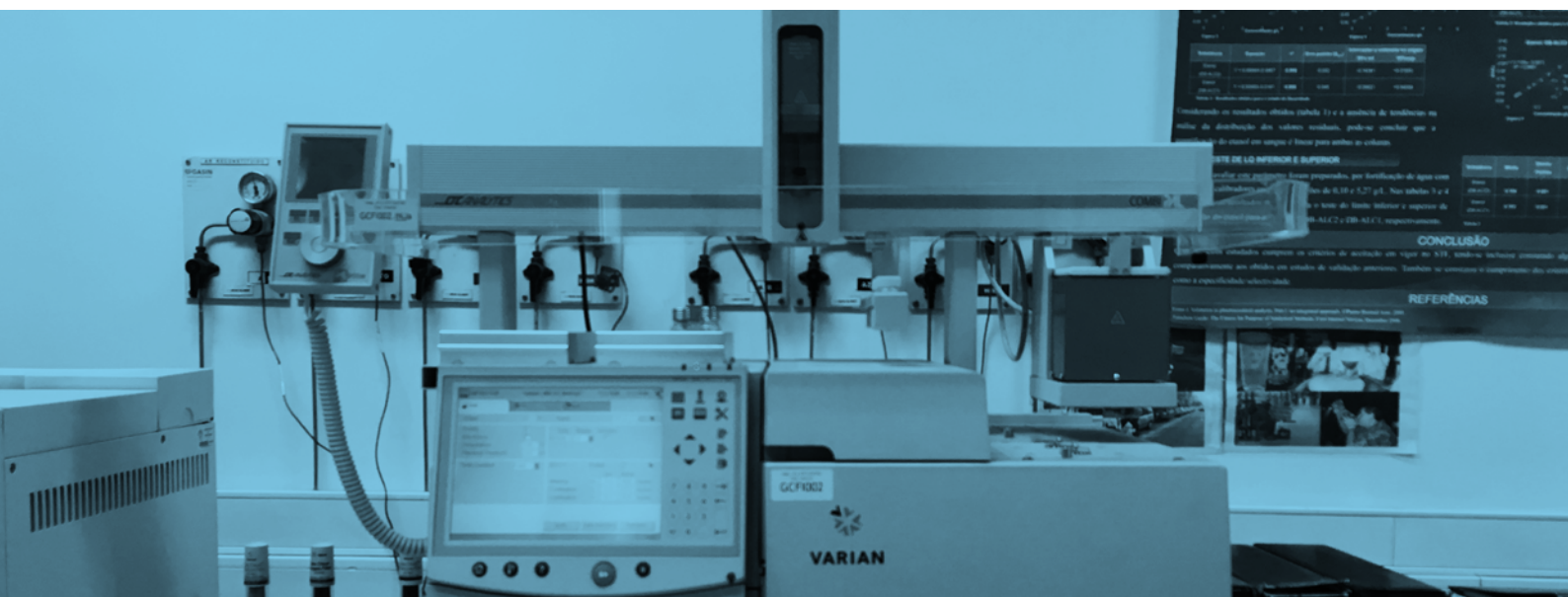


Universidade de Coimbra
Faculdade de Ciências e Tecnologia

Desenvolvimento e validação de um método analítico para voláteis com produção endógena em situações de putrefação

Mélanie Silva Pinto



Dissertação no âmbito do Mestrado em Química Forense, orientada pela Mestre Carla Maria Pinto Monteiro, no Serviço de Química e Toxicologia Forenses do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses - Delegação do Centro, coorientada pela Professora Doutora Maria Ermelinda da Silva Eusébio e apresentada ao Departamento de Química da Universidade de Coimbra

julho de 2019

AGRADECIMENTOS

À Mestre Carla Maria Pinto Monteiro pela oportunidade que me deu em cumprir o meu sonho, pelo acompanhamento, por me ter deixado aprender muito mais para além do objetivo do estágio, pelo rigor, pela confiança depositada, por todos os conhecimentos transmitidos, pelo bom humor e pela grande ligação que construímos ao longo deste ano. Um obrigada não chega.

À Senhora Professora Doutora Maria Ermelinda da Silva Eusébio, pela disponibilidade imediata na disponibilização de padrões necessários ao estudo desenvolvido, pela sabedoria, rigor e profissionalismo demonstrados ao longo do meu percurso.

À Doutora Cláudia Isabel Reis Margalho por todo o apoio, preocupação, conhecimento e, principalmente, por naquele dia, ter acreditado em mim e me ter dado esta oportunidade. Nunca me esquecerei.

Ao Mestre João Miguel Franco por ter aprovado a realização deste estudo, permitindo o desenvolvimento das minhas competências e a oportunidade de trabalhar num local dotado de capacidade técnicas e científicas.

Ao Senhor Professor Doutor Francisco Corte Real pela oportunidade de desenvolvimento do meu estágio neste serviço e pela grande disponibilidade demonstrada ao longo deste trabalho.

A todos os profissionais que integram o Serviço de Química e Toxicologia, em especial à Dona Alda, pela disponibilidade, simpatia, conhecimentos transmitidos, apoio e por me terem permitido sentir-me, por um ano, uma deles. Muito obrigado.

À minha companheira de todos os dias, Elisa Ferreira por todo o apoio, pelos desafios que enfrentámos juntas, pelos risos, pela força e por todos estes dias sentadas frente a frente a cumprir o nosso sonho e a tornarmo-nos inseparáveis.

Ao todos os meus queridos amigos de mestrado, pelos desabafos, gargalhadas e amizade incondicional.

À minha mãe e ao meu pai, que são o pilar da minha vida e que acreditaram em mim desde o primeiro dia, por todo o apoio e força transmitidos ao longo destes cinco anos de estudo.

Às melhores manas do mundo e cunhados por estarem sempre do meu lado, por me apoiarem, acreditarem sempre em mim e por festejarem comigo cada vitória.

Ao meu Dinis, que veio tornar este ano ainda mais especial e me deu ainda mais sentido de responsabilidade no dia a dia.

A toda a minha família, aos que estão cá e aos que já são estrelinhas no céu, em especial à minha avó Maria, por todo o apoio, preocupação, e força.

Ao meu Zé, para quem não tenho palavras. A minha maior força, o meu apoio nos dias bons e menos bons, aquele que tem a palavra certa no momento certo, o meu porto seguro. Obrigada por fazeres parte deste percurso e da minha vida.

Ao Looping...

RESUMO

A possibilidade de formação de etanol durante a putrefação leva a que em casos putrefativos a interpretação dos resultados obtidos seja dificultada. De acordo com a literatura, a detecção de outras substâncias voláteis produzidas durante o processo de putrefação pode, nestes casos, ser um indicador da ocorrência de produção *post-mortem* de etanol. De entre estes compostos destacam-se: 3-metil-1-butanol, 2-metil-1-butanol, 1-pentanol, acetaldeído, 2-propanol, acetato de etilo, metil-etil-cetona, acetona, 2-butanol, metanol, *t*-butanol, dietil-éter, isobutanol, *n*-butanol e *n*-propanol.

O objetivo do presente estudo foi o de desenvolver e validar um método em sangue, urina e humor vítreo, para voláteis com formação endógena em situações de putrefação. As substâncias analisadas foram selecionadas com base na sua relevância no auxílio da diferenciação entre a formação *post-mortem* de etanol e o seu consumo *in vivo* bem como de acordo com a sua disponibilidade em tempo útil. Todas foram estudadas em termos de solubilidade em água, tendo sido misturadas numa única solução. Devido à menor solubilidade de algumas delas, recorreu-se à utilização de um banho de ultrassons durante 10 minutos após a preparação da mistura.

Para a realização do presente estudo, foi utilizado um cromatógrafo de gás Varian 450-GC com detector de ionização em chama, acoplado a um injetor de *headspace* (HS-GC-FID). A preparação dos *vials* foi feita por diluição de 100 µL da amostra de interesse em 1 mL de padrão interno (acetoneitrilo (0.1 g/L)), tendo sido utilizadas duas colunas capilares (VF-624ms e VF-5ms) com polaridades diferentes de forma a garantir que todos os compostos em estudo seriam devidamente identificados e, indubitavelmente distinguidos dos restantes. Todos os voláteis foram estudados numa gama de trabalho de 50-2000 mg/L e estudados em termos de: seletividade/especificidade, limites de detecção e de quantificação, linearidade e modelo de calibração, precisão, exatidão, arrastamento, robustez e estabilidade, de acordo com o *Scientific Working Group for Forensic Toxicology*.

O método desenvolvido demonstrou ser uma grande vantagem para aplicação no contexto de toxicologia forense, pois para além de permitir o estudo de vários voláteis num intervalo de tempo de apenas 13 minutos possibilita, ainda, a utilização de volumes reduzidos de amostras, considerado um aspeto de grande importância, uma vez que a quantidade disponível para análise é frequentemente reduzida.

Finalmente, a detecção de substâncias voláteis tem apenas uma função de auxílio no estudo da possibilidade de produção *post-mortem* de etanol. Ou seja, em situações de putrefação, nas quais existam dúvidas acerca da origem dos níveis de etanol obtidos, a pesquisa de voláteis nas diferentes matrizes servirá de apoio neste estudo. Por este motivo, o método desenvolvido é essencialmente qualitativo, para além de ser complementar, não podendo ser utilizado como análise única.

Palavras chave: Etanol, Compostos voláteis, Putrefação, HS-GC-FID, Validação

ABSTRACT

The possibility of ethanol formation during putrefaction leads to the difficulty of interpreting the obtained results in putrefactive cases. According to the literature, the detection of other volatile substances produced during the putrefaction process can, in these cases, be an indicator of the occurrence of postmortem ethanol production. These compounds include: 3-methyl-1-butanol, 2-methyl-1-butanol, 1-pentanol, acetaldehyde, 2-propanol, ethyl acetate, methyl ethyl ketone, acetone, butanol, methanol, *t*-butanol, diethyl ether, isobutanol, *n*-butanol and *n*-propanol.

The objective of the present study was to develop and validate a method in blood, urine and vitreous humor, for volatiles with endogenous formation in putrefaction situations. The substances analyzed were selected based on their relevance in helping to differentiate between *post-mortem* formation of ethanol and its *in vivo* consumption, as well as their timely availability. All of them were studied in terms of solubility in water and mixed in a single solution. Due to the smaller solubility of some of them, an ultrasonic bath was used for 10 minutes after the preparation of the mixture.

For the accomplishment of the present study, a Varian 450-GC Gas Chromatograph with flame ionization detector, coupled to a *headspace* injector (HS-GC-FID) was used. The *vials* preparation was done by diluting 100 μ L of the sample of interest in 1 mL of internal standard (acetonitrile (0.1 g/L)), having been used two capillary columns (VF-624ms and VF-5ms) with different polarities to ensure that all compounds under study would be properly identified and undoubtedly distinguished from the remainings. All volatiles were studied in a range of 50-2000 mg/L and studied in terms of: selectivity/specificity, limits of detection and quantification, linearity and calibration model, precision, accuracy, carryover, robustness and stability according to the Scientific Working Group for Forensic Toxicology. .

The method developed proved to be a great advantage for application in the forensic toxicology context, since besides allowing the study of several volatiles in a time interval of only 13 minutes, it also allows the use of reduced volumes of samples, which is considered an aspect of great importance, since the available amount for analysis is often reduced.

Finally, the detection of volatile substances has only an auxiliary role in the study of the possibility of *post-mortem* production of ethanol. That is, in putrefaction situations in which there are doubts about the origin of the obtained ethanol levels, the analysis of the presence of volatiles in the different matrices serve as a support in that research. For this reason, the developed method is essentially qualitative and complementary, and cannot be used as a single analysis.

