

**MINISTÉRIO DA DEFESA
EXÉRCITO BRASILEIRO
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA
INSTITUTO MILITAR DE ENGENHARIA
CURSO DE MESTRADO EM QUÍMICA**

ELCIDE DOBLONI MARQUES MUNA

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO
SIMULTÂNEA DE COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS EM URINA
POR HS-CG/FID**

Rio de Janeiro

2017

INSTITUTO MILITAR DE ENGENHARIA

ELCIDE DOBLONI MARQUES MUNA

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO
SIMULTÂNEA DE COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS EM
URINA POR HS-CG/FID**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Mestrado em Química do Instituto Militar de Engenharia, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Robson Pacheco Pereira - D. Sc.

Rio de Janeiro
2017

c2017

INSTITUTO MILITAR DE ENGENHARIA

Praça General Tibúrcio, 80 – Praia Vermelha

Rio de Janeiro – RJ CEP: 22290-270

Este exemplar é de propriedade do Instituto Militar de Engenharia, que poderá incluir o mesmo em base de dados, armazenar em computador, microfilmear ou adotar qualquer forma de Arquivamento.

É permitida a menção, reprodução parcial ou integral e a transmissão entre bibliotecas deste trabalho, sem modificação de seu texto, em qualquer meio que esteja ou venha a ser fixado, para pesquisa acadêmica, comentários e citações, desde que sem finalidade comercial e que seja feita a referência bibliográfica completa.

Os conceitos expressos neste trabalho são de responsabilidade do autor e dos orientadores.

540	Muna, Elcide Doblioni Marques
M963d	Desenvolvimento de método para determinação simultânea de compostos orgânicos voláteis em urina por HS-CG/FID / Elcide Doblioni Marques Muna; orientado por Robson Pacheco Pereira – Rio de Janeiro: Instituto Militar de Engenharia, 2017. 89p.: il. Dissertação (Mestrado) – Instituto Militar de Engenharia, Rio de Janeiro, 2017. 1. Curso de Química – teses e dissertações. 2. Urina. 3. Metrologia Química. I. Pereira, Robson Pacheco. II. Título. III. Instituto Militar de Engenharia.

INSTITUTO MILITAR DE ENGENHARIA

ELCIDE DOBLONI MARQUES MUNA

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA
DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE COMPOSTOS
ORGÂNICOS VOLÁTEIS EM URINA POR HS-CG/FID**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Mestrado em Química do Instituto Militar de Engenharia, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Robson Pacheco Pereira - D.C.

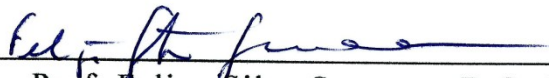
Aprovada em 22 de Maio de 2017 pela seguinte Banca Examinadora:



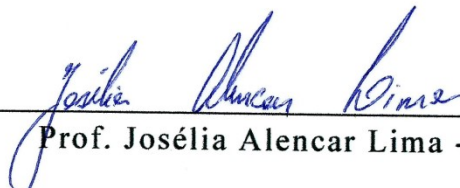
Prof. Robson Pacheco Pereira - D.C. do IME - Presidente



Prof. Luiz Eduardo Pizarro Borges - D.C. do IME



Prof. Felipe Silva Semaan - D.C. da UFF



Prof. Josélia Alencar Lima - D.C. do IME

Rio de Janeiro
2017

AGRADECIMENTOS

Aos Familiares que viveram o percurso do mestrado comigo, especialmente meu pai, José Maria Marques Muna e minha mãe, Giuseppina Doblioni Muna.

Ao Instituto Militar de Engenharia pela oportunidade de realização do Curso de Mestrado em Química.

Aos professores dos Cursos de Pós Graduação em Química do IME, pelos ensinamentos e aconselhamentos transmitidos, especialmente os professores Luiz Eduardo Pizarro Borges, Josélia Alencar Lima e TC Tanos França.

Ao meu orientador e amigo, Robson Pacheco Pereira, pelo apoio na pesquisa e no percurso.

À todos os meus grandes amigos, em especial, Adriano França de Mello, em homenagem póstuma.

Ao Sistema Firjan, que através do Centro de Tecnologia SENAI-Ambiental, colaborou com a execução do presente trabalho.

A todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para o êxito do presente trabalho.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de mestrado.

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	7
LISTA DE TABELAS.....	8
LISTA DE SIGLAS.....	10
1 INTRODUÇÃO.....	13
1.1 As técnicas de análise dos agentes químicos	19
1.2 Análises através da técnica de headspace	20
2 OBJETIVOS.....	24
3 MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1 Materiais	25
3.2 Equipamentos.....	25
3.3 Desenvolvimento do método proposto	26
3.3.1 Método cromatográfico	26
3.3.2 Método de headspace	27
3.3.3 Amostras de urina.....	28
3.4 Parâmetros de mérito	28
3.4.1 Faixa de trabalho	29
3.4.2 Seletividade	30
3.4.3 Linearidade	31
3.4.4 Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ).....	33
3.4.5 Recuperação.....	33
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
4.1 Condições analíticas	35
4.1.1 Preparo dos padrões e amostras	35
4.1.2 Condições dos equipamentos.....	38
4.2 Validação analítica	43

4.2.1	Faixa de trabalho	43
4.2.2	Seletividade	44
4.2.2.1	Diclorometano.....	46
4.2.2.2	Metilisobutilcetona	51
4.2.2.3	Tetraidrofurano.....	54
4.2.2.4	Tolueno	57
4.2.3	Linearidade.....	60
4.2.4	Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)	67
4.2.5	Recuperação	73
4.2.6	Comentários finais sobre a metodologia de extração	76
5	CONCLUSÃO	78
6	PROSPECÇÕES FUTURAS	79
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIG. 1.1	Deslocamento de particionamento (adaptado Perkin Elmer).....	21
FIG. 3.1	Cromatógrafo e extrator de headspace (fonte: Perkin Elmer).	26
FIG. 4.1	Fluxograma de preparo dos padrões.....	38
FIG. 4.2	Programação de temperatura do forno.....	40
FIG. 4.3	Programação de fluxo de gás de arraste.	40
FIG. 4.4	Perfil de cromatograma de uma amostra de urina fortificada.	42
FIG. 4.5	Curvas analíticas do diclorometano.	48
FIG. 4.6	Curvas analíticas da metilisobutilcetona.	52
FIG. 4.7	Curvas analíticas do tetraidrofurano.....	55
FIG. 4.8	Curvas analíticas do tolueno.....	58
FIG. 4.9	Dispersão de resíduos para o diclorometano.....	61
FIG. 4.10	Dispersão de resíduos para a metilisobutilcetona.....	62
FIG. 4.11	Dispersão de resíduos para o tetraidrofurano.....	63
FIG. 4.12	Dispersão de resíduos para o tolueno.....	64

LISTA DE TABELAS

TAB. 1.1	Propriedades físico-químicas e limites das substâncias.....	15
TAB. 4.1	Preparo da solução estoque de analitos (Solução 1A).	36
TAB. 4.2	Preparo da solução estoque de padrão interno (Solução 2A).....	36
TAB. 4.3	Concentrações das soluções intermediárias 1B e 2B.	37
TAB. 4.4	Concentrações para a curva analítica.....	37
TAB. 4.5	Condições utilizadas para a extração headspace.	39
TAB. 4.6	Configurações do cromatógrafo a gás.	41
TAB. 4.7	Tempos de Retenção dos analitos.....	42
TAB. 4.8	Faixas de trabalho em µg/L.	44
TAB. 4.9	Dados das curvas do diclorometano.....	46
TAB. 4.10	Coeficientes das curvas analíticas do diclorometano.....	47
TAB. 4.11	Dados das curvas da metilisobutilcetona.....	51
TAB. 4.12	Coeficientes das curvas analíticas da metilisobutilcetona.....	52
TAB. 4.13	Dados das curvas do tetraidrofurano.....	54
TAB. 4.14	Coeficientes das curvas analíticas do tetraidrofurano.....	55
TAB. 4.15	Dados das curvas do tolueno.....	57
TAB. 4.16	Coeficientes das curvas analíticas do tolueno.....	58
TAB. 4.17	Valores consolidados de tcalc..	59
TAB. 4.18	Valores dos coeficientes de determinação.	60
TAB. 4.19	Valores obtidos no teste C de Cochran.	65
TAB. 4.20	Limites de Detecção e Quantificação do diclorometano.	68
TAB. 4.21	Limites de Detecção e Quantificação da metilisobutilcetona.	68
TAB. 4.22	Limites de Detecção e Quantificação do tetraidrofurano.	69
TAB. 4.23	Limites de Detecção e Quantificação do tolueno.	69

TAB. 4.23	Limites de Detecção e Quantificação em $\mu\text{g/L}$	70
TAB. 4.24	Valores de recuperação dos analitos.	73
TAB. 4.25	Intervalos de recuperação em função das concentrações.....	74
TAB. 4.26	Coeficientes de variação em função das concentrações.	75

LISTA DE SIGLAS

DCM	- Diclorometano
MIBC	- MetilIsobutilcetona
THF	- Tetrahidrofurano
TOL	- Tolueno
IBE	- Índice Biológico de exposição
ACGIH	- American Conference of Governmental Industrial Hygienists
INMETRO	- Instituto nacional de metrologia
FUNDACENTRO	- Fundação Jorge D. F. de Segurança e Medicina do Trabalho
CCE	- Comissão da Comunidade Européia
OSHA	- Occupational Safety and Health Administration
LEO	- Limite de exposição ocupacional
NR	- Norma regulamentadora
TLV	- Threshold limit Values
TWA	- Time Weight Average
STEL	- Short Time Exposure Limit
LT	- Limite de tolerância
NA	- Nível de Ação
MAC	- Maximum Allowable Concentrations
ANSI	- American National Standards Institute
MAK	- Maximale Arbeitsplatzkonzentration
PELS	- Permissible Exposure Limits
RELS	- Recommended Exposure Limits
IBMP	- Índice biológico máximo permitido
CV	- Coeficiente de Variação
CG	- Cromatografia a gás
CPGL	- Cromatografia de partição gás-líquido
DIC	- Detector de ionização em chama
DCE	- Detector de captura de elétrons
LD	- Limite de detecção
LQ	- Limite de quantificação
SPME	- Solid Phase Micro Extration

RESUMO

A determinação dos solventes orgânicos voláteis diclorometano (DCM), metilisobutilcetona (MIBC), tetrahidrofurano (THF) e tolueno (TOL), em urina, é aplicada no monitoramento toxicológico de trabalhadores de diversas atividades industriais e indivíduos que tenham tido contato com as espécies químicas através de outros meios.

Foi aplicada a técnica de cromatografia a gás com detector de ionização em chama e sistema de extração de *headspace*. Foi efetuado um levantamento bibliográfico sobre as características físico-químicas de todas as substâncias estudadas, especialmente, dados de toxicidade e toxicocinética, capazes de justificar o seu monitoramento através da urina.

A metodologia desenvolvida foi submetida a validação nos parâmetros de seletividade, linearidade, avaliação de resíduos, limite de detecção, limite de quantificação, recuperação e repetibilidade.

Todos os analitos obtiveram seletividade positiva, sendo capazes de prover sinais específicos e não influenciáveis pelos componentes oriundos da matriz. Em todos os casos os coeficientes de correlação linear ao quadrado foram superiores a 0,99 provendo distribuições de resíduos, de acordo com o teste C de Cochran, homocedáticas (livres de tendências ao longo da faixa linear). Os Limites de Quantificação (LQ) obtidos foram, em média, quatro vezes menores do que os valores apontados pelo *Biological Exposure Indices* (BEI[®]) da *American Conference of Governmental Industrial Hygienists* (ACGIH). As recuperações obtidas para todos os analitos estão no intervalo de 99 – 100% e todos os ensaios replicados não houveram coeficientes de variação superiores a 5%. O método desenvolvido é aplicável ao monitoramento biológico, em urina, das substâncias estudadas.

ABSTRACT

The determination of the volatile organic solvents dichloromethane (DCM), methylisobutylketone (MIBC), tetrahydrofuran (THF) and toluene (TOL) in urine is applied in the toxicological monitoring of workers of various industrial activities and individuals who have had contact with the chemical species from other sources.

The gas chromatography technique with flame ionization detector and headspace extraction system was applied. A literature review was carried out on the physico-chemical characteristics of all the substances studied, especially toxicity and toxicokinetic data, which could justify their monitoring through the urine.

The methodology was submitted to validation in the parameters of selectivity, linearity, residue evaluation, limit of detection, limit of quantification, recovery and repeatability.

All the analytes obtained positive selectivity, being able to provide specific signals and not influenced by the components coming from the matrix. In all cases linear squared correlation coefficients were higher than 0.99, providing homogeneous distributions of residues, according to the Cochran C test (free of trends along the linear range). The quantification limits (LOQ) obtained were, on average, four times lower than the values indicated by the Biological Exposure Indices (BEI®) of the American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH). The recoveries obtained for all analytes are in the range of 99-100% and all replicate assays had no coefficients of variation greater than 5%. The method developed is applicable to the biological monitoring, in urine, of the substances studied.

1. INTRODUÇÃO

A utilização de agentes químicos é uma constante necessidade em diversos setores industriais, incluindo-se os petroquímicos, farmacêutico, têxteis, de calçados, etc. Embora necessários para o desenvolvimento de um sem número de atividades, alguns agentes químicos podem oferecer riscos ocupacionais. Os danos podem variar desde uma simples cefaléia até comprometimento neurológico ou mesmo morte (BRUCKNER e WARREN, 2001).

Em diversos países do mundo há programas voltados para a saúde e segurança do trabalhador, para reduzir os riscos de intoxicações ocupacionais causadas por agentes químicos a níveis biologicamente aceitáveis, de acordo com as normas regulamentadoras de cada país. No Brasil, as relações de saúde ocupacional, associadas a produtos/substâncias químicas, são regidas principalmente por três Normas Regulamentadoras (NR):

- NR-7 – Programa de Controle Médico de Saúde Ocupacional (PCMSO)
- NR-9 – Programa de Prevenção de Riscos Ambientais (PPRA)
- NR-15 – Atividades e Operações Insalubres.

O empregador precisa atender às exigências das NRs, submetendo o funcionário a exames e procedimentos de rotina a fim de controlar as taxas de toxicidade dentro dos limites permitidos pela legislação vigente.

A NR-7 estabelece a obrigatoriedade de elaboração e implementação, por parte de todos os empregadores e instituições que admitam trabalhadores como empregados, do PCMSO, com o objetivo de promoção e preservação da saúde do conjunto dos seus trabalhadores. A NR-7 estabelece os parâmetros mínimos e diretrizes gerais que devem ser observadas na execução do PCMSO.

Quanto a NR-9 o objetivo é garantir a proteção dos empregados sob a perspectiva da integridade física e psicológica, utilizando como mecanismo a manutenção de um ambiente minimamente saudável para a não influência sobre sua saúde. A NR-9 estabelece a obrigatoriedade da elaboração e implementação, do PPRA, por parte de todos os empregadores e instituições que admitam trabalhadores como empregados. Essa NR é parte integrante do conjunto mais amplo das iniciativas da empresa no campo da preservação da saúde e da integridade dos trabalhadores, devendo estar articulado com o disposto nas demais NR, se comunicando diretamente com a NR-15 e, em especial com o PCMSO previsto na NR-7.

A NR-15 estabelece os limites e tolerâncias nas atividades e operações insalubres no ambiente de trabalho, para fatores de risco físico, químico e biológico. Fica a cargo dessa NR, definir as substâncias e valores de referência para o estabelecimento da margem de insalubridade.


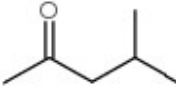

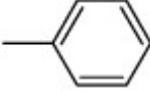
Embora as normas brasileiras contemplem os limites de biológicos de exposição a uma variedade de agentes químicos, alguns agentes ainda não foram contemplados nessas normas. Nesses casos, é indicado que sejam seguidos os parâmetros sugeridos pela *American Conference of Governmental Industrial Hygienists* (ACGIH) (NR-9).

A ACGIH é a maior referência mundial, no âmbito de higiene e toxicologia ocupacional. Se trata de uma instituição não governamental, privada, sem fins lucrativos, cujos membros são higienistas ocupacionais ou profissionais de segurança e saúde ocupacional dedicados a promover a saúde e a segurança dentro de um local de trabalho. A ACGIH publica guias de orientações denominados *Threshold Limit Values* (TLV[®]) e *Biological Exposure Indices* (BEI[®]), para utilização por higienistas ocupacionais na tomada de decisões em relação a níveis de exposição seguros de vários agentes químicos e físicos encontrados no ambiente de trabalho. Os TLVs[®] indicam valores de referência para contaminantes químicos ou fatores físicos (som, vibração, radiação...etc) em um ambiente de trabalho, estimando valores os quais assegurem a saúde do trabalhador. Já os BEIs[®] são valores de referência biológica para evidência direta de interações de substâncias com o

corpo dos trabalhadores submetidos a ambientes insalubres. Funcionários expostos a essas substâncias, associam pequenos sintomas como dores de cabeça, confusão mental, irritações diversas, queimação nas mucosas e problemas respiratórios, à exposição a esses agentes (BRUGNONE *et al.*, 1995).

No final da década de 90, já haviam sido descritas para monitoramento mais de 600 substâncias químicas que podiam gerar algum tipo de dano à saúde do trabalhador (ACGIH, 2010). Dentre essas, o diclorometano (DCM), metilisobutilcetona (MIBC), tetraidrofurano (THF) e o tolueno (TOL) são algumas das substâncias mais utilizadas na indústria abrangendo quase todos os segmentos produtivos. Essas substâncias também estão entre as mais tóxicas tanto pelos efeitos capazes de induzir como pela facilidade com que são absorvidas pelo corpo humano. Algumas informações sobre essas substâncias estão agrupadas na TAB. 1.1.

TAB. 1.1 Propriedades físico-químicas e limites das substâncias.

Parâmetro	DCM	MIBC	THF	TOL
Estrutura				
CAS	75-09-2	108-10-1	109-99-9	108-88-3
Temperatura de Ebulição	40°C	115,8°C	65,5°C	110,6°C
Temperatura de Fusão	-95,1°C	-84,7°C	-108,5°C	-93°C
Densidade (a 25°C)	1,330 g/mL	0,802 g/mL	0,889 g/mL	0,865 g/mL
NR-7 (IBMP)	Carboxihemoglobina até 3,5%	-	-	Ac. Hipúrico em urina 2,5 g/g creatinina
ACGIH (BEI [®])	DCM em urina 300 µg/L	MIBC em urina 1000 µg/L	THF em urina 2000 µg/L	TOL em urina 30 µg/L

O diclorometano (DCM) é utilizado industrialmente como removedor, intermediário para diversos medicamentos e solventes em geral e, especialmente, no processo de descafeinação do café e do chá (ATSDR, 2000). Seus efeitos tóxicos principais incluem o aumento da predisposição ao câncer, doenças no coração, sistema nervoso central, fígado e irritações na pele ou olhos (WINSTON *et al.*, 2000). A exposição ocorre principalmente pela inalação e absorção cutânea (OSHA, Method 80). A NR-7 aponta como indicador biológico a carboxihemoglobina (COHb), tendo Valores de Referência (VR) de 1% e Índice Biológico Máximo Permitido (IBMP) de 3,5%, ambos os valores se aplicam somente a não fumantes. A ACGIH sugere para o monitoramento do diclorometano a determinação da própria substância diretamente em urina, apontando como Índice Biológico de Exposição (IBE) o valor de 300 µg/L.

