitui uma vantagem evidente. Esta questão é de extrema importância em toxicologia forense dada a vulgar

escassez de amostra face às solicitações de diferentes tipos de análise no âmbito de um só processo forense. Acresce ainda o facto de não ser necessário aplicar qualquer procedimento extrativo por se tratar de uma técnica de *headspace*.

- É ainda de referir, que ao longo deste trabalho foram constatados e ultrapassados alguns desafios técnicos, podendo as soluções encontradas revelar-se importantes em futuros desenvolvimentos quer deste quer de outros trabalhos similares, tais como:
 - ✓ Constatou-se que em algumas soluções as perdas dos compostos de interesse eram significativas, originando problemas ao nível da precisão ou exatidão dos resultados. Por esse motivo, verificou-se a necessidade de utilizar soluções devidamente refrigeradas, uma vez que só assim se cumpriam os critérios de aceitação utilizados na avaliação das curvas de calibração;
 - ✓ Tendo em consideração a elevada diversidade das características físico-químicas das onze substâncias estudadas tornou-se necessário desenvolver condições cromatográficas específicas, nomeadamente a introdução de um gradiente térmico com o objetivo de melhorar a separação cromatográfica. Além disso, otimizaram-se outros aspetos como foi o caso da introdução de um intervalo de tempo, após cada análise cromatográfica (*post-run time*) de 3 min, com o objetivo de garantir a reprodutibilidade, em análises sequenciais, dos tempos de retenção de cada uma das substâncias, o que não se revela necessário nas condições habituais de utilização do equipamento (análises realizadas em condições isotérmicas).

- ✓ Alguns compostos (e.g. tolueno) não exibiam um comportamento reprodutível, do ponto de vista cromatográfico, quando se utilizava a água como solvente na preparação das soluções. Este facto resultava da sua pouca ou praticamente nenhuma solubilidade em água, tendo-se optado por alterar o procedimento de preparação das respetivas soluções escolhendo-se um solvente adequado às características de solubilidade das substâncias afetadas.

No futuro, e com vista ao desenvolvimento deste trabalho, seria pertinente incluir outras substâncias voláteis, metabolitos ou até isómeros das já estudadas (e.g. o- e m-xileno). Também se poderá considerar a sua aplicação a outras amostras biológicas (e.g. órgãos).

Parte VI – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alexander, C.B; **McBay**, A.J.; **Hudson**, R.P. – Isopropanol and isopropanol deaths – ten years experience. *J Forensic Sci* 27 (1982) 541-548. Cit. por **Baselt**, R.C. - Disposition of toxic drugs and chemicals in man. 6th ed. Foster City: Biomedical Publications (2002) 574-576.

Argo, A. [et.al] - A fatal case of a paint thinner ingestion: Comparison between toxicological and histological findings. *Am J Forensic Med Pathol.* 31 (2010) 86-191.

Bailey, D.N. - Detection of isopropanol in acetonemic patients not exposed to isopropanol. *J Toxicol Clin Toxicol.* 28 (1990) 459–466.

Baselt, R.C. - Disposition of toxic drugs and chemicals in man. 6th ed. Foster City: Biomedical Publications (2002) 5-6; 12-15; 147; 205-207; 417-418; 574-576; 689-691, 1120-1124; 1198-1200.

Baydala, L. [et.al] - Inhalant abuse. *Paediatr Child Health.* 15 (2010) 443-448.

Bennett, J.R. [et.al]– Acute methy alcohol poisoning: a review based on experiences in an outbreak of 323 cases. *Medicin* 32 (1953) 431-463. Cit. por **Baselt**, R.C. - Disposition of toxic drugs and chemicals in man. 6th ed. Foster City: Biomedical Publications (2002) 689-691.

Brouette, T.; **Anton**, R. - Clinical review of inhalants. *Am J Addict.* 10 (2001) 79–94.

Campbell, J.E. – Deaths associated with anesthesia. *J. Forensic Sci.* 5 (1960) 501-549. Cit. por **Moffat**, A.C. [et.al] - Clarke’s analysis of drug and poisons in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material. 3th ed. Pharmaceutical Press. (2004) 993.

Causon, R. - Validation of chromatographic methods in biomedical analysis. Viewpoint and discussion. *J Chromatogr B.* 689 (1997) 175-180.

Collison I.B. - Elevated post mortem ethanol concentrations in an insulin-dependent diabetic. *J Anal Toxicol.* 29 (2005) 762–764.

Coopman, V.A.; **Gordonnier**, J.A.; **Meyere**, C.A. - Fatal workplace accident involving ethyl acetate: a distribution study. *Forensic Sci Int.* 154 (2005) 92–95.

Cox, D. [et.al] - Distribution of ether in two post mortem cases. *J Anal Toxicol.* 30 (2006) 635-663.

Dadgar, D.; Burnett, P.E.- Issues in evaluation of bioanalytical method selectivity and drug stability. *J Pharm Biomed Anal* 14 (1995) 23-31.

Dawling, S. - Gas chromatography. In **Moffat, A.C.** [et.al] - Clarke's analysis of drug and poisons in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material. 3th ed. Pharmaceutical Press. (2004)

Davis, P.L.; Cortivo, L.A; Maturo, J - Endogenous isopropanol: forensic and biochemical implications. *J Anal Toxicol.* 8 (1984) 209–212.

DiMaio, D.; DiMaio, V.J. - Forensic pathology, 2nd ed. Boca Raton, FL: CRC Press (1993) 450–451.

Esmail, A. [et.al] - Deaths from volatile substances abuse in those under 18 years: results from a national epidemiological study. *Archives of Disease in Childhood.* 69 (1993) 356-360.

Eurachem. The fitness for purpose of analytical methods – A laboratory guide to method validation and related topics (1998).

Feltraco, L.L.; Antunes, M.; Linden, R.- Determinação de etanol e voláteis relacionados em sangue e fluido oral por microextração em fase sólida em headspace associada à cromatografia gasosa com detetor de ionização em chama. *Química Nova.* 32 (2009) 2401-2406.

Flanagan, R.J.; Strrte, P.J.; Ramsey, J.D. - Volatile substance abuse; practical guidelines for analytical investigation of suspected cases and interpretation of results, UNDCP Technical Series N° 5, United Nations Drug Control Programme, Vienna (1997).

Flanagan, R.J.; Pounder D.J.- A chloroform-related death: analytical and forensic aspects. *Forensic Sci Int.* 197 (2010) 89-96.

Foulconer, J.A. - Correlation of concentrations of ether in arterial blood with electro-encephalographic patterns occurring during ether-oxygen and during nitrous oxide, oxygen and ether anesthesia of human surgical patients. *Anesthesiology* 13

(1952) 361–369. Cit. por **Baselt**, R.C. - Disposition of toxic drugs and chemicals in man. 6th ed. Foster City: Biomedical Publications (2002) 417-418.

Franco, M. Confirmação da presença de Drogas de Abuso em Amostras Biológicas em Contexto Forense. Dissertação de Mestrado em Medicina Legal e Ciências Forenses, Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa. (2006).

Fry, B.T.; Taylor, T.; Hathway, D.E. - Pulmonary elimination of chloroform and its metabolite in man. Arch. Int. Pharm. Ther. 196 (1972) 196-198. Cit. por **Baselt**, R.C. - Disposition of toxic drugs and chemicals in man. 6th ed. Foster City: Biomedical Publications (2002) 205-207.

Gaillard, Y. [et.al] - A case of drug-facilitated sexual assault leading to death by chloroform poisoning. Int J Legal Med. 120 (2006) 241–245.

Gamis, A.S.; Wasserman, G.S. - Acute acetone intoxication in a pediatric patient. Pediatr Emerg Care. 4 (1988) 24-26.

Garnier, R. - Acute poisoning with industrial products. Rev Prat. 50 (2000) 377-384.

Gaulier, J.M. [et.al] - Analytical aspects of volatile substance abuse (VSA). J Forensic Sci. 48 (2003) 880-882.

Harger R.N.; Johnson S.L.; Bridwell, E.G. – Detection and estimation of methanol, with results in human cases of methanol poisoning. J. Biol. Chem. 23 (1938) 50-51. Cit. por **Baselt**, R.C. - Disposition of toxic drugs and chemicals in man. 6th ed. Foster City: Biomedical Publications. (2002) 689-691.

Hartmann, C. [et al] - Validation of bioanalytical chromatographic methods. J Pharm Biomed Anal. 17 (1998) 193-218.

Hobara, T. [et.al] - Three cases of thinner-sniffing and estimating the fatal concentration of toluene by toxicokinetics. Problems of Forensic Sciences. 43 (2000) 105-111.

International Conference on Harmonization (ICH). Definitions and terminology ICH Q2A [Documento na internet]. ICH; 1994 [citado em 2012 Abril 18]. Disponível em <http://www.ich.org>

International Conference on Harmonization (ICH). Validation of analytical methods: Methodology ICH Q2B [Documento na internet]. ICH; 1996 [citado em 2012 Abril 18]. Disponível em <http://www.ich.org>.

International Conference on Harmonization (ICH). Validation of analytical procedures: Text and Methodology ICH Q2(R₁) [Documento na internet]. ICH; 2005 [citado em 2012 Abril 16]. Disponível em <http://www.ich.org>.

International Organization for Standardization / International Electrotechnical Commission (ISO/IEC). ISO/IEC 17025:1999 — General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. Geneve (Switzerland) (1999).

Jenkins, J., [et.al] - Evaluation of isopropanol concentrations in the presence of acetone in post mortem biological. J Anal Toxicol. 32 (2008) 719–720.

Jones, A.W., [et.al] - Two fatalities from ingestion of acetonitrile: limited specificity of analysis by headspace gas chromatography. J. Anal. Toxicol. 16 (1992) 104-106.

Jones, A.W. [et.al] - Concentrations of Acetone in Venous Blood Samples from Drunk Drivers, Type-I Diabetic Outpatients, and Healthy Blood Donors. J Anal Toxicol. 17 (1993) 182-185.

Jones, A.E.; Summers, R.L. - Detection of isopropyl alcohol in a patient with diabetic ketoacidosis. J Emerg Med. 19 (2000) 165–168.

Jones, G. Post mortem toxicology. In **Moffat, A.C.** [et.al] - Clarke's analysis of drug and poisons in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material. 3th ed. Pharmaceutical Press. (2004) 191- 218.

Kim, N.Y.; Park, S.W.; Sush, J.K. - Two fatal cases of dichloromethane or chloroform poisoning. J Forensic Sci. 41 (1996) 527-529.

Kintz, P [et.al] - An unusual fatal intoxication with n-butyl alcohol. Bull Int Asso Forensic Toxicol. 27 (1997) 6.

Klaassen, C.D.; Watkins III, J. - Casarett and Doull's toxicology. The basic science of poisons. 5th ed. McGraw-Hill. (1996).

Korsten, M.A. [et.al] – High blood acetaldehyde levels after ethanol administration. *New Eng. J. Med.* 292 (1975) 386-389. Cit. por **Baselt**, R.C. - Disposition of toxic drugs and chemicals in man. 6th ed. Foster City: Biomedical Publications (2002) 5-6.

Kugelberg, F.C.; Jones, A.W. - Interpreting results of ethanol analysis in post mortem specimens: a review of the literature, *Forensic Sci Int.* 165 (2007) 10-29.

Lindner, W.; Wainer, I.W. - Requirements for initial assay validation and publication. *J. Chromatogr B.* (1998) 707-709.

Lush, C.B. [et.al] –The analysis of blood in cases of suspected solvent abuse, with a review of results during the period October 1977 to July 1979. *Forensic Toxicol.* (1979) 304-313. Cit. por **Baselt**, R.C. - Disposition of toxic drugs and chemicals in man. 6th ed. Foster City: Biomedical Publications (2002) 1120-1124.

Marjot, R.; Mcleod, A.A. - Chronic non-neurological toxicity from volatile substance abuse. *Hum Toxicol.* 8 (1989) 301–306.

Martínez, M.A.; Ballesteros, S. - An unusual case of drug-facilitated sexual assault using aromatic solvents. *J Anal Toxicol.* 30 (2006) 449-453.

Martínez, M.A.; Ballesteros, S. - Toxicological findings in two planned complex suicide cases: ingestion of petroleum distillates and subsequent hanging. *J Anal Toxicol.* 33 (2009) 336-342.

Meadows, R.; Vergheses, A. - Medical complications of glue sniffing. *South Med J.* 56 (1996) 455 – 462.

Miller, J.N. - Basic statistical methods for analytical chemistry. Part 2, calibration and regression methods. A review. *Analyst.* 116 (1991) 3-14.

Moffat, A.C. [et.al] - Clarke's analysis of drug and poisons in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material. 3th ed. Pharmaceutical Press. (2004) 574-575; 579; 993; 999; 1145-1146; 1235; 1650-1651; 1706-1707.

Molina, D.K. - A characterization of sources of isopropanol detected on post mortem toxicologic analysis. *J Forensic Sci.* 55 (2010) 998–1002.

Monticelli, F. [et.al] - Another case of diethyl ether intoxication?: a case report focusing on toxicological analysis. *Leg Med.* 13 (2011) 254-258.

Morris, L.E.; Frederickson, E.L.; Orth, O.S. – Differences in the concentration of chloroform in the blood of man and dog during anesthesia. *J. Pharm. Exp. Ther.* 101 (1951) 56-62. Cit. por **Baselt, RC.** - Disposition of toxic drugs and chemicals in man. 6th ed. Foster City: Biomedical Publications (2002) 205-207.

Nashelsky, M.B. [et.al] - Homicide facilitated by inhalation of chloroform. *J Forensic Sci.* 40 (1995) 134-138.

NP-INML-009 – Recomendações para colheita e Acondicionamento de Amostras em Toxicologia Forense. Revisão 00, documento interno aprovado para os Serviços de Toxicologia Forense do INML, I.P.

Peters, F.T.; Maurer, H.H.- Bioanalytical method validation and its implications for forensic and clinical toxicology – a review. *Accred Qual Assur.* (2002) 441-449.

Pontes, H. [et.al] - GC determination of acetone, acetaldehyde, ethanol and methanol in biological matrices and cell culture. *J Chromatogr Science.* 47 (2009) 272-278.

Ragheb, A.A.S.; Salhab, A.S.; Amr, S.S. - A case report and review of literature. *Am J Forensic Med Pathol.* 7 (1986) 327-329.

Ramsey, J. [et.al] - An introduction to the practice, prevalence and chemical toxicology of volatile substance abuse. *Human Toxicol.* 8 (1989) 261-269.

Ramu, A.; Rosenbaum, J. ; Blaschke, T.F. - Disposition of acetone following acute acetone intoxication. *West J Med.* 129 (1978) 429–432.

Ribani, M. [et.al] - Validação em métodos cromatográficos e electroforéticos. *Quím Nova.* 27 (2007) 771-780.

Rinsky, R.A. - Benzene and leukemia: An epidemiologic risk assessment. *Environ Health Perspect.* 82 (1989) 189–191.

Risse. M. [et.al] - Multiple homicides as a result of chloroform poisoning: case report and experimental study. *Forensic Sci Int.* 124 (2001) 209-213.

Rosenberg, N.L. [et.al] - Neuropsychologic impairment and MRI abnormalities associated with chronic solvent abuse. *J Toxicol Clin Toxicol.* 40 (2002) 21–34.

Sevcik, P.; Hep, A.; Peslová, M. - Intravenous xylene poisoning. *Intensive Care Med.* 18 (1992) 377-378.

Silvilotti, M.L.A. Ethanol, isopropanol, and methanol. In: Dart RC, editor. *Medical toxicology*, 3rd edn. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins. (2004) 1215–1216.

Society of Forensic Toxicologists/American Academy of Forensic Sciences (SOFT/AAFS). Forensic toxicology laboratory guidelines [Documento na internet] Mesa (AZ): SOFT/AAFS; (2002) [citado em 2012 Abril 10]. Disponível em http://www.soft-tox.org/?pn=publications&sp=Laboratory_Guidelines

Steffee, C.H.; Davis G.J.; Nicol, K.K. - A whiff of death; fatal volatile solvent inhalation abuse. *South Med J.* 89 (1996) 879-884.

Swanson, J.R.; Krasselt, W.G. - An acetonitrile-related death. *J Forensic Sci.* 39 (1994) 271-279.

Thompson, M.; Ellison, S.; Wood, R. – Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical report), *Pure Appl Chem.* 74 (2002) 835-855.

TIAFT, The International Association of Forensic Toxicologists. Reference blood level list of therapeutic and toxic substances. [Documento na internet] TIAFT. 2004 [citado em 2012 Julho]. Disponível aos membros da TIAFT em <http://www.tiaft.org>.

Vogt, C. R.; Liao, J.C.; Sun, A.Y. – Extraction and determination of chloroform in rat blood and tissues by gas chromatography-electron-capture detection: Distribution of chloroform in the animal body. *Clin. Chem.* 26 (1980) 66-68.

Ward, M.E.; Meyerhein, R.F. - Diethyl ether, a chemical asphyxiant used as a prelude to homicide: a report of three cases. *J Forensic Sci.* 42 (1997) 344-348.

Widmark, E.M.P. – Studies in the acetone concentration in blood, urine, and alveolar air. *Biochem, J.* 13 (1919) 430-445. Cit. por **Baselt, R.C.** - Disposition of

toxic drugs and chemicals in man. 6th ed. Foster City: Biomedical Publications (2002) 12-14.

Wiśiewski, M. [et.al] - Oral intoxication with xylene-a case report. *Przegl Lek.* 64 (2007) 324-325.

Wu Chen, N.B.; Donoghue, E.R; Schaffer, M.I. – Methanol intoxications : Distribution in post mortem tissues and fluids including vitreous humor. *J Forensic Sci.* 30 (1985) 213-216. Cit. por **Baselt, R.C.** - Disposition of toxic drugs and chemicals in man. 6th ed. Foster City: Biomedical Publications (2002) 689-691.

Wu, L.; Ringwalt, C. - Inhalant use and disorders among adults in the United States. *Drug Alcohol Depend.* 85 (2006) 1-11.

Zetting, G [et.al]– Survival after poisoning due to intake of ten times lethal dose of acetone. *Dtsch. Med. Woch.* 122 (1997) 1489-1492. Cit. por **Baselt, RC.** - Disposition of toxic drugs and chemicals in man. 6th ed. Foster City: Biomedical Publications (2002) 12-14.

Zuba, D. [et.al] - Concentration of ethanol and other volatile compounds in the blood of acutely poisoned alcoholics. *Alcohol.* 26 (2002) 17-22.