Keywords: Ethanol, Volatile compounds, Putrefaction, HS-GC-FID, Validation

ÍNDICE

Resumo	I
Abstract	III
Índice de figuras	VIII
Índice de tabelas	IX
Lista de abreviaturas	XI
PARTE I - INTRODUÇÃO	1
Justificação do tema	3
Objetivo	7
PARTE II - REVISÃO DA LITERATURA	9
2.1. Processo de putrefação	11
2.2. Síntese de etanol post-mortem	12
2.2.1. Microrganismos	12
2.2.2. Substratos	12
2.2.3. Locais de produção	13
2.2.4. Produtos de putrefação	13
2.3. Condições de síntese	14
2.4. A importância das substâncias voláteis no estudo da produção post-mortem de etanol	14
2.4.1. Etanol	15
2.4.2. <i>n</i> -Propanol	15
2.4.3. <i>t</i> -Butanol	16
2.4.4. <i>n</i> -Butanol	16
2.4.5. Isobutanol	16
2.4.6. Acetona e 2-propanol	16
2.4.7. Acetaldeído e metanol	17
2.4.8. 2-Butanol	17
2.4.9. Acetato de etilo, 1-pentanol, 2-metil-1-butanol, 3-metil-1-butanol, metil etil cetona, dietil-éter	17
2.5. Técnicas utilizadas	18
2.5.1. Cromatografia de gás com detetor de ionização de chama e sistema de injeção de <i>headspace</i> (HS-GC-FID)	18
2.6. Matrizes biológicas	20
2.6.1. Sangue	20
2.6.2. Urina	21
2.6.3. Humor vítreo	22

2.7. Acondicionamento das amostras biológicas	22
2.8. Validação de métodos analíticos	23
2.8.1. Seletividade/Especificidade	24
2.8.2. Identificação de interferentes	25
2.8.3. Gama de trabalho	25
2.8.4. Limite de deteção	26
2.8.5. Limite de quantificação	26
2.8.6. Linearidade e modelo de calibração	27
2.8.7. Precisão	27
2.8.8. Bias	29
2.8.9. Exatidão	29
2.8.10. Robustez	29
2.8.11. Estabilidade	30
PARTE III - MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1. Material e métodos	35
3.1.1. Substâncias estudadas	35
3.1.2. Amostras biológicas	36
3.1.3. Material e equipamento	36
3.1.4. Preparação das soluções	37
3.1.5. Preparação das amostras, controlos e calibradores	44
3.1.6. Preparação da curva de calibração	44
3.1.7. Preparação das amostras de controlo de qualidade interno	45
PARTE IV - RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
4.1. Desenvolvimento do método analítico	49
4.1.1. Condições da análise cromatográfica	49
4.1.2. Identificação das substâncias	51
4.2. Validação do método analítico desenvolvido	53
4.2.1. Seletividade/Especificidade	54
4.2.2. Interferentes	56
4.2.3. Análise dos limites de deteção e quantificação	58
4.2.4. Linearidade	59
4.2.5. Verificação do limiar analítico de quantificação	60
4.2.6. Repetibilidade	61
4.2.7. Precisão intermédia	62
4.2.8. Limite de repetibilidade	64

4.2.9. Exatidão	65
4.2.10. BIAS	66
4.2.11. Robustez	67
4.2.12. Arrastamento	67
4.2.13. Estabilidade	67
4.3. Aplicação do método desenvolvido a casos reais	71
PARTE V - CONCLUSÕES	79
PARTE VI - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
PARTE VII - ANEXOS	95
7.1. Limites de detecção e de quantificação	97
7.2. Linearidade	113
7.3. Estudo da homocedasticidade	129
7.4. Ponderação	137
7.5. Repetibilidade	138
7.6. Precisão e exatidão	154
7.7. Limite de repetibilidade	186
7.8. BIAS do método	187
7.9. Estabilidade	195
7.9.1. Estabilidade da reta ao 4º dia	195
7.9.2. Estabilidade dos controlos de qualidade internos	197
7.9.3. Estabilidade das amostras biológicas	198
7.10. Procedimentos de ensaio para a determinação qualitativa e quantitativa de substâncias voláteis com produção endógena em situações de putrefação	201

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – (A) Coeficientes de partição líquido/ar em água, sangue e plasma às temperaturas de equilíbrio de 20°C a 40°C e (B) Logaritmo do coeficiente de partição em função da temperatura. Adaptado de ¹⁴ .	4
Figura 2 – Cromatogramas registados para o padrão 1-pentanol: (em baixo) usando o programa de temperaturas apresentado na figura 3; (em cima) um programa de temperaturas similar, mas sem isotérmica de 1 minuto aos 100 °C	50
Figura 3 - Esquema ilustrativo da rampa de temperaturas utilizada no método cromatográfico	50
Figura 4 – Cromatograma da solução de controlo a 1500mg/L, colunas VF-5ms (em cima), VF-624ms (em baixo)	51
Figura 5 - Cromatograma obtido para a amostra de sangue sem fortificação - colunas VF-5ms (em cima) e VF-624ms (em baixo)	55
Figura 6 – Cromatogramas obtidos para a amostra de sangue fortificada com os analitos em estudo, 100 mg/L – colunas VF-5ms (em cima) e VF-624ms (em baixo)	56
Figura 7 - Retas de calibração para metanol (esquerda) e etanol (direita) obtidas 4 dias após a preparação das soluções padrão.	68

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Fatores que afetam a decomposição cadavérica. Adaptado de ¹²	11
Tabela 2 – Solubilidade em água de cada uma das substâncias em estudo, a 25 °C	38
Tabela 3 – Resultados obtidos nos testes de solubilidade efetuados no banho de ultrassons: Razão entre as áreas do analito e do padrão interno para concentrações de analito de 10 mg/L.	38
Tabela 4 – Preparação dos Calibradores	44
Tabela 5 – Preparação dos CQI	45
Tabela 6 – Tempos de retenção das substâncias em estudo nas diferentes colunas cromatográficas (VF5-ms e VF-624ms)	52
Tabela 7 – Parâmetros de validação do método analítico desenvolvido	53
Tabela 8 – Agrupamento de amostras brancas para o estudo da seletividade	54
Tabela 9 – Tempos de retenção das substâncias interferentes	57
Tabela 10 – Resultados obtidos para os limites de detecção e de quantificação das substâncias em estudo	58
Tabela 11 – Resultados obtidos na avaliação da linearidade do método (Fc: F crítico; Fexp. F experimental)	59
Tabela 12 – Resultados obtidos no teste ao limiar analítico de quantificação	60
Tabela 13 – Resultados obtidos na avaliação da repetibilidade	61
Tabela 14 – Resultados obtidos no estudo da precisão intermédia	63
Tabela 15 – Resultados obtidos para o limite de repetibilidade relativo à concentração de 100 mg/L	64
Tabela 16 – Resultados obtidos na avaliação da exatidão do método	65
Tabela 17 – Resultados obtidos na análise do Bias	66
Tabela 18 – Estabilidade do dietil-éter à concentração de 100 mg/L	68
Tabela 19 – Substâncias que permaneceram estáveis ao final de 15 dias, nas diferentes matrizes biológicas	70
Tabela 20 – Substâncias detetadas nas diferentes matrizes, em casos de putrefação, sem informação de submersão	71
Tabela 21 – Substâncias detetadas nas diferentes matrizes, em casos de submersão	73
Tabela 22 – Análise quantitativa dos casos de putrefação, sem informação de submersão	75
Tabela 23 – Análise quantitativa dos casos com informação de submersão	76

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CQI: Controlo de qualidade interno

CV: Coeficiente de Variação

DP: Desvio padrão

et al.: et alii, et aliae, et alia (e outros)

e.g.: exempli grata (por exemplo)

FID: Detetor de ionização em chama

GC: Cromatografia gasosa

GC-MS: Cromatografia com detetor de massa

HS: *Headspace*

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

HV: Humor Vítreo

INMETRO: Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

INMLCF: Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P.

IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry

LOD: Limite de deteção

LOQ: Limite de quantificação

PI: Padrão interno

r: Coeficiente de correlação

r²: Coeficiente de determinação

SC: Sangue Cardíaco

Sg: Sangue

SP: Sangue Periférico

SQTF: Serviço de Química e Toxicologia Forenses

Subs: Substância

SWGTOX: Scientific Working Group for Forensic Toxicology

TMS: Trimetilclorosilano

TRR: Tempo de retenção relativo

U: Urina

VOC: Volatile Organic Compound (composto orgânico volátil)



PARTE I

INTRODUÇÃO

JUSTIFICAÇÃO DO TEMA

O etanol é considerado a substância psicoativa mais identificada em amostras *post-mortem*, assumindo um dos principais papéis no que toca a suicídios, assaltos, mortes traumáticas (e.g. afogamentos, enforcamentos), acidentes fatais (e.g. acidentes de carro) e crimes violentos (e.g. violações facilitadas, homicídios).¹⁻⁷

Ao longo dos anos verificou-se que a correta interpretação dos resultados analíticos obtidos durante a análise de amostras em putrefação tem levantado algumas incertezas em relação à origem do etanol, e estas devem-se ao facto de este composto poder ser produzido após a morte, probabilidade que aumenta de acordo com o tempo decorrido entre a morte e a autópsia e com a temperatura de armazenamento.¹ Desta forma, a distinção entre a ingestão *ante-mortem* de etanol e a sua produção *post-mortem* é dificultada, nestas condições, o que leva a que, muitas das vezes, seja necessário corroborar os resultados obtidos em diversas matrizes (e.g. urina e humor vítreo) de forma a estudar a origem do etanol detetado.^{8,9}

Segundo a literatura, a análise de outros voláteis formados durante o processo de putrefação permite auxiliar na interpretação dos valores obtidos para o etanol.⁸

Entre os voláteis formados durante a putrefação e referidos na literatura encontram-se: etanol, 3-metil-1-butanol, 2-metil-1-butanol, 1-pentanol, acetaldeído, 2-propanol, acetato de etilo, metil-etil-cetona, acetona, 2-butanol, metanol, *t*-butanol, dietil-éter, isobutanol, *n*-butanol e *n*-propanol, sendo que alguns destes (e.g. 2-propanol, *n*-propanol e *n*-butanol) podem ser utilizados como marcadores/indicadores de formação de etanol *post-mortem*, uma vez que não existem de forma natural no organismo.^{1,10-12}

Na literatura, é aconselhada a utilização de mais do que um equipamento cromatográfico para a análise de etanol, de forma a serem obtidos diferentes tempos de retenção, tanto para esta substância como para o padrão interno utilizado.⁸ Desta forma, é possível identificar e distinguir cada uma das substâncias em análise inequivocamente.⁸ A escolha de dois padrões internos diferentes que permitam a confirmação da inexistência de um deles nas amostras, constitui outra das formas de garantir a correta interpretação dos resultados obtidos, nos casos em que pelo menos um dos padrões internos é produzido endogenamente.⁸ Uma vez que não existem evidências da formação de acetonitrilo durante o processo putrefativo, a utilização de apenas um padrão interno é suficiente neste caso.¹⁰

O presente estudo compila todos os procedimentos necessários à análise qualitativa e/ou quantitativa de todos os voláteis acima referidos, sendo que todos serão analisados das duas formas.

Em relação às matrizes biológicas utilizadas, estas foram selecionadas tendo em conta, por um lado, as amostras mais utilizadas no Serviço de Química e Toxicologia Forenses da Delegação do Centro do INMLCF e, por outro, aquelas que poderão ser utilizadas como complemento à análise efetuada, no caso de se encontrar disponível mais do que um tipo de amostra para um mesmo caso. Desta forma, o facto de se ter optado pela validação em sangue, urina e humor vítreo prende-se com a vantagem de num só método serem reunidas duas das formas de estudo da origem do etanol detetado durante a putrefação, o que leva a uma maior robustez nas deduções efetuadas.

O sangue é considerado a amostra de eleição para detetar, quantificar e interpretar a presença de substâncias tóxicas em toxicologia *post-mortem*, enquanto a urina pode fornecer informação qualitativa sobre a exposição *ante-mortem* a certa substância (uma vez que os metabolitos e substâncias tóxicas se acumulam nesta matriz, o que facilita a sua deteção).¹³ Em relação ao humor vítreo, esta é uma matriz extremamente útil para prever a concentração de determinado composto no sangue no momento da morte.¹³ Uma vez que se encontra menos sujeito a contaminações bacterianas e fúngicas, é útil na distinção entre a ingestão *ante-mortem* ou formação *post-mortem* de certa substância.¹³

Tal como é possível observar na figura 1, o coeficiente de partição líquido/ar para o etanol mantém a sua tendência em sangue e em água. Este resultado demonstra que a concentração de etanol no *headspace* não sofre alterações significativas entre estas duas matrizes.¹⁴

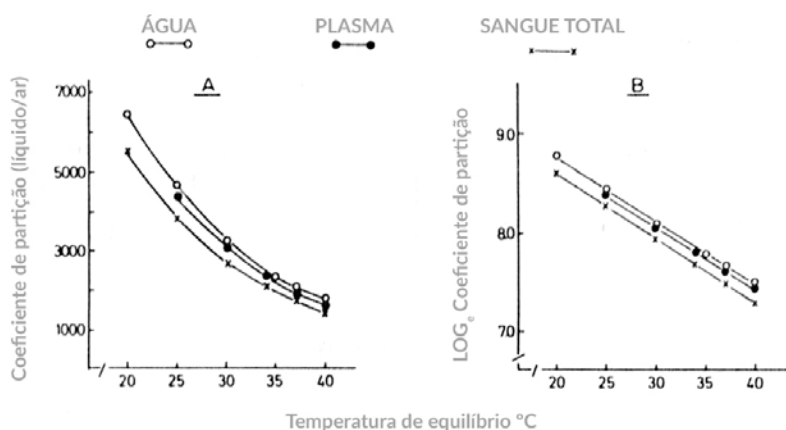


Figura 1 – (A) Coeficientes de partição líquido/ar em água, sangue e plasma às temperaturas de equilíbrio de 20 °C a 40 °C e (B) Logaritmo do coeficiente de partição em função da temperatura. Adaptado de ¹⁴.