O reconhecimento de que o diclorometano pode ser metabolizado e ligado à hemoglobina para formar COHb, resultando em uma redução na capacidade de transporte de oxigênio do sangue (STEWART *et al.*, 1972a, b), induziu investigações sobre risco de doença cardíaca isquêmica e outros efeitos cardiovasculares. Pouco se sabe sobre os efeitos neurológicos de longo prazo das exposições crônicas, embora haja estudos que forneçam alguma evidência de aumento da prevalência de sintomas neurológicos em trabalhadores com exposições médias de 75-100 ppm (CHERRY *et al.*, 1981; 1983) e longas de 100-200 ppm (LASH *et al.*, 1991). A eliminação de diclorometano na urina de seres humanos expostos é geralmente pequena, com níveis urinários de diclorometano na ordem de 20-25 ou 65-100 µg/L nas 24 horas após exposição por inalação de 2 horas a 100 ou 200 ppm, respectivamente (DIVINCENZO *et al.*, 1972). Há correlação direta entre os níveis urinários e de exposição ao diclorometano (SAKAI *et al.*, 2002).

A metilisobutilcetona (MIBC) é utilizada industrialmente para na produção de tintas, pesticidas, adesivos, separação de cera/óleo, acabamento de couro, revestimento têxtil, como desnaturante para formulações de etanol e produção de antioxidantes de borracha (BRAITHWAITE, 1995). Seus efeitos tóxicos principais incluem irritação aos olhos, nariz, garganta e pele, pode

causar dores de cabeça e náuseas. São observados efeitos sobre o fígado e rins. Exposições a altas concentrações podem oferecer risco de vida em função dos efeitos narcóticos (OSHA, Method 1004). Não consta menção dessa substância na NR-7, mas consta na ACGIH, sendo o MIBC monitorado em urina, com Índice Biológico de Exposição (IBE) de 1000 µg/L.

Vários estudos de exposições ocupacionais a misturas de vapores de solventes que incluíram MIBC relataram vários efeitos neurológicos. Redução do desempenho neurocomportamental e aumento da prevalência de sintomas neurológicos agudos foram observados entre pintores de estaleiros expostos a misturas complexas de vapor de solventes quando comparados a um grupo de controle não exposto correspondente à idade, sexo, raça e educação (VALCIUKAS *et al.*, 1985). A deficiência em desempenho contínuo, comparação de padrões e memória padrão foi relatada em trabalhadores de fabricação de tintas expostos a misturas de solventes que incluíram MIBC (TSAI *et al.*, 1997).

O tetraidrofurano (THF) é utilizado industrialmente como solvente de polímeros plásticos, tintas, intermediário na produção de diversas outras substâncias puras ou complexas (combustíveis, vitaminas, hormônios, medicamentos, inseticidas...etc.). Seus efeitos tóxicos principais estão associados ao sistema nervoso central e, especialmente, ao fígado. Não consta menção dessa substância na NR-7, mas consta na ACGIH, sendo o THF monitorado em urina, com Índice Biológico de Exposição (IBE) de 2000 µg/L.

A exposição ao THF é principalmente por inalação ou absorção dérmica no local de trabalho. A exposição não ocupacional é incomum, mas pode ocorrer por via inalatória e oral e pela contaminação do ambiente (ar e água) (NTP, 1998). Há vários relatos (GARNIER *et al.*, 1989; ALBRECHT *et al.*, 1987; JUNTUNEN *et al.*, 1984; EDLING, 1982; EMMETT, 1976) de intoxicação ocupacional de encanadores, por uso de cola contendo THF. Ong *et al.* (1991) sugerem que a expiração é uma importante via de excreção para o THF, juntamente com a eliminação urinária.

O tolueno (TOL) é o mais tóxico entre os quatro agentes químicos citados e é o que apresenta maior utilização industrial, sendo o principal

substituinte do benzeno em diversas atividades onde a utilização desse composto foi proibida. O tolueno é utilizado industrialmente em diversos segmentos, desde alimentos até combustíveis. É um forte depressor do sistema nervoso central, conduzindo à confusão mental, perda de coordenação motora e inconsciência, podendo em casos de exposição aguda conduzir à morte (OSHA, Method 111). Consta na NR-7, como sendo o seu respectivo indicador biológico o Ácido Hipúrico em urina. O VR é de até 1,5 g/g de creatinina e o IBMP é de 2,5 g/g de creatinina. A ACGIH sugere para o monitoramento do tolueno a determinação da própria substância diretamente em urina, apontando como Índice Biológico de Exposição (IBE) o valor de 30 µg/L. Intensos danos cerebrais são descritos em usuários que cheiraram cronicamente tolueno ou cola à base de tolueno. (SHERMAN and GUILLERY, 2006; HORMES *et al.*, 1986; HUNNEWELL e MILLER, 1998; KIYOKAWA *et al.*, 1999; LAZAR *et al.*, 1983; POBLANO *et al.*, 1996; SASA *et al.*, 1978; TOYONAGA *et al.*, 1989; EHYAI E FREEMON, 1983).

Diversos estudos ocupacionais examinaram os efeitos da exposição ao tolueno por inalação. Os efeitos mais observados são os neurológicos, incluindo visão alterada, tontura, fadiga, dor de cabeça e diminuição do desempenho em testes neurocomportamentais. Estudos em seres humanos mostraram que a maioria do tolueno no corpo é eliminada na urina, principalmente como metabólito (ácido hipúrico) (LÖF *et al.*, 1990, 1993; TURKALL *et al.*, 1991; TARDIF *et al.*, 1992, 1998). Os níveis urinários de ácido hipúrico são utilizados como biomarcador de exposição aguda ao tolueno (LOWRY, 1987). O tolueno em urina, amostrado no final do turno de trabalho, apresenta-se como o marcador biológico mais apropriado para exposições mais longas (KAWAI *et al.*, 2008). É possível correlacionar os efeitos toxicológicos observados nos casos do uso do tolueno como droga com os casos de exposição ocupacional, uma vez que os sintomas sejam parecidos e comparáveis, torna-se viável extrapolar os efeitos observados nos usuários para os casos de exposição aguda ao tolueno.

1.1. AS TÉCNICAS DE ANÁLISE DOS AGENTES QUÍMICOS

Para todas as substâncias referenciadas na NR-7, também são apontadas as técnicas analíticas aos quais devem ser procedidos os monitoramentos. No caso das substâncias diclorometano e tolueno, as técnicas são respectivamente, espectrometria UV/VIS e cromatografia líquida.

Como A NR-7 não contempla o monitoramento da metilisobutilcetona e do tetraidrofurano, convém adotar o preconizado pela ACGIH, de acordo com o que fora citado anteriormente. Cabendo para ambas as determinações a técnica de cromatografia a gás.

A espectrometria UV/VIS é uma das técnicas analíticas mais tradicionais, com aplicações que se estendem por todas as áreas das ciências. Seu funcionamento é baseado no princípio da indução de transições eletrônicas nas moléculas as quais se querem analisar (SKOOG *et al.*, 2006).

A grande característica de ser aplicável a várias áreas é também o seu maior ponto fraco, pois suas aplicações são majoritariamente associadas a determinações qualitativas e semi-quantitativas, necessitando de procedimento diferenciado para determinações quantitativas. A aplicação dessa técnica para fins quantitativos, requer uma complexa etapa de preparo de amostra para evitar ou atenuar as interferências características dessa técnica analítica de ordem química e/ou espectral, geralmente causadas por substâncias concorrentes.

As deficiências da espectrometria UV/VIS limitam sua utilização a matrizes analíticas simples quando analisadas substâncias mais complexas e no caso de matrizes mais complexas somente substâncias simples.

A técnica da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é bastante utilizada e aplicável adequadamente para fins qualitativos, semi-quantitativos e quantitativos (DONG, 2006; SNYDER and KIRKLAND, 2009). É baseada na separação química dos componentes de uma dada amostra, a partir de suas propriedades físico-químicas (MEYER, 2004). Essa técnica também requisita uma etapa de preparo de amostra, como forma de facilitar o

processo de separação química, reduzindo o máximo possível a quantidade e diversidade de substâncias potencialmente complicadoras do processo analítico. A cromatografia líquida permite o isolamento e determinação de substâncias contidas nas amostras (McMASTER, 2007).

A técnica de cromatografia a gás (CG) consiste de uma separação química dos componentes da amostra em fase gasosa, para tal, a amostra líquida é injetada no equipamento e vaporizada instantaneamente (SKOOG *et al.*, 2006; GROB, 2004). Assim como as demais, depende de um tratamento prévio da amostra com objetivo de eliminar componentes não vaporizáveis. O ponto fraco dessa técnica é a restrição a aplicação em substâncias estáveis termicamente e o acúmulo de resíduos, oriundos das amostras, no corpo do injetor, fazendo com as injeções não sejam uniformes (SKOOG *et al.*, 2006).

Tanto na CLAE quanto na CG é observada a capacidade de efetuar separação e isolamento da substância de interesse para proceder a análise, no entanto, nos dois casos ainda incidem os erros provindos das etapas de manipulação e preparo das amostras.

Em todos os casos, os ensaios químicos são severamente impactados pela complexidade da matriz, analitos e a disponibilização dos mesmos à análise.

1.2. ANÁLISES ATRAVÉS DA TÉCNICA DE HEADSPACE

Os ensaios químicos utilizando técnicas de espectrometria UV/VIS, CLAE e CG, prescindem de etapas de preparo da amostra. A execução dessas etapas de preparo demandam tempo, exigem um elevado consumo de amostra e aumentam a possibilidade de erros de no resultado final.

A técnica de CG associada a extração de *headspace* (HS-CG) elimina perdas observadas com os outros métodos, uma vez que as etapas de preparo são substituídas pela etapa de extração por *headspace* acoplado ao CG (KOLB e ETTRE, 2006). Essa etapa consiste de pré-evaporação e concentração dos analitos na fase gasosa do frasco de *headspace*. A técnica HS-CG permite

eliminar totalmente a injeção dos resíduos oriundos das amostras e concentrar as substâncias de interesse aumentando dessa forma a sensibilidade de detecção dessas substâncias no instante da análise (KOLB e ETTRE, 2006).

A FIG 1.1 ilustra o mecanismo de deslocamento de particionamento em função da temperatura, a favor da fase de vapor.

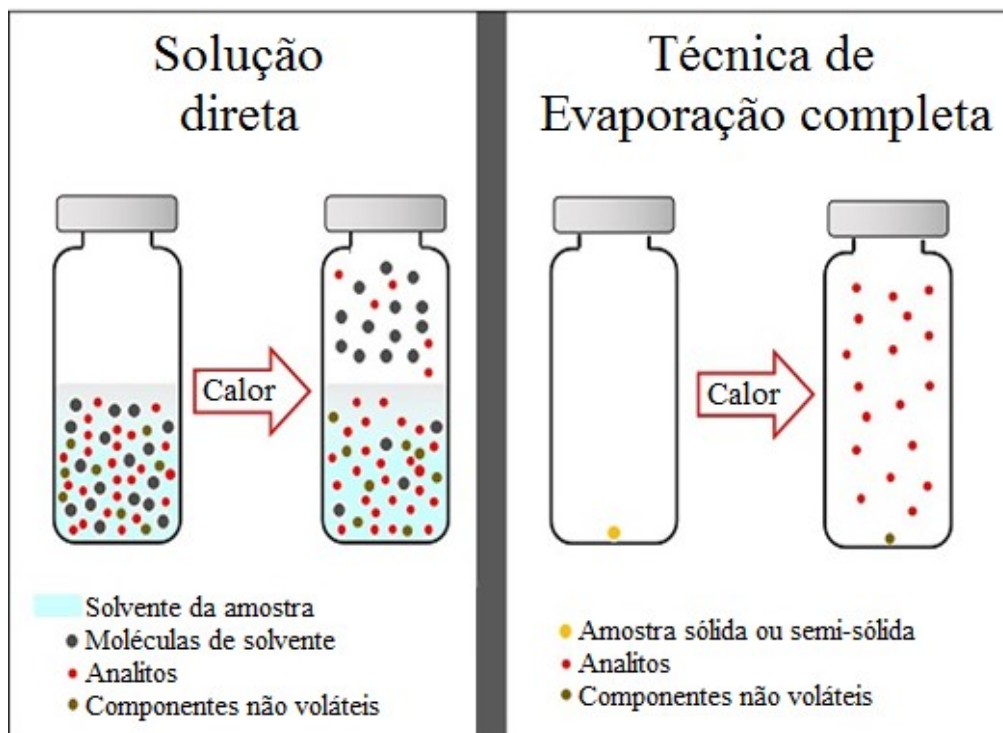


FIG. 1.1 Deslocamento de particionamento (adaptado Perkin Elmer, 1997).

O processo acima é efetuado diretamente no equipamento de *headspace*, através do controle dos parâmetros de temperatura de equilíbrio, tempo de estabilização, temperatura da linha de transferência, pressão introduzida no *vial* e volume de injeção (SKOOG *et al.*, 2002). A otimização desses parâmetros é decisiva para minimizar variações no procedimento de injeção da amostra no cromatógrafo influenciando diretamente nas variações do tempo de retenção e na forma dos picos cromatográficos (HIGSON, 2004).

O funcionamento da extração de *headspace* pode ser descrito em quatro etapas, da seguinte forma:

- Condicionamento térmico – A amostra é introduzida dentro do forno do equipamento, onde será aquecida até a temperatura alvo para a extração;
- Estabilização – Ao alcançar a temperatura selecionada, a amostra permanecerá até que o particionamento adequado do analito entre as fases tenha sido alcançado. Essa etapa é de máxima importância, pois se associa diretamente com a porção de analito que será introduzida no sistema;
- Pressurização – Quando a amostra passa pela fase de estabilização, a seringa de injeção é introduzida no *vial* e injeta o próprio gás de arraste, com objetivo de que este se misture com a fase gasosa e aumente a pressão interna do *vial*. Essa etapa garante a uniformidade da transferência de massa gasosa para o cromatógrafo;
- Descompressão e introdução no sistema – Imediatamente na seqüência da pressurização, inicia-se essa etapa, que consiste na ligação da seringa de injeção com o injetor do cromatógrafo. A amostra se expandirá pela diferença de pressão até o injetor, onde será carregada pelo gás de arraste dando início ao processo de separação na coluna. A importância dessa etapa associa-se à velocidade de injeção, uma pressão baixa demais pode representar uma injeção com atraso, o que cromatograficamente seria evidenciado através de alargamentos no pico oriundo do analito.

A técnica HS-CG já foi utilizada por outros pesquisadores para determinações dessas substâncias, porém, de formas isoladas, KAWAI *et al.* (2003) utilizaram a técnica para a determinação de metilisobutilcetona (MIBC) e metiletilcetona (MEC) em urina, ONG *et al.* (1991) determinaram tetrahidrofurano em urina, POLI *et al.* (2005) e NETTO *et al.* (2008) utilizaram a técnica *Solid-Phase Microextraction* (SPME) associada a técnica de *headspace* (HS-SPME-CG) para a determinação, respectivamente, de diclorometano e tolueno em urina.

A técnica de HS-SPME-CG consiste de uma extração em fase sólida, efetuada através da adsorção dos analitos da amostra em colunas de sílica fundida recobertas por filmes finos de polímeros (como o polimetilsiloxano, poliacrilato ou carbowax) e posteriormente submetendo ao *headspace* e análise cromatográfica (PAWLISZYN, 1997; 1999). Essa técnica é um recurso para purificação de amostras e pré-concentração dos analitos da amostra, apresenta no entanto um grande limitação associada a seletividade das substâncias analisadas, pois devem possuir propriedades químicas muito similares, em função da fase da coluna utilizada (PAWLISZYN, 1997; 1999).

A técnica de HS-CG apresenta uma grande aplicabilidade e potencial a ser explorado para o desenvolvimento de métodos de determinação simultânea de diversas substâncias sem a limitação de similaridade química, permite alcançar limites de detecção inferiores às demais técnicas e sem manipulação direta da amostra.

2. OBJETIVOS

O objetivo desse trabalho foi o desenvolvimento de um método para a determinação simultânea das substâncias diclorometano, metilisobutilcetona, tetraidrofurano e tolueno em matriz de urina, utilizando a técnica de CG-HS.

Efetuar a validação do método analítico gerando evidência estatística para cada um dos analitos estudados, propondo um modelo de validação para futuras aplicações em matrizes biológicas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MATERIAIS

As substâncias diclorometano, metilisobutilcetona, tetraidrofurano, tolueno, fluorbenzeno e metanol, todos de grau UV/HPLC ou equivalente e oriundos da Sigma-Aldrich; Brasil. Foi utilizada água ultrapura, oriunda de sistema Milli-Q[®].

Foram utilizadas micropipetas automáticas da Eppendorf, nos volumes de 10 a 100 μL , 100 a 1000 μL , 1000 a 10000 μL e suas respectivas ponteiras. Balões volumétricos calibrados nos volumes de 50 e 100 mL, termômetros para monitoramento de temperatura ambiente e *vials* de *headspace* de volume total de 20 mL com tampas lacráveis.

3.2. EQUIPAMENTOS

Para a realização dos experimentos analíticos, foram utilizados os equipamentos descritos a seguir, conjuntamente às suas condições de operação.

Foi utilizado um sistema de injeção por *headspace* (Turbo Matrix 40 Trap - Perkin Elmer) acoplado a um cromatógrafo a gás com detector de ionização em chama (CG-DIC) (Clarus 500 - Perkin Elmer). A coluna utilizada foi do tipo DB-624 com 60 m de comprimento, 250 μm de diâmetro e 1,4 μm de filme interno. A FIG 3.1 apresenta um sistema analítico similar ao utilizado para as determinações no presente trabalho.



FIG. 3.1 Cromatógrafo a gás e extrator de headspace (fonte: Perkin Elmer).

3.3. DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO PROPOSTO

3.3.1. MÉTODO CROMATOGRÁFICO

Para se definir o perfil cromatográfico dos analitos de interesse, preparou-se um padrão (padrão de desenvolvimento) contendo os quatro analitos (diclorometano, metilisobutilcetona, tetraidrofurano e tolueno), Foram pipetados 100 μL de cada um dos analitos para um balão volumétrico de 100 mL, contendo 5 mL de Metanol. O balão foi fechado e agitado manualmente durante aproximadamente 1 minuto e em seqüência avolumou-se utilizando água ultrapura. Em seguida foi submetido à agitação magnética por 60 minutos a temperatura de 25°C. As concentrações finais dos analitos são: 1330 mg/L (diclorometano); 802 mg/L (metilisobutilcetona); 889 mg/L

(tetraidrofurano); 865 mg/L (tolueno). O mesmo procedimento foi realizado na preparação do padrão interno, constituído apenas do fluorbenzeno na concentração de 1024 mg/L.

Para a determinação dos parâmetros cromatográficos foram testadas diversas condições analíticas, variando-se a programação de aquecimento do forno, fluxo do gás de arraste (somente o Hélio foi utilizado como gás de arraste), temperatura do injetor, temperatura do detector e proporção dos gases de queima do detector (Hidrogênio e Ar comprimido).

O ponto ótimo do desenvolvimento é a obtenção de condições capazes de separar adequadamente os analitos permitindo medições sem interferentes no detector com o menor tempo de análise possível.

3.3.2. MÉTODO DE HEADSPACE

Para a realização da extração de *headspace*, a amostra original é acondicionada em um frasco fechado que é então aquecido até uma determinada temperatura e os compostos voláteis têm o seu particionamento de equilíbrio líquido-gasoso deslocado a favor da fase gasosa. Depois de algum tempo, o sistema alcança o equilíbrio e os compostos voláteis presentes na fase vapor são analisados pela técnica de CG. Ao extrair uma alíquota da fase vapor, torna-se possível analisar os compostos voláteis sem interferência da matriz não volátil (KOLB e ETTRE, 2006).

Para o desenvolvimento desse método de *headspace*, o padrão de desenvolvimento e o padrão interno foram diluídos, obtendo-se concentrações finais dos analitos de: 0,133 mg/L (diclorometano); 0,802 mg/L (metilisobutilcetona); 0,089 mg/L (tetraidrofurano); 0,086 mg/L (tolueno) e do padrão interno de 0,102 mg/L (fluorbenzeno).