Parte VII – ANEXOS – Resultados do Procedimento de Validação

7.1 Experiência efetuada à temperatura do injetor

Acetaldeído 1000mg/L	Método 40 50 60 70 80	Área_FID1A 31,09769 46,70485 60,32219 73,14662 125,82977	Acetaldeído 100mg/L	Método 40º HS 50º HS 60º HS 70º HS 80º HS	Área_FID1A 2,97471 4,58726 5,86698 6,71929 12,03294	Acetaldeído 50mg/L	Método 40º HS 50º HS 60º HS 70º HS 80º HS	Área_FID1A 1,46736 2,27756 2,77291 3,42637 4,22437	Acetaldeído 10mg/L	Método 40º HS 50º HS 60º HS 70º HS 80º HS	Área_FID1A 0,3014 0,483749 0,355636 0,420899 0,417908
Metanol 1000mg/L	Método 40 50 60 70 80	Área_FID1A 9,06601 15,19067 20,55196 35,0751 87,34496	Metanol 100mg/L	Método 40º HS 50º HS 60º HS 70º HS 80º HS	Área_FID1A 0,859112 1,2966 2,49352 3,24216 8,07791	Metanol 50mg/L	Método 40º HS 50º HS 60º HS 70º HS 80º HS	Área_FID1A 0,478691 0,667092 1,3482 1,8985 3,26401	Metanol 10mg/L	Método 40º HS 50º HS 60º HS 70º HS 80º HS	Área_FID1A xxxx xxxx 0,392729 0,511932 0,990439
Éter 1000mg/L	Método 40 50 60 70 80	Área_FID1A 1071,24255 1371,75378 1320,1344 1329,34851 1270,55505	Éter 100mg/L	Método 40º HS 50º HS 60º HS 70º HS 80º HS	Área_FID1A 103,7712 132,9458 128,85683 132,45795 155,06479	Éter 50mg/L	Método 40º HS 50º HS 60º HS 70º HS 80º HS	Área_FID1A 52,57134 67,5153 67,57715 66,82823 76,5518	Éter 10mg/L	Método 40º HS 50º HS 60º HS 70º HS 80º HS	Área_FID1A 9,50698 12,82764 12,45409 11,43387 15,36659
Acetona 1000mg/L	Método 40 50 60 70 80	Área_FID1A 61,90128 95,98767 126,97543 164,84381 322,36426	Acetona 100mg/L	Método 40º HS 50º HS 60º HS 70º HS 80º HS	Área_FID1A 5,7507 8,9613 12,4101 15,19069 30,21066	Acetona 50mg/L	Método 40º HS 50º HS 60º HS 70º HS 80º HS	Área_FID1A 2,84106 4,41685 6,23765 8,1334 11,63836	Acetona 10mg/L	Método 40º HS 50º HS 60º HS 70º HS 80º HS	Área_FID1A 0,635931 0,977358 1,36873 1,74482 2,74102
Isopropanol 1000mg/L	Método 40 50 60 70 80	Área_FID1A xxxx xxxx 150,57 198,23 203,69063	Isopropanol 100mg/L	Método 40º HS 50º HS 60º HS 70º HS 80º HS	Área_FID1A xxxx xxxx 11,24634 13,14208 18,36272	Isopropanol 50mg/L	Método 40º HS 50º HS 60º HS 70º HS 80º HS	Área_FID1A xxxx xxxx 4,422147 5,37684 6,74977	Isopropanol 10mg/L	Método 40º HS 50º HS 60º HS 70º HS 80º HS	Área_FID1A xxxx xxxx xxxx 0,7879 1,311918
Acetonitrilo 1000mg/L	Método 40 50 60 70 80	Área_FID1A 82,79455 66,28735 82,79455 111,69108 229,34871	Acetonitrilo 100mg/L	Método 40º HS 50º HS 60º HS 70º HS 80º HS	Área_FID1A 8,51235 5,86327 8,51235 9,89263 20,49721	Acetonitrilo 50mg/L	Método 40º HS 50º HS 60º HS 70º HS 80º HS	Área_FID1A 4,12528 2,87086 4,12528 5,29722 7,58176	Acetonitrilo 10mg/L	Método 40º HS 50º HS 60º HS 70º HS 80º HS	Área_FID1A 0,835158 0,616491 0,835158 0,996634 1,60881
PI (100mg/L) 1000mg/L	Método 40 50 60 70 80	Área_FID1A 26,04694 47,28735 69,54808 114,40451 163,36372	PI (100mg/L) 100mg/L	Método 40º HS 50º HS 60º HS 70º HS 80º HS	Área_FID1A 23,47878 42,636 77,32649 104,60761 173,35902	PI (100mg/L) 50mg/L	Método 40º HS 50º HS 60º HS 70º HS 80º HS	Área_FID1A 24,71245 42,09731 78,06692 114,76569 186,63794	PI (100mg/L) 10mg/L	Método 40º HS 50º HS 60º HS 70º HS 80º HS	Área_FID1A 26,84203 46,24963 78,68858 113,86193 205,61606
Acetato de Etilo 1000mg/L	Método 40 50 60 70 80	Área_FID1A 631,94 418,32214 363,7442 418,32214 631,94	Acetato de Etilo 100mg/L	Método 40º HS 50º HS 60º HS 70º HS 80º HS	Área_FID1A 64,64146 40,39594 35,87497 40,39594 64,64146	Acetato de Etilo 50mg/L	Método 40º HS 50º HS 60º HS 70º HS 80º HS	Área_FID1A 27,32533 21,700951 17,89516 21,700951 27,32533	Acetato de Etilo 10mg/L	Método 40º HS 50º HS 60º HS 70º HS 80º HS	Área_FID1A 6,42105 4,6987 3,111113 4,6987 6,42105
Clorofórmio 1000mg/L	Método 40 50 60 70 80	Área_FID1A 275,33255 313,30429 217,38129 214,92467 171,80991	Clorofórmio 100mg/L	Método 40º HS 50º HS 60º HS 70º HS 80º HS	Área_FID1A 30,70061 33,47229 27,11684 26,98169 28,76725	Clorofórmio 50mg/L	Método 40º HS 50º HS 60º HS 70º HS 80º HS	Área_FID1A 19,41358 20,86997 17,72216 15,3439 17,63909	Clorofórmio 10mg/L	Método 40º HS 50º HS 60º HS 70º HS 80º HS	Área_FID1A 2,25575 2,66854 2,1542 1,649 2,34197
Butanol 1000mg/L	Método 40 50 60 70 80	Área_FID1A 24,85935 53,5108 82,75484 131,96504 309,28296	Butanol 100mg/L	Método 40º HS 50º HS 60º HS 70º HS 80º HS	Área_FID1A 2,40299 4,28613 8,61701 11,70664 27,88156	Butanol 50mg/L	Método 40º HS 50º HS 60º HS 70º HS 80º HS	Área_FID1A 1,12774 2,00799 3,98797 6,23535 10,37658	Butanol 10mg/L	Método 40º HS 50º HS 60º HS 70º HS 80º HS	Área_FID1A xxxx xxxx xxxx 1,03479 2,06778
Tolueno 1000mg/L	Método 40 50 60 70 80	Área_FID1A 1272,79785 1367,44702 669,40234 736,67169 608,85443	Tolueno 100mg/L	Método 40º HS 50º HS 60º HS 70º HS 80º HS	Área_FID1A 151,68477 161,09837 124,67354 123,94995 130,18561	Tolueno 50mg/L	Método 40º HS 50º HS 60º HS 70º HS 80º HS	Área_FID1A 113,65427 118,65142 96,89741 82,18822 94,58639	Tolueno 10mg/L	Método 40º HS 50º HS 60º HS 70º HS 80º HS	Área_FID1A 10,3542 12,04722 9,28688 6,93805 9,89922
Xilol 1000mg/L	Método 40 50 60 70 80	Área_FID1A 1351,14221 1380,96484 528,35443 689,94153 612,04138	Xilol 100mg/L	Método 40º HS 50º HS 60º HS 70º HS 80º HS	Área_FID1A 109,63641 116,18526 89,37055 88,99673 93,70593	Xilol 50mg/L	Método 40º HS 50º HS 60º HS 70º HS 80º HS	Área_FID1A 103,93574 108,29437 88,07693 75,98064 86,57546	Xilol 10mg/L	Método 40º HS 50º HS 60º HS 70º HS 80º HS	Área_FID1A 10,33803 11,91711 9,19544 7,06659 9,839511

7.2 Linearidade

Tabela de cálculo para o estudo da linearidade das substâncias voláteis

Preparação da curva de calibração referente ao estudo da Linearidade do Acetaldeído

Calibradores (mg/L)	Solução Trabalho 19 500 mg/L	Solução Trabalho 9 750mg/L	Volume da solução Final (mL)
1 950	1000µL		10
1 755	900 µL		10
1 462	750 µL		10
1 170	600 µL		10
975		1000 µL	10
731		750 µL	10
488		500 µL	10
288		250 µL	10
98		100 µL	10
50		50 µL	10

Preparação da curva de calibração referente ao estudo da Linearidade do Acetato de Etilo

Calibradores (mg/L)	Solução Trabalho 19 800	Solução Trabalho 9 900	Volume da solução Final (mL)
1 980	1000 µL		10
1 782	900 µL		10
1 485	750 µL		10
1 188	600 µL		10
990		1000 µL	10
742,5		750 µL	10
495		500 µL	10
247,5		250 µL	10
99		100 µL	10
49,5		50 µL	10

Preparação da curva de calibração referente ao estudo da Linearidade do Acetona

Calibradores (mg/L)	Solução Trabalho 19 750 mg/L	Sol. Trabalho 9 875mg/L	Volume da solução Final (mL)
1 975	1000 µL		10
1 778	900 µL		10
1 481	750 µL		10
1 185	600 µL		10
988		1000 µL	10
741		750 µL	10
494		500 µL	10
247		250 µL	10
98		100 µL	10
49		50 µL	10

Preparação da curva de calibração referente ao estudo da Linearidade do Acetonitrilo

Calibradores (mg/L)	Solução Trabalho 19 500 mg/L	Solução Trabalho 9 750mg/L	Volume da solução Final (mL)
1 950	1000 µL		10
1 755	900 µL		10
1 462	750 µL		10
1 170	600 µL		10
975		1000 µL	10
731		750 µL	10
488		500 µL	10
288		250 µL	10
98		100 µL	10
50		50 µL	10

Preparação da curva de calibração referente ao estudo da Linearidade do Butanol

Calibradores (mg/L)	Solução Trabalho 20 250	Solução Trabalho 10 125	Volume da solução Final (mL)
2 025	1000 µL		10
1 822,5	900 µL		10
1 518,8	750 µL		10
1 215	600 µL		10
1012,5		1000 µL	10
759,4		750 µL	10
506,2		500 µL	10
253,1		250 µL	10
101,2		100 µL	10
50,6		50 µL	10

Preparação da curva de calibração referente ao estudo da Linearidade do 2-propanol

Calibradores (mg/L)	Sol. Trabalho 19 650	Sol. Trabalho 9 825	Volume da solução Final (mL)
1 965	1000 µL		10
1 768	900 µL		10
1 474	750 µL		10
1 179	600 µL		10
982		1000 µL	10
737		750 µL	10
491		500 µL	10
245		250 µL	10
98		100 µL	10
49		50 µL	10

Preparação da curva de calibração referente ao estudo da Linearidade do Éter

Calibradores (mg/L)	Solução Trabalho 19 964	Solução Trabalho 9 982	Volume da solução Final (mL)
1 996,4	1000 µL		10
1 796,8	900 µL		10
1 497,3	750 µL		10
1 197,8	600 µL		10
998,2		1000 µL	10
748,6		750 µL	10
499,1		500 µL	10
249,5		250 µL	10
109,8		110 µL	10
4,96		50 µL	10

Preparação da curva de calibração referente ao estudo da Linearidade do Metanol

Calibradores (mg/L)	Solução Trabalho 19 800 mg/L	Solução Trabalho 9 900mg/L	Volume da solução Final (mL)
1 980	1000µL		10
1 782	900 µL		10
1 485	750 µL		10
1 180	600 µL		10
990		1000 µL	10
742		750 µL	10
495		500 µL	10
248		250 µL	10
99		100 µL	10
50		50 mL	10

Preparação da curva de calibração referente ao estudo da Linearidade do clorofórmio

Calibradores (mg/L)	Solução Trabalho 14 700	Solução Trabalho 1470	Volume da solução Final (mL)
999,6	680 µL		10
852,6	580 µL		10
646,8	440 µL		10
514,5	350 µL		10
382,2	260 µL		10
220,5	150 µL		10
102,9	70 µL		10
80,8		550 µL	10
61,7		500 µL	10
51,4		350 µL	10

Preparação da curva de calibração referente ao estudo da Linearidade do Tolueno

Calibradores (mg/L)	Solução Trabalho 10 022	Solução Trabalho 1 020	Solução Trabalho 100,2	Volume da solução Final (mL)
1 020	1000 µL			10
801,8	800 µL			10
601,3	600 µL			10
501,1	500 µL			10
370,8	370 µL			10
180,4	180 µL			10
100,2	100 µL			10
75,2	75 µL			10
20,4		200 µL		10
10,2		100 µL		10
1			100 µL	10

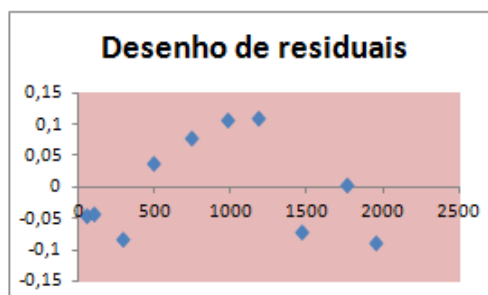
Preparação da curva de calibração referente ao estudo da Linearidade do p-Xyleno

Calibradores (mg/L)	Solução Trabalho 9 988	Solução Trabalho 998	Solução Trabalho 99,9	Volume da solução Final (mL)
998	1000 µL			10
799	800 µL			10
799	800 µL			10
599,3	600 µL			10
499,4	500 µL			10
374,5	375 µL			10
179,8	180 µL			10
99,9	100 µL			10
74,9	75 µL			10
19,96		200 µL		10
9,98		100 µL		10
1			100 µL	10

Estudo da linearidade do acetaldeído

SUMÁRIO DOS RESULTADOS

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,99807432
Quadrado de R	0,99615234
Quadrado de R ajustado	0,99567138
Erro-padrão	0,08285327
Observações	10



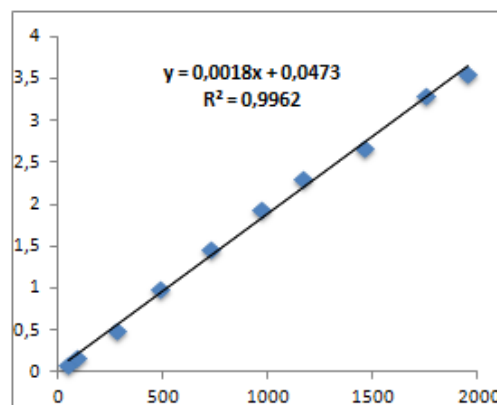
ANOVA

	gl	SQ	MQ	F	F de significância
Regressão	1	14,21799253	14,2179925	2071,18538	6,00226E-11
Residual	8	0,054917315	0,00686466		
Total	9	14,27290985			

	Coefficientes	Erro-padrão	Stat t	valor P	95% inferior	95% superior
Interceptar	0,04733422	0,044847445	1,05544961	0,32204861	-0,056084175	0,150752613
Variável X 1	0,00184732	4,05912E-05	45,5102778	6,0023E-11	0,001753715	0,001940923

RESULTADO RESIDUAL

Observação	Y previsto	Residuais
1	0,13970017	-0,0465781
2	0,22837148	-0,04205571
3	0,57936208	-0,0824678
4	0,94882587	0,037700771
5	1,39772437	0,077610286
6	1,8484702	0,10536485
7	2,20869739	0,110180018
8	2,74811453	-0,0730293
9	3,28937898	0,003531997
10	3,64960617	-0,09025701

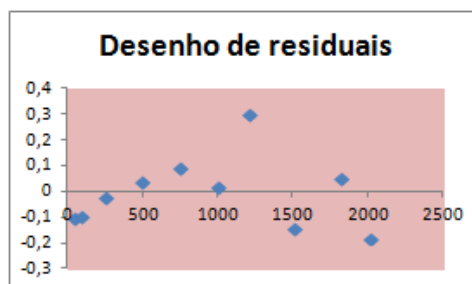


C Teórica	Acetaldeído	n-propanol	Subs/P.I.
50	17,09513	183,57765	0,09312207
98	37,32017	200,30602	0,18631577
288	96,18931	193,58104	0,49689427
488	182,68668	185,1817	0,98652664
731	269,8222	182,88881	1,47533466
975	350,27454	179,27539	1,95383505
1170	433,77911	187,06427	2,31887741
1462	527,81256	197,30682	2,67508523
1755	643,34369	195,37233	3,29291098
1950	702,91693	197,48468	3,55934916

Estudo da linearidade do acetato de etilo

SUMÁRIO DOS RESULTADOS

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,998717936
Quadrado de R	0,997437515
Quadrado de R ajustado	0,997117205
Erro-padrão	0,149047042
Observações	10



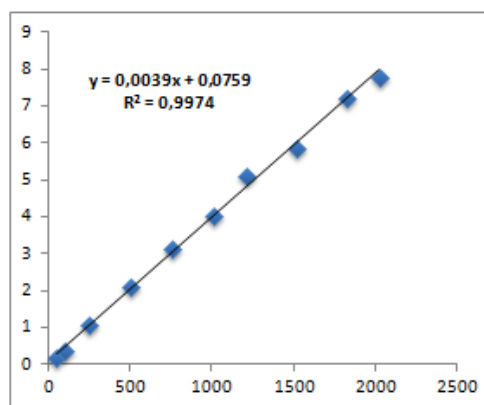
ANOVA

	gl	SQ	MQ	F	F de significância
Regressão	1	69,17691009	69,1769101	3113,97009	1,18018E-11
Residual	8	0,177720166	0,02221502		
Total	9	69,35463026			

	Coefficientes	Erro-padrão	Stat t	valor P	95% inferior	95% superior
Interceptar	0,075850053	0,080029126	0,94778059	0,37098736	-0,108697443	0,260397549
Variável X 1	0,003896348	6,98233E-05	55,8029577	1,1802E-11	0,003735335	0,004057361

RESULTADO RESIDUAL

Observação	Y previsto	Residuais
1	0,274563801	-0,0977828
2	0,469381201	-0,09024831
3	1,061626098	-0,01682021
4	2,047402144	0,042679922
5	3,033178189	0,093190723
6	4,018954235	0,023957735
7	4,80991288	0,307784476
8	5,994402674	-0,14023286
9	7,174996119	0,054381193
10	7,965954765	-0,17690986

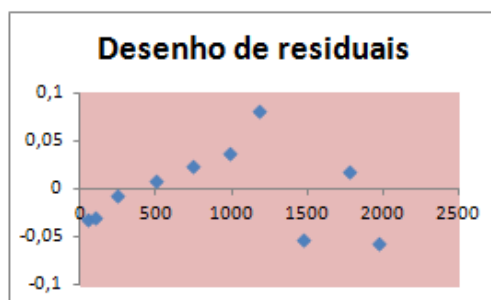


C Teórica	Acetato de Etilo	n-propanol	Subs/P.I.
51	32,45304	183,57765	0,176781
101	75,9426	200,30602	0,37913289
253	202,25461	193,58104	1,04480589
506	387,04495	185,1817	2,09008207
759	571,77789	182,88881	3,12636891
1012	724,79462	179,27539	4,04291197
1215	957,33832	187,06427	5,11769736
1519	1155,06763	197,30682	5,85416982
1822	1412,42029	195,37233	7,22937731
2025	1538,21704	197,48468	7,7890449