Para além disto, uma vez que a percentagem de água no humor vítreo se encontra entre os 98 e os 99.7%, sendo de 98% na urina, nestes casos a utilização de curvas de calibração em água é já bastante frequente.^{13,15} Com base nestas evidências, optou-se pela validação da maior parte dos parâmetros em água *MilliQ*, sendo que os testes de estabilidade e seletividade foram efetuados nas matrizes em estudo (sangue, urina e humor vítreo).

Para a realização do presente estudo, optou-se por recorrer à utilização de um cromatógrafo de gás (*VARIAN 450-GC Gas Chromatograph*) com detetor de ionização em chama, acoplado a um injetor *headspace* (HS-GC-FID). A escolha do equipamento teve em consideração dois aspetos principais: o facto de este ser um equipamento recomendado para a análise de substâncias voláteis e, por outro lado, ser utilizado na realização de análises de alcoolémia e de voláteis no Serviço de Toxicologia Forenses da Delegação do Centro do INMLCF.

OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi o desenvolvimento e validação de um método analítico para voláteis com produção endógena em situações de putrefação.

Utilizou-se, assim, um cromatógrafo de gás com detetor de ionização em chama e injeção por *headspace* estático, devido ao facto de este constituir um equipamento recomendado para a análise do tipo de substâncias em estudo sendo, ainda, a tecnologia disponível no Serviço de Química e Toxicologia Forenses para a análise de etanol e de voláteis.

A validação foi efetuada com base nos parâmetros de seletividade/especificidade, limites de deteção e quantificação, gama de trabalho, linearidade e modelo de calibração, precisão, exatidão, arrastamento, robustez e estabilidade para posterior aplicação a amostras de urina, humor vítreo e sangue, em que exista informação de putrefação.

Numa fase final o método foi aplicado a amostras de casos reais em que existia informação de putrefação e/ou submersão de forma a detetar a presença das substâncias estudadas nas matrizes analisadas.

Desta forma, o método desenvolvido funciona como complemento na avaliação acerca da ingestão *ante-mortem* ou produção *post-mortem* de etanol, não podendo ser utilizado como análise única.



PARTE II
REVISÃO
DA LITERATURA

2.1. PROCESSO DE PUTREFAÇÃO

O processo de decomposição química de cadáveres é iniciado, sob condições naturais, imediatamente após a morte, dividindo-se, essencialmente, em duas fases: autólise e putrefação.^{10,12} Estes fenómenos são provocados pela anoxia da célula, que culmina numa destruição de membranas celulares e junções, com conseqüente libertação de enzimas e conteúdo celular.¹² Existem diversos fatores capazes de afetar a decomposição cadavérica, organizados em dois grupos principais, tal como apresentado na tabela 1.¹²

Tabela 1 – Fatores que afetam a decomposição cadavérica. Adaptado de ¹²

Singularidades do corpo	Singularidades do meio ambiente
Roupa vestida	Insetos, microrganismos
Conteúdo gástrico	pH do solo
Constituição corporal	Constituição do solo
Idade no momento da morte	Humidade existente
Causa do óbito	Fluxo de ar
Estado de enfermidade/patologia	Temperatura

A decomposição corporal varia de acordo com o meio ambiente e com o corpo podendo, ainda, oscilar de uma parte do corpo para outra.¹⁰ É devido à ação enzimática que ocorre uma quebra progressiva dos tecidos moles, bem como a alteração dos seus constituintes (e.g. proteínas, carboidratos e gorduras), sendo que algumas destas enzimas derivam de bactérias, fungos e até insetos, enquanto outras já se encontram presentes de forma ativa ou latente nos tecidos.¹⁰

Após a morte, ocorre a diminuição do pH e da circulação do sangue, o que leva a que as condições se tornem rapidamente anaeróbias.¹⁰ Nesta fase, os polímeros são convertidos em monómeros através de uma ação enzimática, o que leva ao aumento do pH e à produção de gases e compostos odoríferos (e.g. metano) em conjunto com etanol e outros compostos voláteis.¹⁰ Assim, os dois principais fatores que condicionam a taxa de crescimento, bem como o tipo de microrganismos formados são o potencial redox dos tecidos e o pH *post-mortem*.¹⁰

2.2. SÍNTESE DE ETANOL POST-MORTEM

A síntese de etanol *post-mortem* relaciona-se diretamente com: microrganismos, substratos, locais de produção, produtos de putrefação e condições de síntese.¹

2.2.1. MICRORGANISMOS

Cerca de 24, 17 e 58 espécies de fungos, fermentos e bactérias, respetivamente, são capazes de produzir etanol *post-mortem*, sendo que algumas espécies de bactérias (*Clostridium*, *Enterobacterias*, *Streptococci* e *Bacillus*) são consideradas as maiores colonizadoras de corpos, e, conseqüentemente, maiores produtoras de etanol *post-mortem*.^{1,10} Em relação aos fermentos, estes são encontrados em menor extensão durante a putrefação, destacando-se *Candida Albicans*, *Saccharomyces Cerevisiae* e outras espécies das famílias *Candida* e *Saccharomyces*.¹⁰ De uma forma geral, as Enterococci são consideradas as bactérias mais relacionadas com o aumento dos níveis de etanol.¹⁰ Dentro do conjunto de bactérias existente, algumas espécies foram identificadas, durante análises *post-mortem*, nas matrizes sangue e urina. Entre estas encontram-se: *C.Tropicalis*, *C.Parasilosis*, *C. Albicans*, *C.Tropicana*, *L.Garviae*, *Corynebacterium sp.*, *K.Oxytoca*, *E.Coli*, *Enterococcus* e *C.Glabarata*.¹⁶

A contaminação *post-mortem* através de microrganismos pode ocorrer por via endógena ou exógena, sendo a primeira caracterizada pela penetração da bactéria intestinal através das paredes deste órgão, sendo posteriormente distribuída através do sistema linfático intestinal e da veia portal hepática, na corrente sanguínea.^{1,10} Porém, esta situação apenas se verifica para temperaturas corporais acima de 5 °C.¹ Em relação à via exógena, esta ocorre através de falhas e fissuras na pele.¹ Em variadas ocasiões, o sistema respiratório sofre, também ele, uma invasão bacteriana similar.¹⁰

2.2.2. SUBSTRATOS

Durante o processo de decomposição, várias substâncias são produzidas, através de variados processos, nomeadamente decomposição proteica, lipídica e de carboidratos, sendo que esta última se encontra maioritariamente relacionada com álcoois, cetonas, aldeídos, éteres, ésteres e ácidos.¹² Nesta fase, o glicogénio é convertido em monómeros de glucose que, por sua vez, seguirão um de dois caminhos: formação de água e dióxido de carbono, por decomposição

completa através de oxidação, ou decomposição incompleta, com consequente formação de álcoois e ácidos orgânicos.¹²

Diferentes espécies de bactérias são capazes de produzir diferentes tipos de compostos voláteis. Assim, a espécie *C.aminovalevicum* produz etanol, *n*-butanol e acetona, enquanto *C.cadaveris* produz, para além das mencionadas, 1-pentanol, 3-metil-1-butanol e isobutanol.¹²

2.2.3. LOCAIS DE PRODUÇÃO

Uma vez que a principal fonte de etanol endógeno é a glucose, os locais de maior produção deste volátil serão aqueles que possuírem maior capacidade de armazenamento desta substância, mais concretamente o fígado, o que torna este órgão inutilizável para a determinação de etanol *post-mortem*.¹

Os pulmões, coração e músculo-esquelético são outros dos órgãos que possuem glucose, existindo estudos que demonstram que os músculos, rins, e sangue cardíaco constituem elementos de pouca relevância na determinação de etanol após a morte, apontando para o cérebro como uma opção aceitável numa fase inicial de decomposição, uma vez que possui uma capacidade de armazenamento de glucose diminuta, sendo, assim, considerado, um bom indicador de ingestão *ante-mortem* de etanol.^{1,17}

2.2.4. PRODUTOS DE PUTREFAÇÃO

Durante a putrefação existe a possibilidade de formação de diversos voláteis para além de etanol: acetaldeído, 2-propanol, *n*-propanol, acetato de etilo, metil-etil-cetona, 2-butanol, metanol, *t*-butanol, dietil-éter, feniletanol, *p*-hidroxifeniletanol, *n*-butanol, acetona, 1-pentanol, 3-metil-1-butanol, 2-metil-1-butanol, isobutanol, formaldeído, 1-hexanol, 2-etil-1-hexanol, 1-octanol e 1-octan-3-ol.^{1,10-12,18,19}

Assim, o tipo de álcool e derivados produzidos depende, entre outros fatores, das condições, micróbios e substratos disponíveis, sendo que existem casos de deteção de acetona, acetaldeído e formaldeído na ausência de formação de etanol.^{1,10}

2.3. CONDIÇÕES DE SÍNTESE

Como anteriormente mencionado, o tipo de substrato disponível, os microrganismos presentes, a preservação do corpo e fluídos biológicos e, ainda, a temperatura de armazenamento do mesmo antes e após a realização da autópsia, são todos os fatores de que depende a quantidade de etanol formada *post-mortem*.¹ Isto significa que se não forem reunidas todas estas condições, a presença de micróbios poderá não ser suficiente para a sua formação, e é nesta fase, que toda a informação recolhida durante a autópsia tem um papel extremamente importante para que a possibilidade de formação de etanol *post-mortem* possa ou não ser colocada.¹

Para além deste fator, para que a síntese ocorra, é necessário que a temperatura corporal se encontre acima dos 5 °C durante mais de 4 horas, existindo estudos que testemunham um aumento rápido da concentração até ao quinto dia, depois do qual estabiliza a um máximo no 15º dia, decrescendo, depois, lentamente.¹ Dependendo das condições, a produção significativa de etanol pode ocorrer de horas até vários dias.¹

Por fim, a diminuição da quantidade de glicogénio devida a esforço físico intenso ou jejum prolongado leva ao aumento do pH, com conseqüente aumento da proliferação microbiana, e posterior aumento da probabilidade de produção de etanol após a morte.¹ Outro dos fatores de aumento substancial de contaminação e proliferação microbiana é a presença de um corpo fortemente degradado/traumatizado.¹

2.4. A IMPORTÂNCIA DAS SUBSTÂNCIAS VOLÁTEIS NO ESTUDO DA PRODUÇÃO *POST-MORTEM* DE ETANOL

Para a elaboração do presente estudo, foram selecionadas as substâncias: acetaldeído, 2-propanol, *n*-propanol, acetato de etilo, metil-etil-cetona, 2-butanol, metanol, *t*-butanol, dietil-éter, etanol, *n*-butanol, acetona, 1-pentanol, 2-metil-1-butanol, 3-metil-1-butanol e isobutanol, uma vez que, para além de serem as mais referenciadas na literatura são, ainda as que se encontravam disponíveis como padrões para o presente estudo, podendo, a qualquer altura, ser acrescentadas outras substâncias consideradas pertinentes e, posteriormente, revalidado o método.

2.4.1. ETANOL

Como já se referiu anteriormente, a concentração de etanol pode sofrer alterações durante o processo de putrefação, o que leva à ocorrência do seu aumento, mesmo não existindo evidências do seu consumo *ante-mortem*.²⁰ Desta forma, a formação deste composto após a morte pode, rapidamente ser confundida com o seu consumo *in-vivo*.²¹

Alguns autores defendem que concentrações de etanol no sangue iguais ou superiores a 200 mg/L se relacionam com uma probabilidade de consumo *ante-mortem* de etanol igual à da sua produção *post-mortem*, sendo que, a partir dos 500 mg/L a probabilidade de estes valores se aliarem a uma concentração positiva no humor vítreo é de 87% e 99%, respetivamente.²² De acordo com outros estudos efetuados, a formação de etanol após a morte é compatível com concentrações inferiores a 700 mg/L e até menores do que 300 mg/L, existindo exceções em que estes valores atingiram os 1900 mg/L.^{9,23,24} Esta discordância permite enfatizar a importância do presente trabalho no estudo da produção *post-mortem* de etanol.