Foram testadas as variáveis de temperatura de incubação, tempo de incubação, temperatura da agulha, tempo de pressurização, temperatura da linha de transferência, volume de amostra e volume de padrão interno.

O ponto ótimo do desenvolvimento é a obtenção de condições capazes de gerar o maior tamanho de pico, ou seja, maior contagem de área, mantendo os parâmetros cromatográficos já desenvolvidos.

3.3.3. AMOSTRAS DE URINA

Um conjunto de amostras de urina de indivíduos não expostos (cedidas pelo Centro de Tecnologia SENAI – Ambiental. Integrante do Sistema FIRJAN), previamente descaracterizadas e avaliadas quanto a data de coleta e forma de estocagem, sendo observado tempo de coleta não superior a dois dias e armazenagem em geladeira, foi misturado e homogeneizado, compondo o que pode ser denominado “*pool*”, o volume inicialmente dedicado para os procedimentos experimentais foi de aproximadamente 500 mL, cabendo a reprodução do procedimento de composição do “*pool*”, caso necessário.

O preparo dos padrões em matriz de urina foi efetuado nas mesmas condições que os aquosos, substituindo-se somente a água ultrapura com 5% de metanol, pela urina oriunda do “*pool*”. O padrão interno não foi preparado em urina.

3.4. PARÂMETROS DE MÉRITO

A validação estatística do método proposto foi efetuada através do estudo dos parâmetros: Faixa de trabalho; Seletividade; Linearidade; Limites de detecção e quantificação (LD e LQ) e Recuperação.

3.4.1. FAIXA DE TRABALHO

A seleção da faixa de trabalho deve estar relacionada diretamente com a aplicação do método. Os valores de referência para composição da faixa analítica são os Índices de Exposição Biológica (IBE) apontados pela ACGIH (ACGIH, 2010). Os limites de diclorometano, metilisobutilcetona, tetraidrofurano e tolueno são, respectivamente, 300, 1000, 2000 e 30 µg por litro de urina.

A faixa selecionada deve atender os requisitos desses valores, para que os resultados possam ser adequadamente comparados e correlacionados com a toxicidade de cada uma dessas substâncias (CHASIN e SALVATORI, 1994).

3.4.2. SELETIVIDADE

A seletividade foi avaliada através do teste t aplicado aos coeficientes angulares das curvas analíticas sem matriz e com matriz, para cada curva sendo consideradas três replicatas por nível de concentração (LOVELAND, 2011). As equações utilizadas encontram-se listadas a seguir e foram aplicadas a cada analito.

A EQ 3.1 foi utilizada para obtenção do valor de $t_{\text{calculado}}$ e é representada a seguir:

$$T_{\text{calc}} = \frac{|b_1 - b_2|}{EP \sqrt{\frac{1}{S_{xx1}} + \frac{1}{S_{xx2}}}} \quad \text{EQ. 3.1}$$

As equações para obtenção do Erro Padrão (EP, EQ 3.2), das variáveis “Sxx” (EQ 3.3) e do Desvio Padrão do Resíduo (DPR, EQ 3.4) estão representadas a seguir:

$$EP = \sqrt{\frac{GL_1 (DPR_1)^2 + GL_2 (DPR_2)^2}{GL_1 + GL_2}} \quad \text{EQ. 3.2}$$

$$S_{xx} = \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \quad \text{EQ. 3.3}$$

$$DPR = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}} \quad \text{EQ. 3.4}$$

Onde:

GL = Graus de liberdade do resíduo ($n - 2$).

As hipóteses associadas ao teste t , neste caso, referem-se à igualdade ou não dos coeficientes angulares, o teste será avaliado através da comparação entre os valores de $t_{\text{calculado}}$ e t_{tabelado} . O valor de t_{tabelado} utilizado como referencial comparativo é 2,160 sendo oriundo da tabela t -student, com distribuição normal e bicaudal para 13 graus de liberdade em um intervalo de confiança de 95% (BUSSAB e MORETTIN, 2004).

3.4.3. LINEARIDADE

A linearidade é obtida por calibração analítica, onde se efetuam leituras de padrões de concentração conhecida, atribuindo-se valores de resposta correlacionados a valores de concentração, dessa forma é possível a adoção de um modelo matemático capaz de expressar a relação da concentração com a resposta medida (VIEIRA e LICHTIG, 2004). O modelo adequado para essa correlação é a regressão linear, é descrito a seguir:

$$\text{Área} = b \cdot C + a \quad \text{EQ. 3.5}$$

Onde:

Área = Resposta medida (área do analito / área do padrão interno);

C = Concentração em $\mu\text{g/L}$;

a = Coeficiente linear.

b = Coeficiente angular.

Os resíduos foram verificados quanto às suas variâncias por nível de concentração e quantidade de replicatas. O teste C de Cochran foi utilizado para essa avaliação. O teste consiste no estudo da homogeneidade das variâncias, considerando as hipóteses: homogênea e não homogênea (homocedástica e heterocedástica), através da comparação de valores calculados com valores críticos tabelados (COCHRAN, 1941).

A EQ 3.6 apresenta o cálculo para a obtenção de C_{calc} para comparação com o valor crítico C_{tab} .

$$C_{\text{calc}} = \frac{S^2_{\text{max}}}{\sum S^2} \quad \text{EQ. 3.6}$$

Onde:

S^2_{max} = Maior variância entre todo o grupo amostral.

$\sum S^2$ = Somatório de todas as variâncias do grupo amostral.

O valor de referência para a avaliação, o C_{tabelado} , é obtido através de cruzamento de dados da curva analítica na tabela de Cochran. Os parâmetros utilizados no cruzamento de dados da tabela são o número de níveis de concentração da curva “l” sendo igual a 5 e o número de replicatas por nível de concentração “n” sendo igual a 3, o valor de C_{tabelado} é igual a 0,6838. (COCHRAN, 1941).

3.4.4. LIMITES DE DETECÇÃO (LD) E QUANTIFICAÇÃO (LQ)

No presente estudo, foi utilizado o método do desvio padrão para a determinação dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) (BRENDOLAN, 2010). O método consiste na utilização do desvio padrão e do coeficiente angular de acordo com as EQ 3.7 e 3.8, respectivamente para LD e LQ. O desvio padrão foi obtido de sete replicatas do ponto mais baixo da curva analítica e o coeficiente angular foi aproveitado da curva utilizada no estudo de linearidade.

$$LD = \frac{3 s}{S} \quad \text{EQ. 3.7}$$

$$LQ = \frac{10 s}{S} \quad \text{EQ. 3.8}$$

Onde:

s = Desvio padrão da resposta.

S = Coeficiente angular da curva analítica.

3.4.5. RECUPERAÇÃO

Experimentalmente, a recuperação foi feita a partir de amostras fortificadas com concentrações conhecidas nas faixas baixa, média e alta da curva analítica, respectivamente, níveis 1, 3 e 5. A recuperação representa o estudo do comportamento do sistema analítico frente a amostras fortificadas com concentrações conhecidas do analito alvo. A limitação deste procedimento é a de que o analito adicionado não estar necessariamente na

mesma forma que a encontrada na amostra. A EQ 3.9 apresenta o cálculo utilizado para obtenção dos valores de recuperação (CAUSON, 1997).

$$\text{Recuperação (\%)} = \left(\frac{C_1 - C_2}{C_3} \right) \times 100 \quad \text{EQ. 3.9}$$

Onde:

C_1 = Concentração do analito na leitura da amostra fortificada;

C_2 = Concentração do analito na leitura do branco;

C_3 = Concentração teórica de fortificação.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As condições apresentadas nesse segmento foram as melhores obtidas no percurso da otimização do método. E os demais dados relacionados aos preparos dos padrões foram produto de cálculo, levando-se em consideração as propriedades físico-químicas das substâncias de interesse e as concentrações finais compatíveis aos valores de referência apontados pelo Índice Biológico de Exposição (IBE), todas as informações estão contidas na TAB. 1.1.

De acordo com o citado anteriormente, os padrões foram preparados levando-se em consideração as respectivas densidades a 25°C, para tal, todas as substâncias e materiais utilizados foram acondicionados e manipulados em ambiente de temperatura controlada de 25°C. Todos os materiais volumétricos utilizados passaram pela devida calibração e avaliação de enquadramento nos termos da ISO 17025.

4.1. CONDIÇÕES ANALÍTICAS

4.1.1. PREPARO DOS PADRÕES E AMOSTRAS

Como detalhado no item 3.4.1 (Faixa de trabalho), os Índices Biológicos de Exposição (IBE) são específicos e característicos de cada substância e são a referência para as faixas de trabalho utilizadas para cada substância.

A composição dos padrões se deu em cinco etapas: (i) preparo da solução estoque dos analitos; (ii) preparo da solução estoque do padrão interno; (iii) preparo da solução intermediária dos analitos, (iv) preparo da solução intermediária do padrão interno e (v) preparo da curva analítica.

Preparo da solução estoque dos analitos (solução 1A): Efetuou-se de acordo com a TAB 4.1, utilizando como solvente uma solução aquosa de metanol (grau espectroscópico ou grau de pureza equivalente) 5%. Cada analito foi aliqotado a partir da substância pura.

TAB. 4.1 Preparo da solução estoque de analitos (Solução 1A).

Substância	Volume adicionado (mL)	Volume Final (mL)	Concentração (mg/L)
DCM	0,188		5000
MIBC	0,935	50	15000
THF	1,687		30000
TOL	0,028		500

Preparo da solução estoque de padrão interno (solução 2A): Efetuou-se de acordo com a TAB 4.2, utilizando como solvente uma solução aquosa de metanol (grau espectroscópico ou grau de pureza equivalente) 5%. Duas formas de preparo foram apresentadas.

TAB. 4.2 Preparo da solução estoque de padrão interno (Solução 2A).

Substância	Volume adicionado (mL)	Volume Final (mL)	Concentração (mg/L)
	0,024	50	
Fluorbenzeno	0,048	100	500

Preparo das soluções intermediárias de analitos e padrão interno (soluções 1B e 2B): As soluções 1A e 2A foram diluídas 100 vezes em água ultrapura contendo 5% de metanol, dando origem, respectivamente, às

soluções intermediárias 1B e 2B. A TAB 4.3 lista as concentrações finais obtidas após a diluição.

TAB. 4.3 Concentrações das soluções intermediárias 1B e 2B.

Solução	Substância	Concentração (mg/L)	Concentração (µg/L)
1B	DCM	50	50000
	MIBC	150	150000
	THF	300	300 000
	TOL	5	5 000
2B	Fluorbenzeno	5	5 000

A curva analítica foi elaborada através da diluição da solução 1B em água ultrapura contendo 5% de metanol, em balão volumétrico de 50 mL. A TAB 4.4 lista os volumes adicionados a cada nível da curva e as concentrações finais de cada analito.

TAB. 4.4 Concentrações para a curva analítica.

Nível	Volume adicionado (mL)	Concentração final (µg/L)			
		DCM	MIBC	THF	TOL
1	0,150	150	450	900	15
2	0,300	300	900	1800	30
3	0,450	450	1350	2700	45
4	0,600	600	1800	3600	60
5	0,750	750	2250	4500	75

Uma vez que os padrões de composição da curva analítica estejam estabelecidos, devem ser preparados de forma equiparada às amostras, com objetivo de igualar os fatores contribuintes da incerteza. Para que os padrões sejam passíveis de comparação com as amostras, devem passar por pelos mesmos procedimentos de preparo (SKOOG *et al.*, 2006).

O preparo das amostras consistiu na retirada de uma alíquota de 8 mL da urina, para um frasco específico de *headspace*, seguida da adição de 1 mL da solução intermediária de padrão interno (Solução 2B) e selamento imediato do frasco.

A FIG 4.1 apresenta um fluxograma de preparo dos padrões, desde as substâncias puras até os padrões prontos para extração e leitura, para aquisição no sinal e composição da curva analítica.

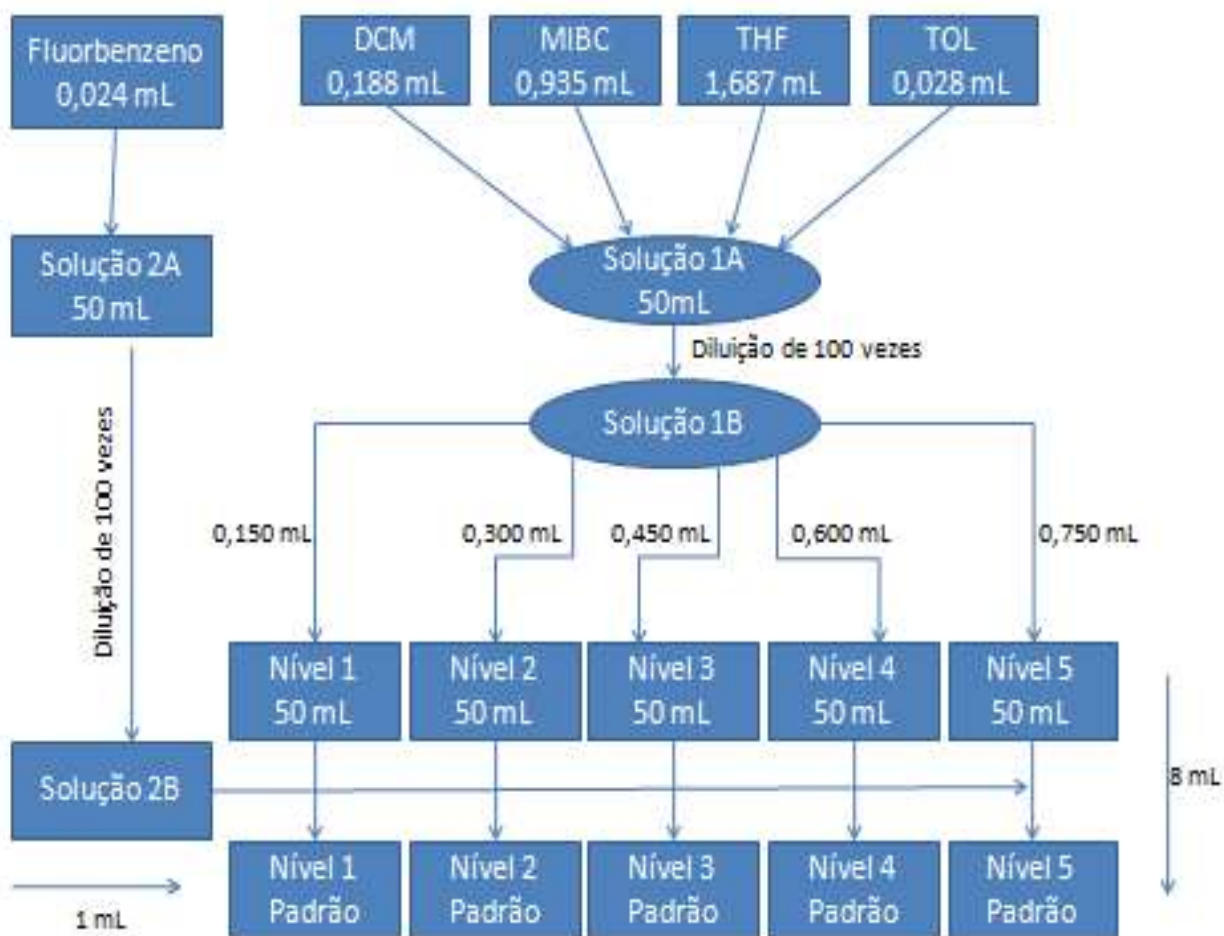


FIG. 4.1 Fluxograma de preparo dos padrões.

4.1.2. CONDIÇÕES DOS EQUIPAMENTOS

Utilizando os equipamentos apresentados no item 3.2 do presente trabalho, serão apresentadas agora as respectivas condições de operação, obtidas experimentalmente e consideradas ótimas para a devida aplicação analítica. A TAB 4.5 apresenta as condições analíticas do equipamento extrator de *headspace* Turbo Matrix 40 Trap.

TAB. 4.5 Condições utilizadas para a extração *headspace*.

Condições	Variáveis
Temperatura de incubação	80°C
Tempo de incubação	60 minutos
Temperatura da agulha	200°C
Tempo de pressurização	1 minuto
Temperatura da <i>transfer line</i>	150°C

As condições do cromatógrafo a gás relacionam-se ao controle das regiões aquecidas e do fluxo do gás de arraste, serão apresentadas em seqüência.

A temperatura do injetor foi ajustada em 200°C, utilizando *liner* (câmara de vaporização) específico para injeções de *headspace*, podendo também ser utilizado um *liner* do tipo *splitless* (sem divisão) sem alterações consideráveis na introdução do sistema. O detector (DIC) foi ajustado em 220°C, mantendo a proporção dos gases de queima do detector de 1:10, respectivamente, H₂ e ar comprimido.

O programa de aquecimento do forno inicia 45 °C por 5,5 min, ascendendo a uma taxa de 15 °C/min até 140 °C, onde permaneceu por 4 min

e posteriormente ascendeu à taxa de 40 °C/min até 200 °C, finalizando a etapa de separação cromatográfica e iniciando a limpeza da coluna, sob uma taxa de 100 °C/min até 240 °C e mantendo-se nesta temperatura durante 2 min. A FIG 4.2 apresenta o programa de aquecimento do forno.

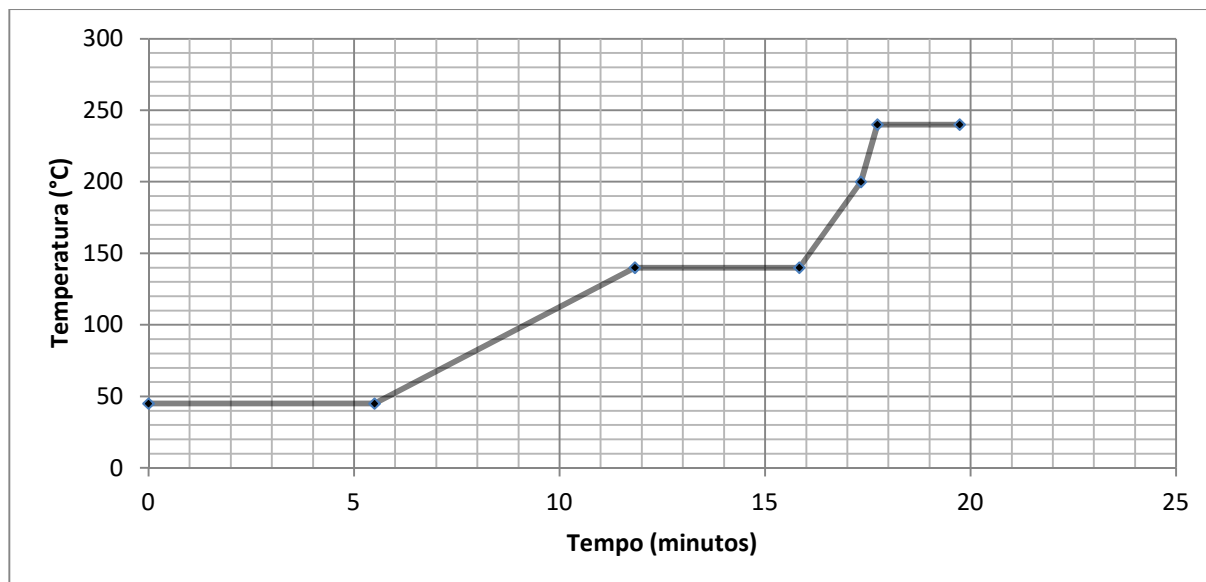


FIG. 4.2 Programação de temperatura do forno.

O gás de arraste utilizado foi He, sendo controlado através do fluxo, iniciando com um fluxo de 1,4 mL/min durante 17 min, seguido por um aumento à taxa de 100 mL/min até 1,8 mL/min,. A FIG 4.3 apresenta o fluxo do gás de arraste durante a corrida cromatográfica.