Estudo da linearidade da acetona

SUMÁRIO DOS RESULTADOS

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,99923229
Quadrado de R	0,99846517
Quadrado de R ajustado	0,99827331
Erro-padrão	0,04617695
Observações	10



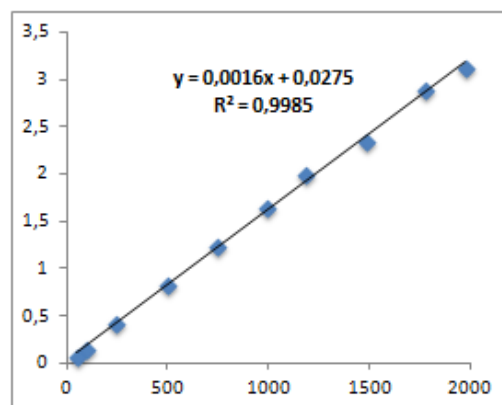
ANOVA

	gl	SQ	MQ	F	F de significância
Regressão	1	11,09718334	11,09718334	5204,3	1,51833E-12
Residual	8	0,017058484	0,002132311		
Total	9	11,11424182			

	Coefficientes	Erro-padrão	Stat t	valor P	95% inferior	95% superior
Interceptar	0,02751105	0,024792725	1,109642111	0,29939	-0,029661074	0,084683177
Variável X 1	0,00159963	2,21737E-05	72,14083348	1,5E-12	0,001548498	0,001650763

RESULTADO RESIDUAL

Observação	Y previsto	Residuais
1	0,10589294	-0,03072666
2	0,18427483	-0,02876867
3	0,42261977	-0,00650856
4	0,81772849	0,0090457
5	1,21283721	0,024543142
6	1,60794593	0,037540438
7	1,92307313	0,08331361
8	2,39656374	-0,0525701
9	2,87165398	0,019500977
10	3,18678118	-0,05536987



C Teórica	Acetona	n-propanol	Subs/P.I.
49	13,79885	183,57765	0,075166285
98	31,14882	200,30602	0,15550616
247	80,55124	193,58104	0,416111206
494	153,10345	185,1817	0,82677419
741	226,30302	182,88881	1,237380351
988	294,99521	179,27539	1,645486366
1185	375,32327	187,06427	2,006386735
1481	462,48593	197,30682	2,343993634
1778	564,85168	195,37233	2,891154955
1975	618,40576	197,48468	3,131411307

Estudo da linearidade do acetonitrilo

SUMÁRIO DOS RESULTADOS

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,999426202
Quadrado de R	0,998852733
Quadrado de R ajustado	0,998709324
Erro-padrão	0,01869282
Observações	10



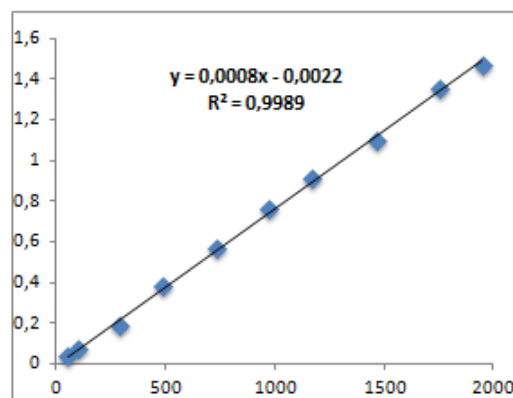
ANOVA

	gl	SQ	MQ	F	F de significância
Regressão	1	2,433752668	2,433752668	6965,09074	4,73932E-13
Residual	8	0,002795372	0,000349422		
Total	9	2,436548041			

	Coefficientes	Erro-padrão	Stat t	valor P	95% inferior	95% superior
Interceptar	-0,00222006	0,010118191	-0,2194124	0,83182356	-0,025552647	0,021112534
Variável X 1	0,000764295	9,15794E-06	83,45711915	4,7393E-13	0,000743177	0,000785413

RESULTADO RESIDUAL

Observação	Y previsto	Residuais
1	0,035994689	-0,00166856
2	0,072680844	-0,00059379
3	0,217896876	-0,02827526
4	0,370755858	0,007202655
5	0,55647952	0,014950575
6	0,742967477	0,016616145
7	0,892004984	0,016950906
8	1,115179096	-0,02083025
9	1,339117504	0,016672489
10	1,488155011	-0,0210249

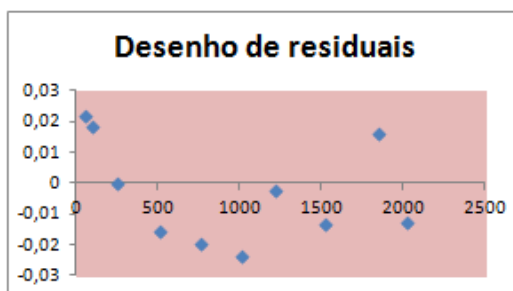


C Teórica	Acetonitrilo	n-propanol	Subs/P.I.
50	6,30151	183,57765	0,034326128
98	14,43947	200,30602	0,07208705
288	36,70715	193,58104	0,189621618
488	69,991	185,1817	0,377958513
731	104,50817	182,88881	0,571430095
975	136,17465	179,27539	0,759583622
1170	170,03317	187,06427	0,90895589
1462	215,92249	197,30682	1,094348842
1755	264,88385	195,37233	1,355789993
1950	289,73572	197,48468	1,467130109

Estudo da linearidade do 1-butanol

SUMÁRIO DOS RESULTADOS

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,999854857
Quadrado de R	0,999709736
Quadrado de R ajustado	0,999673453
Erro-padrão	0,018814264
Observações	10



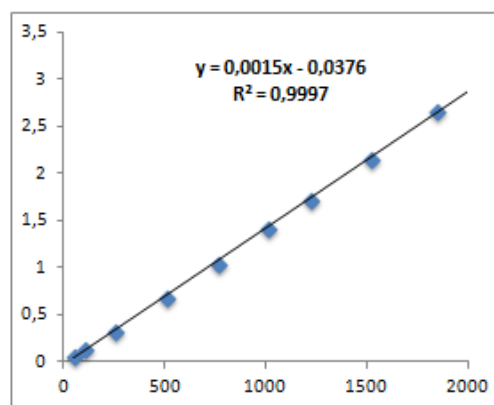
ANOVA

	gl	SQ	MQ	F	F de significância
Regressão	1	9,753141906	9,753141906	27553,0749	1,94126E-15
Residual	8	0,002831812	0,000353977		
Total	9	9,755973718			

	Coefficientes	Erro-padrão	Stat t	valor P	95% inferior	95% superior
Interceptar	-0,03759297	0,01008845	-3,72633787	0,00581823	-0,060856982	-0,01432897
Variável X 1	0,001456372	8,77379E-06	165,9911892	1,9413E-15	0,001436139	0,001476604

RESULTADO RESIDUAL

Observação	Y previsto	Residuais
1	0,036681991	0,022006968
2	0,109500584	0,018552804
3	0,330869107	-0,00021165
4	0,699331188	-0,01559119
5	1,067793269	-0,01986838
6	1,43625535	-0,02392612
7	1,731898838	-0,00221444
8	2,174635884	-0,01349388
9	2,649413111	0,016293573
10	2,911560046	-0,01299477

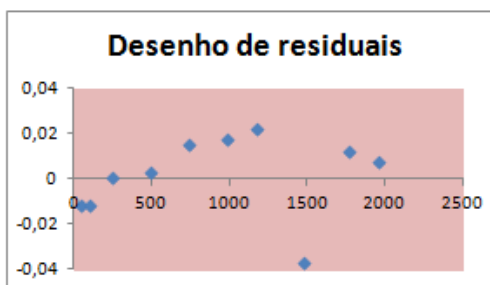


C Teórica	1-Butanol	n-propanol	Subs./P.I.
51	11,16778	190,28758	0,058688959
101	25,05688	195,67526	0,128053388
253	61,51923	186,05124	0,330657458
506	124,70288	182,38348	0,683739997
759	196,71843	187,72188	1,047924888
1012	261,76624	185,34364	1,412329228
1215	321,33615	185,77733	1,729684402
1519	402,65274	186,3148	2,161142003
1845	507,59531	190,41679	2,665706685
2025	593,91418	202,70023	2,930012364

Estudo da linearidade do 2-propanol

SUMÁRIO DOS RESULTADOS

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,99962851
Quadrado de R	0,99925716
Quadrado de R ajustado	0,9991643
Erro-padrão	0,01909797
Observações	10



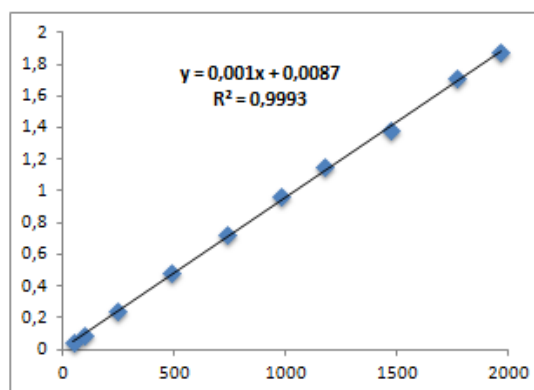
ANOVA

	gl	SQ	MQ	F	F de significância
Regressão	1	3,925034573	3,925034573	10761,4111	8,32874E-14
Residual	8	0,002917859	0,000364732		
Total	9	3,927952432			

	Coefficientes	Erro-padrão	Stat t	valor P	95% inferior	95% superior
Interceptar	0,00872184	0,010252998	0,850662498	0,41968735	-0,014921615	0,032365296
Variável X 1	0,0009563	9,21848E-06	103,7372215	8,3287E-14	0,000935042	0,000977558

RESULTADO RESIDUAL

Observação	Y previsto	Residuais
1	0,05558054	-0,01145349
2	0,10243924	-0,01136444
3	0,24301533	0,000489356
4	0,47826512	0,002955976
5	0,7135149	0,015314542
6	0,94780839	0,017907762
7	1,13619948	0,021908531
8	1,41830797	-0,03671578
9	1,69946015	0,011986039
10	1,88785124	0,007516573

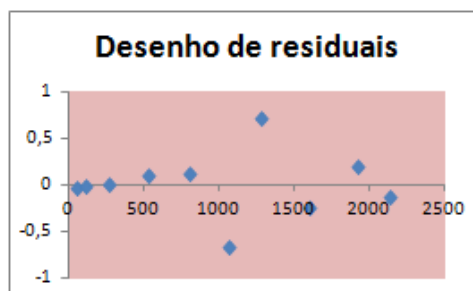


C Teórica	2-propanol	n-propanol	Subs/P.I.
49	8,10074	183,57765	0,044127049
98	18,24283	200,30602	0,091074796
245	47,13789	193,58104	0,243504684
491	89,11334	185,1817	0,481221093
737	133,29475	182,88881	0,728829446
982	173,12914	179,27539	0,965716153
1179	216,64063	187,06427	1,158108013
1474	272,59756	197,30682	1,381592182
1768	334,36923	195,37233	1,711446191
1965	370,64374	197,48468	1,876822749

Estudo da linearidade do éter

SUMÁRIO DOS RESULTADOS

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,998824705
Quadrado de R	0,997650791
Quadrado de R ajustado	0,99735714
Erro-padrão	0,367006945
Observações	10



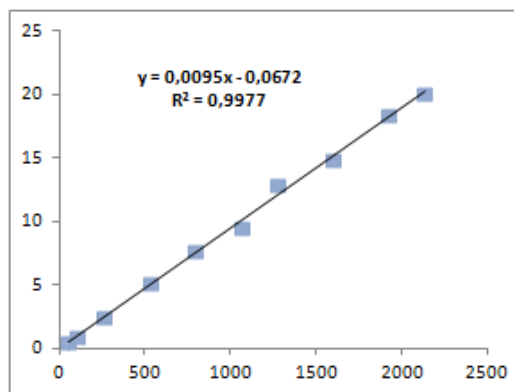
ANOVA

	gl	SQ	MQ	F	F de significância
Regressão	1	457,6099282	457,6099282	3397,40149	8,33591E-12
Residual	8	1,077552783	0,134694098		
Total	9	458,687481			

	Coefficientes	Erro-padrão	Stat t	valor P	95% inferior	95% superior
Interceptar	-0,06721685	0,197062864	-0,34109344	0,74181868	-0,521644629	0,387210928
Variável X 1	0,009489815	0,000162811	58,28723262	8,3359E-12	0,009114372	0,009865259

RESULTADO RESIDUAL

Observação	Y previsto	Residuais
1	0,435743354	-0,03487037
2	0,948193373	-0,01793496
3	2,4665638	0,006598964
4	5,009834266	0,09250765
5	7,543614917	0,114737445
6	10,08688538	-0,66563186
7	12,10821601	0,702322524
8	15,12597724	-0,25140529
9	18,20067735	0,190057762
10	20,2314978	-0,13638187

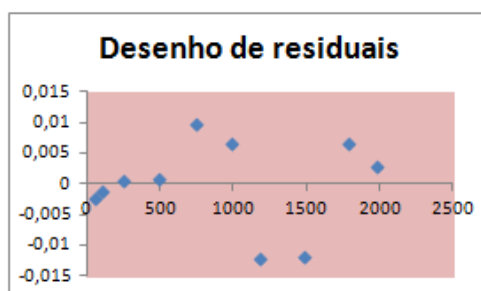


C Teórica	Éter	n-propanol	Subs/P.I.
53	73,59132	183,57765	0,400872982
107	186,33636	200,30602	0,930258412
267	478,75742	193,58104	2,473162764
535	944,86035	185,1817	5,102341916
802	1400,62695	182,88881	7,658352362
1070	1688,9989	179,27539	9,421253525
1283	2396,39404	187,06427	12,81053854
1601	2934,85449	197,30682	14,87457195
1925	3593,04077	195,37233	18,39073512
2139	3968,47754	197,48468	20,09511594

Estudo da linearidade do metanol

SUMÁRIO DOS RESULTADOS

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,99932144
Quadrado de R	0,99864333
Quadrado de R ajustado	0,99847375
Erro-padrão	0,00779116
Observações	10



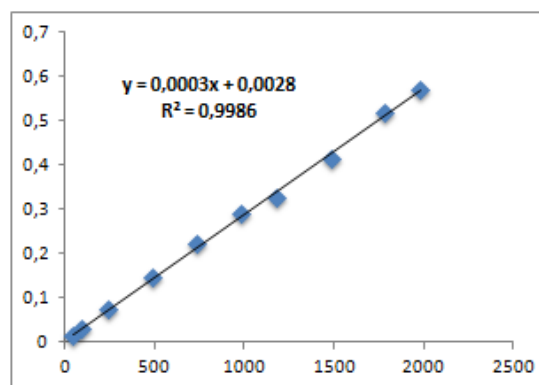
ANOVA

	gl	SQ	MQ	F	F de significância
Regressão	1	0,357462824	0,357462824	5888,80024	9,26805E-13
Residual	8	0,000485617	6,07021E-05		
Total	9	0,357948442			

	Coefficientes	Erro-padrão	Stat t	valor P	95% inferior	95% superior
Interceptar	0,00276312	0,004183211	0,660526999	0,52747346	-0,006883378	0,012409626
Variável X 1	0,00028663	3,73515E-06	76,73851862	9,268E-13	0,000278017	0,000295243

RESULTADO RESIDUAL

Observação	Y previsto	Residuais
1	0,01709463	-0,00231026
2	0,0311395	-0,00119197
3	0,07384738	0,00050835
4	0,14464501	0,000933414
5	0,21544264	0,00983588
6	0,2865269	0,006481364
7	0,34098661	-0,0120031
8	0,42840878	-0,01188851
9	0,51353791	0,006708276
10	0,57029067	0,002926557

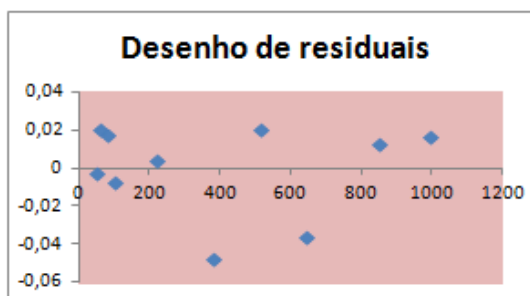


C Teórica	Metanol	n-propanol	Subs/P.I.
50	2,71408	183,57765	0,014784371
99	5,99867	200,30602	0,029947527
248	14,39386	193,58104	0,074355732
495	26,95846	185,1817	0,145578424
742	41,20092	182,88881	0,225278518
990	52,52917	179,27539	0,29300826
1180	61,54106	187,06427	0,328983509
1485	82,18229	197,30682	0,41652027
1782	101,64171	195,37233	0,520246188
1980	113,20162	197,48468	0,573217224

Estudo da linearidade do clorofórmio

SUMÁRIO DOS RESULTADOS

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,99909452
Quadrado de R	0,99818986
Quadrado de R ajustado	0,9979636
Erro-padrão	0,02569343
Observações	10



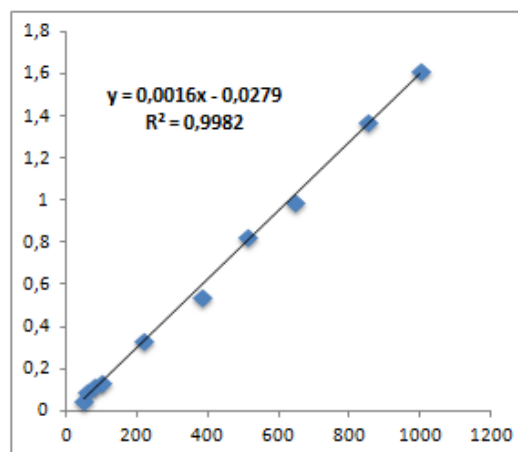
ANOVA

	gl	SQ	MQ	F	F de significância
Regressão	1	2,91229717	2,91229717	4411,55392	2,93778E-12
Residual	8	0,005281218	0,000660152		
Total	9	2,917578388			

	Coefficientes	Erro-padrão	Stat t	valor P	95% inferior	95% superior
Interceptar	-0,0279302	0,012578414	-2,22048418	0,05713893	-0,056936045	0,001075705
Variável X 1	0,00162988	2,45391E-05	66,41952967	2,9378E-12	0,001573288	0,001686463

RESULTADO RESIDUAL

Observação	Y previsto	Residuais
1	0,05584543	-0,00245361
2	0,07263315	0,020812229
3	0,10376377	0,017442551
4	0,13978402	-0,00699884
5	0,33145737	0,004291621
6	0,59500824	-0,04796504
7	0,81064076	0,0206138
8	1,02627329	-0,03586255
9	1,36170166	0,013462132
10	1,60129335	0,016657707