Regra geral, a produção *post-mortem* de etanol através de fermentação inicia-se entre 3 e 10 dias após a morte.²⁵

2.4.2. *n*-PROPANOL

O *n*-propanol é considerado um dos principais indicadores de formação de etanol *post-mortem*, uma vez que não existe naturalmente no organismo.^{26,27} A relação etanol vs. *n*-propanol pode variar entre 20:1 e 25:1.²⁸ Num estudo efetuado, obtiveram-se resultados iguais a 24:1, indicando a possibilidade de formação de etanol após a morte, através de ação microbiana.²⁸

De acordo com a literatura, a concentração de *n*-propanol aumenta a uma taxa de 12,3 mg/L/dia após a morte, sendo que os níveis de etanol foram superiores a 100 mg/L em 99% das vítimas.²⁹ Assim, foi possível concluir que através de um aumento de 10 mg/L no nível de *n*-propanol, a concentração de etanol sofre um incremento de 14 e 25 mg/L no corpo de vítimas não putrificadas e putrificadas, respetivamente.²⁹ Desta forma, estes dados tornam-se em mais um complemento na distinção entre a ingestão *ante-mortem* e a produção *post-mortem* de etanol.^{11,28,29}

O facto de poder ser produzido durante a putrefação, faz deste, que é um dos padrões internos mais utilizados na análise sanguínea em GC, inutilizável em casos de putrefação.³⁰

2.4.3. *t*-BUTANOL

Existe uma grande controvérsia em relação à formação *post-mortem* de *t*-butanol, existindo vários estudos que utilizam este composto como padrão interno.^{10,18} Porém, e uma vez que, também na literatura, se encontram referências ao *t*-butanol como sendo produzido durante a putrefação este será, à semelhança dos restantes, englobado no presente estudo.^{11,31}

2.4.4. *n*-BUTANOL

Existe uma estreita relação entre a concentração de *n*-butanol no sangue e o tempo a que o corpo se encontra submerso em água, sendo que esta depende apenas de um fator: temperatura da água.^{10,32} Um estudo efetuado demonstrou que o *n*-propanol e o *n*-butanol são os dois tipos de álcoois mais formado por micróbios, concomitantemente com etanol, sob as condições utilizadas, com um aumento de 4.2 mg/L e 0.42 mg/L, respetivamente, nos primeiros cinco dias.³³

2.4.5. ISOBUTANOL

Apesar do seu uso como padrão interno em vários estudos, este é um dos voláteis formados a partir da bactéria *C.cadaveris*, tal como o *n*-pentanol e o 3-metil-1-butanol, como anteriormente mencionado, sendo, por isso, considerado como um marcador de formação de etanol *post-mortem*.^{10,12,34}

2.4.6. ACETONA E 2-PROPANOL

Estes dois compostos podem ser convertidos endogenamente, um no outro.³⁵ Em indivíduos diabéticos, em situações de alcoolismo ou, até, em períodos de jejum prolongado, as concentrações de acetona sofrem oscilações.³⁵ Para além disto existe, ainda, a possibilidade de formação de acetona na ausência de etanol.^{1,10} Ainda que de mais difícil interpretação esta é considerada como um dos marcadores de formação de etanol após a morte, juntamente com o 2-propanol, este pelo facto de não existir naturalmente no organismo.²⁹

2.4.7. ACETALDEÍDO E METANOL

O acetaldeído é o principal metabolito do etanol, sendo, também, uma das substâncias que permite estabelecer uma conexão entre a detecção deste e a sua formação através de fermentação.²⁵ Apesar disso, existem relatos da sua detecção na ausência de etanol.^{1,10}

No caso do metanol existe a possibilidade de ocorrer o contrário: formação de etanol sem consequente produção de metanol após a morte.¹⁸ Assim, apesar de este ser considerado um possível indicador de formação de etanol durante a putrefação, a sua ausência não implica que este processo não ocorreu.

2.4.8. 2-BUTANOL

Num estudo efetuado em amostras *post-mortem* com informação de suspeita de contaminação microbial foi detetado 2-butanol.⁶ De acordo com a literatura, esta é uma substância detetada em casos de putrefação.^{1,36} Por este motivo, quando detetado durante uma análise de rotina em que exista informação de estado de decomposição cadavérica, este composto pode ser um indicador de formação de etanol *post-mortem*.⁶

2.4.9. ACETATO DE ETILO, 1-PENTANOL, 2-METIL-1-BUTANOL, 3-METIL-1-BUTANOL, METIL ETIL CETONA, DIETIL-ÉTER

A detecção das substâncias acetato de etilo, 2-metil-1-butanol e 3-metil-1-butanol, 1-pentanol, metil-etil-cetona e dietil-éter sugere a existência de bactérias responsáveis pela possível formação de etanol após a morte, o que os torna, consequentemente, importantes no processo de análise dos resultados obtidos para esta substância.^{10,12,18}

2.5. TÉCNICAS UTILIZADAS

2.5.1. CROMATOGRAFIA DE GÁS COM DETETOR DE IONIZAÇÃO DE CHAMA E SISTEMA DE INJEÇÃO DE HEADSPACE (HS-GC-FID)

2.5.1.1. Cromatografia de gás (GC)

A cromatografia de gás baseia-se na distribuição de analitos entre uma fase estacionária e uma fase móvel (gás inerte), resultando, idealmente, na retenção diferenciada dos analitos.³⁷ Se a fase estacionária for sólida, o processo denominar-se-á de cromatografia gás-sólido; por outro lado, cromatografia gás-líquido será o nome atribuído no caso de a fase estacionária ser líquida, sendo este tipo de cromatografia o mais seletivo e versátil, uma vez que a gama de fases líquidas existentes e disponíveis até uma temperatura de 400 °C é bastante alargada.^{37,38}

É através de um sistema de injeção que a amostra é introduzida no sistema cromatográfico, sendo volatilizada para a fase móvel. É possível controlar a temperatura de injeção no cromatógrafo de temperaturas inferiores a 0 °C até valores superiores a 300 °C.³⁷ Assim, temperaturas mais baixas permitem evitar a dissipação dos compostos mais voláteis, enquanto temperaturas elevadas servirão para que os compostos cuja volatilidade seja bastante baixa, volatilizem.³⁷

Após volatilização, a amostra é colocada em contacto com a fase móvel, iniciando-se a interação entre os seus componentes e a fase estacionária, ocorrendo partição entre as duas fases, o que culmina na obtenção de diferentes taxas de migração na coluna.^{37,38} Assim, características físicas tais como o tamanho, a massa molecular, a forma e o ponto de ebulição, bem como características moleculares que determinam as interações intermoleculares com a fase estacionária, constituem fatores que permitem uma separação seletiva dos analitos, uma vez que estas particularidades irão determinar a velocidade de migração ao longo da coluna do GC e o consequente tempo de retenção de cada um.³⁸

Por fim, os analitos passam para um detetor onde é produzido um sinal com intensidade proporcional à natureza e quantidade de analito na amostra. Após amplificação desse sinal, passar-se-á à sua quantificação, num qualquer dispositivo que permita a obtenção do cromatograma (e.g. computador, integrador eletrónico, registador gráfico).³⁷

A cromatografia de gás é, assim, uma técnica simples, multifacetada e de rápida aplicação, para uma excelente separação de substâncias de massa molecular não muito elevada, termicamente

estáveis e com pressão de vapor apropriada às temperaturas utilizadas. Para além disto, pode ser conseguida uma elevada resolução, precisão, exatidão e rapidez de análise.^{37,38}

2.5.1.2. Detetor de ionização em chama

O detetor de ionização em chama é o detetor mais utilizado em cromatografia de gás, e este facto deve-se às suas inúmeras vantagens.^{37,39} O FID possui elevada sensibilidade para variados compostos orgânicos, simplicidade, confiabilidade, resposta linear numa faixa bastante ampla e nível de ruído extremamente baixo.^{37,39}

Neste detetor, é produzida uma chama por combustão de ar e hidrogénio. A introdução de compostos orgânicos na chama leva à formação de múltiplos iões, os quais são atraídos para o eléctrodo coletor do FID.³⁷ Assim, é produzida uma corrente proporcional à quantidade de analito existente na chama.³⁷ A sua resposta é de algum modo previsível, na medida em que os hidrocarbonetos, por exemplo, fornecem respostas numa proporção equivalente ao número de átomos de carbono.³⁹

A linha de base de um sistema de deteção por ionização em chama é muito próxima de zero, uma vez que a queima de hidrogénio puro não produz iões.³⁹ Assim, esta resulta, maioritariamente, de impurezas existentes tanto no gás de arraste como no hidrogénio.³⁹ Este fator permite que o FID possua capacidade de deteção de concentrações relativamente baixas.

Em relação às suas desvantagens, a principal é o facto de ocorrer a destruição da amostra.^{37,39}

2.5.1.3. Headspace Estático

O acoplamento da cromatografia de gás à técnica de injeção por *headspace* é a opção preferencial para a análise de compostos voláteis, nomeadamente de etanol, em matrizes biológicas.^{36,40}

O *headspace* estático, em particular, constitui uma das técnicas utilizadas no âmbito da toxicologia forense, nomeadamente para análise tanto qualitativa como quantitativa de substâncias voláteis.³⁴ A amostra é colocada num *vial* devidamente selado, no interior do qual ocorre disseminação dos analitos voláteis da mesma para o *headspace*.^{34,41} O objetivo será atingir

o equilíbrio entre a concentração de analito na amostra e no *headspace*, de forma a que, nesta altura, uma alíquota da fase de vapor seja diretamente injetada no cromatógrafo de gás, a pressão e temperatura ambientes.^{34,41} De uma forma mais simplificada, este é um procedimento de um passo, no qual uma porção do *headspace* é diretamente injetada no GC.³⁴

Algumas das várias vantagens desta técnica são a facilidade de manipulação da amostra (o que diminui a possibilidade de perda de analito), ausência de contaminação da coluna e do injetor (uma vez que a injeção ocorre a partir do *headspace*), simplicidade, menor gasto de consumíveis, diminuição da produção de artefactos e quantificação precisa de analitos pouco solúveis em água.^{34,40} A sua principal desvantagem é a menor sensibilidade quando comparado com o *headspace* dinâmico – desvantagem que não afeta a sua aplicação no ramo da toxicologia forense e que é compensada pela obtenção de uma injeção mais limpa.³⁴

2.6. MATRIZES BIOLÓGICAS

A distribuição de etanol nas diversas matrizes biológicas não é linear, porém existem aproximações que permitem esclarecer o facto de a análise de sangue, urina e humor vítreo ser a forma mais eficiente de distinguir a ingestão *ante-mortem* da produção *post-mortem* de etanol.⁴² A concentração de etanol no sangue é 30% inferior à sua concentração na urina (considerando condições em que ocorre a fase de eliminação) e 18% inferior à do humor vítreo.⁴² Tal como referido anteriormente, o cérebro é considerado um bom indicador de consumo *ante-mortem* de etanol, porém as amostras deste órgão enviadas para o SQTf são bastante raras, e tendo em conta a impossibilidade da sua análise sem prévia diluição e homogeneização, esta matriz não foi incluída no presente estudo.¹⁷

2.6.1. SANGUE

Eleito como a amostra preferencial em toxicologia *post-mortem*, o sangue permite a deteção, quantificação e interpretação da presença de substâncias tóxicas.^{13,43}

Se por um lado permite excluir a suspeita de exposição aguda a determinada substância, por outro, a existência de níveis superiores a 10 - 20 vezes a concentração terapêutica ou tóxica, dependendo da substância, permite concluir acerca de intoxicação ou morte.¹³

Nos casos em que várias substâncias e/ou o etanol se encontram envolvidos, a análise da razão existente entre a concentração substância/metabolito torna-se de extrema utilidade para a conclusão acerca de intoxicação aguda.¹³

Uma vez que o fenómeno de redistribuição *post-mortem* afeta várias substâncias e, por existirem casos em que as suas concentrações no sangue da cavidade cardíaca se inserem entre os limites máximo terapêutico e mínimo para casos de intoxicação ou morte reportados, é recomendado que, sempre que possível, sejam recolhidas amostras em pelo menos dois locais distintos: coração e vasos periféricos.¹³ Ou seja, enquanto que numa análise *in vivo* a concentração obtida para qualquer substância corresponde ao seu nível real, após a morte, os fenómenos de redistribuição *post-mortem* podem levar a alterações nas concentrações dos analitos em estudo.¹³ Desta forma, os resultados obtidos numa análise de rotina podem ser comprometidos em situações de putrefação, o que vem realçar a importância do presente estudo.¹³

Um dos aspetos mais relevantes a ter em conta durante a obtenção de amostras biológicas *post-mortem*, é o facto de que, nestes casos, os princípios farmacocinéticos poderão ser afetados, ou seja, o princípio de que, de uma forma geral, as concentrações das substâncias em análise se mantêm constantes no sangue periférico, comparativamente às do sangue cardíaco, deixa de existir de forma tão linear.¹³

Finalmente, aquando da recolha, a contaminação da amostra por infiltrações de fluídos gástricos ou viscerais deve ser evitada, o que coloca as recolhas de sangue torácico e abdominal em última opção.^{13,43}

2.6.2. URINA

É na urina que as substâncias tóxicas, bem como os seus metabolitos se acumulam, o que facilita a sua deteção nesta matriz.¹³

De facto, a análise de urina permite comprovar o uso de determinada substância, mas não fornece nenhuma informação acerca da quantidade ou data de ingestão, uma vez que a deteção de substâncias nesta matriz pode ocorrer num intervalo de tempo de várias horas até várias semanas após a ingestão.¹³ Assim a informação obtida é apenas qualitativa, o que torna a urina num fluido biológico útil para confirmação ou orientação da pesquisa no sangue.¹³

Sendo composta essencialmente por água (98%), a urina encontra-se menos sujeita a contaminações microbiais e ao processo de fermentação, quando comparada com amostras de sangue, o que realça a sua utilidade em casos de análise de etanol em situações *post-mortem*.^{8,13}