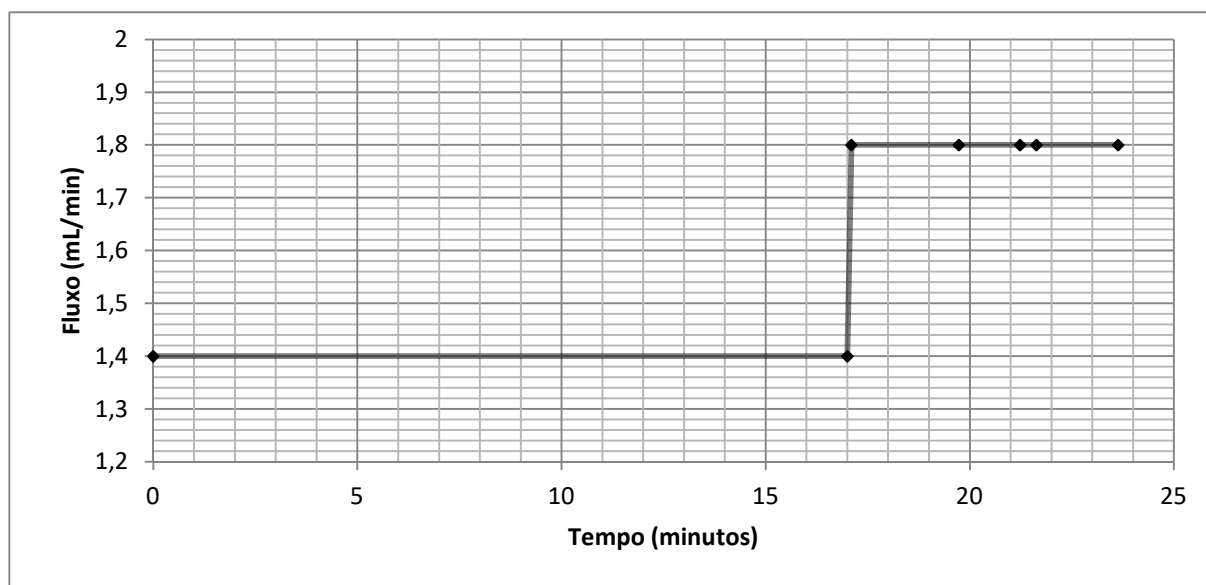


FIG. 4.3 Programação de fluxo de gás de arraste.

A TAB 4.6 apresenta as configurações do cromatógrafo a gás, de forma condensada.

TAB. 4.6 Configurações do cromatógrafo a gás.

Condições	Variáveis
Programa do Forno	45°C por 5,5 min 15°C/min até 140°C 140°C por 4,0 min 40°C/min até 200°C 100°C/min até 240°C 240°C por 2,0 min
Tempo de corrida	20 minutos
Temperatura do injetor	200°C
Modo de controle	Fluxo
Programa de fluxo	1,4 mL/min por 17 min 100 mL/min até 1,8mL/min
Temperatura do detector	220°C
Fluxo de H ₂	45 mL/min
Fluxo de Ar comprimido	450 mL/min

A FIG 4.4 apresenta o perfil de cromatograma de uma amostra de urina fortificada pelos analitos a uma concentração equivalente ao nível 3 da curva analítica. A TAB 4.7 apresenta os tempos de retenção de cada substância.

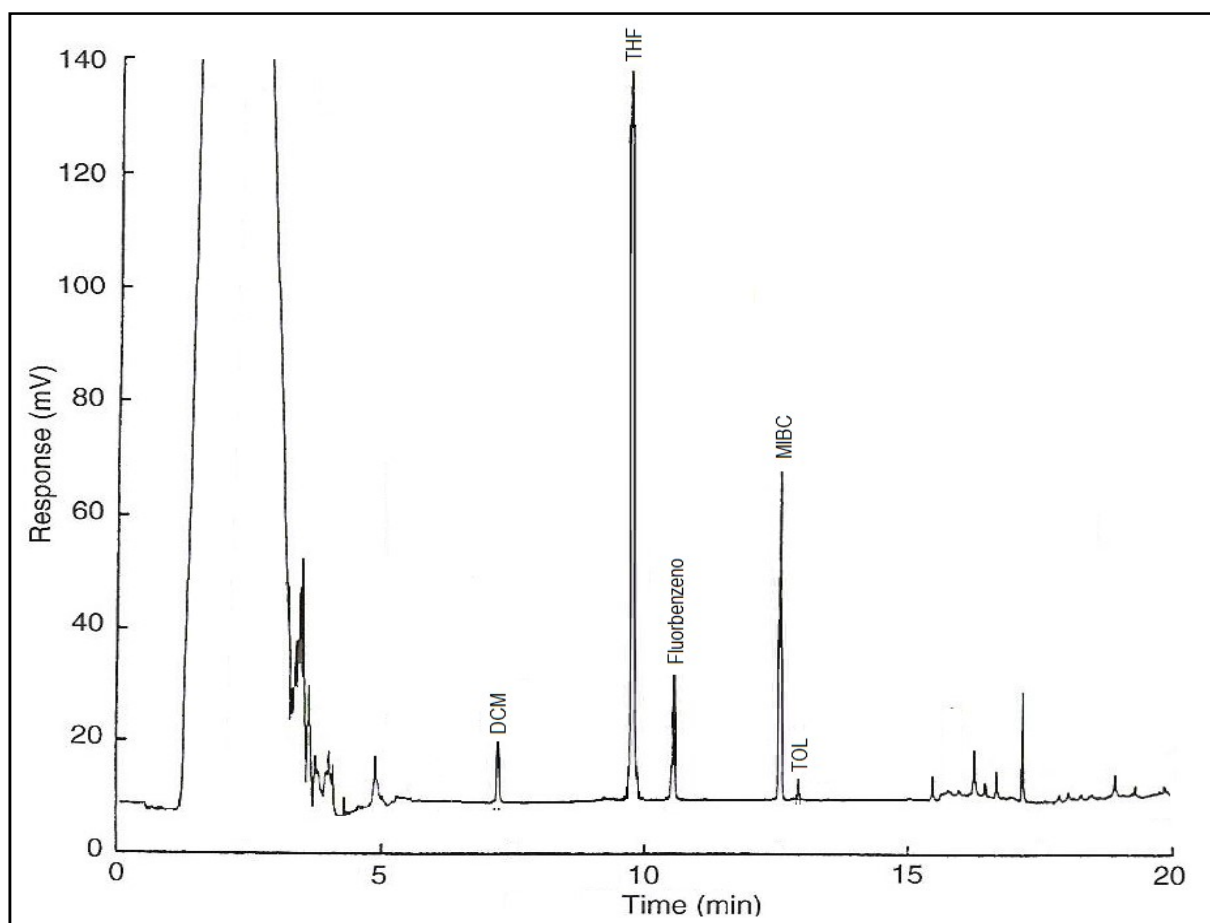


FIG. 4.4 Perfil de cromatograma de uma amostra de urina fortificada.

TAB. 4.7 Tempos de Retenção dos analitos

Analito	Tempos de Retenção
Diclorometano	7,441
Tetraidrofurano	9,699
Fluorbenzeno (Padrão Interno)	10,813
Metilisobutilcetona	12,528
Tolueno	12,823

Uma característica importante do método desenvolvido é o alto nível de automatização do processo de preparo das amostras. Fontes de incerteza oriundas de operações manuais são consideradas de grande desvio, em contrapartida, a automatização do processo de extração permite que a incerteza originada seja dispersa uniformemente entre todas as leituras, sendo representada no estudo da repetibilidade, como será apresentado posteriormente (PIMENTEL *et al.*, 2008).

O que fundamenta a busca pela redução das operações manuais é o próprio conceito de erro sistemático (SKOOG *et al.*, 2006), onde predominam três tipos: erros instrumentais, de método e pessoais (ou de operação).

A automatização do processo visa o deslocamento das fontes de erro a favor de erros sistemáticos instrumentais, os quais podem ser facilmente transpostos. Os erros de método sempre estarão presentes, no entanto, esse tipo de erro associa-se com os erros instrumentais e pessoais. Quando associados a erros instrumentais, são beneficiados pela sua constância, já quando associados aos erros pessoais, são praticamente indetermináveis, uma vez que as fontes e intensidades do erro de origem pessoal tendem a aleatoriedade (NETO *et al.*, 2002).

4.2. VALIDAÇÃO ANALÍTICA

4.2.1. FAIXA DE TRABALHO

Os IBE dos analitos foram apresentados em etapas anteriores e esses mesmos valores serviram de referencial para seleção da faixa de trabalho.

Os valores apontados no IBE são associados à toxicologia específica de cada substância, uma vez que cada substância possui um efeito diferente (ACGIH, 2010). Por esse mesmo motivo, cada analito possui uma faixa analítica diferente. A TAB 4.8 apresenta as curvas analíticas de cada analito estudado.

TAB. 4.8 Faixas de trabalho em µg/L.

Nível	Diclorometano	Metilisobutil cetona	Tetraidrofurano	Tolueno
1	150	450	900	15
2	300	900	1800	30
3	450	1350	2700	45
4	600	1800	3600	60
5	750	2250	4500	75

4.2.2. SELETIVIDADE

Foi utilizada a regressão linear para obtenção dos valores dos coeficientes angulares (VIEIRA e LICHTIG, 2004). A comparação entre os coeficientes angulares foi realizada assumindo-se como hipótese a igualdade entre os valores obtidos nas curvas sem matriz e com matriz, ou seja, $b_1 = b_2$. Os coeficientes angulares indicam a inclinação das retas, valores estatisticamente equivalentes de coeficiente angular indicam igualdade entre as capacidades de resposta dos analitos sem matriz e com matriz.

Os dados brutos de cada analito são apresentados nos tópicos a seguir, separadamente, mostrando os valores os quais serão aplicados nas equações mencionadas no item 3.4.2.

A seqüência de disposição dos dados visa atender à geração das variáveis necessárias para o cálculo da EQ 3.1, que é a principal equação para o teste de hipótese proposto. As equações subseqüentes se referem às variáveis contidas na equação principal.

Sendo assim, a seqüência de exposição dos dados da seletividade segue a ordem:

- Listagem dos dados brutos oriundos diretamente de leitura instrumental e sua conversão a dados refinados;
- Avaliação das curvas analíticas geradas para checagem da viabilidade dos dados para testes comparativos;
- Obtenção dos coeficientes angular e linear das curvas, para utilização nos cálculos de Desvio Padrão dos Resíduos (DPR);
- Cálculo dos valores de DPR_1 (curva sem matriz) e DPR_2 (curva com matriz) e considerações sobre os valores encontrados;
- Obtenção dos valores de Erro Padrão (EP), através da aplicação da EQ. 3.2 utilizando os valores obtidos de DPR_1 e DPR_2 , oriundos da EQ. 3.4;
- Obtenção dos valores de S_{xx} , através da aplicação da EQ. 3.3;
- Obtenção dos valores de t_{calc} , através da aplicação da EQ. 3.1 em conjunto com as variáveis já obtidas.
- Efetiva comparação entre os valores de t_{calc} obtidos e o valor de t_{tab} e avaliação do comportamento de influência da matriz.

As tabelas contendo os valores brutos instrumentais e os valores para construção da curva analítica (eixos X e Y) fornecerão também os dados necessários para os cálculos do Desvio Padrão do Resíduo (DPR), Erro Padrão (EP) e S_{xx} .

Para a realização da avaliação da seletividade, se faz necessária a confirmação sobre as condições da matriz. O melhor quadro é a disponibilidade da matriz livre das substâncias de interesse, caso essa condição não seja viável, outros mecanismos devem ser empenhados para viabilizar as comparações.

A matriz passou pelo procedimento analítico como uma amostra normal, não apresentando identificação positiva para nenhuma das substâncias de interesse. O resultado analítico da matriz serve como um branco para todas as etapas do processo de validação.

4.2.2.1. DICLOROMETANO

A TAB 4.9 apresenta os dados brutos obtidos através da integração das áreas do analito e do padrão interno e a respectiva conversão em eixo Y (razão entre as áreas do analito e padrão interno).

TAB. 4.9 Dados das curvas do diclorometano.

Concentração (µg/L)	Curva sem matriz			Curva com matriz		
	Área do analito (SA)	Área do PI (SPI)	Razão entre as áreas (SA/SPI)	Área do analito (SA)	Área do PI (SPI)	Razão entre as áreas (SA/SPI)
150	4972	2797	1,78	4867	2639	1,84
150	4934	2616	1,89	4965	2798	1,77
150	5146	2620	1,96	4826	2600	1,86
300	9191	2754	3,34	9521	2763	3,45
300	9508	2706	3,51	9458	2786	3,39
300	9573	2652	3,61	9502	2646	3,59
450	13575	2735	4,96	14175	2692	5,27
450	14493	2642	5,49	13950	2761	5,05
450	14565	2718	5,36	14178	2610	5,43
600	19199	2631	7,30	19041	2708	7,03
600	18986	2724	6,97	18915	2655	7,12
600	18925	2607	7,26	19004	2608	7,29
750	24445	2645	9,24	25388	2676	9,49
750	24780	2694	9,20	25473	2791	9,13
750	24298	2654	9,16	25346	2772	9,14

A TAB 4.10 lista os coeficientes angular, linear e de correlação linear ao quadrado, obtidos a partir dos dados apresentados na TAB 4.9.

TAB. 4.10 Coeficientes das curvas analíticas do diclorometano.

Parâmetro	Curva analítica sem matriz	Curva analítica com matriz
Coef. Angular	0,012223	0,012351
Coef. Linear	-0,098839	-0,167285
R²	0,995404	0,995714

O primeiro indicativo de resultados que corroboram a hipótese de não interferência da matriz na quantificação pode ser visto diretamente através dos coeficientes das curvas. No caso do diclorometano, os coeficientes angulares 0,0122 e 0,0123 são equivalentes em ordem, garantindo também igualdade nas capacidades de resposta de cada curva. A mesma similaridade também é observada nos coeficientes de correlação linear ao quadrado.

Os resultados obtidos nos coeficientes das curvas, iguais em termos de ordem, corroboram a inexistência de substâncias químicas presentes na urina capazes de induzir perturbação química no comportamento extrativo do diclorometano.

É possível visualizar a similaridade das curvas graficamente, através da sobreposição das curvas geradas. A FIG 4.5 apresenta as duas curvas analíticas, sem matriz e com matriz de urina.

No presente caso, para o diclorometano, a similaridade das curvas é tão grande que se torna consideravelmente difícil distinguir qual é a curva sem matriz e a curva com matriz, somente observando os coeficientes das curvas se faz possível efetuar essa identificação.

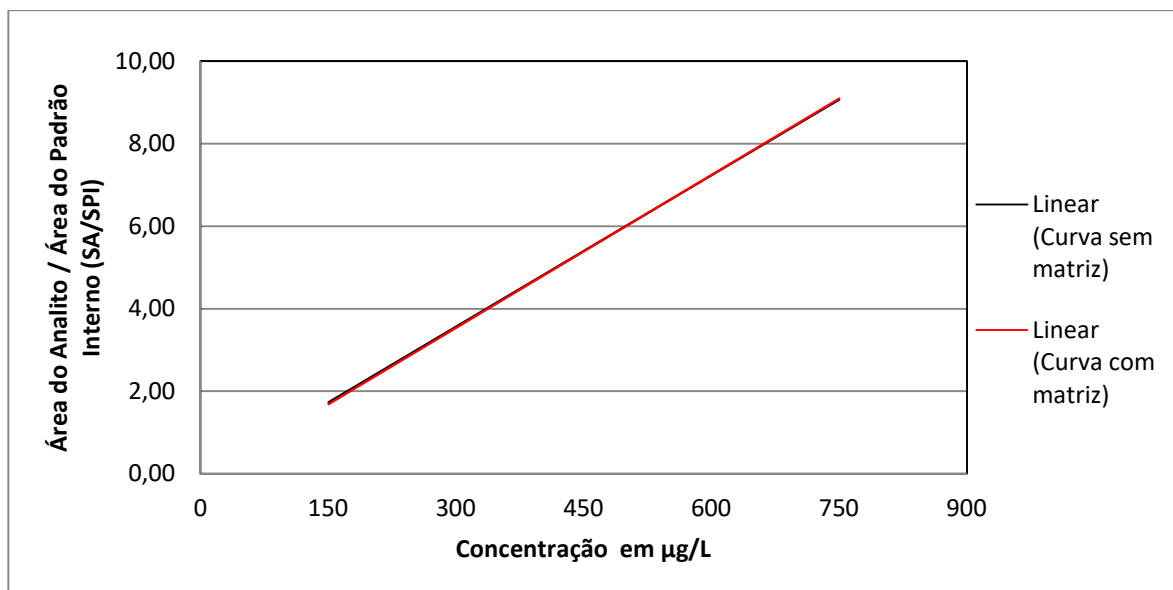


FIG. 4.5 Curvas analíticas do diclorometano.

Utilizando os valores da TAB 4.9 (coluna “Razão entre as áreas (SA/SPI)”) e os coeficientes das curvas apresentados na TAB 4.10, reunimos os dados para a aplicação na EQ 3.4 (Desvio Padrão do Resíduo, DPR), sendo considerado como resíduo a diferença entre os valores de Y experimentais (y_i) e Y teóricos (\hat{y}), oriundos dos coeficientes angular e linear.

A EQ 3.4, aplicada as curvas sem matriz e com matriz provê os resultados, respectivamente para o DPR_1 e DPR_2 .

Para o diclorometano, observam-se os valores de $DPR_1 = 0,18925$ e $DPR_2 = 0,18465$. Sua similaridade em termos de ordem permite uma avaliação parcial sobre o progresso da argumentação estatística empregada, ou seja, a observação de valores intermediários permite a estimativa dos resultados finais.

O valor de Erro Padrão (EP) calculado através da EQ. 3.2 representa uma correlação entre os desvios observados nas curvas sem matriz e com matriz, para que posteriormente seja viabilizada a comparação entre os coeficientes angulares pela EQ. 3.1.

Aplicando a EQ. 3.2, utilizando os dados obtidos de DPR_1 e DPR_2 e assumindo que $GL_1 = GL_2 = 13$, obtêm-se $EP = 0,69472$. Esse número reflete

o distanciamento entre os valores obtidos e a média originada pelo conjunto desses valores. O erro padrão aponta o intervalo a partir da média (sendo a média o ponto central), podendo ser expresso até em termos percentuais. Este número indica o grau de precisão, ou seja, a proximidade entre os valores obtidos e a respectiva média. A sua dimensão ou ordem apresenta proporcionalidade à média (LUNET *et al.*, 2006).

Tratando agora da obtenção dos valores de S_{xx} , efetuada a partir da aplicação da EQ. 3.3. Assume-se que, a partir da análise do significado físico das variáveis estatísticas, que os valores de S_{xx_1} e S_{xx_2} podem ser diferentes, no caso de uma comparação entre faixas analíticas diferentes, ou seja, esse fator permite uma correção e/ou adequação entre as faixas de trabalho, para que seja possível efetuar a comparação.

No entanto, esse tipo de comparação é consideravelmente complicado, pois muitos fatores sofrem alterações severas, em especial os parâmetros da curva, para os quais podem ser evidenciados coeficientes angulares diferentes, tornando a comparação entre as curvas estatisticamente incoerente.

No presente caso, para o diclorometano, os valores de S_{xx} são equivalentes, em função de a comparação efetuada compreender a mesma faixa de trabalho nas duas curvas analíticas.

Utilizando a EQ. 3.3, substituindo os dados apresentados na TAB 4.9 (coluna concentração ($\mu\text{g/L}$)), obtêm-se $S_{xx} = 675000$. O valor remete ao ponto central e à amplitude total da curva. Da mesma forma, valores diferentes indicam incomparabilidade estatística entre as curvas, por possuírem pontos centrais e amplitudes não compatíveis (DEAN e VOSS, 1999).

Utilizando a EQ. 3.1 em conjunto com as variáveis que foram obtidas nas etapas anteriores, é possível a obtenção do valor de t_{calc} , para efetiva comparação com o t_{tabelado} .