C Teórica	Clorofórmio	n-propanol	Subs/P.I.
51,4	10,25091	191,99403	0,053391816
61,7	17,82467	190,74962	0,093445376
80,8	22,98705	189,65224	0,12120632
102,9	25,99664	195,77968	0,13278518
220,5	64,49577	192,0952	0,335748993
382,2	105,86194	193,5166	0,547043199
514,5	156,94136	188,8006	0,831254562
646,8	189,39981	191,2336	0,990410733
852,6	262,48575	190,87599	1,375163791
999,6	312,28973	193,01556	1,617951061

Estudo da linearidade do tolueno

SUMÁRIO DOS RESULTADOS

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,998361666
Quadrado de R	0,996726017
Quadrado de R ajustado	0,996316769
Erro-padrão	0,388572857
Observações	10



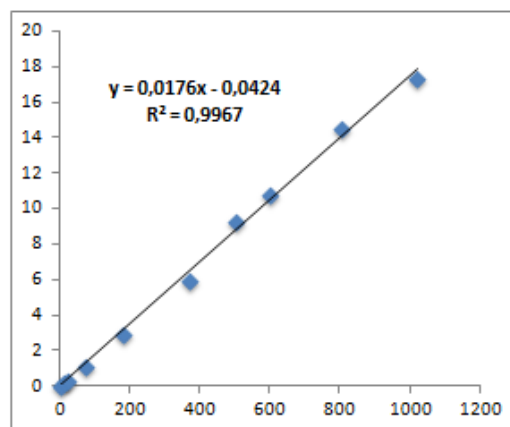
ANOVA

	gl	SQ	MQ	F	F de significância
Regressão	1	367,7344089	367,7344089	2435,50681	3,14582E-11
Residual	8	1,20791092	0,150988865		
Total	9	368,9423198			

	Coefficientes	Erro-padrão	Stat t	valor P	95% inferior	95% superior
Interceptar	-0,04243108	0,177166488	-0,23949832	0,81674126	-0,450977731	0,366115578
Variável X 1	0,017586933	0,000356365	49,35085419	3,1458E-11	0,016765153	0,018408712

RESULTADO RESIDUAL

Observação	Y previsto	Residuais
1	-0,02484414	0,040561786
2	0,136955635	0,026994564
3	0,316342347	0,033336739
4	1,28010625	-0,15126718
5	3,130251553	-0,1694417
6	6,464733961	-0,48123318
7	8,770380817	0,5355162
8	10,53259146	0,276106178
9	14,05877143	0,470128625
10	17,89624011	-0,58070203

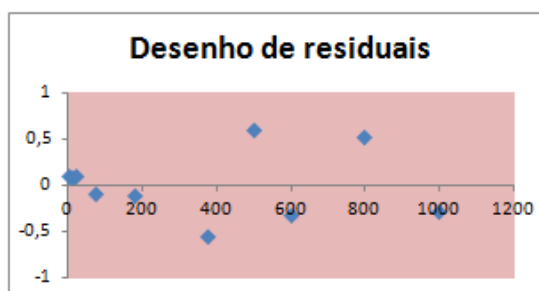


C Teórica	Tolueno	n-propanol	Subs./P.I.
1	2,91541	185,48648	0,015717642
10,2	30,03717	183,20911	0,163950199
20,4	66,20129	189,32013	0,349679086
75,2	205,66249	182,18938	1,128839068
180,4	561,33917	189,58974	2,960809852
370	1100,28723	183,88687	5,98350078
501,1	1776,61011	190,91229	9,305897017
601,3	2001,74097	185,19724	10,80869764
801,8	2743,75488	188,84808	14,52890006
1020	3572,22754	206,30185	17,31553808

Estudo da linearidade do p-xileno

SUMÁRIO DOS RESULTADOS

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,998554911
Quadrado de R	0,99711191
Quadrado de R ajustado	0,996750899
Erro-padrão	0,383439477
Observações	10



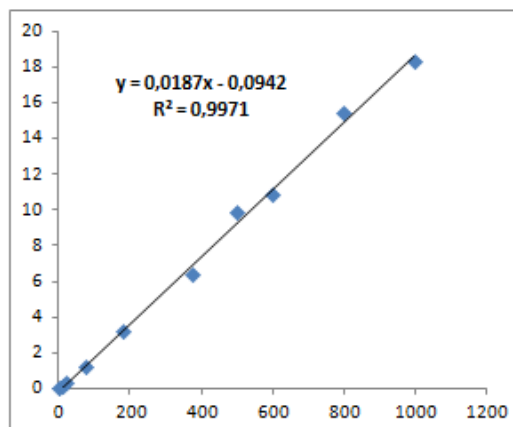
ANOVA

	gl	SQ	MQ	F	F de significância
Regressão	1	406,084858	406,084858	2761,99666	1,9046E-11
Residual	8	1,17620666	0,147025833		
Total	9	407,2610647			

	Coefficientes	Erro-padrão	Stat t	valor P	95% inferior	95% superior
Interceptar	-0,09419152	0,175403628	-0,5369987	0,60587704	-0,498673011	0,310289972
Variável X 1	0,018732432	0,000356437	52,55470157	1,9046E-11	0,017910488	0,019554377

RESULTADO RESIDUAL

Observação	Y previsto	Residuais
1	-0,07545909	0,092350022
2	0,092758157	0,081320632
3	0,279707833	0,090883345
4	1,308867674	-0,09956497
5	3,273899843	-0,11504626
6	6,92110445	-0,55749312
7	9,260785269	0,59506927
8	11,13215528	-0,32345764
9	14,87302205	0,525579519
10	18,60077611	-0,2896408



C Teórica	Tolueno	n-propanol	Subs/P.I.
1	3,13304	185,48648	0,016890935
9,98	31,89282	183,20911	0,174078789
19,96	70,16037	189,32013	0,370591178
74,9	220,32211	182,18938	1,209302705
179,8	598,88623	189,58974	3,158853586
374,5	1170,18457	183,88687	6,363611333
499,4	1881,60376	190,91229	9,855854539
599,3	2001,74097	185,19724	10,80869764
799	2907,99634	188,84808	15,39860156
998	3777,62109	206,30185	18,31113531

7.3 Limites de detecção e quantificação

Tabela de cálculo para o estudo dos LOD e LOQ das substâncias voláteis

Preparação da curva de calibração referente ao estudo da Limites do Acetaldeído

Calibradores (mg/L)	Sol. Trabalho 19 500 mg/L	Sol. Trabalho 9 750mg/L	Volume da solução Final (mL)
165,8		170 µL	10
107,2		110 µL	10
87,8		90 µL	10
73,1		75 µL	10
58,5		60 µL	10
48,8		50 µL	10
34,1		35 µL	10
24,4		25 µL	10
14,6		15 µL	10
9,8		10 µL	10

Preparação da curva de calibração referente ao estudo da Limites do Acetato de Etilo

Calibradores (mg/L)	Sol. Trabalho 19 800	Sol. Trabalho 9 900	Volume da solução Final (mL)
168,3		170 µL	10
108,9		110 µL	10
89,1		90 µL	10
74,3		75 µL	10
59,4		60 µL	10
49,5		50 µL	10
34,6		35 µL	10
24,8		25 µL	10
14,8		15 µL	10
9,9		10 µL	10

Preparação da curva de calibração referente ao estudo da Limites do Acetona

Calibradores (mg/L)	Sol. Trabalho 19 750 mg/L	Sol. Trabalho 9 875mg/L	Volume da solução Final (mL)
167,9		170 µL	10
108,6		110 µL	10
88,9		90 µL	10
74,1		75 µL	10
59,2		60 µL	10
49,4		50 µL	10
34,6		35 µL	10
24,7		25 µL	10
14,8		15 µL	10
9,9		10 µL	10

Preparação da curva de calibração referente ao estudo da Limites do Acetonitrilo

Calibradores (mg/L)	Sol. Trabalho 19 500 mg/L	Sol. Trabalho 9 750mg/L	Volume da solução Final (mL)
146,2		150 µL	10
131,6		135 µL	10
117		120 µL	10
102,4		105 µL	10
87,8		90 µL	10
73,1		75 µL	10
58,5		60 µL	10
34,1		35 µL	10
24,4		25 µL	10
19,5		20 µL	10

Preparação da curva de calibração referente ao estudo da Limites do Butanol

Calibradores (mg/L)	Sol. Trabalho 20 250	Sol. Trabalho 10 125	Volume da solução Final (mL)
202,5		200 µL	10
172,1		170 µL	10
111,4		110 µL	10
91,1		90 µL	10
75,9		75 µL	10
60,8		60 µL	10
50,6		50 µL	10
35,4		35 µL	10
25,3		25 µL	10
15,2		15 µL	10

Preparação da curva de calibração referente ao estudo da Limites do 2-propanol

Calibradores (mg/L)	Sol. Trabalho 19 650	Sol. Trabalho 9 825	Volume da solução Final (mL)
196,5		200 µL	10
167		170 µL	10
108,1		110 µL	10
88,4		90 µL	10
73,7		75 µL	10
58,9		60 µL	10
49,1		50 µL	10
34,4		35 µL	10
24,6		25 µL	10
14,7		15 µL	10

Preparação da curva de calibração referente ao estudo da Limites do Éter

Calibradores (mg/L)	Sol. Trabalho 9 982	Volume da solução Final (mL)
169,7	170 µL	10
109,8	110 µL	10
89,8	90 µL	10
74,9	75 µL	10
59,9	60 µL	10
49,6	50 µL	10
35	35 µL	10
25	25 µL	10
15	15 µL	10
10	10 µL	10

Preparação da curva de calibração referente ao estudo da Limites do Metanol

Calibradores (mg/L)	Sol. Trabalho 19 800	Sol. Trabalho 9 900	Volume da solução Final (mL)
168,3		170 µL	10
148,5		150 µL	10
133,6		135 µL	10
104		105 µL	10
88,9		90 µL	10
74,1		75 µL	10
59,2		60 µL	10
49,4		50 µL	10
24,7		25 µL	10
19,8		20 µL	10

Preparação da curva de calibração referente ao estudo da Limites do clorofórmio

Calibradores (mg/L)	Sol. Trabalho 14 700	Sol. Trabalho 1470	Volume da solução Final (mL)
220,5	150 µL		10
205,8	140 µL		10
147	100 µL		10
102,9		700 µL	10
91,1		620 µL	10
80,8		550 µL	10
61,7		500 µL	10
51,4		350 µL	10
39,7		270 µL	10
25,7		175 µL	10

Preparação da curva de calibração referente ao estudo dos Limites do Tolueno

Calibradores (mg/L)	Sol. Trabalho 10 022	Sol. Trabalho 1 020	Sol. Trabalho 100,2	Volume da solução Final (mL)
30,6		300µL		10
20,4		200µL		10
10,2		100µL		10
5,5			550µL	10
4,5			450µL	10
3,5			350µL	10
1,5			150µL	10
1			100µL	10
0,9			90µL	10
0,8			80µL	10

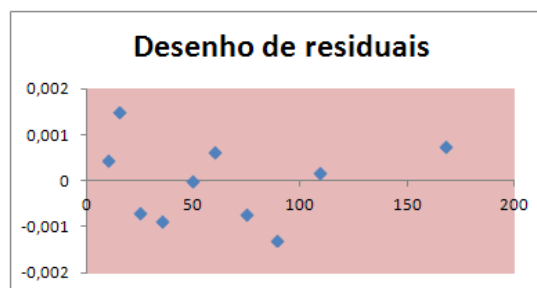
Preparação da curva de calibração referente ao estudo dos Limites do p-Xyleno

Calibradores (mg/L)	Sol. Trabalho 9 988	Sol. Trabalho 998	Sol. Trabalho 99,9	Volume da solução Final (mL)
29,9		300µL		10
20		200µL		10
10		100µL		10
5,5			550µL	10
4,5			450µL	10
3,5			350µL	10
1,5			150µL	10
1			100µL	10
0,9			90µL	10
0,7			70µL	10

Estudo dos LOD e LOQ do acetaldeído

SUMÁRIO DOS RESULTADOS

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,99995945
Quadrado de R	0,999918902
Quadrado de R ajustado	0,999908764
Erro-padrão	0,00095461
Observações	10



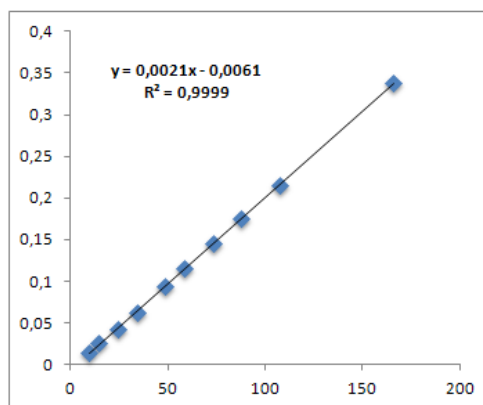
ANOVA

	gl	SQ	MQ	F	F de significância
Regressão	1	0,089886479	0,089886479	98637,6472	1,18282E-17
Residual	8	7,29024E-06	9,1128E-07		
Total	9	0,089893769			

	Coefficientes	Erro-padrão	Stat t	valor P	95% inferior	95% superior
Interceptar	-0,00610756	0,000510404	-11,96611862	2,19056E-06	-0,007284555	-0,004930565
Variável X 1	0,002071115	6,59452E-06	314,0663102	1,18282E-17	0,002055908	0,002086322

RESULTADO RESIDUAL

Observação	Y previsto	Residuais
1	0,014189371	0,000669053
2	0,024130725	0,001341619
3	0,044427655	-0,001153975
4	0,064517475	-0,001325358
5	0,094962871	-0,000126951
6	0,11505269	0,001003325
7	0,145290975	0,000160461
8	0,175736371	-0,000691249
9	0,215916009	-0,000396996
10	0,337283371	0,000520073



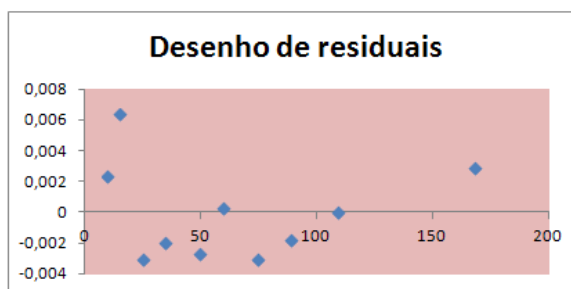
C Teórica	Acetaldeído	n-propanol	Subs/P.I.
9,8	2,87974	193,81195	0,014858423
14,6	5,03003	197,47025	0,025472343
24,4	8,33532	192,6187	0,04327368
34,1	12,51897	198,10968	0,063192117
48,8	18,1567	191,45383	0,094835919
58,5	22,39853	192,99758	0,116056015
73,1	27,67238	190,25168	0,145451436
87,8	33,56768	191,76587	0,175045121
107,2	41,78985	193,90331	0,215519013
165,8	64,98614	192,37856	0,337803443

LD = 2
LQ = 5

Estudo dos LOD e LOQ do acetato de etilo

SUMÁRIO DOS RESULTADOS

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,999884007
Quadrado de R	0,999768027
Quadrado de R ajustado	0,99973903
Erro-padrão	0,003297612
Observações	10



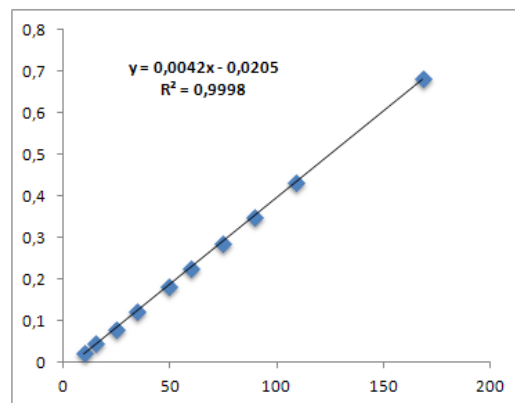
ANOVA

	gl	SQ	MQ	F	F de significância
Regressão	1	0,374930273	0,374930273	34478,73362	7,91863E-16
Residual	8	8,6994E-05	1,08742E-05		
Total	9	0,375017267			

	Coefficientes	Erro-padrão	Stat t	valor P	95% inferior	95% superior
Interceptar	-0,020549165	0,001762916	-11,65634832	2,67441E-06	-0,024614457	-0,016483873
Variável X 1	0,004165666	2,24341E-05	185,6845002	7,91863E-16	0,004113933	0,004217399

RESULTADO RESIDUAL

Observação	Y previsto	Residuais
1	0,020690925	0,002406825
2	0,041102686	0,006418852
3	0,082759343	-0,003014801
4	0,123582866	-0,001893558
5	0,185651285	-0,002637605
6	0,226891375	0,000372525
7	0,288959793	-0,002962056
8	0,350611645	-0,001705606
9	0,433091825	9,35088E-05
10	0,680532365	0,002921914



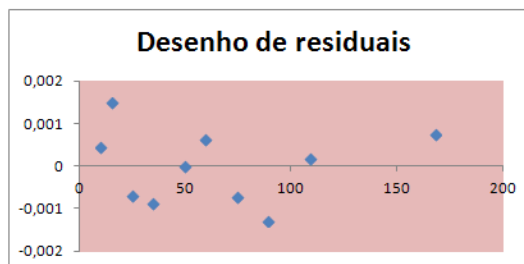
C Teórica	Acetato de Etilo	n-propanol	Subs/P.I.
9,9	4,47662	193,81195	0,02309775
14,8	9,38409	197,47025	0,047521538
24,8	15,36029	192,6187	0,079744542
34,6	24,10783	198,10968	0,121689309
49,5	35,03867	191,45383	0,18301368
59,4	43,86136	192,99748	0,2272639
74,3	54,41155	190,25168	0,285997737
89,1	66,90827	191,76587	0,348906038
108,9	83,99607	193,90331	0,433185333
168,3	131,48195	192,37856	0,683454279

LD = 3
LQ = 8

Estudo dos LOD e LOQ da acetona

SUMÁRIO DOS RESULTADOS

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,9999465
Quadrado de R	0,999893002
Quadrado de R ajustado	0,999879628
Erro-padrão	0,000926028
Observações	10



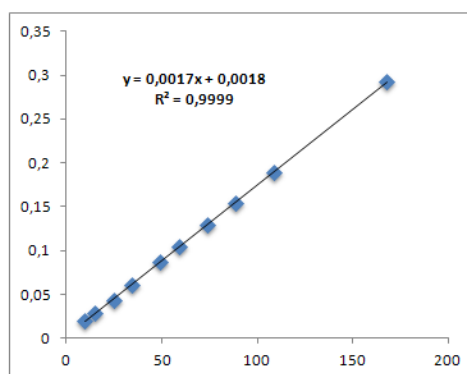
ANOVA

	gl	SQ	MQ	F	F de significância
Regressão	1	0,064108716	0,064108716	74759,92741	3,58406E-17
Residual	8	6,86022E-06	8,57528E-07		
Total	9	0,064115576			

	Coefficientes	Erro-padrão	Stat t	valor P	95% inferior	95% superior
Interceptar	0,0018101	0,000495144	3,655701848	0,006441075	0,000668295	0,002951906
Variável X 1	0,001727084	6,31654E-06	273,4226169	3,58406E-17	0,001712518	0,00174165