A urina foi, inicialmente, considerada como um indicador de ingestão de etanol *ante-mortem*, uma vez que, em condições normais, não possui glucose na sua constituição.⁴⁴ O facto de terem surgido casos de submersão nos quais se detetou a presença de etanol em urina, existindo evidências de que este não teria sido ingerido antes da morte, levou a considerar esta matriz como um complemento em análises *post-mortem*.⁴⁴

Por fim, numa análise *post-mortem* efetuada a um indivíduo diabético (nos quais normalmente se detetam corpos cetónicos), foram detetadas as substâncias etanol e acetona em urina às concentrações de 1000 mg/L e 802 mg/L, respetivamente.⁴⁵ A análise foi repetida ao longo de três meses, ao fim dos quais estas concentrações passaram a ser de 2800 mg/L e 929 mg/L.⁴⁵ Este estudo permitiu ilustrar a importância de um correto armazenamento das amostras e da corroboração dos resultados em diversas matrizes.⁴⁵

2.6.3. HUMOR VÍTREO

Considerado um dos fluídos biológicos mais relevantes em toxicologia forense, o humor vítreo é a matriz de eleição em casos de putrefação ou de graves danos corporais, o que torna a sua recolha extremamente importante, principalmente nestes casos.⁴³

O facto de se encontrar localizado no interior do globo ocular torna-o resistente a contaminações microbiais, fúngicas e a alterações *post-mortem*, o que permite a sua utilização em análises quantitativas.¹³

É uma matriz estável, de fácil acesso e estéril, que deve ser recolhida sempre que possível, uma vez que possui uma função extremamente relevante na interpretação de determinados resultados analíticos toxicológicos, auxiliando na distinção entre uma formação *post-mortem* ou ingestão *ante-mortem* de etanol.^{43,46}

2.7. ACONDICIONAMENTO DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Após a recolha das amostras biológicas, a multiplicação microbiana e consequente produção *post-mortem* de etanol continua a decorrer no caso de não ser adicionado nenhum agente que

impeça/atrase este processo.^{6,47} É por este motivo que um correto acondicionamento é essencial na obtenção de resultados fiáveis.⁶

A substância mais utilizada no momento de conservação das amostras é o fluoreto de sódio.⁶ Este composto impede não só a formação de polissacarídeos por ação de micróbios, como a conseqüente disseminação microbial.⁶ Esta prática, aliada ao armazenamento das amostras a temperaturas ideais, previne efetivamente a formação de etanol por micróbios.⁶ De acordo com a literatura, a temperatura ideal é de 4 °C, com uma concentração de fluoreto de sódio superior ou igual a 1% (m/v).⁴⁷

2.8. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

A validação de um método analítico encontra-se, muitas das vezes, relacionada com o seu desenvolvimento, ou seja, evolui a partir deste.⁴⁸ Assim, este é um procedimento utilizado de forma a determinar e confirmar que o método utilizado é adequado e possui recursos de desempenho consistentes com a sua aplicação.⁴⁸

Para que um método seja validado, é necessário, não só, recorrer a calibradores e equipamentos calibrados e adequados, como também o operador deverá possuir a competência necessária e inerente ao estudo em questão.⁴⁸

A validação e revalidação de um método analítico deve ocorrer:

- Anteriormente à sua inclusão no uso rotineiro;
- De todas as vezes em que o método já validado sofre alterações nas suas condições;
- Sempre que a alteração do método se encontra fora do objetivo original a que foi proposto.⁴⁸

Desta forma, os parâmetros que devem ser avaliados durante o desenvolvimento e validação de um determinado método analítico variam de procedimento para procedimento e de norma para norma. A título de exemplo, de acordo com o *Analytical Procedure and Method Validation*, são avaliados: a linearidade, a gama de trabalho, a especificidade, a precisão, a exatidão e os limites de deteção e de quantificação.⁴⁹

No presente estudo serão avaliados os parâmetros de: gama de trabalho, seletividade, linearidade e modelo de calibração, limites de deteção e quantificação, precisão, exatidão, arrastamento, robustez e estabilidade.⁵⁰

2.8.1. SELETIVIDADE/ESPECIFICIDADE

Parâmetros de confiabilidade das medidas na presença de interferências, a seletividade e a especificidade são muitas das vezes confundidas entre si.⁵¹ Diz-se que um método é seletivo quando fornece resposta a um determinado número de compostos químicos distinguíveis, ou não, entre si.⁵¹ Quando a resposta é apenas obtida para um só analito, o método é classificado como específico.⁵¹ Segundo a IUPAC, o termo seletividade é o mais correto, pelo que é recomendada a sua única utilização.⁵¹

Através da seletividade, é possível determinar e avaliar o nível de interferência criado por impurezas, produtos de degradação, excipientes e, até, outro ingrediente ativo, garantindo-se, assim, que o sinal obtido corresponda apenas ao analito em estudo.⁵²

Aquando do desenvolvimento de um método analítico, a seletividade constitui o primeiro parâmetro a avaliar, porém, a possibilidade de degradação de amostras e consequente co-eluição de compostos não observados numa fase inicial, com o analito de interesse, leva a que, por vezes, seja necessário reavaliar este parâmetro ao longo do processo de validação e posterior utilização do método.⁵¹

A seletividade pode ser avaliada por comparação dos resultados obtidos para amostras brancas fortificadas com os analitos em estudo (controlo positivo), e na ausência deste (controlo negativo).⁵¹ Em cromatografia, a avaliação é normalmente feita de duas formas: comparação entre o espectro do pico adquirido em ensaio para as amostras fortificadas com o de um padrão, o que implica a utilização de técnicas hífenadas, como por exemplo o GC-MS; tomando como base os tempos de retenção.⁵¹ Neste caso o tempo de retenção do analito em estudo deve ser bem distinguível dos restantes componentes.⁵¹ Por outro lado, e nos casos em que não existe a possibilidade de obtenção de uma matriz livre do analito de interesse, pode recorrer-se ao método de adição padrão.⁵¹ Aqui, são criadas duas curvas analíticas, sendo uma formada pela amostra à qual é adicionada a substância de interesse e a outra, sem presença de matriz.⁵¹ Após comparação e no caso de se obterem duas curvas paralelas entre si, conclui-se que o método é seletivo, ou seja, que não existe interferência da matriz.⁵¹ Por último, a utilização de uma técnica cromatográfica distinta, ou de técnicas e métodos específicos constitui mais um dos procedimentos para avaliação da seletividade.⁵¹

2.8.2. IDENTIFICAÇÃO DE INTERFERENTES

Dá-se o nome de interferente a qualquer substância, que não fazendo parte do estudo, pode, caso esteja presente, comprometer a identificação, análise e quantificação dos compostos relevantes.⁵⁰ Podem ser distinguidas interferências de matriz e interferências de analitos comuns.⁵⁰

A avaliação da existência de interferentes da matriz é feita com base na análise de um número mínimo de 10 amostras de matriz branca provenientes de diferentes fontes, sem adição do padrão interno utilizado.⁵⁰

Na análise da interferência de analitos comuns, e de acordo com o tipo de estudo efetuado, são selecionadas substâncias comuns, que possam interferir com os compostos em estudo.⁵⁰ Assim, as substâncias a analisar, terão de se relacionar com aquelas que realmente participam no estudo.⁵⁰ Por exemplo, se se tratar de uma análise de drogas, terão de ser selecionados outros tipos de drogas, possivelmente comprometedoras da correta interpretação dos resultados obtidos.⁵⁰ No caso de uma análise de voláteis, outros voláteis, comuns, terão de ser avaliados através do estudo de amostras provenientes de casos anteriormente analisados ou, ainda da fortificação de amostras brancas.⁵⁰

No contexto deste trabalho, a comparação entre os tempos de retenção obtidos em diferentes colunas cromatográficas com os das substâncias em estudo permitirá a obtenção de conclusões. No caso de algum interferente comprometer, de alguma forma, a correta interpretação dos resultados obtidos, encontramos-nos perante uma inconformidade, o que leva à impossibilidade, dependendo de diversos fatores (e.g. relevância da impureza interferente, nível de interferência), de quantificação da substância alvo.⁵⁰

2.8.3. GAMA DE TRABALHO

Ao intervalo existente entre as concentrações mínima e máxima de analito numa amostra para as quais o método utilizado possui parâmetros de precisão, exatidão e linearidade adequados dá-se o nome de gama de trabalho.⁵³

Assim, à concentração mais baixa da gama de trabalho, o fator limitante corresponde ao limite de deteção e/ou quantificação. Em relação à concentração máxima, os limites dependerão do mecanismo de deteção, sendo as limitações impostas por variados efeitos.⁵³

2.8.4. LIMITE DE DETEÇÃO

O limite de detecção corresponde à concentração mais baixa de analito que pode ser detetada, mas não necessariamente quantificada, numa amostra, como valor exato.⁵¹⁻⁵³

Existem 2 metodologias mais utilizadas na determinação do limite de detecção: método sinal/ruído: o limite de detecção é a concentração de analito que leva à obtenção de um pico duas a três vezes superior ao nível de ruído da linha de base e o método baseado em parâmetros da reta de calibração.⁴⁸ Neste caso é construída uma curva de calibração com amostras brancas fortificadas com os analitos em estudo em concentrações próximas às do limite de detecção esperado, sendo este limite calculado através da equação (1).⁵¹

$$(1) \text{ LOD} = \frac{3.3 \times S_{y/x}}{b}$$

Em que $S_{x/y}$ corresponde ao desvio padrão residual da curva de calibração e b ao seu declive.

2.8.5. LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO

Correspondente à menor concentração de analito que é possível quantificar através da utilização de um determinado método experimental, com precisão e exatidão aceitáveis.⁵¹

Para o cálculo do limite de quantificação podem ser utilizadas as metodologias mencionadas acima para o limite de detecção, porém, neste caso, a relação entre o pico e o ruído da linha de base é de 10:1 ou 20:1.^{48,51}

Se forem utilizados parâmetros da reta de calibração, o limite de quantificação pode ser calculado pela equação (2).⁵¹

$$(2) \text{ LOQ} = \frac{10 \times S_{y/x}}{b}$$

Em que $S_{x/y}$ corresponde ao desvio padrão residual da curva de calibração e b ao seu declive.

2.8.6. LINEARIDADE E MODELO DE CALIBRAÇÃO

Numa primeira fase, é necessário estabelecer a gama de trabalho pretendida para cada analito, ou seja, a gama de concentrações do analito na qual o método será utilizado.⁵⁴ De seguida, a escolha entre um modelo quadrático ou linear é de extrema importância na obtenção de resultados quantitativos precisos e confiáveis.⁵⁵

O modelo de calibração deve descrever uma relação entre a função de resposta (y) e a concentração de analito na amostra (x).^{55,56} À capacidade de um determinado método em atribuir resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em estudo, dentro de uma determinada gama de aplicação dá-se o nome de linearidade, sendo que, para a sua análise é recomendada a utilização de, no mínimo cinco concentrações distintas.⁵⁴

A soma dos resíduos e a sua distribuição, o coeficiente de correlação e a ordenada na origem, são parâmetros utilizados para avaliar a qualidade da reta.⁵⁴ A partir dos pontos obtidos pode ser elaborado o cálculo dos coeficientes de regressão (m e y_0) e do coeficiente de correlação (r) que permite avaliar a qualidade da curva, uma vez que quanto mais próximo de 1.0 menor a sua incerteza e a dispersão do conjunto de pontos experimentais.⁵¹ Segundo o INMETRO, um valor acima de 0.90 permite concluir que se obteve um ajuste ideal dos dados. Para a ANVISA este valor passa a ser 0.99.⁵¹

O modelo de calibração mais utilizado é, de facto, o linear: quando é obtida uma relação linear entre os sinais e a concentração do analito, é calculada, regra geral, uma linha de regressão através do método dos mínimos quadrados, simples ou ponderada, dependendo da homocedasticidade da resposta.⁵⁰ Assim, se a homogeneidade de variâncias não se verificar, será selecionado um fator de ponderação que dependerá, entre outros fatores, da análise residual e do coeficiente de correlação e desvio obtidos.⁵⁵ O fator selecionado será a aproximação mais adequada da variância observada - a qual aumenta, regra geral, de acordo com a concentração e a heterocedasticidade. Assim, promover-se-á a obtenção de resultados satisfatórios.⁵⁵

2.8.7. PRECISÃO

A precisão pode ser dividida em três categorias: repetibilidade, precisão intermédia e reprodutibilidade, sendo o primeiro e o último as duas medidas extremas deste parâmetro.⁵¹

2.8.7.1. Repetibilidade

Também denominada de precisão intra-ensaio, a repetibilidade reflete a dispersão entre resultados, verificada durante um curto intervalo de tempo, sob as mesmas condições de operação: mesmo local, analista, instrumento, condições de análise.⁵¹ É expressa através do desvio padrão relativo, sendo comumente designada de precisão intra corrida ou intra-ensaio.⁵¹