O t_{calc} apresenta valor de -0,1071, sendo inferior portanto, ao valor de referência que é de 2,160. Como discutido anteriormente, o valor de referência é oriundo da tabela t -Student, assumindo $n = 13$ e intervalo de

confiança de 95% para distribuição normal e bicaudal. Na presente situação, a obtenção de um valor de t_{calc} inferior ao t_{tab} significa a igualdade estatística entre os coeficientes angulares com um nível de confiança de 95%. A comparação é feita assumindo-se que $-\infty < t_{\text{calc}} < t_{\text{tab}}$ (LOVELAND, 2011).

A equivalência entre os coeficientes angulares indica que não existem diferenças consideráveis entre as quantificações efetuadas nos padrões em água e diretamente nas amostras, permitindo a composição da curva analítica e equacionamento direto das amostras.

Embora a argumentação estatística esteja em destaque, é importante considerarmos que a mesma é simplesmente uma ferramenta de dimensionamento de desempenho do método. Os resultados expressam matematicamente o comportamento físico-químico do método analítico desenvolvido, ou seja, a obtenção de valores coesos estatisticamente se deve ao controle e precisão alcançados nos procedimentos analíticos.

4.2.2.2. METILISOBUTILCETONA

A TAB 4.11, lista os dados brutos obtidos através da integração das áreas do analito metilisobutilcetona (MIBC) e do padrão interno e a respectiva conversão em eixo Y (razão entre as áreas do analito e padrão interno) para composição das curvas analíticas.

TAB. 4.11 Dados das curvas da metilisobutilcetona.

Concentração ($\mu\text{g/L}$)	Curva sem matriz			Curva com matriz		
	Área do analito (SA)	Área do PI (SPI)	Razão entre as áreas (SA/SPI)	Área do analito (SA)	Área do PI (SPI)	Razão entre as áreas (SA/SPI)
450	2913	2797	1,04	3021	2639	1,14
450	2968	2616	1,13	3032	2798	1,08
450	3009	2620	1,15	2979	2600	1,15
900	5562	2754	2,02	5763	2763	2,09
900	5758	2706	2,13	5694	2786	2,04
900	5780	2652	2,18	5823	2646	2,20
1350	8540	2735	3,12	8505	2692	3,16
1350	8813	2642	3,34	8357	2761	3,03
1350	8930	2718	3,29	8667	2610	3,32
1800	11645	2631	4,43	11526	2708	4,26
1800	11653	2724	4,28	11389	2655	4,29
1800	11928	2607	4,58	11646	2608	4,47
2250	14471	2645	5,47	14696	2676	5,49
2250	14507	2694	5,38	14769	2791	5,29
2250	14449	2654	5,44	14585	2772	5,26

A TAB 4.12 lista os coeficientes angular, linear e de correlação linear ao quadrado, obtidas a partir das curvas analíticas apresentadas.

TAB. 4.12 Coeficientes das curvas analíticas da metilisobutilcetona.

Parâmetro	Curva analítica sem matriz	Curva analítica com matriz
Coef. Angular	0,002437	0,002372
Coef. Linear	-0,025405	0,015572
R ²	0,996603	0,995890

Como discutido anteriormente, ressalta-se a importância de avaliar inicialmente os parâmetros obtidos nas curvas analíticas, para a MIBC. Os coeficientes angulares 0,0024 e 0,0023, são considerados de mesma ordem, assim como os fatores de correlação linear. Esses valores são os primeiros indicativos de similaridade entre as curvas comparadas.

A FIG. 4.6 apresenta as duas curvas da metilisobutilcetona, para que sejam avaliadas graficamente.

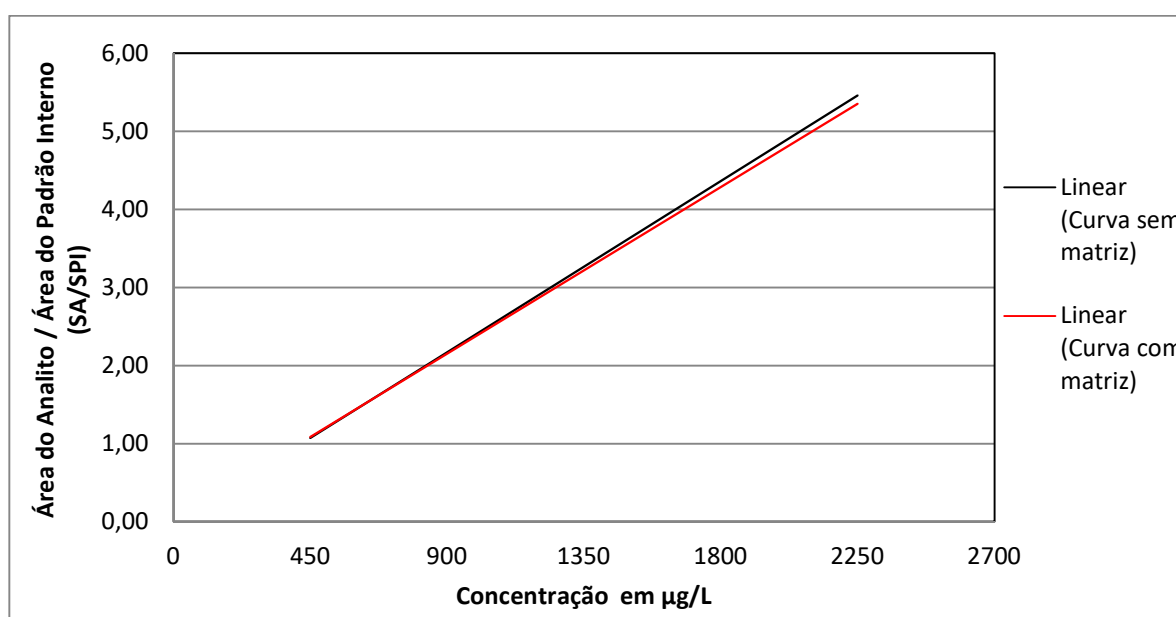


FIG. 4.6 Curvas analíticas da metilisobutilcetona.

Os valores de DPR_1 e DPR_2 são, respectivamente, 0,09728 e 0,10417, apresentam a mesma ordem de grandeza e permitem a expectativa de aplicabilidade para o cálculo do erro padrão (EP), assim como observado para o diclorometano.

Aplicando a EQ. 3.2, utilizando os dados obtidos de DPR_1 e DPR_2 e assumindo $GL_1 = GL_2 = 13$, obtêm-se $EP = 0,35840$.

Os valores de S_{xx_1} e S_{xx_2} são equivalentes, em função da comparação efetuada compreender a mesma faixa de trabalho nas duas curvas analíticas. Utilizando a EQ 3.3, substituindo os dados listados na TAB 4.11, obtêm-se $S_{xx} = 6075000$.

Utilizando a EQ 3.1 em conjunto com as variáveis obtidas nas etapas anteriores, é possível a obtenção do valor de t_{calc} , para comparação com o $t_{tabelado}$.

A metilisobutilcetona apresentou resultados em conformidade com a argumentação estatística nas etapas anteriores, para os coeficientes angulares e valores de desvio padrão dos resíduos permitindo que a hipótese de interesse seja comprovada.

Foi obtido o valor de $t_{calc} = 0,3173$ e, de acordo com a comparação $-\infty < 0,3173 < 2,160$, evidencia-se que a hipótese de equivalência estatística entre os coeficientes angulares é mantida. Sendo assim, torna-se possível assumir a não interferência da matriz na capacidade de resposta do presente analito.

4.2.2.3. TETRAIDROFURANO

A TAB 4.13, lista os dados brutos obtidos através da integração das áreas do analito tetraidrofurano (THF) e do padrão interno e a respectiva conversão em eixo Y (razão entre as áreas do analito e padrão interno) para composição da curva analítica.

TAB. 4.13 Dados das curvas do tetraidrofurano.

Concentração ($\mu\text{g/L}$)	Curva sem matriz			Curva com matriz		
	Área do analito (SA)	Área do PI (SPI)	Razão entre as áreas (SA/SPI)	Área do analito (SA)	Área do PI (SPI)	Razão entre as áreas (SA/SPI)
900	6321	2797	2,26	7340	2639	2,78
900	6408	2616	2,45	7338	2798	2,62
900	6636	2620	2,53	7210	2600	2,77
1800	11904	2754	4,32	13999	2763	5,07
1800	12537	2706	4,63	13695	2786	4,92
1800	12506	2652	4,72	14081	2646	5,32
2700	18585	2735	6,80	20658	2692	7,67
2700	19209	2642	7,27	20052	2761	7,26
2700	19523	2718	7,18	20953	2610	8,03
3600	25334	2631	9,63	27998	2708	10,34
3600	25281	2724	9,28	27390	2655	10,32
3600	26107	2607	10,01	28163	2608	10,80
4500	31199	2645	11,80	17723	2676	13,25
4500	32265	2694	11,98	35648	2791	12,77
4500	31525	2654	11,88	35413	2772	12,78

A TAB 4.14 lista os coeficientes angular, linear e de correlação linear ao quadrado, obtidos a partir das curvas analíticas apresentadas.

TAB. 4.14 Coeficientes das curvas analíticas do tetraidrofurano.

Parâmetro	Curva analítica sem matriz	Curva analítica com matriz
Coef. Angular	0,00267	0,00267
Coef. Linear	-0,09108	0,32120
R ²	0,99599	0,99324

Para o tetraidrofurano, observam-se coeficientes angulares equivalentes, apontando uma boa perspectiva analítica, já que se trata da principal variável observada. A diferença observada nos coeficientes lineares é originada pela influência da matriz sobre o processo de extração de *headspace*, o analito tem sua extratividade acentuada. Embora visível graficamente, essa diferença é estatisticamente desprezível, como será observado posteriormente.

A FIG 4.7 apresenta as curvas do tetraidrofurano.

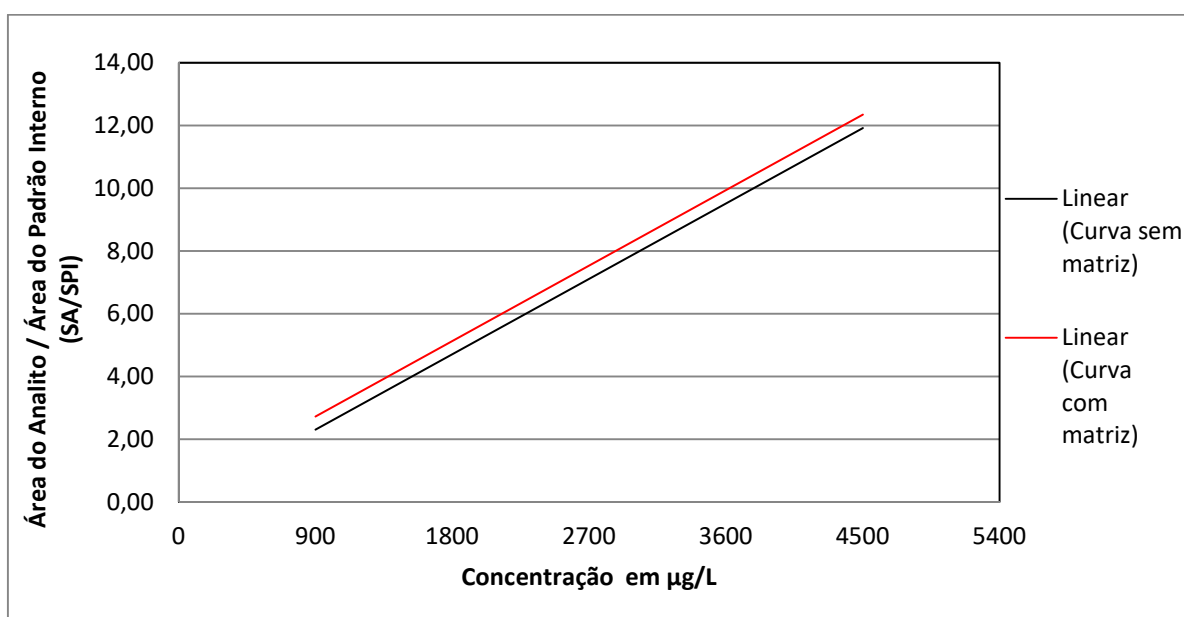


FIG. 4.7 Curvas analíticas do tetraidrofurano.

Para o tetraidrofurano, os valores de DPR_1 e DPR_2 são, respectivamente, 0,23154 e 0,30166. Apresentam diferença em ordem, neste caso, torna-se pouco previsível o resultado obtido para t_{calc} . A diferença observada nos valores de DPR reflete a diferença dos coeficientes lineares, essas diferenças ainda não são capazes de prover uma influência estatisticamente relevante no processo analítico.

Aplicando a EQ 3.2, utilizando os dados obtidos de DPR_1 e DPR_2 e assumindo que $GL_1 = GL_2 = 13$, obtêm-se $EP = 0,86164$.

As faixas de trabalho das duas curvas analíticas são equivalentes, assim como nos demais casos, logo só há um valor de S_{xx} .

Utilizando a EQ 3.3 e substituindo os dados apresentados na TAB. 4.13, obtêm-se $S_{xx} = 24300000$. O valor apresenta proporcionalidade em relação aos níveis de concentração estudados e apresenta-se dentro do esperado para o argumento estatístico, tal como os demais analitos estudados.

Utilizando a EQ 3.1 em conjunto com as variáveis obtidas nas etapas anteriores, torna-se possível a obtenção do valor de t_{calc} , para comparação com $t_{tabelado}$.

O valor de t_{calc} obtido para o tetraidrofurano é de - 0,0172, seguindo na comparação com t_{tab} , têm-se $-\infty < -0,0172 < 2,160$, evidenciando portanto, a igualdade entre os coeficientes angulares, dentro dos termos de comparação e intervalo de confiança.

Embora os valores dos coeficientes lineares e dos DPR, intermediários para obtenção de t_{calc} , tenham apresentado diferenças consideráveis, constata-se, ao final do cálculo, que essas diferenças não são estatisticamente expressivas sobre a comparação entre os coeficientes angulares.

Mesmo considerando uma possível diferença entre os ambientes químicos comparados durante a etapa de extração, podemos assumir que o efeito observado é analiticamente desprezível, não comprometendo assim a capacidade de resposta para a detecção e quantificação do tetraidrofurano, dentro da faixa estudada.

4.2.2.4. TOLUENO

A TAB 4.15 apresenta os dados brutos obtidos através da integração das áreas do analito tolueno (TOL) e do padrão interno e a respectiva conversão em eixo Y (razão entre as áreas do analito e padrão interno) para composição da curva analítica.

TAB. 4.15 Dados das curvas do tolueno.

Concentração ($\mu\text{g/L}$)	Curva sem matriz			Curva com matriz		
	Área do analito (SA)	Área do PI (SPI)	Razão entre as áreas (SA/SPI)	Área do analito (SA)	Área do PI (SPI)	Razão entre as áreas (SA/SPI)
15	67	2797	0,0240	70	2639	0,0266
15	64	2616	0,0243	71	2798	0,0254
15	63	2620	0,0242	73	2600	0,0280
30	129	2754	0,0470	130	2763	0,0469
30	142	2706	0,0525	133	2786	0,0479
30	146	2652	0,0550	131	2646	0,0495
45	199	2735	0,0727	189	2692	0,0702
45	209	2642	0,0791	196	2761	0,0709
45	201	2718	0,0740	189	2610	0,0724
60	268	2631	0,1017	259	2708	0,0957
60	262	2724	0,0961	267	2655	0,1005
60	264	2607	0,1012	262	2608	0,1004
75	354	2645	0,1338	329	2676	0,1229
75	338	2694	0,1254	337	2791	0,1207
75	338	2654	0,1272	332	2772	0,1197

A TAB 4.16 lista os coeficientes angular, linear e de correlação linear ao quadrado, obtidos a partir das curvas analíticas apresentadas.

TAB. 4.16 Coeficientes das curvas analíticas do tolueno.

Parâmetro	Curva analítica sem matriz	Curva analítica com matriz
Coef. Angular	0,00172	0,00160
Coef. Linear	-0,00134	0,00129
R ²	0,99303	0,99651

Todos os coeficientes observados no TOL apresentam proximidade entre os valores da curva sem matriz e com matriz, apresentando uma boa expectativa do comportamento do analito em relação ao teste de hipóteses.

A FIG 4.8 apresenta as curvas sem matriz e com matriz, para comparação gráfica de similaridade.

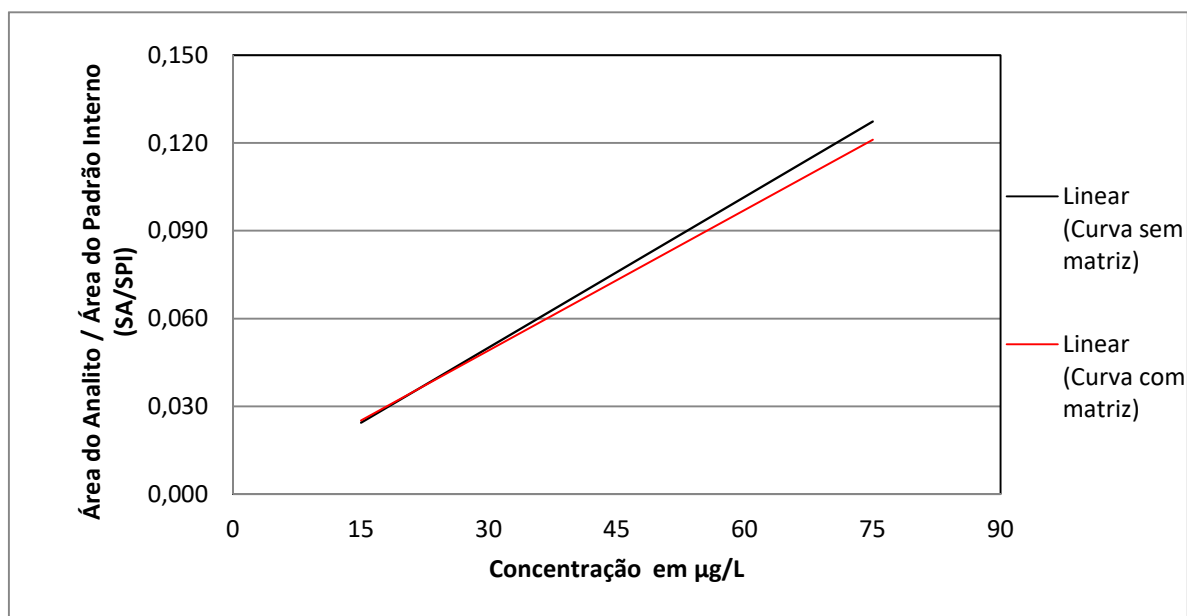


FIG. 4.8 Curvas analíticas do tolueno.

Para o tolueno, os valores obtidos em DPR_1 e DPR_2 são 0,003276 e 0,002155. Dentre todos os analitos estudados, é o que apresenta a menor diferença entre os valores de desvio padrão dos resíduos. Esses valores apresentam grande previsibilidade sobre o resultado do teste de hipóteses efetuado.

Aplicando a EQ. 3.2, utilizando os dados obtidos de DPR_1 e DPR_2 e assumindo $GL_1 = GL_2 = 13$, obtêm-se $EP = 0,01191$.

Os valores de Sxx_1 e Sxx_2 são equivalentes, em função da comparação efetuada compreender a mesma faixa de trabalho nas duas curvas analíticas, assim como os demais analitos estudados.

Utilizando a EQ. 3.3, substituindo os dados observados na TAB. 4.15, obtêm-se $Sxx = 6750$. O valor apresenta-se em conformidade com a argumentação estatística.

Utilizando a EQ. 3.1 em conjunto com as variáveis obtidas nas etapas anteriores, é possível a obtenção do valor de t_{calc} , para comparação com $t_{tabelado}$.

O t_{calc} apresenta valor de 0,5771 que, comparado ao valor de referência, encontra-se na faixa $-\infty < 0,5771 < 2,160$. A conclusão obtida pela comparação confirma a hipótese testada, de que a matriz não exerce influência sobre a capacidade de determinação do analito.