RESULTADO RESIDUAL

Observação	Y previsto	Residuais
1	0,018908236	0,000465285
2	0,02737095	0,00149041
3	0,044469086	-0,000678114
4	0,061567221	-0,0008821
5	0,087128071	-8,5286E-06
6	0,104053498	0,000648025
7	0,129787056	-0,000710824
8	0,155347905	-0,001279978
9	0,189371468	0,000191516
10	0,291787574	0,000764309



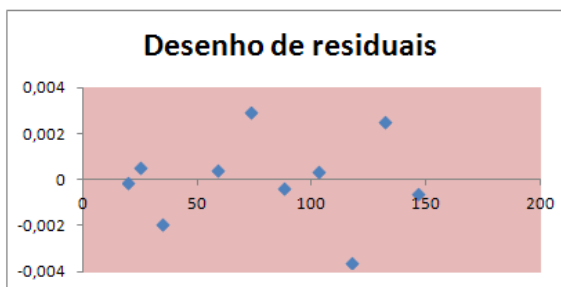
C Teórica	Acetona	n-propanol	Subs/P.I.
9,9	3,75482	193,81195	0,019373522
14,8	5,69926	197,47025	0,02886136
24,7	8,43496	192,6187	0,043790971
34,6	12,02231	198,10968	0,060685121
49,4	16,67937	191,45383	0,087119542
59,2	20,20713	192,99748	0,104701523
74,1	24,55697	190,25168	0,129076232
88,9	29,54497	191,76587	0,154067927
108,6	36,75689	193,90331	0,189562984
167,9	56,28071	192,37856	0,292551883

LD = 2
LQ = 5

Estudo dos LOD e LOQ do acetonitrilo

SUMÁRIO DOS RESULTADOS

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,998586155
Quadrado de R	0,99717431
Quadrado de R ajustado	0,996821098
Erro-padrão	0,002014244
Observações	10



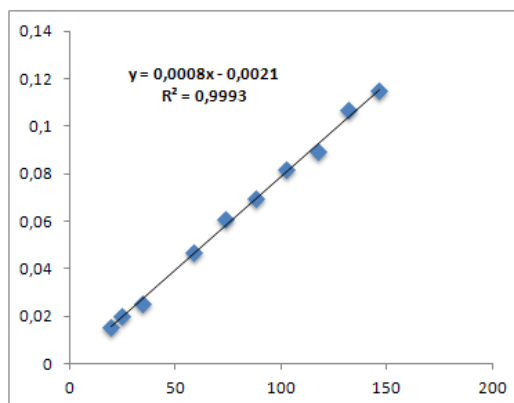
ANOVA

	gl	SQ	MQ	F	F de significância
Regressão	1	0,011454094	0,011454094	2823,16643	1,74521E-11
Residual	8	3,24574E-05	4,05718E-06		
Total	9	0,011486551			

	Coefficientes	Erro-padrão	Stat t	valor P	95% inferior	95% superior
Interceptar	9,18831E-05	0,001342509	0,068441334	0,947114052	-0,003003947	0,003187713
Variável X 1	0,000790237	1,48727E-05	53,13347749	1,74521E-11	0,000755941	0,000824534

RESULTADO RESIDUAL

Observação	Y previsto	Residuais
1	0,015501508	-0,000144467
2	0,01937367	0,000514313
3	0,027038971	-0,001940947
4	0,046320758	0,000402917
5	0,05785822	0,002895518
6	0,069474707	-0,000350462
7	0,081012169	0,000369426
8	0,092549632	-0,003618161
9	0,104087095	0,002478022
10	0,115624557	-0,000606159



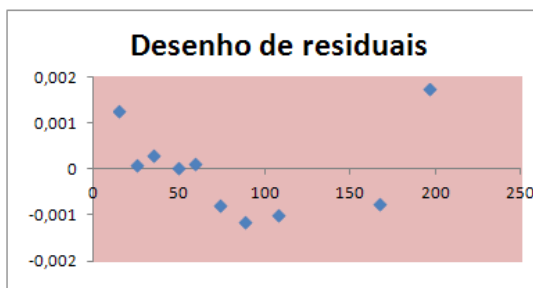
C Teórica	Acetonitrilo	n-propanol	Subs/P.I.
19,5	2,90286	189,0247	0,015357041
24,4	3,75932	194,30096	0,019887983
34,1	4,87657	178,45386	0,025098023
58,5	8,33802	181,90288	0,046723674
73,1	11,05128	190,56483	0,060753738
87,8	13,17265	189,12335	0,069124245
102,4	15,39116	191,40367	0,081381596
117	17,02181	184,39627	0,088931471
131,6	19,65021	186,25481	0,106565117
146,2	21,42273	184,5862	0,115018399

LD = 8
LQ = 25

Estudo dos LOD e LOQ do 1-butanol

SUMÁRIO DOS RESULTADOS

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,999689949
Quadrado de R	0,999379994
Quadrado de R ajustado	0,999302493
Erro-padrão	0,002254724
Observações	10



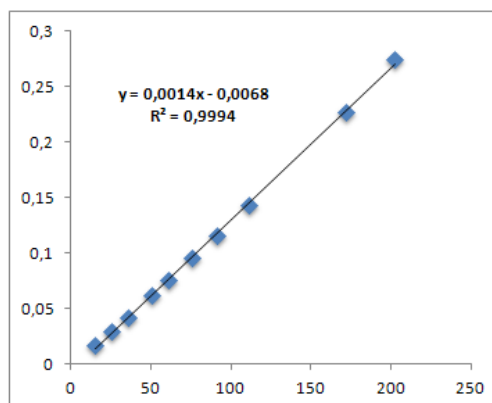
ANOVA

	gl	SQ	MQ	F	F de significância
Regressão	1	0,065555893	0,065555893	12895,10544	4,04156E-14
Residual	8	4,06702E-05	5,08378E-06		
Total	9	0,065596563			

	Coefficientes	Erro-padrão	Stat t	valor P	95% inferior	95% superior
Interceptar	-0,006825119	0,001240144	-5,503490556	0,000571387	-0,009684896	-0,003965343
Variável X 1	0,001371222	1,20752E-05	113,5566178	4,04156E-14	0,001343377	0,001399068

RESULTADO RESIDUAL

Observação	Y previsto	Residuais
1	0,014017456	0,00282179
2	0,027866799	0,001078314
3	0,041716141	0,000643677
4	0,062558717	4,46798E-05
5	0,076545182	-0,000761135
6	0,097250635	-0,001710453
7	0,11809321	-0,002266968
8	0,145929017	-0,002367518
9	0,229162196	-0,00135942
10	0,270847346	0,003877034



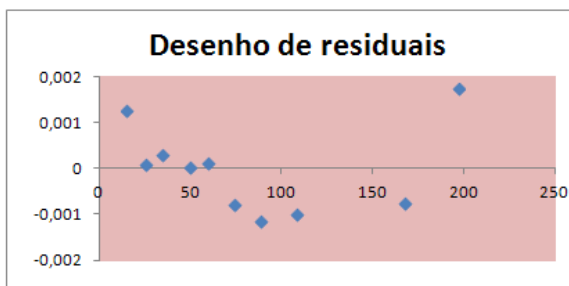
C Teórica	1-Butanol	n-propanol	Subs/P.I.
15,2	3,32525	197,47025	0,016839245
25,3	5,57537	192,6187	0,028945113
35,4	8,39189	198,10968	0,042359818
50,6	11,98566	191,45383	0,062603396
60,8	14,62613	192,99748	0,075784047
75,9	18,17668	190,25168	0,095540181
91,1	22,21152	191,76587	0,115826242
111,4	27,83705	193,90331	0,1435615
172,1	43,82437	192,37856	0,227802776
202,5	51,71048	188,22676	0,27472438

LD = 5
LQ = 16

Estudo dos LOD e LOQ do 2-propanol

SUMÁRIO DOS RESULTADOS

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,999881238
Quadrado de R	0,99976249
Quadrado de R ajustado	0,999732801
Erro-padrão	0,001009347
Observações	10



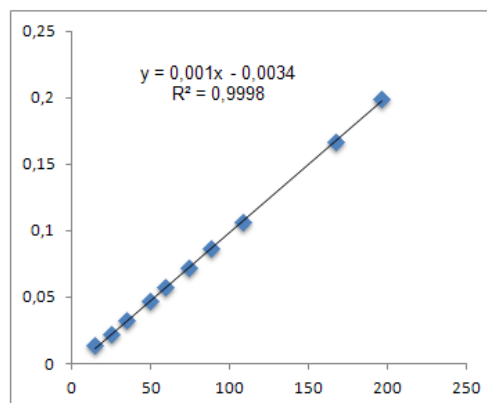
ANOVA

	gl	SQ	MQ	F	F de significância
Regressão	1	0,034307248	0,034307248	33674,78866	8,70216E-16
Residual	8	8,15025E-06	1,01878E-06		
Total	9	0,034315399			

	Coefficientes	Erro-padrão	Stat t	valor P	95% inferior	95% superior
Interceptar	-0,003374092	0,00055516	-6,077690777	0,000296684	-0,004654294	-0,00209389
Variável X 1	0,001022251	5,57064E-06	183,5069172	8,70216E-16	0,001009405	0,001035096

RESULTADO RESIDUAL

Observação	Y previsto	Residuais
1	0,011652991	0,001263183
2	0,021773271	9,63087E-05
3	0,031791326	0,000325631
4	0,046818409	4,42212E-05
5	0,056836464	0,000141637
6	0,071965772	-0,000765665
7	0,086992854	-0,001141655
8	0,10713119	-0,000970753
9	0,167341746	-0,000737058
10	0,197498136	0,00174415



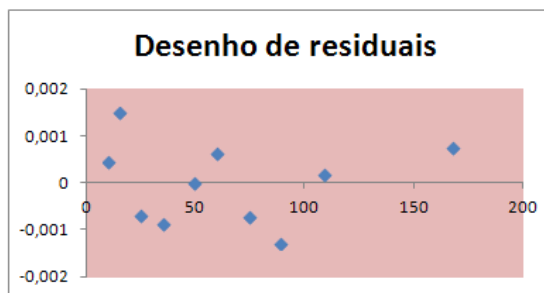
C Teórica	Isopropanol	n-propanol	Subs/P.I.
14,7	2,55056	197,47025	0,012916173
24,6	4,21249	192,6187	0,02186958
34,4	6,36268	198,10968	0,032116957
49,1	8,97203	191,45383	0,04686263
58,9	10,99663	192,99748	0,056978101
73,7	13,54594	190,25168	0,071200107
88,4	16,46333	191,76587	0,0858512
108,1	20,58486	193,90331	0,106160436
167	32,05117	192,37856	0,166604688
196,5	37,50273	188,22676	0,199242286

LD = 3
LQ = 10

Estudo dos LOD e LOQ do éter

SUMÁRIO DOS RESULTADOS

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,9992055
Quadrado de R	0,9984117
Quadrado de R ajustado	0,9982131
Erro-padrão	0,0230739
Observações	10



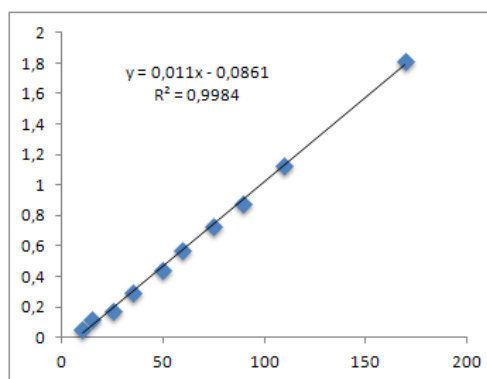
ANOVA

	gl	SQ	MQ	F	F de significância
Regressão	1	2,677326673	2,677326673	5028,75016	1,74138E-12
Residual	8	0,004259232	0,000532404		
Total	9	2,681585905			

	Coefficientes	Erro-padrão	Stat t	valor P	95% inferior	95% superior
Interceptar	-0,0860876	0,012330807	-6,981506645	0,000114739	-0,114522501	-0,057652718
Variável X 1	0,0110417	0,000155706	70,91368105	1,74138E-12	0,010682595	0,01140071

RESULTADO RESIDUAL

Observação	Y previsto	Residuais
1	0,0243289	0,02847727
2	0,0795372	0,03405421
3	0,1899537	-0,014635421
4	0,3003702	-0,011740216
5	0,4615784	-0,019801666
6	0,5719949	-0,003247667
7	0,7409322	-0,01318275
8	0,9054528	-0,024339383
9	1,1262858	-0,003116263
10	1,7876808	0,027531886



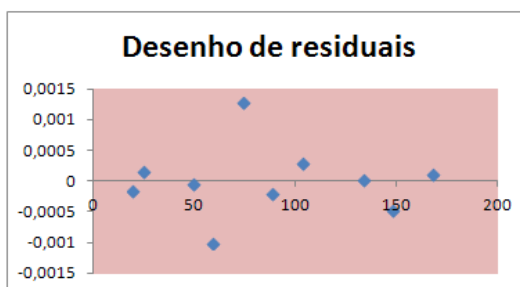
C Teórica	Éter	n-propanol	Subs/P.I.
10	10,23447	193,81195	0,052806187
15	22,43092	197,47025	0,113591389
25	33,76958	192,6187	0,175318284
35	57,1804	198,10968	0,288630015
49,6	84,57984	191,45383	0,441776694
59,6	109,76678	192,99748	0,568747219
74,9	138,45555	190,25168	0,727749421
89,8	168,96748	191,76587	0,881113412
109,8	217,7863	193,90331	1,123169584
169,7	349,20801	192,37856	1,815212724

LD = 7
LQ = 21

Estudo dos LOD e LOQ do metanol

SUMÁRIO DOS RESULTADOS

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,999211952
Quadrado de R	0,998424524
Quadrado de R ajustado	0,99822759
Erro-padrão	0,000618464
Observações	10



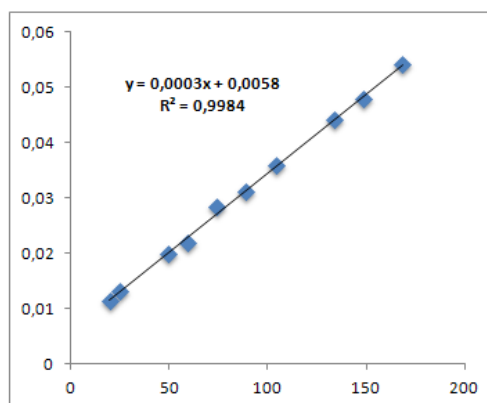
ANOVA

	gl	SQ	MQ	F	F de significância
Regressão	1	0,001939198	0,001939198	5069,831834	1,68569E-12
Residual	8	3,05998E-06	3,82497E-07		
Total	9	0,001942258			

	Coefficientes	Erro-padrão	Stat t	valor P	95% inferior	95% superior
Interceptar	0,005842218	0,000401289	14,55861912	4,85639E-07	0,004916844	0,006767593
Variável X 1	0,000286614	4,02533E-06	71,20275159	1,68569E-12	0,000277332	0,000295897

RESULTADO RESIDUAL

Observação	Y previsto	Residuais
1	0,011517181	-0,000161628
2	0,012921591	0,000155113
3	0,020000963	-3,18386E-05
4	0,022809783	-0,001007354
5	0,027080335	0,00127672
6	0,031322226	-0,00019261
7	0,035650101	0,000296385
8	0,044133883	2,22711E-05
9	0,048404436	-0,000474184
10	0,054079398	0,000117124



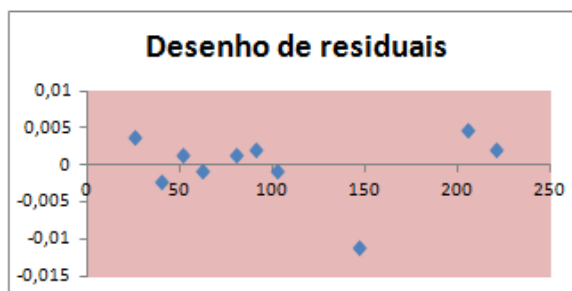
C Teórica	Metanol	n-propanol	Subs/P.I.
19,8	2,14648	189,0247	0,011355553
24,7	2,47182	194,30096	0,013076704
49,4	3,88002	192,32169	0,019969124
59,2	4,19308	181,90288	0,021802429
74,1	5,15823	190,56483	0,028357055
88,9	5,93221	189,12335	0,031129616
104	6,79832	191,40367	0,035946487
133,6	8,45165	186,25481	0,044156154
148,5	8,92724	184,5862	0,047930252
168,3	10,00393	173,45447	0,054196522

LD = 7
LQ = 22

Estudo dos LOD e LOQ do clorofórmio

SUMÁRIO DOS RESULTADOS

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,999096197
Quadrado de R	0,99819321
Quadrado de R ajustado	0,997967361
Erro-padrão	0,004734421
Observações	10



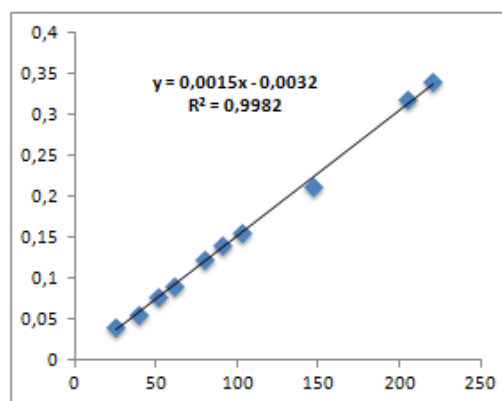
ANOVA

	gl	SQ	MQ	F	F de significância
Regressão	1	0,099067376	0,099067376	4419,74241	2,9161E-12
Residual	8	0,000179318	2,24147E-05		
Total	9	0,099246693			

	Coefficientes	Erro-padrão	Stat t	valor P	95% inferior	95% superior
Interceptar	-0,00322679	0,002821737	-1,14354709	0,28587448	-0,009733726	0,003280148
Variável X 1	0,001548898	2,32983E-05	66,48114327	2,9161E-12	0,001495172	0,001602624

RESULTADO RESIDUAL

Observação	Y previsto	Residuais
1	0,036579886	0,003737437
2	0,058264456	-0,00225082
3	0,076386561	0,001341544
4	0,092340208	-0,00092058
5	0,121924157	0,001341022
6	0,137877805	0,00209784
7	0,1561548	-0,00090994
8	0,224461195	-0,01117373
9	0,315536389	0,004605839
10	0,338305187	0,002131391



C Teórica	Clorofórmio	n-propanol	Subs/P.I.
25,7	7,96771	197,62498	0,040317322
39,7	10,82765	193,30383	0,056013634
51,4	14,15806	182,14853	0,077728105
61,7	17,08721	186,90964	0,091419629
80,8	22,54654	182,91086	0,12326518
91,1	26,88662	192,0807	0,139975646
102,9	30,77176	198,21436	0,155244857
147	40,36878	189,26935	0,213287466
205,8	63,41003	198,06831	0,320142228
220,5	67,3266	197,76547	0,340436579