Para o estudo da repetibilidade são injetadas, em quintuplicado, todas as amostras de controlo de qualidade interno, juntamente com o padrão interno.⁵⁰ No final são calculados os TRR de cada substância em estudo, bem como a média, desvio padrão e coeficiente de variação obtidos para cada uma delas através da razão: área da substância/área do PI.⁵⁰ Os valores obtidos devem ser $\leq 10\%$.⁵⁰

2.8.7.2. Precisão intermédia

A precisão intermédia reflete a dispersão dos resultados com as variações que possam ocorrer no interior do laboratório, sejam elas diferentes analistas, equipamentos, dias, entre outros.⁵⁴ Assim, dependendo da finalidade de utilização de cada procedimento, a amplitude na qual a precisão intermédia deve ser estabelecida é determinada pelo analista.⁵⁴

O estudo deste parâmetro é feito com base na injeção, durante 5 dias, dos calibradores e dos controlos definidos para o trabalho pretendido, nomeadamente às concentrações baixa, média e alta.⁵⁰ Os dados obtidos são, posteriormente, tratados obtendo-se os valores correspondentes aos coeficientes de variação, que poderão variar até aos 10%.⁵⁰

2.8.7.3. Reprodutibilidade

A reprodutibilidade constitui a medida de precisão mais significativa no que diz respeito à análise de uma determinada amostra por vários laboratórios.⁴⁸ Assim, a precisão entre diferentes laboratórios é expressa por este parâmetro.⁵⁴

Regra geral, a precisão é aplicada em termos de desvio padrão ou de desvio padrão relativo, sendo que, tal como a repetibilidade e a precisão intermédia, depende, também, da concentração do analito, o que leva à sua determinação em variadas concentrações.⁴⁸

Em procedimentos quantitativos, a precisão deve ser avaliada através da utilização de três

amostras diferentes por concentração e três *pools* de concentração dissemelhantes (baixa, média e alta), num total de cinco corridas, sendo que o CV% não poderá exceder os 20% para cada uma das concentrações, ≤10% em alguns casos específicos (e.g. análise de álcool no sangue).⁵⁰

2.8.8. BIAS

O *bias* pode ser calculado a partir dos resultados obtidos nos estudos de precisão. Neste parâmetro, os resultados obtidos nas cinco corridas e para cada um dos controlos de qualidade definidos (baixo, médio e alto) são agrupados, sendo calculada a sua média e erro relativo (*bias*).⁵⁰ O valor aceitável é de ±20%, salvo algumas excessões (e.g. etanol), no qual o valor esperado é de, no máximo ±10%.⁵⁶ O cálculo é efetuado de acordo com a equação (3).⁵⁰

$$(3) \quad \text{Bias (\% à concentração (x))} = \left[\frac{\text{Média da concentração calculada (x)} - \text{Concentração nominal (x)}}{\text{Concentração nominal (x)}} \right] \times 100$$

2.8.9. EXATIDÃO

Medida da proximidade entre o valor obtido e o valor aceite como verdadeiro, a exatidão corresponde, intrinsecamente a um valor exato, ou seja, adquirido através de uma medição perfeita e, por isso, é necessário ter em conta que esse valor é, por natureza, indeterminado.^{51,55} Assim, numa das alternativas é feita uma aproximação que consiste na adição de uma concentração nominal a uma matriz branca, sendo a exatidão definida a cada concentração, de forma a ser possível avaliar a conformidade entre as concentrações nominais e medidas de cada um dos analitos nas amostras de matriz branca.^{50,54}

2.8.10. ROBUSTEZ

A robustez é definida como a sensibilidade de um método analítico a pequenas e deliberadas variações nos seus parâmetros. Assim, a resistência a estas alterações, confere confiabilidade ao seu uso.⁵²

Para avaliar a robustez de um método, são aplicadas variações possíveis de ocorrer na existência de troca de equipamento, analista, ou ainda, laboratório e algumas destas alterações podem ser: pH, concentração do solvente, temperatura, natureza do gás de arraste, alteração do tipo de pipetas, substituição do liner, entre outros.^{51,52}

A INMETRO aconselha a realização do teste de Youden, no qual oito ensaios são, no total, realizados, sendo determinado, a partir da combinação dos efeitos, quais são suscetíveis a variações.⁵¹ Assim, é possível concluir acerca da influência de cada uma destas e avaliar o método em termos de robustez.⁵¹

2.8.11. ESTABILIDADE

A estabilidade consiste em comprovar que a concentração de determinado analito na amostra não sofre alterações durante um período razoável de tempo que varia, entre outros fatores, de acordo com a necessidade.⁵¹

O estudo deste parâmetro é de extrema importância nomeadamente para garantir que as análises são efetuadas durante um período de tempo prévio ao da degradação das amostras.⁵¹

Para além deste fator, o facto de, muitas das vezes, as corridas ocorrerem durante a noite, leva a que seja necessária uma maior estabilidade de soluções.⁵¹

De forma a testar este parâmetro, as amostras poderão ser sujeitas a variadas condições tais como diferentes níveis de luz e temperatura.⁵⁵

Para o estudo da estabilidade devem ser utilizadas duas concentrações, no mínimo, que correspondam à concentração de analito esperada ou que representem as regiões extremas da curva de calibração (baixa e alta concentração).⁵⁵ Para além disto é necessário que as amostras de estabilidade sejam comparadas com controlos sendo que, apesar de variações até 20% poderem ser toleráveis em determinadas condições, uma variação de mais de 10% é considerada comprometedora da integridade dos dados obtidos.⁵⁵

Inicialmente, são criadas *pools* de cada uma das matrizes a analisar as quais são posteriormente fortificadas às concentrações baixa e alta da gama de trabalho.⁵⁰ De seguida, estas *pools* são divididas, sendo as primeiras imediatamente analisadas em triplicado.⁵⁰ As restantes são armazenadas de forma idêntica às amostras de rotina, sendo depois analisadas a diferentes intervalos de tempo.⁵⁰ No final, a média dos resultados obtidos através do cálculo: $\text{área}_{\text{sub.}} / \text{área}_{\text{PI}}$ em cada um dos ensaios é comparada com a do primeiro, sendo o analito em estudo considerado estável até que a média obtida deixe de se encontrar dentro do erro aceitável (*bias*) para o método em estudo.⁵⁰



PARTE III

MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MATERIAL E MÉTODOS

De forma a que seja possível analisar qualitativa e quantitativamente amostras reais e, tendo em conta o objetivo de implementação do método, após validação, no SQTF, é necessário que a reprodutibilidade e exatidão do mesmo sejam garantidas.

Para a análise das 16 substâncias selecionadas utilizou-se um cromatógrafo de gás acoplado a um detetor de ionização em chama e com injeção por *headspace* (HS-GC-FID), por ser um dos instrumentos analíticos utilizados no serviço para a análise de etanol e de voláteis nas matrizes em estudo. O método foi desenvolvido e validado de acordo com a norma SWGTOX e, tal como anteriormente mencionado, foram criados os procedimentos para a integração dos métodos na rotina.⁵⁰

3.1.1. SUBSTÂNCIAS ESTUDADAS

As substâncias voláteis analisadas no presente estudo foram selecionadas tendo em conta em primeiro lugar o seu relacionamento com a formação de etanol *post-mortem* e, em segundo lugar, a disponibilidade dos padrões, tendo em conta o espaço de tempo existente para a realização do presente estudo.

As substâncias de estudo são as seguintes: acetaldeído, 2-propanol, *n*-propanol, acetato de etilo, metil-etil-cetona, 2-butanol, metanol, *t*-butanol, dietil-éter, etanol, *n*-butanol, acetona, 2-metil-1-butanol, 3-metil-1-butanol, 1-pentanol e isobutanol.

Todas foram estudadas numa gama de trabalho de 50-2000 mg/L. A escolha deste intervalo teve em conta, não só o intervalo de concentrações para o qual existem evidências de possibilidade de produção *post-mortem* de etanol (<300 mg/L até 1900 mg/L), mas também, as gamas de trabalho para as quais já existiam estudos acerca das substâncias em análise.⁸ De acordo com a literatura, as gamas de trabalho utilizadas variam: 100-1000 mg/L (e.g. acetona, metanol, isopropanol), 50-2000 mg/L (e.g. acetaldeído, acetato de etilo, acetona, *n*-butanol, 2-propanol, dietil-éter, metanol).^{57,58} Existe, ainda, uma investigação efetuada para substâncias produzidas durante a putrefação, na qual os valores mais baixos variam entre 100-110 mg/Kg, o que equivale, de acordo com a densidade dos analitos a, aproximadamente, 70-100 mg/L.¹⁷ A compilação de todos estes dados, acrescida ao facto de a concentração de etanol ser considerada positiva a partir de 100 mg/L, originou a gama de trabalho definida.

Na realização do presente estudo foram utilizados padrões das marcas *Merk* (acetato de etilo, 2-propanol, *n*-propanol, acetona, etanol, acetaldeído, dietil-éter), *VWR Chemicals* (metil-etil-cetona, 2-butanol, *n*-butanol), *Fluka* (*t*-butanol, isobutanol, 2-metil-1-butanol), *Riedel de Haën* (3-metil-1-butanol, 1-pentanol, metanol, acetonitrilo), todos com pureza de, pelo menos 98%.

Na preparação das soluções, utilizou-se água *MilliQ* obtida com sistema *Millipore*.

Para a realização do presente estudo utilizou-se um sistema cromatográfico HS-GC-FID: um cromatógrafo de gás VARIAN 450-GC com detetor de ionização em chama e injeção por *headspace* estático (CTC Analytics' CombiPAL). Foram utilizadas duas colunas: VF-5ms (fase estacionária constituída por 5% fenilmetilpolissiloxano) com as dimensões de 30 m x 0,25 mm x 0,50 µm e VF-624ms (fase estacionária constituída por 6% cianopropilfenil e 94% dimetil polissiloxano) de 30 m x 0,25 mm x 1,40 µm. O hélio funcionou como gás de arraste e o azoto como gás "makeup", fazendo a ligação entre a coluna e o detetor. Neste detetor, a chama é produzida por combustão de ar e hidrogénio.

3.1.2 AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Todas as amostras recolhidas *post-mortem* (sangue, urina e humor vítreo), foram obtidas em autópsias realizadas na Unidade Funcional de Patologia Forense do Serviço de Clínica e Patologia Forenses da Delegação do Centro do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses de Coimbra, ou em Gabinetes Médico-Legais da região centro de Portugal.

Por sua vez, as amostras biológicas coletadas *in vivo* foram obtidas a partir de recolhas efetuadas em estabelecimentos oficiais de saúde de acordo com a Portaria n.º 902- B/2007, de 13 de agosto.

Todas as amostras se encontravam armazenadas a uma temperatura de -10 °C e fora do prazo legal estipulado para a sua conservação no INMLCF. Anteriormente à sua análise, estas foram seriadas, a fim de verificar que se encontravam livres de VOCs.

3.1.3. MATERIAL E EQUIPAMENTO

- Balões Volumétricos de 5, 10, 50, 100, 500 e 1000 mL;
- Frascos de vidro âmbar de 1000 e 500 mL;
- Pipetas graduadas de 10 e 20 mL;

- Pipeta automática eletrônica de 10-300 μL *Sartorius* 15026801;
- Pipeta automática de 100 μL *Eppendorf* 3408347;
- Doseador *Eppendorf Multipette Plus* com combitips de 10 mL 3883039;
- *Vials* de 10 mL;
- Cápsulas de alumínio para *vials*;
- Suporte para *vials*.
- Hote *Kottermann*;
- Vórtex *Zx³*;
- Homogeneizador de amostras *GFL* 3015;
- Banho de ultrassons *Bandelin Sonorex Super RK* 510H.

3.1.4. PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES

Inicialmente, procedeu-se ao estudo de cada uma das substâncias individualmente de forma a verificar a sua solubilidade em água (tabela 2). Percebendo-se que a acetona seria o solvente mais indicado para algumas delas (3-metil-1-butanol, 1-pentanol e dietil-éter), optou-se pela realização de dois testes: o primeiro consistiu na separação destas substâncias das restantes, criando-se uma segunda mistura (Mistura II), em acetona. O segundo teste baseou-se na mistura de todas as substâncias, incluindo as anteriores, e utilização do banho de ultrassons. Para isso, efetuaram-se alguns estudos que passaram pela alteração da temperatura do banho e verificação dos resultados obtidos. Assim, a mistura foi submetida a três variações: ultrassons à temperatura ambiente, a 30 °C e a 50 °C. Foram obtidos resultados bastante semelhantes para todos os testes à concentração de 10 mg/L, tal como apresentado na tabela 3. Tendo em conta este aspeto, os pontos de ebulição das substâncias em análise e, ainda, o facto de menores temperaturas maximizarem o processo sonoquímico, verificou-se que a melhor opção seria o banho de ultrassons à temperatura ambiente.⁵⁹

Uma vez que ambos os resultados foram positivos (mistura em acetona e ultrassons), optou-se pela simplificação do estudo, implementando-se, assim, o banho de ultrassons durante 10 minutos, criando-se apenas uma solução formada pelas 16 substâncias em estudo, o que se revelou bastante positivo em termos de tempo de resposta.