A TAB 4.17 apresenta uma consolidação de todos os valores obtidos de t_{calc} e comparados diretamente ao valor de t_{tab} . Todos os valores se mostraram coerentes a hipótese presumida inicialmente, indicando que a otimização do método foi abrangente a todos os analitos e permitindo afirmar que o método desenvolvido é específico e seletivo para cada analito.

TAB. 4.17 Valores consolidados de t_{calc} .

t	Diclorometano	Metilisobutilcetona	Tetraidrofurano	Tolueno
$t_{calculado}$	-0,107	0,317	-0,017	0,577
$t_{tabelado}$		2,160		

4.2.3. LINEARIDADE

A linearidade foi estudada a partir dos dados obtidos na curva analítica sem matriz. A evidência estatística da linearidade dentro da faixa de trabalho selecionada se dá através da obtenção dos valores de coeficiente de determinação, denominado R^2 (MUKAKA, 2012). O R^2 é obtido elevando-se ao quadrado o coeficiente de correlação linear (ou de Pearson), esse valor se apresentará num intervalo compreendido entre -1 e 1, onde 0 (ponto central) representa a inexistência absoluta de correlação e -1 e 1 representam a correlação máxima possível, respectivamente, descendente e ascendente (LOVELAND, 2011).

Uma correlação linear, em módulo, superior a 0,9 é considerada muito forte, de 0,7 até 0,9 é considerada forte, de 0,5 até 0,7 moderada, de 0,3 a 0,5 fraca e de 0 a 0,3 desprezível (MUKAKA, 2012). A TAB 4.18 apresenta os valores obtidos de R^2 para todos os analitos, utilizando-se a curva analítica sem matriz.

TAB. 4.18 Valores dos coeficientes de determinação.

R^2	Diclorometano	MetilIsobutilcetona	Tetraidrofurano	Tolueno
R^2	0,9954	0,9966	0,9959	0,9930

De acordo com MUKAKA (2012), os valores obtidos podem ser considerados como correlações muito fortes em função de, em todos os casos, terem sobreposto a margem de 0,9 de correlação. Esse fator é mais um indicador de uniformidade do processo extrativo por *headspace*.

Outro fator associado à linearidade é a avaliação da dispersão dos resíduos ao longo da faixa de trabalho, essa avaliação é efetuada através do teste C de Cochran (COCHRAN, 1941). O valor de $C_{\text{calculado}}$ é comparado com um valor crítico, C_{tabelado} , e a conclusão aponta para duas hipóteses, uma dispersão homocedástica ou heterocedástica. O termo homocedástico significa a existência de uniformidade na dispersão dos resíduos, ou seja, dispersão

livre de tendências. Heterocedástico significa a existência de uma dispersão não uniforme, ou seja, uma dispersão com tendência (BRITO *et al.*, 2003).

A curva analítica utilizada no teste apresenta 5 níveis de concentração e 3 replicatas por nível, sendo assim, $l = 5$ e $n = 3$. O valor de C_{tabelado} associado a essas variáveis é 0,6838.

A FIG 4.9 apresenta a dispersão de resíduos para o analito diclorometano.

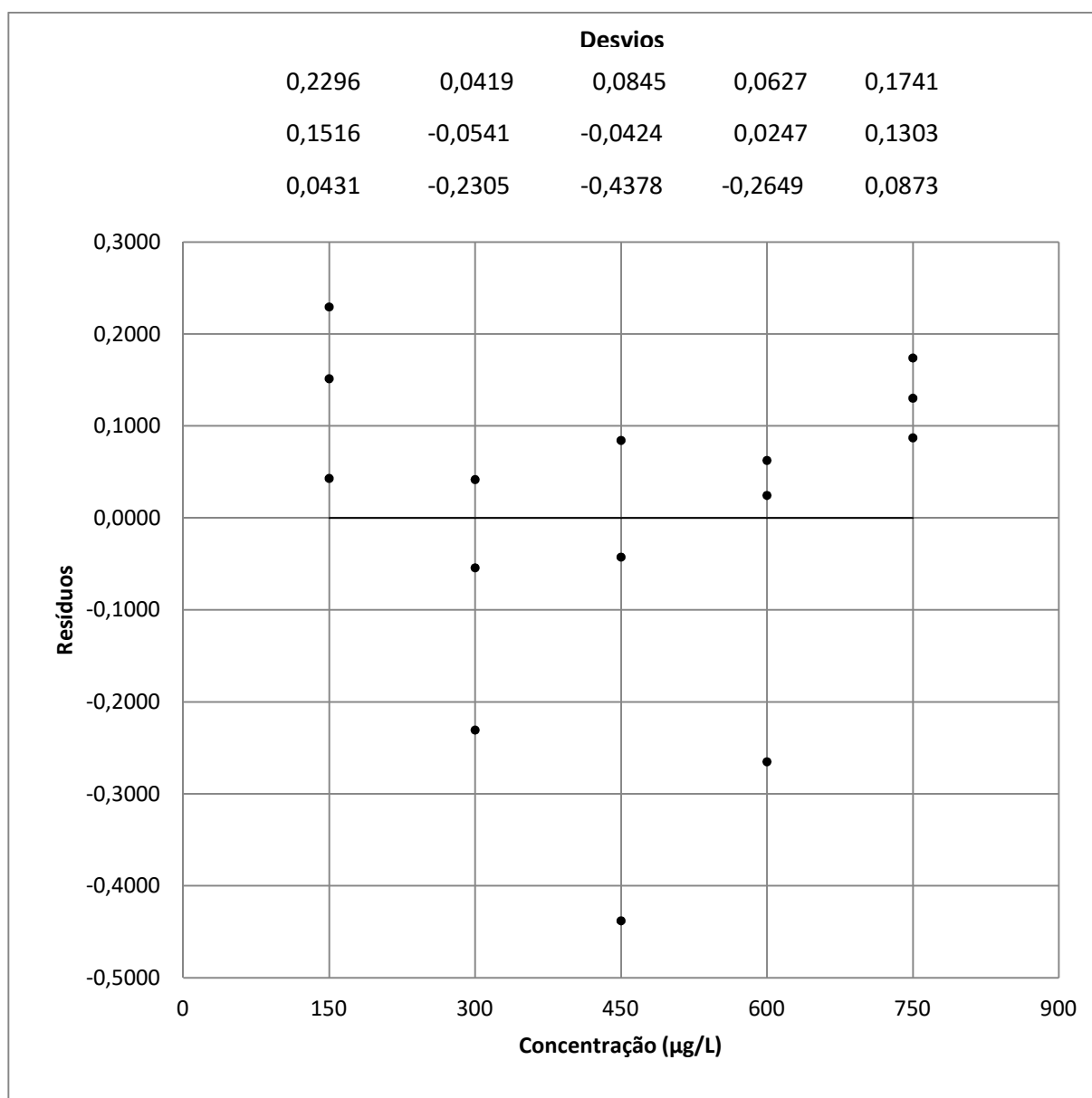


FIG. 4.9 Dispersão de resíduos para o diclorometano.

A FIG 4.10 apresenta a dispersão de resíduos para o analito metilisobutilcetona.

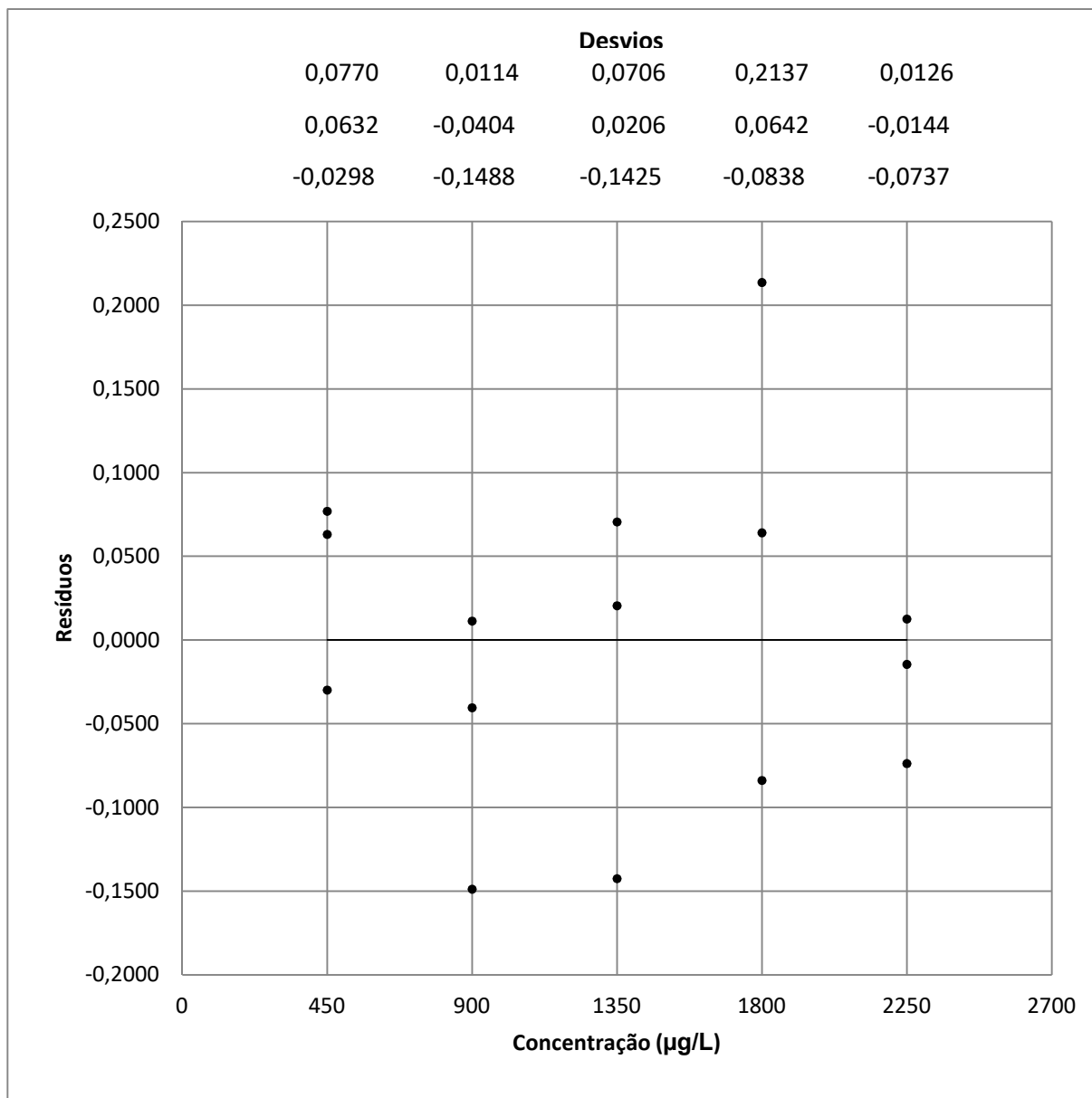


FIG. 4.10 Dispersão de resíduos para a metilisobutilcetona.

A FIG 4.11 apresenta a dispersão de resíduos para o analito tetraidrofurano.

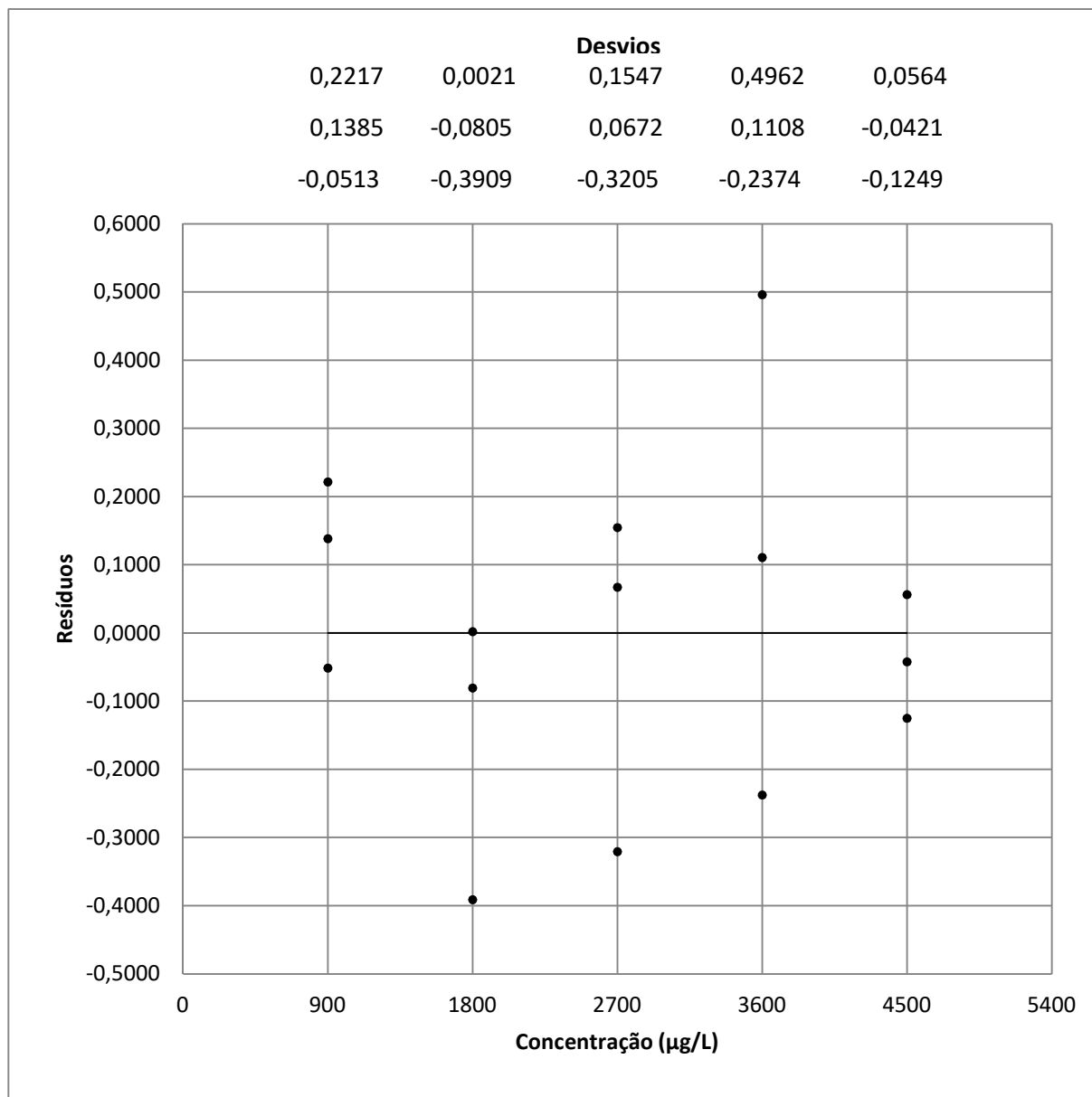


FIG. 4.11 Dispersão de resíduos para o tetraidrofurano.

A FIG 4.12 apresenta a dispersão de resíduos para o analito tolueno.

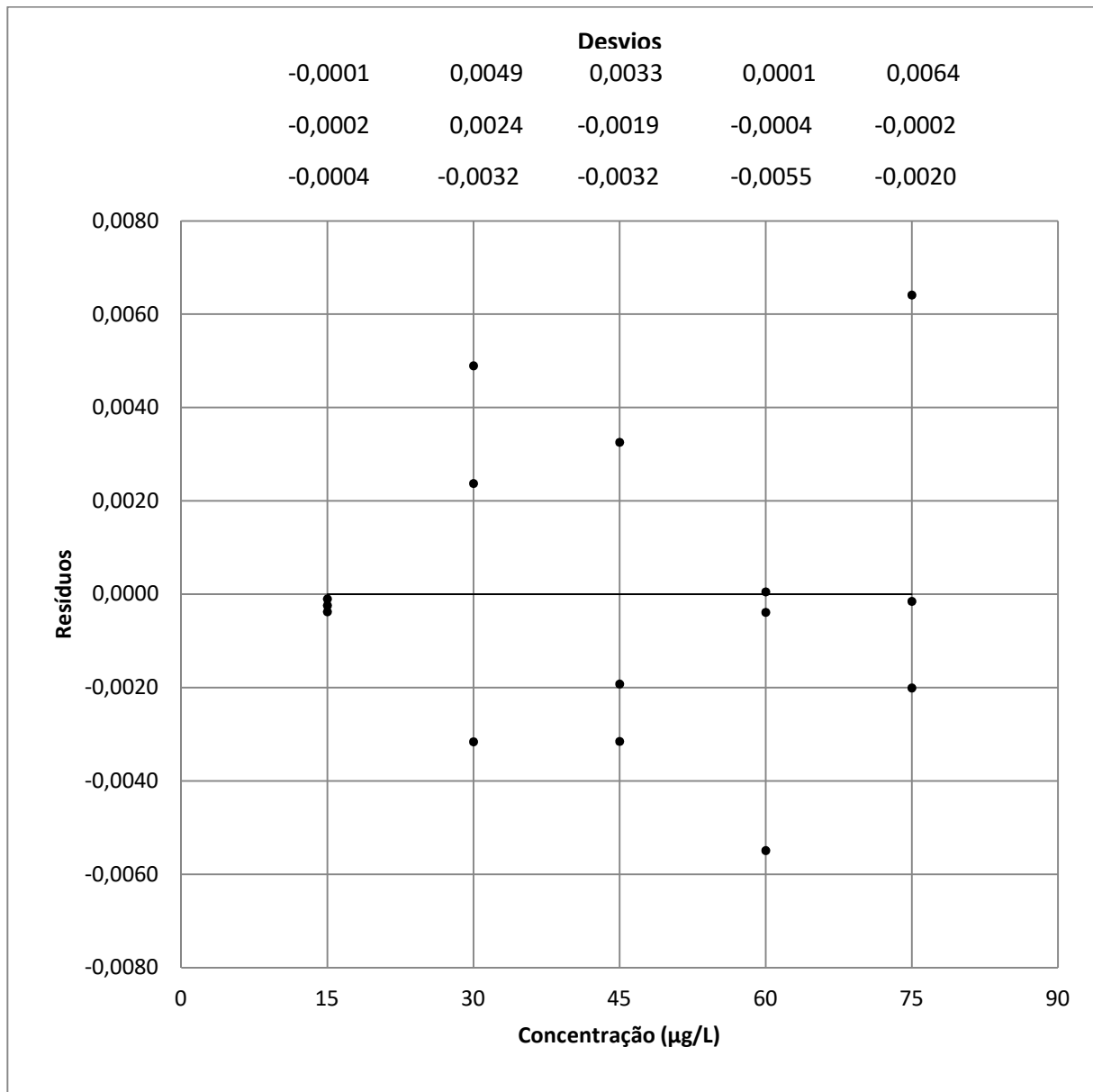


FIG. 4.12 Dispersão de resíduos para o tolueno.

É possível evidenciar, através dos gráficos de dispersão, a inexistência de tendências ao longo da faixa de concentração, no entanto, para uma qualificação inequívoca se faz necessária uma evidência estatística apropriada (BRITO *et al.*, 2003).

A avaliação da tendência dos resíduos, como argumento estatístico de reforço ao parâmetro de linearidade, não é comumente encontrada em trabalhos de validação analítica. Entende-se que, estatisticamente, quanto maior for a linearidade (correlação linear) menor será a probabilidade de observação de tendências ao longo da faixa, essa consideração implica no desprezo do dimensionamento estatístico das tendências, uma vez que não existe nenhum normativo indicando a aplicabilidade dessa avaliação.

Para que haja uma evidência estatística da ausência de tendências na faixa de concentração estudada, emprega-se o teste C de Cochran (MILLER e MILLER, 2010), que avalia a homogeneidade das variâncias envolvidas na dispersão dos resíduos e provê parâmetros comparativos de faixa crítica para avaliação das hipóteses de homocedasticidade e heterocedasticidade (MASSART *et al.*, 1997; TAYLOR, 1988).