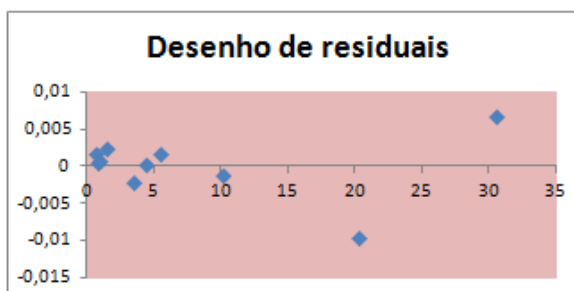
LD = 10

LQ = 31

Estudo dos LOD e LOQ do tolueno

SUMÁRIO DOS RESULTADOS

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,999649399
Quadrado de R	0,999298922
Quadrado de R ajustado	0,999211287
Erro-padrão	0,004458248
Observações	10



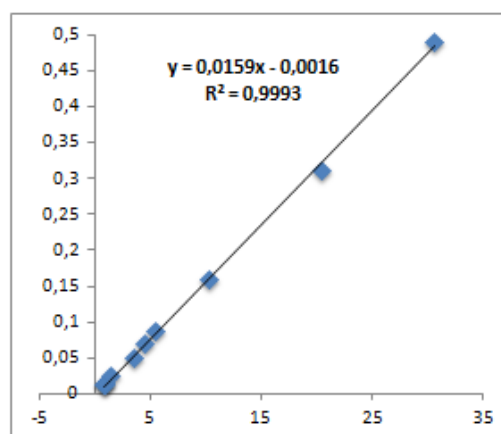
ANOVA

	gl	SQ	MQ	F	F de significância
Regressão	1	0,226645605	0,226645605	11402,9934	6,60763E-14
Residual	8	0,000159008	1,9876E-05		
Total	9	0,226804613			

	Coefficientes	Erro-padrão	Stat t	valor P	95% inferior	95% superior
Interceptar	-0,00161222	0,001833065	-0,87951872	0,40476382	-0,005839271	0,002614841
Variável X 1	0,015855993	0,000148485	106,7847996	6,6076E-14	0,015513584	0,016198401

RESULTADO RESIDUAL

Observação	Y previsto	Residuais
1	0,011072579	0,001646265
2	0,012658178	0,000281088
3	0,014243777	0,000693766
4	0,022171774	0,00238042
5	0,053883759	-0,00237715
6	0,069739752	0,000100829
7	0,085595744	0,001623524
8	0,16011891	-0,00131091
9	0,321850034	-0,00974817
10	0,483581159	0,006710344



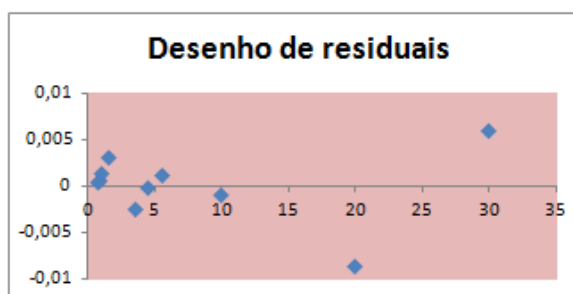
C Teórica	Tolueno	n-propanol	Subs/P.I.
0,8	2,36966	186,31096	0,012718844
0,9	2,37283	183,38211	0,012939267
1	2,74202	183,56566	0,014937543
1,5	4,62081	188,20355	0,024552194
3,5	9,91926	192,58229	0,051506605
4,5	13,293	190,33347	0,06984058
5,5	15,65037	179,43707	0,087219269
10,2	29,19602	183,84477	0,158807999
20,4	57,66664	184,76865	0,312101864
30,6	90,59045	184,76855	0,490291503

LD = 1
LQ = 3

Estudo dos LOD e LOQ do p-xileno

SUMÁRIO DOS RESULTADOS

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,999741332
Quadrado de R	0,99948273
Quadrado de R ajustado	0,999418072
Erro-padrão	0,004053255
Observações	10



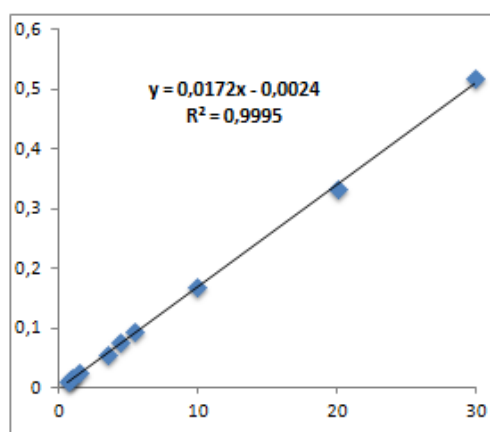
ANOVA

	gl	SQ	MQ	F	F de significância
Regressão	1	0,253954701	0,253954701	15457,8227	1,95801E-14
Residual	8	0,000131431	1,64289E-05		
Total	9	0,254086132			

	Coefficientes	Erro-padrão	Stat t	valor P	95% inferior	95% superior
Interceptar	-0,002385	0,001670141	-1,42802121	0,19113751	-0,006236347	0,001466355
Variável X 1	0,017177344	0,00013816	124,3294926	1,958E-14	0,016858747	0,017495941

RESULTADO RESIDUAL

Observação	Y previsto	Residuais
1	0,009639145	0,000376901
2	0,013074613	0,000608564
3	0,014792348	0,001262344
4	0,02338102	0,002980917
5	0,057735708	-0,00249215
6	0,074913051	-0,00027773
7	0,092090395	0,001151207
8	0,169388443	-0,00095553
9	0,341161882	-0,00868898
10	0,511217587	0,006034456



C Teórica	p-Xylene	n-propanol	Subs/P.I.
0,7	1,80125	179,83644	0,010016046
0,9	2,50925	183,38211	0,013683178
1	2,94709	183,56566	0,016054691
1,5	4,96141	188,20355	0,026361936
3,5	10,63893	192,58229	0,055243553
4,5	14,2056	190,33347	0,074635323
5,5	16,731	179,43707	0,093241603
10	30,96551	183,84477	0,168432912
20	61,43057	184,76865	0,332472906
29,9	95,57191	184,76855	0,517252043

LD = 1
LQ = 2

7.4 Repetibilidade do equipamento

ACETALDEÍDO						
	Repetib_TRR			Repetib_Áreas		
	TR (min)	TR pi (min)	TRR	Área	Área pi	A/Api
250 mg/L	1,942	4,688	0,414	83	180	0,460
	1,942	4,69	0,414	83	175	0,473
	1,942	4,69	0,414	83	179	0,462
	1,942	4,689	0,414	83	179	0,463
	1,943	4,692	0,414	82	174	0,471
		Média	0,414		Média	0,466
	Desv. pad. (s)	0,000		Desv. pad. (s)	0,006	
	CV (%)	0,0		CV (%)	1,3	
1500 mg/L	1,942	4,692	0,414	480	179	2,687
	1,945	4,696	0,414	488	184	2,656
	1,947	4,694	0,415	491	179	2,739
	1,944	4,695	0,414	490	178	2,754
	1,944	4,696	0,414	496	183	2,710
		Média	0,414		Média	2,709
	Desv. pad. (s)	0,000		Desv. pad. (s)	0,040	
	CV (%)	0,1		CV (%)	1,5	

ACETONITRILLO						
	Repetib_TRR			Repetib_Áreas		
	TR (min)	TR pi (min)	TRR	Área	Área pi	A/Api
250 mg/L	3,618	4,688	0,772	32	180	0,178
	3,619	4,69	0,772	31	175	0,177
	3,619	4,69	0,772	32	179	0,177
	3,618	4,689	0,772	32	179	0,177
	3,62	4,692	0,772	31	174	0,179
		Média	0,772		Média	0,178
	Desv. pad. (s)	0,000		Desv. pad. (s)	0,001	
	CV (%)	0,0		CV (%)	0,6	
1500 mg/L	3,617	4,692	0,771	197	179	1,100
	3,621	4,696	0,771	202	184	1,100
	3,62	4,694	0,771	198	179	1,103
	3,62	4,695	0,771	197	178	1,106
	3,62	4,696	0,771	202	183	1,103
		Média	0,771		Média	1,102
	Desv. pad. (s)	0,000		Desv. pad. (s)	0,003	
	CV (%)	0,0		CV (%)	0,2	

ACETATO DE ETILO						
	Repetib_TRR			Repetib_Áreas		
	TR (min)	TR pi (min)	TRR	Área	Área pi	A/Api
250 mg/L	4,898	4,688	1,045	173	180	0,958
	4,899	4,69	1,045	174	175	0,994
	4,898	4,69	1,044	172	179	0,964
	4,899	4,689	1,045	174	179	0,970
	4,901	4,692	1,045	170	174	0,975
		Média	1,045		Média	0,972
	Desv. pad. (s)	0,000		Desv. pad. (s)	0,014	
	CV (%)	0,0		CV (%)	1,4	
1500 mg/L	4,901	4,692	1,045	1048	179	5,866
	4,906	4,696	1,045	1059	184	5,767
	4,904	4,694	1,045	1076	179	6,001
	4,905	4,695	1,045	1077	178	6,051
	4,905	4,696	1,045	1086	183	5,934
		Média	1,045		Média	5,924
	Desv. pad. (s)	0,000		Desv. pad. (s)	0,112	
	CV (%)	0,0		CV (%)	1,9	

1-BUTANOL						
	Repetib_TRR			Repetib_Áreas		
	TR (min)	TR pi (min)	TRR	Área	Área pi	A/Api
250 mg/L	8,011	4,688	1,709	62	180	0,342
	8,012	4,69	1,708	59	175	0,337
	8,012	4,69	1,708	60	179	0,335
	8,011	4,689	1,708	60	179	0,336
	8,013	4,692	1,708	59	174	0,341
		Média	1,708		Média	0,338
	Desv. pad. (s)	0,000		Desv. pad. (s)	0,003	
	CV (%)	0,0		CV (%)	0,9	
1500 mg/L	8,012	4,692	1,708	383	179	2,142
	8,015	4,696	1,707	393	184	2,143
	8,012	4,694	1,707	388	179	2,163
	8,014	4,695	1,707	385	178	2,164
	8,013	4,696	1,706	396	183	2,163
		Média	1,707		Média	2,155
	Desv. pad. (s)	0,000		Desv. pad. (s)	0,011	
	CV (%)	0,0		CV (%)	0,5	

ACETONA						
	Repetib_TRR			Repetib_Áreas		
	TR (min)	TR pi (min)	TRR	Área	Área pi	A/Api
250 mg/L	2,96	4,688	0,631	69	180	0,384
	2,961	4,69	0,631	68	175	0,390
	2,96	4,69	0,631	69	179	0,386
	2,96	4,689	0,631	69	179	0,386
	2,962	4,692	0,631	68	174	0,392
		Média	0,631		Média	0,388
	Desv. pad. (s)	0,000		Desv. pad. (s)	0,003	
	CV (%)	0,0		CV (%)	0,8	
1500 mg/L	2,96	4,692	0,631	419	179	2,343
	2,963	4,696	0,631	427	184	2,327
	2,963	4,694	0,631	427	179	2,378
	2,962	4,695	0,631	425	178	2,391
	2,962	4,696	0,631	433	183	2,364
		Média	0,631		Média	2,361
	Desv. pad. (s)	0,000		Desv. pad. (s)	0,026	
	CV (%)	0,0		CV (%)	1,1	

2-PROPANOL						
	Repetib_TRR			Repetib_Áreas		
	TR (min)	TR pi (min)	TRR	Área	Área pi	A/Api
250 mg/L	3,15	4,688	0,672	41	180	0,228
	3,151	4,69	0,672	40	175	0,227
	3,151	4,69	0,672	40	179	0,226
	3,151	4,689	0,672	41	179	0,227
	3,153	4,692	0,672	40	174	0,231
		Média	0,672		Média	0,228
	Desv. pad. (s)	0,000		Desv. pad. (s)	0,002	
	CV (%)	0,0		CV (%)	0,8	
1500 mg/L	3,151	4,692	0,672	248	179	1,388
	3,154	4,696	0,672	254	184	1,385
	3,154	4,694	0,672	251	179	1,398
	3,154	4,695	0,672	250	178	1,404
	3,154	4,696	0,672	257	183	1,403
		Média	0,672		Média	1,395
	Desv. pad. (s)	0,000		Desv. pad. (s)	0,009	
	CV (%)	0,0		CV (%)	0,6	

<u>ÉTER</u>						
	Repetib_TRR			Repetib_Áreas		
	TR (min)	TR pi (min)	TRR	Área	Área pi	A/Api
250 mg/L	2,337	4,688	0,499	396	180	2,200
	2,338	4,69	0,499	410	175	2,339
	2,337	4,69	0,498	401	179	2,239
	2,337	4,689	0,498	403	179	2,248
	2,339	4,692	0,499	400	174	2,293
		Média	0,498		Média	2,264
	Desv. pad. (s)	0,000		Desv. pad. (s)	0,053	
	CV (%)	0,0		CV (%)	2,4	
1500 mg/L	2,337	4,692	0,498	2638	179	14,761
	2,34	4,696	0,498	2641	184	14,384
	2,341	4,694	0,499	2705	179	15,084
	2,339	4,695	0,498	2730	178	15,345
	2,339	4,696	0,498	2719	183	14,861
		Média	0,498		Média	14,887
	Desv. pad. (s)	0,000		Desv. pad. (s)	0,360	
	CV (%)	0,1		CV (%)	2,4	

<u>TOLUENO</u>						
	Repetib_TRR			Repetib_Áreas		
	TR (min)	TR pi (min)	TRR	Área	Área pi	A/Api
100 mg/L	9,254	4,645	1,992	354	186	1,906
	9,251	4,64	1,994	340	181	1,877
	9,255	4,649	1,991	313	185	1,696
	9,255	4,646	1,992	327	188	1,738
	9,253	4,647	1,991	312	189	1,650
		Média	1,992		Média	1,773
	Desv. pad. (s)	0,001		Desv. pad. (s)	0,112	
	CV (%)	0,1		CV (%)	6,3	
800 mg/L	9,258	4,641	1,995	3025	192	15,724
	9,258	4,643	1,994	2750	190	14,480
	9,262	4,649	1,992	2755	189	14,549
	9,261	4,648	1,992	2702	195	13,887
	9,259	4,642	1,995	2952	192	15,391
		Média	1,994		Média	14,806
	Desv. pad. (s)	0,001		Desv. pad. (s)	0,742	
	CV (%)	0,1		CV (%)	5,0	

<u>METANOL</u>						
	Repetib_TRR			Repetib_Áreas		
	TR (min)	TR pi (min)	TRR	Área	Área pi	A/Api
250 ng/mL	2,115	4,688	0,451	13	180	0,072
	2,116	4,69	0,451	12	175	0,070
	2,116	4,69	0,451	13	179	0,072
	2,115	4,689	0,451	13	179	0,071
	2,117	4,692	0,451	13	174	0,073
		Média	0,451		Média	0,072
	Desv. pad. (s)	0,000		Desv. pad. (s)	0,001	
	CV (%)	0,0		CV (%)	1,3	
1500 mg/L	2,116	4,692	0,451	76	179	0,426
	2,117	4,696	0,451	79	184	0,428
	2,118	4,694	0,451	75	179	0,420
	2,117	4,695	0,451	75	178	0,420
	2,118	4,696	0,451	78	183	0,426
		Média	0,451		Média	0,424
	Desv. pad. (s)	0,000		Desv. pad. (s)	0,004	
	CV (%)	0,0		CV (%)	0,9	

<u>p-XYLENO</u>						
	Repetib_TRR			Repetib_Áreas		
	TR (min)	TR pi (min)	TRR	Área	Área pi	A/Api
100 ng/mL	11,98	4,645	2,579	361	186	1,944
	11,98	4,64	2,582	346	181	1,909
	11,981	4,649	2,577	319	185	1,726
	11,98	4,646	2,579	333	188	1,767
	11,979	4,647	2,578	318	189	1,680
		Média	2,579		Média	1,805
	Desv. pad. (s)	0,002		Desv. pad. (s)	0,116	
	CV (%)	0,1		CV (%)	6,4	
800 mg/L	11,986	4,641	2,583	3155	192	16,399
	11,986	4,643	2,582	2870	190	15,113
	11,987	4,649	2,578	2870	189	15,157
	11,987	4,648	2,579	2813	195	14,458
	11,986	4,642	2,582	3070	192	16,005
		Média	2,581		Média	15,426
	Desv. pad. (s)	0,002		Desv. pad. (s)	0,773	
	CV (%)	0,1		CV (%)	5,0	

<u>CLOROFÓRMIO</u>						
	Repetib_TRR			Repetib_Áreas		
	TR (min)	TR pi (min)	TRR	Área	Área pi	A/Api
100 mg/L	5,564	4,651	1,196	27	189	0,142
	5,564	4,651	1,196	29	194	0,147
	5,564	4,65	1,197	28	192	0,145
	5,563	4,649	1,197	28	197	0,141
	5,563	4,648	1,197	26	198	0,132
		Média	1,197		Média	0,142
	Desv. pad. (s)	0,000		Desv. pad. (s)	0,006	
	CV (%)	0,0		CV (%)	4,1	
750 mg/L	5,563	4,648	1,197	210	193	1,090
	5,564	4,65	1,197	236	195	1,207
	5,564	4,650	1,197	232	197	1,180
	5,564	4,65	1,197	227	196	1,159
	5,564	4,649	1,197	235	193	1,219
		Média	1,197		Média	1,171
	Desv. pad. (s)	0,000		Desv. pad. (s)	0,051	
	CV (%)	0,0		CV (%)	4,3	

7.5 Precisão intermédia

Tabela de cálculo para o estudo da precisão intermédia das substâncias voláteis

Preparação da curva de calibração referente ao estudo da Precisão intermédia do Acetaldeído

Calibradores (mg/L)	Solução Trabalho 19 500 mg/L	Solução Trabalho 9 750mg/L	Volume da solução Final (mL)
1 950	1000 µL		10
1 462	750 µL		10
975		1000 µL	10
488		500 µL	10
50		50 µL	10

Preparação da curva de calibração referente ao estudo da Precisão intermédia do Acetato de Etilo

Calibradores (mg/L)	Solução Trabalho 19 800	Solução Trabalho 9 900	Volume da solução Final (mL)
1 980	1000 µL		10
1 485	750 µL		10
990		1000 µL	10
495		500 µL	10
49,5		50 µL	10

Preparação da curva de calibração referente ao estudo da Precisão intermédia da Acetona

Calibradores (mg/L)	Solução Trabalho 19 750 mg/L	Solução Trabalho 9 875mg/L	Volume da solução Final (mL)
1 975	1000 µL		10
1 481	750 µL		10
988		1000 µL	10
494		500 µL	10
49		50 µL	10

Preparação da curva de calibração referente ao estudo da Precisão intermédia do Acetonitrilo

Calibradores (mg/L)	Solução Trabalho 19 500 mg/L	Solução Trabalho 9 750mg/L	Volume da solução Final (mL)
1 950	1000 µL		10
1 462	750 µL		10
975		1000 µL	10
488		500 µL	10
50		50 µL	10

Preparação da curva de calibração referente ao estudo da Precisão intermédia do Butanol