Tabela 2 – Solubilidade em água de cada uma das substâncias em estudo, a 25 °C⁶⁰

Composto	Solubilidade em água (g/L)
Acetaldeído	Solúvel
2-Propanol	Solúvel
<i>n</i> -Propanol	Solúvel
Acetato de etilo	80.0
Metil-etil-cetona	211.0
2-Butanol	181.0
Metanol	Solúvel
<i>t</i> -Butanol	Solúvel
Dietil-éter	60.4
Etanol	Solúvel
<i>n</i> -Butanol	68.0
Acetona	Solúvel
2-Metil-1-butanol	30.0
1-Pentanol	22.0
3-Metil-1-butanol	26.7
Isobutanol	85.0

Tabela 3 – Resultados obtidos nos testes de solubilidade efetuados no banho de ultrassons: Razão entre as áreas do analito e do padrão interno para concentrações de analito de 10 mg/L.

Substância	$A_{\text{subs.}}/A_{\text{PI}}$ à temperatura ambiente	$A_{\text{subs.}}/A_{\text{PI}}$ a 30°C	$A_{\text{subs.}}/A_{\text{PI}}$ a 50°C
Acetaldeído	0.014	0.012	0.013
Metanol	0.003	0.002	0.003
Etanol	0.006	0.006	0.006
Dietil-éter	0.105	0.083	0.096
Acetona	0.017	0.016	0.025
2-Propanol	0.012	0.012	0.013
<i>t</i> -Butanol	0.034	0.031	0.034
<i>n</i> -Propanol	0.012	0.012	0.012
Metil-etil-cetona	0.046	0.040	0.040
Acetato de etilo	0.059	0.045	0.051
2-Butanol	0.028	0.023	0.024
Isobutanol	0.029	0.029	0.027
<i>n</i> -Butanol	0.020	0.021	0.021
3-Metil-1-butanol	0.032	0.030	0.032
2-Metil-1-butanol	0.044	0.039	0.037
1-Pentanol	0.034	0.033	0.033

3.1.4.1. Soluções de armazenamento

Para a obtenção dos calibradores utilizados tanto no desenvolvimento do método como na análise de amostras reais, foram preparadas as soluções de armazenamento 3.1.4.1.1. e 3.1.4.1.2. Em relação ao padrão interno, a solução elaborada encontra-se evidenciada no ponto 3.1.4.1.3.

É de salientar que os controles e calibradores devem provir de soluções de armazenamento distintas. A densidade das substâncias voláteis é: 790 g/L para acetona, metanol, etanol e acetonitrilo; 800 g/L para *n*-propanol; 801 g/L para isobutanol; 780 g/L para *t*-butanol e acetaldeído; 710 g/L para dietil-éter; 900 g/L para acetato de etilo; 820 g/L para 1-pentanol e 2-metil-1-butanol; 810 g/L para 3-metil-1-butanol e *n*-butanol; 806 para 2-butanol; 804 para metil-etil-cetona; 786 g/L para 2-propanol.

3.1.4.1.1. Solução de 100 mg/L

Diluir 12,6 µL de acetona, etanol e metanol, 12,5 µL de *n*-propanol e isobutanol, 12,8 µL de *t*-butanol e acetaldeído, 14,1 µL de dietil-éter, 11,1 µL de acetato de etilo, 12,2 µL de 1-pentanol e 2-metil-1-butanol, 12,3 µL de 3-metil-1-butanol e *n*-butanol, 12,4 µL de 2-butanol e metil-etil-cetona e 12,7 de 2-propanol em água *MilliQ* até perfazer um volume de 100 mL. No final, colocar em banho de ultrassons durante 10 minutos à temperatura ambiente.

3.1.4.1.2. Solução de 2500 mg/L

Diluir 158,2 µL de acetona e etanol, 176,2 µL de dietil-éter, 156,2 µL de *n*-propanol, 160,2 µL de *t*-butanol e acetaldeído, 154,4 µL de 3-metil-1-butanol e *n*-butanol, 155,2 µL de 2-butanol, 155,6 µL de metil-etil-cetona, 152,4 µL de 1-pentanol e 2-metil-1-butanol, 139 µL de acetato de etilo, 159 µL 2-propanol, 156,2 µL isobutanol, 157,8 µL de metanol em água *MilliQ* até perfazer um volume de 50 mL. no final, colocar em banho de ultrassons durante 10 minutos à temperatura ambiente.

3.1.4.1.3. Solução contendo 10000 mg/L de acetonitrilo

Diluir 12,6 mL de Acetonitrilo em água desionizada até perfazer um volume de 1000 mL.

3.1.4.2. Soluções de trabalho de padrões de referência (calibradores para o estudo dos limites de detecção e quantificação)

3.1.4.2.1. Solução de 1 mg/L

Diluir 100 µL da solução **3.1.4.1.1.** em água *MilliQ* até perfazer um volume de 10 mL. No final, colocar em banho de ultrassons durante 10 minutos à temperatura ambiente.

3.1.4.2.2. Solução de 5 mg/L

Diluir 500 µL da solução **3.1.4.1.1.** em água *MilliQ* até perfazer um volume de 10 mL. No final, colocar em banho de ultrassons durante 10 minutos à temperatura ambiente.

3.1.4.2.3. Solução de 15 mg/L

Diluir 1500 µL da solução **3.1.4.1.1.** em água *MilliQ* até perfazer um volume de 10 mL. No final, colocar em banho de ultrassons durante 10 minutos à temperatura ambiente.

3.1.4.2.4. Solução de 30 mg/L

Diluir 3 mL da solução **3.1.4.1.1.** em água *MilliQ* até perfazer um volume de 10 mL. No final, colocar em banho de ultrassons durante 10 minutos à temperatura ambiente.

3.1.4.2.5. Solução de 45 mg/L

Diluir 4.5 mL da solução **3.1.4.1.1.** em água *MilliQ* até perfazer um volume de 10 mL. No final, colocar em banho de ultrassons durante 10 minutos à temperatura ambiente.

3.1.4.2.6. Solução de 60 mg/L

Diluir 6 mL da solução **3.1.4.1.1.** em água *MilliQ* até perfazer um volume de 10 mL. No final, colocar em banho de ultrassons durante 10 minutos à temperatura ambiente.

3.1.4.2.7. Solução de 90 mg/L

Diluir 9 mL da solução **3.1.4.1.1.** em água *MilliQ* até perfazer um volume de 10 mL. No final, colocar em banho de ultrassons durante 10 minutos à temperatura ambiente.

3.1.4.3. Soluções de trabalho de padrões de referência (calibradores para o estudo da linearidade e do modelo de calibração)

3.1.4.3.1. Solução contendo 50 mg/L

Diluir 100 μ L da solução descrita em **3.1.4.1.2.** em água *MilliQ* até perfazer um volume de 5 mL. No final, colocar em banho de ultrassons durante 10 minutos à temperatura ambiente.

3.1.4.3.2. Solução contendo 150 mg/L

Diluir 300 μ L da solução descrita em **3.1.4.1.2.** em água *MilliQ* até perfazer um volume de 5 mL. No final, colocar em banho de ultrassons durante 10 minutos à temperatura ambiente.

3.1.4.3.3. Solução contendo 200 mg/L

Diluir 400 μ L da solução descrita em **3.1.4.1.2.** em água *MilliQ* até perfazer um volume de 5 mL. No final, colocar em banho de ultrassons durante 10 minutos à temperatura ambiente.

3.1.4.3.4. Solução contendo 350 mg/L

Diluir 700 μ L da solução descrita em **3.1.4.1.2.** em água *MilliQ* até perfazer um volume de 5 mL. Coloque-a no ultrassons durante 10 minutos.

3.1.4.3.5. Solução contendo 500 mg/L

Diluir 1 mL da solução descrita em **3.1.4.1.2.** em água *MilliQ* até perfazer um volume de 5 mL. No final, colocar em banho de ultrassons durante 10 minutos à temperatura ambiente.

3.1.4.3.6. Solução contendo 650 mg/L

Diluir 1.3 mL da solução descrita **3.1.4.1.2.** em água *MilliQ* até perfazer um volume de 5 mL. No final, colocar em banho de ultrassons durante 10 minutos à temperatura ambiente.

3.1.4.3.7. Solução contendo 950 mg/L

Diluir 1.9 mL da solução descrita em **3.1.4.1.2.** em água *MilliQ* até perfazer um volume de 5 mL. No final, colocar em banho de ultrassons durante 10 minutos à temperatura ambiente.

3.1.4.3.8. Solução contendo 1250 mg/L

Diluir 2.5 mL da solução descrita em **3.1.4.1.2.** em água *MilliQ* até perfazer um volume de 5 mL. No final, colocar em banho de ultrassons durante 10 minutos à temperatura ambiente.

3.1.4.3.9. Solução contendo 1500 mg/L

Diluir 3 mL da solução descrita em **3.1.4.1.2.** em água *MilliQ* até perfazer um volume de 5 mL. No final, colocar em banho de ultrassons durante 10 minutos à temperatura ambiente.

3.1.4.3.10. Solução contendo 1700 mg/L

Diluir 3.4 mL da solução descrita em **3.1.4.1.2.** em água *MilliQ* até perfazer um volume de 5 mL. No final, colocar em banho de ultrassons durante 10 minutos à temperatura ambiente.

3.1.4.3.11. Solução contendo 1850 mg/L

Diluir 3.7 mL da solução descrita em **3.1.4.1.2.** em água *MilliQ* até perfazer um volume de 5 mL. No final, colocar em banho de ultrassons durante 10 minutos à temperatura ambiente.

3.1.4.3.12. Solução contendo 1900 mg/L

Diluir 3,8 mL da solução descrita em **3.1.4.1.2.** em água *MilliQ* até perfazer um volume de 5 mL. No final, colocar em banho de ultrassons durante 10 minutos à temperatura ambiente.

3.1.4.3.13. Solução contendo 2000 mg/L

Diluir 4 mL da solução descrita em **3.1.4.1.2.** em água *MilliQ* até perfazer um volume de 5 mL. No final, colocar em banho de ultrassons durante 10 minutos à temperatura ambiente.

3.1.4.4. Soluções de trabalho de padrões de referência (controles)

3.1.4.4.1. Solução de 100 mg/L

Diluir 200 µL da solução **3.1.4.1.2.** em água *MilliQ* até perfazer um volume de 5 mL. No final, colocar em banho de ultrassons durante 10 minutos à temperatura ambiente.

3.1.4.4.2. Solução de 800 mg/L

Diluir 1,6 mL da solução **3.1.4.1.2.** em água *MilliQ* até perfazer um volume de 5 mL. No final, colocar em banho de ultrassons durante 10 minutos à temperatura ambiente.

3.1.4.4.3. Solução de 1500 mg/L

Diluir 3 mL da solução **3.1.4.1.2.** em água *MilliQ* até perfazer um volume de 5 mL. No final, colocar em banho de ultrassons durante 10 minutos à temperatura ambiente.

3.1.4.5. Solução de trabalho de padrões de referência (padrão interno)

3.1.4.5.1. Solução de 100 mg/L de acetonitrilo

Diluir em água desionizada 10 mL da solução descrita em **3.1.4.1.3.** até perfazer um volume de 1 L.

3.1.5. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS, CONTROLOS E CALIBRADORES

Num *vial*, coloca-se 1 mL da solução de padrão interno com 100 µL de amostra. Cada um dos deles é imediatamente fechado após a preparação de cada uma das amostras, controlos e calibradores, sob pena de perda das substâncias presentes na matriz.

No caso das amostras reais, estas são previamente colocadas no homogeneizador durante, pelo menos, 10 minutos, sob agitação suave, de acordo com o procedimento vigorativo no Serviço de Química e Toxicologia Forenses.

3.1.6. PREPARAÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO

A curva de calibração foi elaborada com sete pontos distribuídos uniformemente ao longo da gama de trabalho. A preparação dos calibradores realizou-se da forma descrita no ponto 3.1.5, substituindo, porém, do volume de amostra utilizado por um igual volume da solução de trabalho, tal como apresentado na tabela 4.

Tabela 4 – Preparação dos Calibradores

	Solução de Trabalho de Padrões de Referência	Solução de PI a 0.1g/L
Calibrador 1 (50mg/L)	0.1 mL	1 mL
Calibrador 2 (350mg/L)	0.1 mL	1 mL
Calibrador 3 (650mg/L)	0.1 mL	1 mL
Calibrador 4 (950mg/L)	0.1 mL	1 mL
Calibrador 5 (1250mg/L)	0.1 mL	1 mL
Calibrador 6 (1700mg/L)	0.1 mL	1 mL
Calibrador 7 (2000mg/L)	0.1 mL	1 mL

3.1.7. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE CONTROLO DE QUALIDADE INTERNO

Foram selecionados, para este parâmetro, três controlos positivos (100, 800 e 1500 mg/L), devidamente espaçados e distribuídos ao longo da gama de trabalho, e um controlo negativo.