A TAB 4.19 apresenta os valores obtidos no teste C de Cochran, através da EQ. 3.6, para todos os analitos.

TAB. 4.19 Valores obtidos no teste C de Cochran.

c	Diclorometano	Metilisobutilcetona	Tetraidrofurano	Tolueno
$C_{\text{calculado}}$	0,5455	0,4753	0,4999	0,3395
C_{tabelado}	0,6838			

Os valores apresentados confirmam a homocedasticidade da dispersão dos resíduos em todos os analitos, ou seja, valores inferiores ao crítico (C_{tabelado}) (ISO 5725, 1994).

GUIMARÃES *et al.* (2010) desenvolveram um método analítico para determinação simultânea de vários HPA's (Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos) e, na etapa de determinação da linearidade, em um conjunto de 16 analitos, 6 apresentaram comportamento heterocedástico na variância de seus resíduos. A fim de aproveitar os resultados e manter o método desenvolvido, foi criado um parâmetro secundário para avaliação dos

resultados obtidos. Foi utilizado o CV% (Coeficiente de Variação, percentual) para comparar as maiores variâncias encontradas em todos analitos. Naquele trabalho, a evidência utilizada para desprezar a heterocedasticidade encontrada em alguns analitos, foi a observação de valores de CV%, nos casos de heterocedasticidade, equivalentes em ordem aos valores associados à analitos homocedásticos (GUIMARÃES *et al.*, 2010).

No trabalho de FARIAS *et al.* (2015), também é evidenciada uma situação de heterocedasticidade no comportamento das variâncias dos resíduos. No entanto, a medida escolhida para transpor a heterocedasticidade foi a substituição do modelo de regressão linear simples pela regressão linear ponderada. A ponderação aplicada à curva foi selecionada em função de reduzir as variâncias encontradas no modelo anterior. Os novos resultados de resíduo foram re submetidos à avaliação das variâncias, havendo alteração do quadro, passando então para dispersão homocedástica, resultado tido como satisfatório pelo autor (FARIAS *et al.*, 2015).

Entende-se que existem várias formas de aplicar ponderações em curvas analíticas, cabendo a cada uma, uma respectiva influência, sobre a composição da curva, arcos de confiança da curva e, sobretudo, a equação da curva (OLIVEIRA e AGUIAR, 2009).

A medida utilizada no trabalho de GUIMARÃES *et al.* não apresenta uma base estatística capaz de anular a avaliação das variâncias indicada pelo teste C de Cochran (MILLER e MILLER, 2010). A estratégia utilizada por FARIAS *et al.*, entretanto, representa uma forma vantajosa de análise, por apresentar uma solução que ainda utilize os mesmos dados gerados inicialmente (FARIAS *et al.*, 2015).

Além dos casos observados, também se encontra como solução a substituição dos dados que apresentaram maior desvio, por outros oriundos de re-análise, assumindo que a causa do desvio possa estar associada a um erro pontual. Uma vez que a substituição não apresentar alteração no quadro de avaliação, o problema deverá ser tratado como um erro sistemático de método, ou seja, o método analítico deverá retornar à etapa de otimização a fim de prover melhor investigação para resolução do problema.

Para problemas de cunho analítico, não devem ser priorizadas soluções estatísticas, pois quanto maior a complexidade de uma argumentação estatística, maior é o distanciamento da sua representatividade em relação ao método. Entende-se que essas soluções induzem a uma série de problemas relacionados à estabilidade e reprodutibilidade do método, sendo evidenciados posteriormente.

4.2.4. LIMITES DE DETECÇÃO (LD) E QUANTIFICAÇÃO (LQ)

Como fora visto anteriormente, para determinação do Limite de Detecção (LD) e o Limite de Quantificação (LQ) foi utilizado o método do desvio padrão no presente estudo por ser capaz de estabelecer relação entre os dois limites, permitindo a obtenção de um a partir do outro (CURRIE, 1999a; b; LONG e WINEFORDNER, 1983).

O valor de limite de quantificação (LQ) pode ser estimado a partir do valor obtido no limite de detecção (LD) ou vice-versa, no caso da adoção do LQ como o ponto mais baixo em uma curva analítica. Essa relação é evidenciada através das EQ. 3.7 e EQ. 3.8, respectivamente para o Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ).

Os valores de LD e LQ foram calculados através de suas respectivas equações e serão apresentados detalhadamente a seguir.

A TAB 4.20 lista os valores utilizados na determinação dos limites de detecção e quantificação e os limites calculados para o diclorometano.

TAB. 4.20 Limites de Detecção e Quantificação do diclorometano.

Valores Obtidos	Desvio padrão	Coef. Angular	Limite de Detecção (µg/L)	Limite de Quantificação (µg/L)
1,778				
1,886				
1,964				
1,730	0,104718	0,0122	25,75	85,83
1,810				
2,020				
1,920				

A TAB 4.21 lista os valores utilizados na determinação dos limites de detecção e quantificação e os limites calculados para a metilisobutilcetona.

TAB. 4.21 Limites de Detecção e Quantificação da metilisobutilcetona.

Valores Obtidos	Desvio padrão	Coef. Angular	Limite de Detecção (µg/L)	Limite de Quantificação (µg/L)
1,042				
1,135				
1,148				
1,110	0,055089	0,0024	68,86	229,54
1,100				
0,990				
1,090				

A TAB 4.22 lista os valores utilizados na determinação dos limites de detecção e quantificação e os limites calculados para o tetraidrofurano.

TAB. 4.22 Limites de Detecção e Quantificação do tetraidrofurano.

Valores Obtidos	Desvio padrão	Coef. Angular	Limite de Detecção (µg/L)	Limite de Quantificação (µg/L)
2,260				
2,450				
2,533				
2,340	0,139609	0,0027	155,12	517,07
2,290				
2,120				
2,220				

A TAB 4.23 lista os valores utilizados na determinação dos limites de detecção e quantificação e os limites calculados para o tolueno.

TAB. 4.23 Limites de Detecção e Quantificação do tolueno.

Valores Obtidos	Desvio padrão	Coef. Angular	Limite de Detecção (µg/L)	Limite de Quantificação (µg/L)
0,024				
0,024				
0,024				
0,023	0,000926	0,0017	1,63	5,44
0,024				
0,026				
0,025				

A TAB 4.23 lista os valores dos limites de detecção e quantificação de todos os analitos.

TAB. 4.23 Limites de Detecção e Quantificação em µg/L.

Limites	DCM	MIBC	THF	TOL
LD	25,75	68,86	155,12	1,63
LQ	85,83	229,54	517,07	5,44

Deve-se chamar a atenção ao fato de que os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), são apenas estimativas estatísticas, e podem apresentar grande variabilidade em função das condições analíticas (SKOOG *et al.*, 2006).

Como forma transpor a variação dos limites, assume-se como o limite de quantificação o ponto mais baixo da curva analítica. Dessa forma, o limite pode ser testado na prática, considerando as condições analíticas no momento da análise e principalmente, impedindo a influência dessas variações na qualidade dos resultados. Lembrando, ainda que os resultados devam estar compreendidos no intervalo de medição, ou seja, acima dos valores determinados como Limite de Quantificação (INMETRO, 2007).

Leituras efetuadas e correlacionadas ao intervalo entre os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) devem ser relevantes somente em termos qualitativos, ou seja, a determinação de presença ou não de um analito em um determinado ensaio é dada por resultados encontrados dentro desta faixa (INMETRO, 2007).

A obtenção de valores estimados de LQ inferiores ao primeiro ponto da curva analítica atribui confiabilidade à adoção do primeiro ponto como o limite utilizado, pois, indica a robustez e reprodutibilidade das condições analíticas (MUNA, 2015; 2016).

Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) inferiores podem ser alcançados através da aplicação de técnicas de detecção mais sensíveis, como a Espectrometria de massas. Tal condição analítica poderia ser implementada no presente método, no entanto, ampliaria consideravelmente o custo final da análise, fugindo de um dos objetivos determinados inicialmente, que é a disponibilização de um método analítico aplicável à determinação simultânea de vários analitos com o menor custo possível e, dessa forma, incentivar o monitoramento dessas substâncias em uma maior frequência.

Foram observadas, nos trabalhos de POLI *et al.* (2005) e NETTO *et al.* (2008), características consideradas no desenvolvimento do presente método. Em seus trabalhos, é utilizada adicionalmente a técnica de SPME (*Solid Phase Micro Extraction*). Trata-se de uma técnica de pré-concentração com significativos resultados analíticos (PAWLISZYN, 1997), porém, que imputa dois problemas os quais foram contemplados no presente trabalho.

O uso da técnica de SPME requer uma etapa adicional de manipulação da amostra. Embora seja em prol da pré-concentração dos analitos e que realmente tem poder de reduzir os limites de detecção e quantificação, significa também a inserção de mais uma fonte de erro e incerteza em todo o procedimento. É importante lembrar que, quanto menores os volumes de amostra, maiores são as dificuldades na sua manipulação e, conseqüentemente, os erros associados ao processamento das amostras.

A outra questão relacionada à técnica de SPME é a seletividade. A extração e pré-concentração em fase sólida são dependentes do tipo de material utilizado, considerando que cada um destes tem interações diferentes para cada tipo de analito, trata-se de uma variável a ser considerada para que este possa efetivamente retirá-los de sua matriz original. Quanto maior afinidade entre o material e o analito, mais exaustivo será o seu processo de extração para análise cromatográfica (MILLS e WALKER, 2000). No presente trabalho, apresenta-se um conjunto de analitos com estruturas e propriedades físico-químicas distintas.

A seleção de qualquer tipo de material para emprego da técnica SPME implicaria no favorecimento de algumas substâncias e desfavorecimento de outras.

4.2.5. RECUPERAÇÃO

Para o estudo da recuperação foram analisadas três replicatas para os pontos 1, 3 e 5 da curva analítica e a recuperação foi calculada através da EQ. 3.9.

A TAB 4.24 apresenta os valores obtidos experimentalmente e a média geral da recuperação ao longo da curva analítica para os analitos estudados. Ressalta-se que todos os brancos (amostras sem fortificação) se enquadraram na faixa de não detectado (ND), ou seja, inferior ao limite de detecção.

TAB. 4.24 Valores de recuperação dos analitos.

Nível	DCM		MIBC		THF		TOL	
	Nominal	Obtido	Nominal	Obtido	Nominal	Obtido	Nominal	Obtido
1	150	153,53	450	437,77	900	880,79	15	14,78
	150	162,40	450	475,93	900	951,88	15	14,94
	150	168,78	450	481,60	900	983,06	15	14,86
3	450	414,18	1350	1291,55	2700	2579,92	45	43,16
	450	456,91	1350	1378,99	2700	2757,97	45	46,90
	450	446,53	1350	1358,44	2700	2725,18	45	43,88
5	750	764,24	2250	2255,19	4500	4453,20	75	78,74
	750	760,66	2250	2219,76	4500	4521,13	75	73,83
	750	757,14	2250	2244,08	4500	4484,23	75	74,91
Médias	450	453,82	1350	1349,25	2700	2704,15	45	45,11
Rec (%)	100,85		99,94		100,15		100,25	

Os valores obtidos no estudo de recuperação apontam que, tanto o método de extração por *headspace* como o método cromatográfico de análise apresentam perfeita acurácia e sinergia, apresentando resultados satisfatórios.

De acordo com BRITO (2001), a aceitabilidade dos valores encontrados nos estudos de recuperação é correlacionada à concentração dos analitos, em termos percentuais. Quanto menor o percentual de analito em relação à amostra, maior será o intervalo de aceitabilidade dos resultados (BRITO, 2001).

A TAB 4.25 apresenta os intervalos de aceitação dos valores de recuperação em função das concentrações dos analitos em termos percentuais (BRITO, 2001).

TAB. 4.25 Intervalos de recuperação em função das concentrações.

Concentração do analito (%)	Intervalo de Recuperação aceito (%)
≥ 10	98 – 102
≥ 1	97 – 103
$\geq 0,1$	98 – 105
$\geq 0,01$	90 – 107
$\geq 0,001 - \geq 0,00001$	80 – 110
$\geq 0,000001$	60 – 115
$\geq 0,0000001$	40 – 120

Os percentuais de recuperação encontrados estão no intervalo entre 99 – 100, esse intervalo representa uma excelente faixa de recuperação frente as concentrações estudadas.

Finalizando o estudo de validação do ensaio químico desenvolvido, uma última avaliação foi efetuada sobre todos os dados gerados e utilizados nas etapas anteriores da presente validação.

Essa avaliação compara os coeficientes de variação (CV% ou desvio padrão relativo) de todas as replicatas geradas com um critério de aceitabilidade em função da ordem de grandeza das concentrações analisadas (WOOD, 1999).

A TAB 4.26 apresenta as relações de aceitabilidade entre os coeficientes de variação (%) e as concentrações dos analitos, em termos percentuais (WOOD, 1999).

TAB. 4.26 Coeficientes de variação em função das concentrações.

Concentração do analito (%)	Coefficiente de Variação (%)
1 (100%)	2
10^{-1}	2,8
10^{-2} (1%)	4
10^{-3}	5,6
10^{-4}	8
10^{-5}	11
10^{-6} (ppm)	16
10^{-7}	23
10^{-8}	32
10^{-9} (ppb)	45

Como observado na TAB 4.26, a aceitabilidade dos desvios dos coeficientes de variação aumenta inversamente com a concentração. Este

comportamento está associado ao aumento da dificuldade analítica (de determinação) encontrada em concentrações mais baixas.

Efetuando-se um comparativo entre as faixas de concentração adotadas no presente estudo e os respectivos limites aceitáveis de coeficiente de variação, observa-se que os coeficientes aceitáveis estão entre as faixas de 23, 32 e 45%.

Em todo o volume de dados gerados, as replicatas foram avaliadas inicialmente através do teste de Grubbs, para verificação da existência de valores aberrantes integrando um conjunto de replicatas (GRUBBS, 1950). Posteriormente foram submetidos ao cálculo para obtenção dos coeficientes de variação e comparados com os valores de referência contidos na TAB 4.26.

Os testes de Grubbs e avaliação dos coeficientes de variação funcionam conjuntamente como validadores das replicatas geradas, podendo indicar a necessidade de reposição de algum dado (re-leitura, novo experimento, etc.) ou, simplesmente, a retirada do valor reprovado no teste e consideração do mesmo como valor aberrante e não representativo do conjunto.

De acordo com os testes efetuados ao longo de todo o estudo, torna-se possível afirmar que o aproveitamento dos dados gerados foi de 100%.

4.2.6. COMENTÁRIOS FINAIS SOBRE A METODOLOGIA DE EXTRAÇÃO

Para o desenvolvimento do presente método analítico, duas técnicas de *headspace* foram cogitadas, extração estática direta (HS-CG) e micro extração em fase sólida (HS-SPME-CG). Embora muitos trabalhos incentivem o uso da técnica HS-SPME, pela forma como permite etapas sucessivas de concentração dos analitos (KOLB e ETTRE, 2006), a técnica utilizada foi de HS-CG.

Várias são as diferenças entre as técnicas citadas, assim como a especificidade de suas aplicações. Para a escolha do presente método, foram consideradas as características relacionadas à manipulação da amostra,

capacidade de reprodutibilidade e intensidade de sinal gerado por extração direta.

A técnica HS-SPME imputa uma maior manipulação da amostra, uma vez que consiste de etapas adicionais de particionamento. A amostra é filtrada em um material adsorvente, geralmente fibras de poliacrilato e posteriormente dessorvida em outro solvente ou termicamente (LLOMPART *et al.*, 1998). Essas etapas de particionamento criam uma dependência de tempo e condições específicas a cada operação, como forma de deslocar o particionamento e/ou aumentar a velocidade a favor da otimização do processo, geralmente são utilizados agitadores magnéticos, ultrassom e microondas (SHU *et al.*, 2003).

Cada etapa de particionamento depende de um tempo mínimo para que seja atingido o equilíbrio entre as fases envolvidas, logo, há uma grande probabilidade de que as extrações e injeções ocorram com etapas de equilíbrio inconstantes, criando um desvio não mensurável, condição que afeta diretamente a repetibilidade e reprodutibilidade de todo o método analítico (SHU *et al.*, 2003).

A existência de etapas de particionamento não equilibradas é especialmente delicada em uma análise quantitativa, requerem uma calibração multivariada complexa para compensar ou corrigir as diferenças oriundas das relações de pressão parcial e variação de concentração dos analitos, complicando ainda mais quando são considerados muitos analitos (DUNN *et al.*, 1998).

Comparações experimentais entre as duas técnicas apontam que, em uma injeção direta, considerando as características de cada técnica, a extração estática direta apresenta até seis vezes mais sensibilidade do que a micro-extração em fase sólida, considerando, para isso, o baixo desvio observado na extração estática direta e as poucas manipulações que a técnica requisita (KOLB e ETTRE, 2006).

Ambas as técnicas apresentam grande utilidade, cabendo ao desenvolvedor analítico identificar onde cada uma pode ser aplicada com maior aproveitamento.

5. CONCLUSÃO

O método analítico foi desenvolvido experimentalmente e submetido a um estudo de validação, para que fossem dimensionadas as características do ensaio químico.

Os resultados obtidos no presente estudo atribuem grande confiabilidade metrológica para utilização do método dentro das especificações de desenvolvimento, nesse caso, o monitoramento toxicológico das substâncias diclorometano, metilisobutilcetona, tetraidrofurano e tolueno em urina.

A associação da faixa de trabalho com os limites do Índice Biológico de Exposição (IBE) permite uma antecipada identificação de condições tóxicas às quais as pessoas podem estar submetidas em um determinado ambiente. A observação de valores quantificados, mesmo que abaixo dos limites, pode prover informações valiosas quanto ao histórico toxicológico do indivíduo ou salubridade do ambiente.

Como foi evidenciado, os limites de detecção e quantificação alcançados no presente método são capazes de atender os valores do IBE com um grande distanciamento de valores. Os valores teóricos dos limites de quantificação são, em média, quatro vezes menores do que os valores referenciados.

Os experimentos conduzidos para avaliar a influência da matriz sobre a capacidade de medição de cada analito evidenciaram que o método desenvolvido para extração de *headspace* se mostrou eficiente no objetivo de transpor a complexidade da matriz de urina.

O presente trabalho finaliza o objetivo pretendido com êxito, gerando a comunidade científica e acadêmica um ponto de partida para diversas ramificações no âmbito da química analítica, higiene e toxicologia ocupacional e estatística aplicada á metrologia química.

6. PROSPECÇÕES FUTURAS

Sobre as substâncias estudadas, embora existam estudos apontando a correlação sintomatológica com exposições a concentrações moderadas (próximas ao limite) e agudas (50% acima do limite), ao se considerar exposições a baixas concentrações e durante longos períodos ainda não existem estudos capazes de evidenciar essa influência (WHO, 1996).

Os valores adotados como limite de tolerância para cada substância tendem, com o passar dos anos, a diminuir conforme são geradas novas evidências correlacionáveis às suas interações com os diferentes organismos. Essa tendência é o que impõe a importância de otimização constante dos métodos analíticos empregados.

A progressão do presente trabalho está no aumento do escopo de analitos realizados no mesmo ensaio químico, o autor sugere que as substâncias acetona, benzeno, etanol e metiletilcetona podem ser incorporadas ao atual procedimento analítico.

As substâncias citadas acima são atualmente monitoradas diretamente através da urina, assim como as demais estudadas no presente trabalho (ACGIH, 2010). As similaridades químicas entre as substâncias propostas e as estudadas sugerem que o atual método de extração de *headspace* poderá se aplicado diretamente para todas as substâncias. Cromatograficamente, no entanto, será necessária uma nova etapa de otimização do processo de separação e posteriormente procedido um novo estudo de validação para todos os analitos.