Calibradores (mg/L)	Solução Trabalho 20 250	Solução Trabalho 10 125	Volume da solução Final (mL)
2 025	1000 µL		10
1 518,8	750 µL		10
1012,5		1000 µL	10
506,2		500 µL	10
50,6		50 µL	10

Preparação da curva de calibração referente ao estudo da Precisão intermédia do 2-propanol

Calibradores (mg/L)	Solução Trabalho 19 650	Solução Trabalho 9 825	Volume da solução Final (mL)
1 965	1000 µL		10
1 474	750 µL		10
982		1000 µL	10
491		500 µL	10
49		50 µL	10

Preparação da curva de calibração referente ao estudo da Precisão intermédia do Éter

Calibradores (mg/L)	Solução Trabalho 19 964	Solução Trabalho 9 982	Volume da solução Final (mL)
1 996,4	1000 µL		10
1 497,3	750 µL		10
998,2		1000 µL	10
499,1		500 µL	10
4,96		50 µL	10

Preparação da curva de calibração referente ao estudo da Precisão intermédia do Metanol

Calibradores (mg/L)	Solução Trabalho 19 800 mg/L	Solução Trabalho 9 900mg/L	Volume da solução Final (mL)
1 980	1000 µL		10
1 485	750 µL		10
990		1000 µL	10
495		500 µL	10
50		50 µL	10

Preparação da curva de calibração referente ao estudo da Precisão Intermédia do Clorofórmio

Calibradores (mg/L)	Solução Trabalho 14 700	Solução Trabalho 1 470	Volume da solução Final (mL)
999,6	680 µL		10
749,7	510 µL		10
499,8	340 µL		10
249,9	170 µL		10
51,4		350 µL	10

Preparação da curva de calibração referente ao estudo da Precisão Intermédia do Tolueno

Calibradores (mg/L)	Solução Trabalho 10 022	Solução Trabalho 1 020	Volume da solução Final (mL)
1020	1000 µL		10
751,6	750 µL		10
501,1	500 µL		10
250,5	250 µL		10
5,1		50 µL	10

Preparação da curva de calibração referente ao estudo da Precisão intermédia do p-xileno

Calibradores (mg/L)	Sol. Trabalho 9 988	Sol. Trabalho 998	Volume da solução Final (mL)
998	1000 µL		10
749,1	750 µL		10
499,4	500 µL		10
249,7	250 µL		10
4,99		50 µL	10

Estudo da precisão intermédia do acetaldeído e acetato de etilo

Data	1º DIA	2º DIA	3º DIA	4º DIA	5º DIA
R ²	0,9991	0,9997	0,9995	0,9986	0,9994
Declive	0,0021	0,0021	0,0021	0,0021	0,0020
YO	-0,051	-0,040	-0,040	-0,054	-0,053
Gama Baixa 250 mg/L					
Replicado 1	260,6	244,5	240,0	240,2	256,4
Replicado 2	249,0	248,7	241,9	247,8	263,0
Replicado 3	257,9	243,6	236,9	243,1	257,4
Média	255,9	245,6	239,6	243,7	258,9
Recuperação	104,9	100,7	98,2	99,9	106,1
Concenc. Média	248,7				
Recuperação Média	101,9				
Repetibilidade (S _r)	4,0				
Between Run (S _{run})	7,7				
Precisão intermédia	8,7				
C.V (%)	3,3				
Gama Alta 1500mg/L					
Replicado 1	1379,9	1349,2	1302,1	1306,2	1370,2
Replicado 2	1378,9	1313,7	1306,7	1306,2	1354,6
Replicado 3	1345,6	1319,8	1291,9	1291,7	1396,1
Média	1368,1	1327,6	1300,2	1301,4	1373,6
Recuperação	93,6	90,8	88,9	89,0	94,0
Concenc. Média	1334,2				
Recuperação Média	91,3				
Repetibilidade (S _r)	16,2				
Between Run (S _{run})	33,8				
Precisão intermédia	37,5				
C.V (%)	2,6				
C.Vpool	4,5				

Data	1º DIA	2º DIA	3º DIA	4º DIA	5º DIA
R ²	0,9991	0,9998	0,9992	0,9992	0,9994
Declive	0,0043	0,0044	0,0042	0,0043	0,0042
YO	-0,118	-0,082	-0,094	-0,076	-0,117
Gama Baixa 250 mg/L					
Replicado 1	269,9	245,3	255,3	235,4	256,1
Replicado 2	260,4	249,7	257,3	245,7	264,7
Replicado 3	262,4	242,7	249,9	239,9	257,4
Média	264,2	245,9	254,2	240,3	259,4
Recuperação	106,5	99,2	102,5	96,9	104,6
Concenc. Média	252,8				
Recuperação Média	101,9				
Repetibilidade (S _r)	4,5				
Between Run (S _{run})	9,4				
Precisão intermédia	10,4				
C.V (%)	3,9				
Gama Alta 1500 mg/L					
Replicado 1	1489,6	1422,5	1430,8	1390,7	1424,6
Replicado 2	1482,8	1375,0	1436,5	1352,8	1400,9
Replicado 3	1445,1	1387,3	1418,1	1422,7	1456,7
Média	1472,5	1395,0	1428,5	1388,7	1427,4
Recuperação	99,2	93,9	96,2	93,5	96,1
Concenc. Média	1422,4				
Recuperação Média	95,8				
Repetibilidade (S _r)	25,6				
Between Run (S _{run})	29,9				
Precisão intermédia	39,4				
C.V (%)	2,3				
C.Vpool	4,7				

Estudo da precisão intermédia da acetona e do acetonitrilo

Data	1º DIA	2º DIA	3º DIA	4º DIA	5º DIA
R ²	0,9995	0,9997	0,9995	0,9997	0,9995
Declive	0,0018	0,0018	0,0017	0,0017	0,0017
Y0	-0,036	-0,031	-0,032	-0,023	-0,039
Gama Baixa 250 mg/L					
Replicado 1	246,6	236,1	245,4	236,1	248,7
Replicado 2	239,9	238,5	247,5	240,9	252,1
Replicado 3	245,5	235,3	244,4	238,6	249,5
Média	244,0	236,6	245,8	238,5	250,1
Recuperação	98,8	95,8	99,5	96,6	101,2
Concenc. Média	243,0				
Recuperação Média	98,4				
Repetibilidade (S _r)	2,3				
Between Run (S _{run})	5,3				
Precisão intermédia	5,8				
C.V (%)	2,3				
Gama Alta 1500 mg/L					
Replicado 1	1379,9	1360,9	1397,5	1395,3	1400,6
Replicado 2	1389,4	1333,8	1399,9	1357,6	1391,5
Replicado 3	1357,8	1335,2	1392,1	1431,0	1421,6
Média	1375,7	1343,3	1396,5	1394,6	1404,6
Recuperação	92,9	90,7	94,3	94,2	94,8
Concenc. Média	1383,0				
Recuperação Média	93,4				
Repetibilidade (S _r)	20,5				
Between Run (S _{run})	21,5				
Precisão intermédia	29,7				
C.V (%)	1,8				
C.Vpool	3,2				

Data	1º DIA	2º DIA	3º DIA	4º DIA	5º DIA
R ²	0,9996	0,9996	0,9993	0,9982	0,9996
Declive	0,0008	0,0008	0,0008	0,0008	0,0008
Y0	-0,016	-0,018	-0,021	-0,022	-0,018
Gama Baixa 250 mg/L					
Replicado 1	249,3	248,4	247,9	235,5	245,3
Replicado 2	247,0	248,5	248,5	237,5	243,6
Replicado 3	250,8	248,4	247,2	238,8	243,8
Média	249,1	248,4	247,8	237,3	244,2
Recuperação	102,1	101,8	101,6	97,2	100,1
Concenc. Média	245,4				
Recuperação Média	100,6				
Repetibilidade (S _r)	1,2				
Between Run (S _{run})	4,8				
Precisão intermédia	5,0				
C.V (%)	2,0				
Gama Alta 1500 mg/L					
Replicado 1	1415,8	1423,6	1398,7	1415,0	1397,3
Replicado 2	1437,4	1418,3	1399,0	1369,6	1397,9
Replicado 3	1394,5	1404,4	1395,9	1394,1	1400,6
Média	1415,9	1415,5	1397,9	1392,9	1398,6
Recuperação	96,8	96,8	95,6	95,3	95,7
Concenc. Média	1404,1				
Recuperação Média	96,0				
Repetibilidade (S _r)	14,7				
Between Run (S _{run})	6,6				
Precisão intermédia	16,1				
C.V (%)	0,8				
C.Vpool	2,6				

Estudo da precisão intermédia do 1-butanol e do 2-propanol

Data	1º DIA	2º DIA	3º DIA	4º DIA	5º DIA
R ²	0,9995	0,9996	0,9994	0,9996	0,9995
Declive	0,0015	0,0015	0,0014	0,0015	0,0014
Y0	-0,042	-0,041	-0,045	-0,033	-0,045
Gama Baixa 250 mg/L					
Replicado 1	265,0	264,0	276,6	249,8	276,2
Replicado 2	254,2	257,9	273,4	246,1	272,8
Replicado 3	258,8	256,7	273,7	243,8	271,2
Média	259,4	259,5	274,6	246,6	273,4
Recuperação	102,5	102,6	108,5	97,5	108,1
Concenc. Média	262,7				
Recuperação Média	103,8				
Repetibilidade (S _r)	3,5				
Between Run (S _{run})	11,4				
Precisão intermédia	11,9				
C.V (%)	4,4				
Gama Alta 1500 mg/L					
Replicado 1	1487,4	1497,0	1566,2	1459,3	1561,8
Replicado 2	1506,5	1480,7	1577,5	1410,6	1562,3
Replicado 3	1480,0	1482,9	1578,7	1490,4	1576,7
Média	1491,3	1486,9	1574,1	1453,4	1567,0
Recuperação	98,2	97,9	103,6	95,7	103,2
Concenc. Média	1514,5				
Recuperação Média	99,7				
Repetibilidade (S _r)	20,0				
Between Run (S _{run})	52,0				
Precisão intermédia	55,7				
C.V (%)	3,5				
C.Vpool	5,8				

Data	1º DIA	2º DIA	3º DIA	4º DIA	5º DIA
R ²	0,9996	0,9997	0,9995	0,9997	0,9996
Declive	0,0010	0,0010	0,0010	0,0010	0,0010
Y0	-0,020	-0,020	-0,022	-0,012	-0,021
Gama Baixa 250 mg/L					
Replicado 1	256,3	252,0	250,0	239,4	249,1
Replicado 2	251,5	251,2	248,8	239,2	247,7
Replicado 3	256,0	250,7	247,1	238,8	246,9
Média	254,6	251,3	248,6	239,1	247,9
Recuperação	103,5	102,2	101,1	97,2	100,8
Concenc. Média	248,3				
Recuperação Média	100,9				
Repetibilidade (S _r)	1,5				
Between Run (S _{run})	5,7				
Precisão intermédia	5,9				
C.V (%)	2,3				
Gama Alta 1500 mg/L					
Replicado 1	1435,6	1434,7	1411,1	1408,2	1408,5
Replicado 2	1456,4	1423,4	1412,7	1369,9	1405,9
Replicado 3	1434,8	1419,1	1412,2	1444,5	1418,5
Média	1442,3	1425,7	1412,0	1407,5	1411,0
Recuperação	97,8	96,7	95,8	95,5	95,7
Concenc. Média	1419,7				
Recuperação Média	96,3				
Repetibilidade (S _r)	18,2				
Between Run (S _{run})	9,9				
Precisão intermédia	20,7				
C.V (%)	1,0				
C.Vpool	2,9				

Estudo da precisão intermédia do éter e do metanol

Data	1º DIA	2º DIA	3º DIA	4º DIA	5º DIA
R ²	0,9973	0,9989	0,9962	0,9973	0,9983
Declive	0,0111	0,0113	0,0108	0,0112	0,0109
YO	-0,572	-0,464	-0,592	-0,503	-0,543
Gama Baixa 250 mg/L					
Replicado 1	287,6	249,9	273,2	238,3	251,7
Replicado 2	271,2	255,6	272,9	253,1	264,4
Replicado 3	267,1	247,0	265,8	245,8	255,3
Média	275,3	250,8	270,7	245,7	257,1
Recuperação	110,1	100,3	108,3	98,3	102,9
Concenc. Média	259,9				
Recuperação Média	104,0				
Repetibilidade (S _r)	7,1				
Between Run (S _{run})	12,0				
Precisão intermédia	14,0				
C.V (%)	4,9				
Gama Alta 1500 mg/L					
Replicado 1	1537,7	1487,9	1482,1	1407,5	1404,1
Replicado 2	1506,3	1408,2	1484,5	1369,3	1369,5
Replicado 3	1472,1	1430,8	1458,9	1415,8	1433,7
Média	1505,4	1442,3	1475,2	1397,5	1402,4
Recuperação	100,5	96,3	98,5	93,3	93,6
Concenc. Média	1444,6				
Recuperação Média	96,4				
Repetibilidade (S _r)	30,4				
Between Run (S _{run})	43,0				
Precisão intermédia	52,6				
C.V (%)	3,2				
C.Vpool	6,0				

Data	1º DIA	2º DIA	3º DIA	4º DIA	5º DIA
R ²	0,9989	0,9988	0,9987	0,9987	0,9995
Declive	0,0003	0,0003	0,0003	0,0003	0,0003
YO	-0,003	-0,006	-0,009	-0,003	-0,005
Gama Baixa 250 mg/L					
Replicado 1	246,9	259,5	266,6	252,9	256,6
Replicado 2	250,9	255,2	268,0	246,1	249,8
Replicado 3	251,9	260,6	266,4	248,7	254,6
Média	249,9	258,4	267,0	249,2	253,6
Recuperação	100,8	104,2	107,7	100,5	528,4
Concenc. Média	255,6				
Recuperação Média	103,1				
Repetibilidade (S _r)	2,8				
Between Run (S _{run})	7,1				
Precisão intermédia	7,7				
C.V (%)	2,9				
Gama Alta 1500 mg/L					
Replicado 1	1382,3	1435,2	1457,8	1446,5	1437,3
Replicado 2	1424,6	1458,0	1449,9	1416,4	1441,9
Replicado 3	1386,3	1444,9	1447,0	1475,6	1415,6
Média	1397,7	1446,0	1451,6	1446,2	1431,6
Recuperação	94,1	97,4	97,7	97,4	96,4
Concenc. Média	1434,6				
Recuperação Média	96,6				
Repetibilidade (S _r)	18,9				
Between Run (S _{run})	19,0				
Precisão intermédia	26,8				
C.V (%)	1,5				
C.Vpool	3,5				

Estudo da precisão intermédia do tolueno e do p-xileno

Data	1º DIA ()	2º DIA ()	3º DIA ()	5º DIA ()	7º DIA ()
R ²	0,9966	0,9979	0,9994	0,9952	0,993
Declive	0,0177	0,0191	0,0183	0,0190	0,0194
YO	0,040	-0,291	-0,228	-0,521	-0,261
Gama Baixa 100 mg/L					
Replicado 1	97,9	106,1	110,6	114,1	111,7
Replicado 2	99,1	105,0	106,8	115,1	110,2
Replicado 3	87,8	100,3	109,4	115,2	100,9
Média	94,9	103,8	108,9	114,8	107,6
Recuperação	94,9	103,8	108,9	114,8	107,6
Concenc. Média	106,0				
Recuperação Média	106,0				
Repetibilidade (S _r)	4,9				
Between Run (S _{run})	5,8				
Precisão intermédia	7,6				
C.V (%)	6,9				
Gama Alta 800 mg/L					
Replicado 1	789,2	787,1	869,7	803,0	823,9
Replicado 2	773,7	717,6	791,5	737,2	765,7
Replicado 3	683,5	737,5	794,7	812,8	763,4
Média	748,8	747,4	818,6	784,3	784,3
Recuperação	93,4	93,2	102,1	97,8	97,8
Concenc. Média	776,7				
Recuperação Média	96,8				
Repetibilidade (S _r)	37,8				
Between Run (S _{run})	9,1				
Precisão intermédia	38,9				
C.V (%)	3,8				
C.V.pool	8,0				

Data	2º DIA	3º DIA	4º DIA	5º DIA	7º DIA
R ²	0,9966	0,9988	0,9924	0,9943	0,9905
Declive	0,0207	0,0198	0,0191	0,0200	0,0203
YO	-0,294	-0,225	-0,068	-0,527	-0,335
Gama Baixa 100 mg/L					
Replicado 1	104,0	108,4	97,0	114,6	112,2
Replicado 2	102,9	104,6	104,6	115,8	110,5
Replicado 3	98,0	107,2	84,9	115,5	101,5
Média	101,6	106,7	95,5	115,3	108,1
Recuperação	101,6	106,7	95,5	115,3	108,1
Concenc. Média	105,4				
Recuperação Média	105,4				
Repetibilidade (S _r)	7,1				
Between Run (S _{run})	4,8				
Precisão intermédia	8,6				
C.V (%)	7,0				
Gama Alta 800 mg/L					
Replicado 1	768,4	851,0	743,2	808,2	824,3
Replicado 2	700,3	773,4	762,1	743,3	766,8
Replicado 3	719,8	776,8	656,3	731,3	763,1
Média	729,5	800,4	720,6	761,0	784,8
Recuperação	91,3	100,2	90,2	95,2	98,2
Concenc. Média	759,2				
Recuperação Média	95,0				
Repetibilidade (S _r)	34,3				
Between Run (S _{run})	15,0				
Precisão intermédia	37,4				
C.V (%)	4,5				
C.V.pool	8,5				

Estudo da precisão intermédia do clorofórmio

Data	1º DIA ()	2º DIA ()	3º DIA ()	4º DIA ()	5º DIA ()
R ²	0,9986	0,9988	0,9989	0,998	0,9995
Declive	0,0017	0,0019	0,0018	0,0017	0,0019
Y0	-0,023	-0,048	-0,019	-0,007	-0,025
Gama Baixa 100 mg/L					
Replicado 1	97,1	108,2	97,1	91,3	93,9
Replicado 2	100,0	103,4	96,3	96,3	93,0
Replicado 3	98,9	101,5	91,4	95,4	85,2
Média	98,7	104,3	94,9	94,3	90,7
Recuperação	98,7	104,3	94,9	94,3	90,7
Concenc. Média	96,6				
Recuperação Média	96,6				
Repetibilidade (S _r)	3,0				
Between Run (S _{r,run})	3,8				
Precisão intermédia	4,9				
C.V (%)	5,4				
Gama Alta 750 mg/L					
Replicado 1	695,2	731,0	745,3	783,0	655,7
Replicado 2	723,6	738,8	734,0	741,0	654,0
Replicado 3	707,5	702,8	697,1	730,4	675,5
Média	708,8	724,2	725,5	751,5	661,7
Recuperação	94,5	96,6	96,7	100,2	88,2
Concenc. Média	714,3				
Recuperação Média	95,2				
Repetibilidade (S _r)	18,7				
Between Run (S _{r,run})	19,1				
Precisão intermédia	26,7				
C.V (%)	4,6				
C.V.pool	7,2				

7.6 Exatidão

Estudo da exatidão do acetaldeído e do acetato de etilo

Data	1º DIA	2º DIA	3º DIA	4º DIA	5º DIA
Equação	$y = 0.0021x - 0.0505$	$y = 0.0021x - 0.040$	$y = 0.0021x - 0.0398$	$y = 0.0021x - 0.0541$	$y = 0.0021x - 0.0053$
Gama Baixa 250 mg/L					
Média	256,4	245,8	240,0	243,7	223,8
Recuperação	105,1	100,7	98,3	99,9	91,7
Média	99,2				
Desvio padrão	4,85				
C.V (%)	4,9				
N	5				
Texp	0,39				
Tcrit	2,78				
Incerteza de R%	2,2				
Incerteza padrão rel.	0,022				
Gama Média/Alta 1500 mg/L					
Média	1368,1	1327,8	1300,2	1305,7	1285,4
Recuperação	93,6	90,8	88,9	89,3	87,9
Concenc. Média	90,1				
Desvio padrão	2,20				
C.V (%)	2,4				
N	5				
Texp	10,05				
Tcrit	2,78				
Incerteza de R%	1,0				
Incerteza padrão rel.	0,010				

Data	1º DIA	2º DIA	3º DIA	4º DIA	5º DIA
Equação	$y = 0.0043x - 0.118$	$y = 0.0044x - 0.082$	$y = 0.0042x - 0.094$	$y = 0.0043x - 0.076$	$y = 0.0042x - 0.117$
Gama Baixa 250 mg/L					
Média	264,1	245,9	254,2	240,3	259,3
Recuperação	106,5	99,2	102,5	96,9	104,6
Média	101,9				
Desvio padrão	3,91				
C.V (%)	3,8				
N	5				
Texp	1,10				
Tcrit	2,78				
Incerteza de R%	1,7				
Incerteza padrão rel.	0,017				
Gama Média/Alta 1500 mg/L					
Média	1472,4	1395,0	1464,2	1388,7	1427,4
Recuperação	99,2	93,9	98,6	93,5	96,1
Concenc. Média	96,3				
Desvio padrão	2,59				
C.V (%)	2,7				
N	5				
Texp	3,23				
Tcrit	2,78				
Incerteza de R%	1,2				
Incerteza padrão rel.	0,012				

Estudo da exatidão da acetona e do acetonitrilo

Data Equação	1º DIA $y = 0.0018x - 0.036$	2º DIA $y = 0.0018x - 0.031$	3º DIA $y = 0.0017x - 0.032$	4º DIA $y = 0.0017x - 0.0223$	5º DIA $y = 0.0017x - 0.0385$
Gama Baixa 250 mg/L					
Média	240,5	236,6	245,8	238,1	250,1
Recuperação	97,4	95,8	99,5	96,4	101,2
Média	98,1				
Desvio padrão	2,27				
C.V (%)	2,3				
N	5				
Texp	1,91				
Tcrit	2,78				
Incerteza de R%	1,0				
Incerteza padrão rel.	0,010				
Gama Média/Alta 1500 mg/L					
Média	1375,7	1343,3	1422,9	1394,2	1404,6
Recuperação	92,9	90,7	96,1	94,1	94,8
Concenc. Média	93,7				
Desvio padrão	2,05				
C.V (%)	2,2				
N	5				
Texp	6,84				
Tcrit	2,78				
Incerteza de R%	0,9				
Incerteza padrão rel.	0,009				

Data Equação	1º DIA $y = 0.0008x - 0.016$	2º DIA $y = 0.0008x - 0.018$	3º DIA $y = 0.0008x - 0.021$	4º DIA $y = 0.0008x - 0.02$	5º DIA $y = 0.0008x - 0.018$
Gama Baixa 250 mg/L					
Média	249,4	248,4	247,8	234,8	235,2
Recuperação	102,2	101,8	101,6	96,2	96,4
Média	99,6				
Desvio padrão	3,06				
C.V (%)	3,1				
N	5				
Texp	0,26				
Tcrit	2,78				
Incerteza de R%	1,4				
Incerteza padrão rel.	0,014				
Gama Média/Alta 1500 mg/L					
Média	1416,3	1415,5	1419,2	1390,4	1389,6
Recuperação	96,9	96,8	97,1	95,1	95,0
Concenc. Média	96,2				
Desvio padrão	1,02				
C.V (%)	1,1				
N	5				
Texp	8,41				
Tcrit	2,78				
Incerteza de R%	0,5				
Incerteza padrão rel.	0,005				

Estudo da exatidão do 1-butanol e do 2-propanol

Data Equação	1º DIA $y = 0.0015x - 0.042$	2º DIA $y = 0.0015x - 0.041$	3º DIA $y = 0.0014x - 0.045$	4º DIA $y = 0.0015x - 0.033$	5º DIA $y = 0.0014x - 0.045$
Gama Baixa 250 mg/L					
Média	259,4	259,4	274,5	246,7	273,7
Recuperação	102,5	102,5	108,5	97,5	108,2
Média	103,8				
Desvio padrão	4,58				
C.V (%)	4,4				
N	5				
Texp	1,88				
Tcrit	2,78				
Incerteza de R%	2,0				
Incerteza padrão rel.	0,020				
Gama Média/Alta 1500 mg/L					
Média	1491,3	1486,8	1595,8	1453,6	1567,2
Recuperação	98,2	97,9	105,1	95,7	103,2
Concenc. Média	100,0				
Desvio padrão	3,94				
C.V (%)	3,9				
N	5				
Texp	0,00				
Tcrit	2,78				
Incerteza de R%	1,8				
Incerteza padrão rel.	0,018				

Data Equação	1º DIA $y = 0.001x - 0.0196$	2º DIA $y = 0.001x - 0.0196$	3º DIA $y = 0.001x - 0.0217$	4º DIA $y = 0.001x - 0.0122$	5º DIA $y = 0.001x - 0.0208$
Gama Baixa 250 mg/L					
Média	254,6	251,3	248,6	239,1	247,9
Recuperação	103,5	102,2	101,1	97,2	100,8
Média	100,9				
Desvio padrão	2,34				
C.V (%)	2,3				
N	5				
Texp	0,90				
Tcrit	2,78				
Incerteza de R%	1,0				
Incerteza padrão rel.	0,010				
Gama Média/Alta 1500 mg/L					
Média	1442,3	1425,7	1427,8	1407,5	1411,0
Recuperação	97,8	96,7	96,9	95,5	95,7
Concenc. Média	96,5				
Desvio padrão	0,95				
C.V (%)	1,0				
N	5				
Texp	8,15				
Tcrit	2,78				
Incerteza de R%	0,4				
Incerteza padrão rel.	0,004				

Estudo da exatidão do éter e do metanol

Data Equação	1º DIA $y = 0.0111x - 0.572$	2º DIA $y = 0.0113x - 0.464$	3º DIA $y = 0.0108x - 0.592$	4º DIA $y = 0.0112x - 0.503$	5º DIA $y = 0.0109x - 0.543$
Gama Baixa 250 mg/L					
Média	275,3	250,9	270,7	257,4	257,1
Recuperação	110,1	100,3	108,3	102,9	102,8
Média	104,9				
Desvio padrão	4,11				
C.V (%)	3,9				
N	5				
Texp	2,67				
Tcrit	2,78				
Incerteza de R%	1,8				
Incerteza padrão rel.	0,018				
Gama Média/Alta 1500 mg/L					
Média	1519,1	1442,3	1476,0	1397,5	1402,4
Recuperação	101,4	96,3	98,5	93,3	93,6
Concenc. Média	96,6				
Desvio padrão	3,42				
C.V (%)	3,5				
N	5				
Texp	2,21				
Tcrit	2,78				
Incerteza de R%	1,5				
Incerteza padrão rel.	0,015				

Data Equação	1º DIA (22/05/12) $y = 0.0003x - 0.003$	2º DIA (23/05/12) $y = 0.0003x - 0.006$	3º DIA (24/05/12) $y = 0.0003x - 0.009$	4º DIA (25/05/12) $y = 0.0003x - 0.003$	5º DIA (26/05/12) $y = 0.0003x - 0.005$
Gama Baixa 250 mg/L					
Média	249,2	258,8	267,7	249,2	254,3
Recuperação	100,5	104,3	107,9	100,5	102,5
Média	103,2				
Desvio padrão	3,11				
C.V (%)	3,0				
N	5				
Texp	2,27				
Tcrit	2,78				
Incerteza de R%	1,4				
Incerteza padrão rel.	0,013				
Gama Média/Alta 1500 mg/L					
Média	1397,1	1446,4	1452,2	1446,2	1432,3
Recuperação	94,1	97,4	97,8	97,4	96,4
Concenc. Média	96,6				
Desvio padrão	1,50				
C.V (%)	1,6				
N	5				
Texp	5,02				
Tcrit	2,78				
Incerteza de R%	0,7				
Incerteza padrão rel.	0,007				

Estudo da exatidão do tolueno e do p-xileno

Data Equação	1º DIA $y = 0.0177x + 0.040$	2º DIA $y = 0.0191x - 0.2908$	3º DIA $y = 0.0183x - 0.2278$	4º DIA $y = 0.0190x - 0.521$	5º DIA $y = 0.0194x - 0.2607$
Gama Baixa 100 mg/L					
Média	94,9	103,8	108,9	114,8	107,6
Recuperação	94,9	103,8	108,9	114,8	107,6
Média	106,0				
Desvio padrão	7,35				
C.V (%)	6,9				
N	5				
Texp	1,83				
Tcrit	2,78				
Incerteza de R%	3,3				
Incerteza padrão rel.	0,031				
Gama Média/Alta 800 mg/L					
Média	748,8	747,4	776,6	784,4	784,3
Recuperação	93,4	93,2	96,8	97,8	97,8
Concenc. Média	95,8				
Desvio padrão	2,34				
C.V (%)	2,4				
N	5				
Texp	4,02				
Tcrit	2,78				
Incerteza de R%	1,0				
Incerteza padrão rel.	0,010				

Data Equação	1º DIA $y = 0.0207x - 0.2943$	2º DIA $y = 0.0198x - 0.2251$	3º DIA $y = 0.0191x - 0.068$	4º DIA $y = 0.0200x - 0.527$	5º DIA $y = 0.0203x - 0.3347$
Gama Baixa 100 mg/L					
Média	101,6	106,7	99,7	115,3	108,1
Recuperação	101,6	106,7	99,7	115,3	108,1
Média	106,3				
Desvio padrão	6,14				
C.V (%)	5,8				
N	5				
Texp	2,29				
Tcrit	2,78				
Incerteza de R%	2,7				
Incerteza padrão rel.	0,026				
Gama Média/Alta 800 mg/L					
Média	729,5	800,4	821,5	761,0	784,8
Recuperação	91,3	100,2	102,8	95,2	98,2
Concenc. Média	97,6				
Desvio padrão	4,46				
C.V (%)	4,6				
N	5				
Texp	1,23				
Tcrit	2,78				
Incerteza de R%	2,0				
Incerteza padrão rel.	0,020				

Estudo da exatidão do clorofórmio

Data Equação	1º DIA $y = 0.0017x - 0.023$	2º DIA $y = 0.0019x - 0.0477$	3º DIA $y = 0.0018x - 0.019$	4º DIA $y = 0.0017x - 0.0072$	5º DIA $y = 0.019x - 0.0254$
Gama Baixa 100 mg/L					
Média	98,8	104,3	95,2	94,3	90,7
Recuperação	98,8	104,3	95,2	94,3	90,7
Média	96,7				
Desvio padrão	5,18				
C.V (%)	5,4				
N	5				
Texp	1,44				
Tcrit	2,78				
Incerteza de R%	2,3				
Incerteza padrão rel.	0,024				
Gama Média/Alta 750 mg/L					
Média	708,9	724,2	748,5	751,5	661,7
Recuperação	94,5	96,6	99,8	100,2	88,2
Concenc. Média	95,9				
Desvio padrão	4,87				
C.V (%)	5,1				
N	5				
Texp	1,90				
Tcrit	2,78				
Incerteza de R%	2,2				
Incerteza padrão rel.	0,022				

7.7 Teste ao limite de quantificação

	LQ teste		
	sangue	Urina	H vitreo
Acetaldeído	25 mg/L		
	22,32	21,31	24,40
	23,19	22,31	25,45
	24,94	22,42	24,50
	22,70	23,08	24,82
	22,28	22,04	24,67
	Média (ng/mL)	23,09	22,23
Desvio padrão (s)	1,10	0,64	0,41
CV (%)	4,8	2,9	1,7
Erro (%)	7,66	11,07	0,93

	LQ teste		
	sangue	Urina	H vitreo
Acetona	25 mg/L		
	25,05	24,91	24,66
	26,25	26,11	25,19
	28,17	25,87	24,69
	25,97	26,68	25,02
	25,25	25,98	24,83
	Média (ng/mL)	26,14	25,91
Desvio padrão (s)	1,24	0,64	0,23
CV (%)	4,7	2,5	1,7
Erro (%)	4,55	3,64	0,49

	LQ teste		
	sangue	Urina	H vitreo
Metanol	25 mg/L		
	23,21	26,13	27,62
	24,43	28,56	28,29
	23,35	29,23	27,76
	24,87	26,14	26,56
	26,03	28,28	26,62
	Média (ng/mL)	24,38	27,67
Desvio padrão (s)	1,16	1,44	0,75
CV (%)	4,8	5,2	2,8
Erro (%)	2,49	10,67	9,48

	LQ teste		
	sangue	Urina	H vitreo
Isopropanol	25 mg/L		
	23,48	23,78	24,53
	22,48	24,94	25,11
	23,43	24,90	24,69
	20,63	24,66	24,78
	19,26	24,67	24,43
	Média (ng/mL)	21,86	24,59
Desvio padrão (s)	1,85	0,47	0,26
CV (%)	8,5	1,9	1,1
Erro (%)	12,58	1,64	1,17

	LQ teste		
	sangue	Urina	H vitreo
Éter	25 mg/L		
	21,14	19,94	21,09
	20,62	20,89	19,99
	21,35	20,25	20,78
	19,74	21,43	20,54
	18,28	20,87	20,97
	Média (ng/mL)	20,23	20,68
Desvio padrão (s)	1,25	0,59	0,44
CV (%)	6,2	2,8	2,1
Erro (%)	19,10	17,30	17,30

	LQ teste		
	sangue	Urina	H vitreo
Acetonitrilo	25 mg/L		
	27,15	22,56	23,68
	27,22	23,82	24,01
	28,34	23,66	23,00
	24,88	23,21	23,52
	23,61	23,28	22,36
	Média (ng/mL)	26,24	23,31
Desvio padrão (s)	1,85	0,47	0,65
CV (%)	7,1	2,0	2,8
Erro (%)	4,96	6,78	6,74

	LQ teste		
	sangue	Urina	H vitreo
Acetato de Etilo	25 mg/L		
	23,86	20,07	20,74
	22,85	20,68	20,40
	24,41	20,33	20,39
	21,77	21,34	20,55
	20,14	20,18	20,38
	Média (ng/mL)	22,00	20,13
Desvio padrão (s)	1,71	0,51	0,16
CV (%)	7,8	2,5	0,8
Erro (%)	12,00	19,50	18,03

	LQ teste		
	sangue	Urina	H vitreo
1-Butanol	25 mg/L		
	29,63	20,07	28,26
	29,10	20,68	28,92
	30,26	20,33	28,58
	27,04	21,34	28,89
	26,27	20,18	28,64
	Média (ng/mL)	27,95	20,13
Desvio padrão (s)	1,72	0,51	0,27
CV (%)	6,2	2,5	0,9
Erro (%)	11,80	19,50	14,63

	sangue	LQ teste	
		Urina	H vítreo
Tolueno		5 mg/L	
	3,98	5,23	5,78
	3,92	4,51	5,49
	4,15	5,40	5,67
	3,92	5,51	5,32
	4,13	5,56	4,93
Média (ng/mL)	4,06	5,40	5,44
Desvio padrão (s)	0,11	0,43	0,33
CV (%)	2,8	7,9	6,1
Erro (%)	18,90	7,9	8,76

	sangue	LQ teste	
		Urina	H vítreo
p-Xyleno		5 mg/L	
	3,95	5,25	5,78
	3,99	4,50	5,49
	4,12	5,48	5,68
	3,89	5,56	4,92
	4,10	5,30	5,14
Média (ng/mL)	4,03	5,28	5,46
Desvio padrão (s)	0,10	0,42	0,36
CV (%)	2,4	8,0	6,7
Erro (%)	19,50	5,5	9,20

5

	sangue	LQ teste	
		Urina	H vítreo
Clorofórmio		35 mg/L	
	30,16	33,27	30,38
	28,28	31,00	28,73
	28,28	32,00	27,64
	26,86	30,52	29,30
	23,86	33,41	28,56
Média (ng/mL)	27,01	33,34	28,92
Desvio padrão (s)	2,34	1,30	1,01
CV (%)	8,7	3,9	3,5
Erro (%)	22,83	4,74	17,37

AGRADECIMENTOS

Ao Senhor Professor Doutor Duarte Nuno Vieira por ter dado oportunidade de realizar este mestrado e de trabalhar num serviço que possui capacidades técnicas e científicas que permitiram a realização da minha formação e deste trabalho.

Ao Senhor Professor Doutor Francisco Corte Real agradeço o apoio incondicional que prestou ao longo deste mestrado, bem como o cuidado e rigor que colocou nas sugestões apresentadas.

Ao Mestre João Miguel Franco o meu reconhecimento pela forma como me apoiou desde o momento que decidi realizar este mestrado, bem como todo o conhecimento, rigor e confiança transmitido ao longo destes anos de trabalho em conjunto.

Aos colegas do Serviço de Toxicologia Forense da Delegação do Centro do INML, em particular aqueles que me são mais próximos, por estarem comigo nos bons momentos da realização deste trabalho, mas essencialmente nos mais difíceis de ultrapassar. O meu muito obrigado.

Ao Dr. António Ajenjo do Serviço de Toxicologia do Sul, pela forma como sempre se mostrou disponível para ensinar e transmitir os seus conhecimentos e a inestimável colaboração na análise dos resultados deste trabalho.

Ao Senhor Engenheiro Álvaro queria agradecer todo o apoio técnico-científico que sempre disponibilizou ao longo deste trabalho.

À Dra. Cristina Cordeiro pela disponibilidade em me ceder as amostras de humor vítreo utilizadas na realização deste estudo, bem como todo o incentivo e confiança.

Agradeço ao Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra pelo suporte científico prestado no estudo de algumas substâncias em análise na pessoa de Dra. Mariana Marques.

À Dra. Manuela Marques pelo auxílio na obtenção da bibliografia, especialmente pela rapidez e disponibilidade manifestadas.

À minha amiga Cristina Teixeira queria agradecer a sua disponibilidade no auxílio nas traduções, bem como o suporte constante na realização deste trabalho.

Quero agradecer à minha família, por todo o apoio incondicional prestado durante a realização deste trabalho, essencialmente ao Rui, Zé e Manel pela compreensão da minha ausência ao longo destes dois anos. O meu eterno obrigada.

À minha Avó...