O atual estudo representa o alicerce para execução do trabalho proposto, provendo o modelo estatístico que será utilizado no processo de validação. O objetivo final é o desenvolvimento de uma varredura de compostos orgânicos voláteis (COV's) em urina.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACGIH (American Conference of Governmental Industrial Hygienists). Tetrahydrofuran. In: Documentation of the threshold limit values and biological exposure indices. Cincinnati, OH: American Conference of Governmental Industrial Hygienists, 2001.
- ACGIH (American Conference of Governmental Industrial Hygienists). Limites de exposição ocupacional (TLVs®) para substâncias químicas e agentes químicos & índices biológicos de exposição (BEIs®). Tradução: ABHO (Associação Brasileira de Higienistas Ocupacionais), p. 4-5. São Paulo: ABHO, 2010.
- ALBRECHT, W. N.; BOIANO, J. M.; SMITH, R. D. IgA glomerulonephritis in a plumber working with solvent-based pipe cement. *Ind Health* 25:157–158, 1987.
- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). Toxicological profile for methylene chloride. Atlanta, GA, 2000.
- BRAITHWAITE, J. Ketones. In: Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology. 4th ed. Vol 14. New York: John Wiley and Sons, pp. 978–1021, 1995.
- BRENDOLAN, G.; Validação de métodos Analíticos. Apostila de curso. São Paulo, 4ª edição, 2010.
- BRITO, N. M.; AMARANTE JUNIOR, O. P.; POLESE, L.; RIBEIRO, M. L. Validação de métodos analíticos: Estratégia e discussão. *Pesticidas: Revista Ecotoxicol. e Meio ambiente*, Curitiba, v. 13, p. 129-130, 2003.
- BRITO, N. M. Resíduos de pesticidas organoclorados (OC) e organofosforados (OF) em matriz de coco: metodologia e aplicação. São Paulo. Dissertação (Mestrado em Química Analítica), Universidade Estadual Paulista, 2001.
- BRUCKNER, J. V. and WARREN, D. A. Toxic effects of solvents and vapours. In: KLAASSEN, C. D. Casarett and Doull's Toxicology: The basic science of poisons. 6 ed. Unites States: McGraw-Hill, 2001.

- BRUGNONE, F; GOBBI, M; AYYAD, K; et al. Blood toluene as a biological index of environmental toluene exposure in the “normal” population and in occupationally exposed workers immediately after exposure and 16 hours later. *Int J Occup Environ Health* 66:421-425, 1995.
- BUSSAB, W. O. e MORETTIN, P. A. *Estatística Básica*, 5. ed., São Paulo: Saraiva, 2002.
- CAUSON, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis: viewpoint and discussion. *J. Chromatogr. B*, v. 689, p. 175-180, 1997.
- CHASIN, A. A. M. e SALVATORI, M. Validação de métodos cromatográficos em análises toxicológicas. *Rev. Farm. Bioquím. Univ. São Paulo*, São Paulo, v.30, n.2, p.49-53, 1994.
- CHERRY, N.; VENABLES, H.; WALDRON, H. A.; WELLS, G. G. Some observations on workers exposed to methylene chloride. *Br J Ind Med* 38: 351-355, 1981.
- CHERRY, N.; VENABLES, H.; WALDRON, H. A. The acute behavioural effects of solvent exposure. *Occup Med (Lond)* 33: 13-18. <http://dx.doi.org/10.1093/occmed/33.1.13>, 1983.
- COCHRAN, W.G., The distribution of the largest of a set of estimated variances as a fraction of their total, *Annals of Human Genetics (London)* 11(1), 47–52, 1941.
- CURRIE, L.A. Detection and quantification limits: origins and historical overview. *Anal. Chim. Acta*, v. 391, p. 127-134, 1999a.
- CURRIE, L. A. Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities (IUPAC Recommendations 1995). *Anal. Chim. Acta.*, v. 391, p. 105-126, 1999b.
- CURRIE, L. A. *Detection in Analytical Chemistry: Importance, Theory, and Practice*, ACS Symp. Ser. 361, Washington, 1988.
- DEAN, A. and VOSS, D. *Design and analysis of experiments*. Springer-verlag Inc., New York, 1999.
- DIVINCENZO, G. D.; YANNO, F. J.; ASTILL, B. D. The gas chromatographic analysis of methylene chloride in breath, blood, and

- urine. Am Ind Hyg Assoc J 32: 387 - 391.
<http://dx.doi.org/10.1080/0002889718506478>, 1971.
- DIVINCENZO, GD; YANNO, FJ; ASTILL, BD. Human and canine exposures to methylene chloride vapor. Am Ind Hyg Assoc J 33: 125-135.
<http://dx.doi.org/10.1080/0002889728506622>, 1972.
- DIVINCENZO, G. D.; KAPLAN, C. J. Uptake, metabolism, and elimination of methylene chloride vapor by humans. Toxicol Appl Pharmacol 59: 130-140. [http://dx.doi.org/10.1016/0041-008X\(81\)90460-9](http://dx.doi.org/10.1016/0041-008X(81)90460-9), 1981.
- DONG, M. W. "Modern HPLC for Practicing Scientists", Wiley, NJ , 2006.
- DUNN, W. B.; TOWNSHEND, A. and GREEN, J. D., Analyst. V. 123, p. 343 - 348, 1998.
- EDLING, C. Interaction between drugs and solvents as a cause of fatty change in the liver? Br J Ind Med 39(2):198-199, 1982.
- EHYAI, A; FREEMON, F. R. Progressive optic neuropathy and sensorineural hearing loss due to chronic glue sniffing. J Neurol Neurosurg Psychiatry 46:349-51, 1983.
- EMMETT, E A. Parosmia and hyposmia induced by solvent exposure. Br J Ind Med 33(3):196-198, 1976.
- FARIAS, S. L., et al. Avaliação metrológica da curva analítica para determinação do teor de enxofre em baixíssimas concentrações em óleo diesel S-10. Quim. Nova, v. 38, N. 6, p. 852 - 858, 2015.
- GARNIER, R; ROSENBERG, N; PUISSANT, J. M.; *et al.* Tetrahydrofuran poisoning after occupational exposure. Br J Ind Med 46(9):677-678, 1989.
- GROB, R. L.; Modern Practice of Gas Chromatography, 4th ed., John Wiley & Sons: Hooboken, 2004.
- GRUBBS, F. E., "Sample criteria for testing outlying observations". Annals of Mathematical Statistics. 21 (1): 27-58. doi:10.1214/aoms/1177729885, 1950.
- GUIMARÃES, E. F. et al. Validação de Metodologia Analítica para a Determinação de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Solução. Produto e Produção, v. 11, n. 1, p. 113 - 123, 2010.

HIGSON, S. Analytical Chemistry. OXFORD University Press ISBN 978-0-19-850289-0, 2004.

HORMES, J. T; FILLEY, C. M; ROSENBERG, N. L. Neurologic sequelae of chronic solvent vapor abuse. *Neurology* 36:698-702, 1986.

HUNNEWELL, J; MILLER, N. R. Bilateral internuclear ophthalmoplegia related to chronic toluene abuse. *J Neuroophthalmol* 18:277-280, 1998.

Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial - INMETRO. DOQ-CGCRE-008: Orientação sobre validação de métodos analíticos. INMETRO, 2011. Revisão 04, 2007.

Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial - INMETRO. NIT-DICLA-035: Requisitos gerais para laboratórios segundo os princípios das boas práticas de laboratório (BPL). INMETRO, 2009. Revisão 01.

ISO 5725 (E). Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results, 1994.

JUNTUNEN, J; KASTE, M; HARKONEN, H. Cerebral convulsion after enfluran anaesthesia and occupational exposure to tetrahydrofuran. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 47(11):1258, 1984.

KAWAI, T; YASUGI, T; MIZUNUMA, K; et al. Comparative evaluation of urinalysis and blood analysis as means of detecting exposure to organic solvents at low concentrations. *Int Arch Occup Environ Health* 64:223-234, 1992a.

KAWAI, T; YASUGI, T; MIZUNUMA, K; et al. Monitoring of workers exposed to a mixture of toluene, styrene and methanol vapours by means of diffusive air sampling, blood analysis and urinalysis. *Int Arch Occup Environ Health* 63:429-435, 1992b.

KAWAI, T; YASUGI, T; MIZUNUMA, K; et al. Comparative evaluation of blood and urine analysis as a tool for biological monitoring of n-hexane and toluene. *Int Arch Occup Environ Health* 65:S123-S126, 1993.

KAWAI T.; ZHANG W.; TAKEUCHI A.; MIYAMA Y.; SAKAMOTO K.; HIGASHIKAWA K.; IKEDA. M. Methyl isobutyl ketone and methyl ethyl ketone in urine as biological markers of occupational exposure to these solvents at low levels. *Int Arch Occup Environ Health*. 76: 17–23, 2003.

- KAWAI, T.; UKAI, H.; INOUE, O.; MAEJIMA, Y.; FUKUI, Y.; OHASHI, F.; OKAMOTO, S.; TAKADA, S.; SAKURI, H.; IKEDA, M.; *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 81, 253, 2008.
- KIYOKAWA, M; MIZOTA, A; TAKASOH, M; et al. Pattern visual evoked cortical potentials in patients with toxic optic neuropathy caused by toluene abuse. *Jpn J Ophthalmol* 43:438-442, 1999.
- KOLB, B., AUER, M. and POSPISIL, P., *J. Chromatogr.* 279, 341 – 348, 1983.
- KOLB, B. *Topics in forensic and analytical toxicology*, Elsevier, Amsterdam, p. 119 – 126, 1984.
- KOLB, B. Headspace sampling with capillary columns. *Journal of chromatography A*, v. 842, p. 165 – 205, 1999.
- KOLB, B., ETTRE, L. S. in *Static headspace-gas chromatography Theory and Practice*. Wiley Interscience, Hoboken, 2006.
- LASH, A. A.; BECKER, C. E.; SO, Y.; SHORE, M. Neurotoxic effects of methylene chloride: Are they long lasting in humans? *Occup Environ Med* 48: 418-426, 1991.
- LAZAR, R. B; HO, S. U; MELEN, O; et al. Multifocal central nervous system damage caused by toluene abuse. *Neurology* 33:1337-1340, 1983.
- LLOMPART, M.; FINGAS, M. and LI, K., *Anal. Chem.*, v. 70, p. 2510-2515, 1998.
- LÖF, A; WALLEN, M; HJELM, E. W. Influence of paracetamol and acetylsalicylic acid on the toxicokinetics of toluene. *Pharmacol Toxicol* 66:138-141, 1990.
- LÖF, A; HJELM, E. W; COLMSJO, A; et al. Toxicokinetics of toluene and urinary excretion of hippuric acid after human exposure to ²H₈-toluene. *Br J Ind Med* 50:55-59, 1993.
- LONG, G. L. and WINEFORDNER, J. D. Limit of detection: a closer look at the IUPAC definition. *Anal. Chem.*, v. 55, n. 7, p. 712 – 724A, 1983.

- LOVELAND, JENNIFER L. "Mathematical Justification of Introductory Hypothesis Tests and Development of Reference Materials". All Graduate Plan B and other Reports. Paper 14, 2011.
- LOWRY, L. K. Review of biological monitoring tests for toluene. In: M.H. Ho, MH; Dillon, HK, editors. Biological monitoring of exposure to chemicals. New York, NY: John Wiley & Sons, Inc. pp 99-109, 1987.
- LUNET, N.; SEVERO, M.; BARROS, H. Desvio padrão ou erro padrão. (2006) Scientific Electronic Library Online. p. 55. Consultado em 23 de março de 2017.
- McMASTER, M., "HPLC: A Practical User's Guide", Wiley, NJ, 2007.
- MASSART. D.L.; VANDEGINSTE B.G.M.; BUYDENS L.M.C.; JONG, S., LEWI, P.J.; SMEYERS-VERBEKE, J., *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A*, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands. ISBN 0-444-89724-0, 1997.
- MEYER, V.R., "Practical High-Performance Liquid Chromatography", Wiley-VCH, 2004.
- MILLER, J. N.; MILLER J. C.; *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, 6th ed., Pearson: Harlow, 2010.
- MILLS, G. A. e WALKER, J.; *J. Chromatogr. A*, 902, 267, 2000.
- MUKAKA, M.M. - Statistics Corner: A guide to appropriate use of Correlation coefficient in medical research. *Malawai Medical Journal*, DOI:PMC3576830, 2012.
- MUNA E. D. M. et al, *J. Phys.: Conf. Ser.* v. 575, n. 012031, 2015.
- MUNA E. D. M. and PEREIRA R. P., *J. Phys.: Conf. Ser.* v. 733, n. 012013, 2016.
- NETO, B. B. et al. Recomendações para calibração em química analítica - parte I. Fundamentos e calibração com um componente. *Química Nova*, São Paulo, v. 25, n. 5, 2002.
- NETTO, D. C. et al, Headspace solid-phase microextraction procedure for gas-chromatography analysis of toluene in urine. *J. Braz. Chem. Soc.* São Paulo, v. 19, n. 6, 2008.

NR-7 - Norma Regulamentadora 7 – Programa de Controle Médico de Saúde Ocupacional (PCMSO) – Ministério do Trabalho, Brasil.

NR-9 - Norma Regulamentadora 9 – Programa de Prevenção de Riscos Ambientais (PPRA) – Ministério do Trabalho, Brasil.

NR-15 - Norma Regulamentadora 15 – Atividades e Operações Insalubres – Ministério do Trabalho, Brasil.

OLIVEIRA, E. C. e AGUIAR, P. F. Least squares regression with errors in both variables: case studies *Quim. Nova*, v. 36, n. 6, p. 885 - 889, 2013.

OLIVEIRA, E. C. e AGUIAR, P. F. Validação da metodologia da avaliação de incerteza em curvas de calibração melhor ajustadas por polinômios de segundo grau. *Quim. Nova*, v. 32, n. 6, p. 1571 - 1575, 2009.

ONG, C. N.; CHIA, S. E.; PHOON, W. H.; *et al.* Biological monitoring of occupational exposure to tetrahydrofuran. *Br J Ind Med* 48(9):616–621, 1991.

ONG, C. N., KOK., P. W., LEE, B. L., SHI, C. Y., ONG, H. Y., CHIA, K. S., LEE, C. S., LUO, X. W. Evaluation of biomarkers for occupational exposure to benzene. *Occup. Environ. Med.*, London, v.52, p.528-533, 1995.

ONG, C. N., KOK, P. W., ONG, H. Y., SHI, C. Y., LEE, B. L., PHOON, W. H., TAN, K. T. Biomarkers of exposure to low concentrations of benzene: a field assesment. *Occup. Environ. Med.*, London, v.53, p.328-333, 1996.

OSHA - 2-Butanone (MEK) Hexone (MIBK): Method 1004. OSHA Analytical Methods Manual. Salt Lake City, Utah: DOL, Occupational Safety and Health Administration.

OSHA - Methylene Chloride: Method 80. OSHA Analytical Methods Manual. Salt Lake City, Utah: DOL, Occupational Safety and Health Administration.

OSHA - Toluene: Method 111. OSHA Analytical Methods Manual. Salt Lake City, Utah: DOL, Occupational Safety and Health Administration.

PAWLISZYN, J., *Solid Phase Microextraction: Theory and Practice*, Wiley-VCH, New York, 1997.

- PAWLISZYN, J., Applications of solid phase Microextraction, RSC Chromatography Monographs, Royal Society of Chemistry, London, 1999.
- PIMENTEL, M. F. et al. Recomendações para calibração em Química Analítica parte II. Calibração multianálito. Química Nova, v. 31, n. 2, 2008.
- POBLANO, A; LOPE HUERTA, M; MARTINEZ, J. M; et al. Pattern-visual evoked potential in thinner users. Arch Med Res 27:531-533, 1996.
- POLI D.; MANINI P.; ANDREOLI R.; FRANCHINI I.; MUTTI A. Determination of dichloromethane, trichloroethylene and perchloroethylene in urine samples by headspace solid phase microextraction gas chromatography–mass spectrometry. Journal of Chromatography B, 820, 95–102, 2005.
- SAKAI, T.; MORITA, Y.; WAKUI, C. Biological monitoring of workers exposed to dichloromethane, using head-space gas chromatography. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 778: 245 - 250. [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4347\(01\)00450-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4347(01)00450-9), 2002.
- SASA, M; IGARASHI, S; MIYAZAKI, T; et al. Equilibrium disorders with diffuse brain atrophy in long term toluene sniffing. Arch Otorhinolaryngol 221:162-169, 1978.
- SHERMAN S. M. and GUILLERY R. W. Exploring the Thalamus and its Role in Cortical Function. Cambridge, MA: MIT Press, 2006
- SHU, Y. Y.; WANG, S. S.; TARDIF, M. and HUANG, Y., J. Chromatography A, v. 1008, p. 1 – 12, 2003
- SKOOG, WEST, HOLLER, Crouch, Fundamentos de Química Analítica, Tradução da 8ª Edição norte-americana, Editora Thomson, São Paulo-SP, 2006.
- SKOOG, HOLLER and NIEMAN, Princípios de Análise Instrumental, 5ª Edição, Editora Bookman, São Paulo-SP, 2002.
- STEWART, R. D.; FISHER, T. N.; HOSKO, M. J.; PETERSON, J. E.; BARETTA, E. D.; DODD, H. C. Carboxyhemoglobin elevation after exposure to dichloromethane. Science 176: 295-296, 1972a.

- STEWART, R. D.; FISHER, T. N.; HOSKO, M. J.; PETERSON, J. E.; BARETTA, E. D.; DODD, H. C. Experimental human exposure to methylene chloride. *Arch Environ Occup Health* 25: 342-348, 1972b.
- SNYDER, L.R. and KIRKLAND, J., "Introduction to Modern Liquid Chromatography", 3rd Ed., Wiley, 2009.
- TARDIF, R.; PLAA, G. L.; BRODEUR, J. Influence of various mixtures of inhaled toluene and xylene on the biological monitoring of exposure to these solvents in rats. *Can J Physio Pharmacol* 70:385-395, 1992.
- TARDIF, R.; TRUCHON, G.; BRODEUR, J. Comparison of hippuric acid and o-cresol in urine and unchanged toluene in alveolar air for the biological monitoring of exposure to toluene in human volunteers. *Appl Occup Environ Hyg* 13:127-132, 1998.
- TAYLOR, J.K. *Quality Assurance of Chemical Measurements*, 4th printing, Lewis Publishers, Chelsea, Michigan, ISBN 0-87371-097-5, 1988.
- TOYONAGA, N; ADACHI-USAMI, E; YAMAZAKI, H. Clinical and electrophysiological findings in three patients with toluene dependency. *Doc Ophthalmol* 73:201-207, 1989.
- TSAI, S., J. CHEN, W. CHAO, AND J. WANG. Neurobehavioral effects of occupational exposure to low-level organic solvents among Taiwanese workers in paint factories. *Environ Res* 73:146-155, 1997.
- TURKALL, R. M.; SKOWRONSKI, G. A.; ABDEL-RAHMAN, M. S. Differences in kinetics of pure and soil-adsorbed toluene in orally exposed male rats. *Arch Environ Contam Toxicol* 20:155-160, 1991.
- VALCIUKAS, J. A., R. LILIS, R. M. SINGER, L. GLICKMAN, and W. J. NICHOLSON. Neurobehavioral changes among shipyard painters exposed to solvents. *Arch Environ Health* 40(1):47-52, 1985.
- VIEIRA, E. e LICHTIG, J., Validação de métodos cromatográficos em análise de resíduos de pesticidas. *Arq. Inst. Biol., São Paulo*, v. 71 (supl.), p. 1 - 749, 2004.
- WHO (World Health Organization). *Biological monitoring of chemical exposure in the workplace: guidelines*. Geneva, 1996.

WINSTON H. HICKOX et al, dichloromethane (methylene chloride, dcm), public health goals for chemicals in drinking water, California, september 2000.

WOOD, R. How to validate analytical methods. Trends Anal. Chem., v. 18, p. 624-632, 1999.