A função dos controlos positivos é a de determinar os tempos de retenção relativos (TRR) das substâncias voláteis em estudo e avaliar a exatidão do método analítico em cada uma das séries analisadas. A amostra negativa possui um papel fundamental, uma vez que permite detetar a ocorrência de contaminações, arrastamentos e o efeito de matriz.

Desta forma, a preparação das amostras de controlo de qualidade interno positivas ocorreu, tal como apresentado na tabela 5, através da adição de 100 µL da solução de trabalho de padrões de referência a 1 mL de padrão interno (acetonitrilo). Substituindo-se o volume da solução de trabalho por um volume equivalente de água *MilliQ*, obteve-se o controlo negativo. É, ainda, de salientar, que todos os controlos devem ser preparados e analisados contemporaneamente com as amostras de rotina.

Tabela 5 – Preparação dos CQI

	Solução de trabalho de padrões de referência	Solução de PI a 0.1 g/L
Controlo positivo (100mg/L)	0.1 mL	1 mL
Controlo positivo (800mg/L)	0.1 mL	1 mL
Controlo positivo (1500mg/L)	0,1 mL	1 mL
Controlo negativo	–	1 mL



PARTE IV

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO ANALÍTICO

4.1.1. CONDIÇÕES DA ANÁLISE CROMATOGRÁFICA

Numa primeira fase, recorreu-se a uma intensa pesquisa bibliográfica, de forma a possuir uma base prévia às subseqüentes tentativas efetuadas. Uma vez que o tipo de colunas utilizado leva a diferentes ordens de eluição e, conseqüentemente, tempos de retenção, este foi um dos fatores a ter em conta na criação do método.

A utilização de 16 substâncias com pesos moleculares entre os 34.04 (metanol) e os 88.15 (2-metil-1-butanol, 3-metil-1-butanol e 1-pentanol) acrescida ao facto de estas apresentarem uma amplitude de pontos de ebulição muito significativa (20.2 °C para o acetaldeído e 138 °C para o 1-pentanol), levou a que fosse necessário incluir um gradiente térmico no método cromatográfico.

Inicialmente, utilizou-se um programa de temperaturas semelhante àquele que foi posteriormente validado, figura 3, no qual após serem atingidos os 100 °C, foi implementado um post-run, diminuindo imediatamente até ao valor inicial (40 °C). Porém, após injeção de cada uma das substâncias em estudo, foi possível observar que todas eluíram no intervalo de tempo definido, com excessão do 1-pentanol, para o qual se obtinha um pico largo, com pouca definição (figura 2 em cima). De forma a avaliar a influência do tempo à temperatura máxima, alterou-se o método para que, após atingidos os 100 °C, estes fossem mantidos durante 2 minutos antes de voltar à temperatura inicial. Desta forma, obteve-se uma perfeita definição do pico em causa (figura 2 em baixo). Uma vez que a otimização do tempo de resposta numa análise de rotina constitui um fator preponderante na obtenção de resultados no intervalo de tempo mais curto possível, e percebendo-se que a conservação de apenas 1 minuto aos 100 °C levaria aos mesmos resultados, optou-se por esta redução de tempo, que completa uma corrida de 13 minutos com uma separação cromatográfica bastante satisfatória (figura 3).

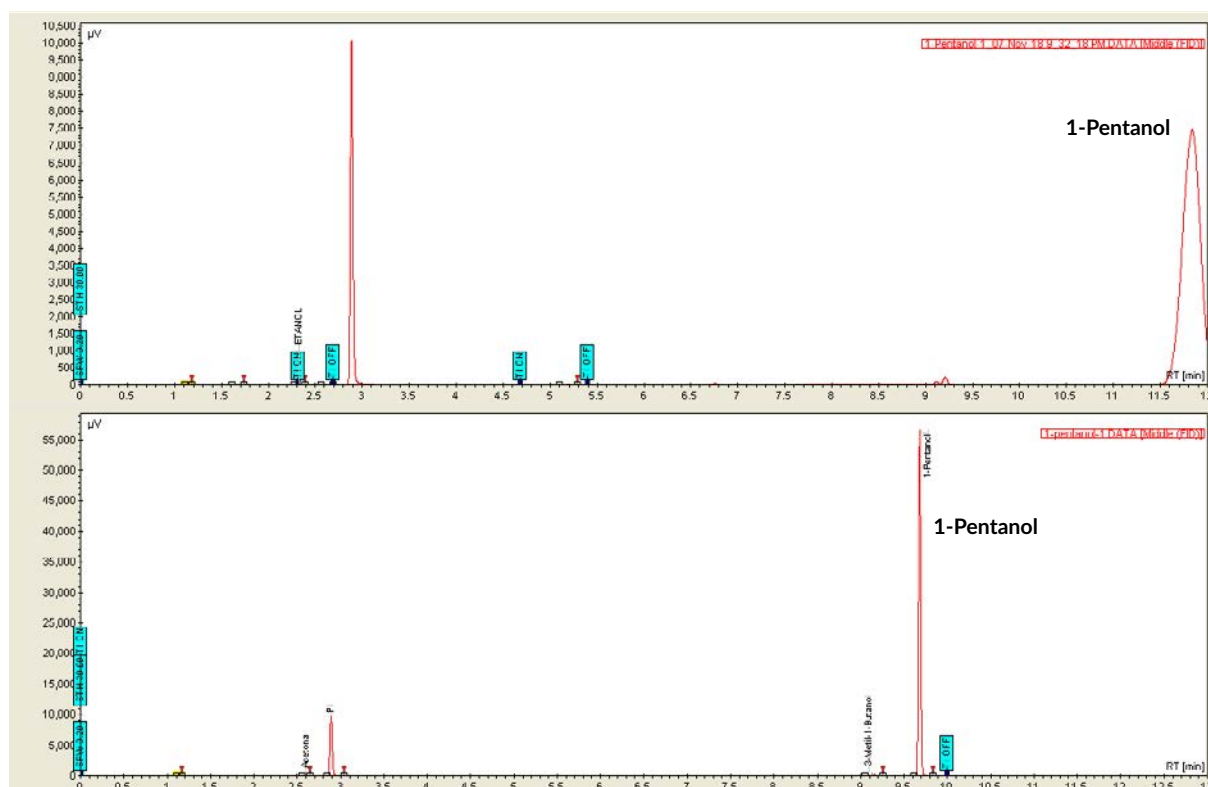


Figura 2 – Cromatogramas registados para o padrão 1-pentanol: (em baixo) usando o programa de temperaturas apresentado na v; (em cima) um programa de temperaturas similar, mas sem isotérmica de 1 minuto aos 100 °C

Obeve-se, assim, o seguinte método: a temperatura do forno mantém-se, inicialmente, a 40 °C durante 6 minutos, seguindo-se de um aumento da temperatura a uma taxa de 20 °C/min até aos 100 °C, onde é mantida por 1 minuto. Finalmente, ocorre uma diminuição à temperatura inicial, o que totaliza uma corrida de 13 minutos.

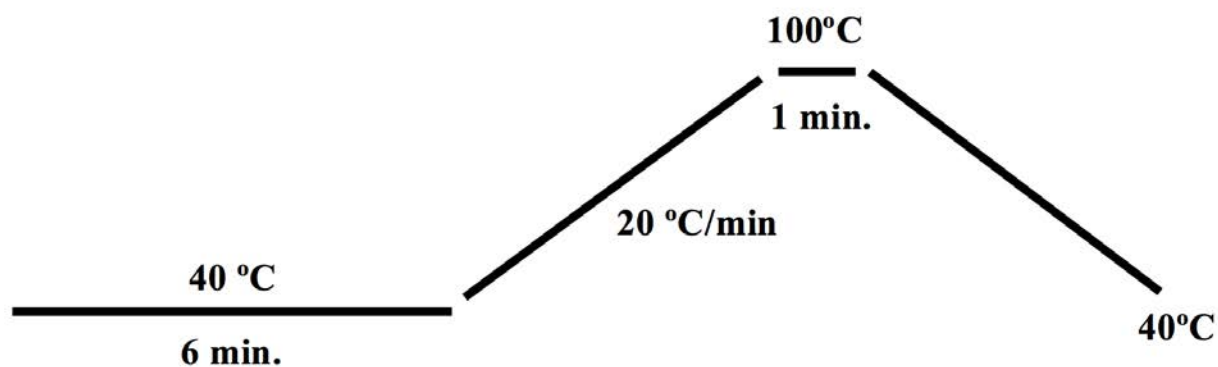


Figura 3 – Esquema ilustrativo da rampa de temperaturas utilizada no método cromatográfico

As temperaturas do injetor e dos detetores foram de 90 °C e 290 °C, respectivamente, e os fluxos de gás foram os seguintes:

- Hidrogénio: 30,0 mL/min; Ar: 300 mL/min; Azoto: 25,0 mL/min; Hélio: 2,5 mL/min.

Relativamente ao *headspace*, a temperatura do forno foi de 80 °C, com incubação por 10 minutos sob agitação a 250 rpm, e a da seringa 70 °C, utilizando-se um volume de injeção de 0,5 mL.

4.1.2. IDENTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS

Tendo em conta que a identificação das substâncias é elaborada com base na análise e comparação dos tempos de retenção relativos, foram preparadas soluções de cada uma das substâncias, isoladamente. Após preparação de *vials* com 1 mL de padrão interno e 100 µL da solução a analisar, estes foram injetados utilizando-se o método construído. Para além disto, os controlos a 100, 800 e 1500 mg/L, foram, também eles analisados, confirmando-se os tempos de retenção de cada uma das substâncias em estudo e garantindo a sua total separação cromatográfica (figura 4 e tabela 6).

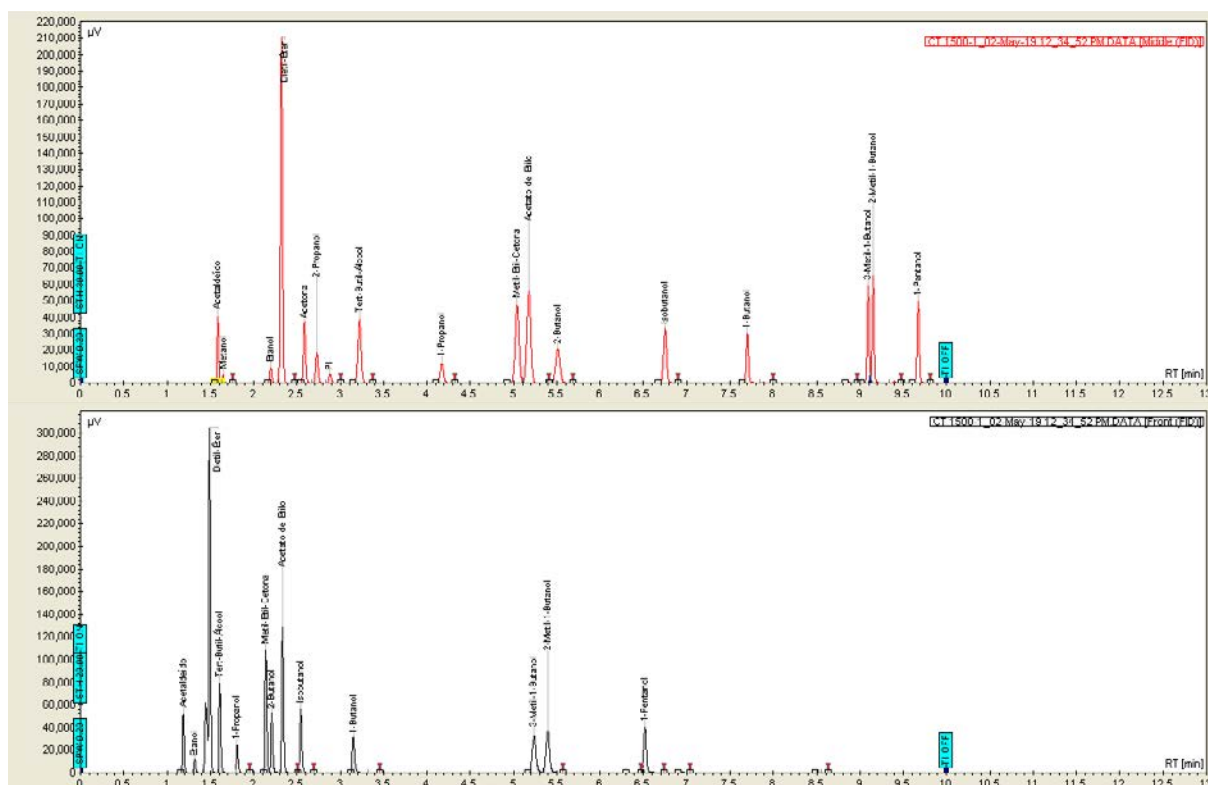


Figura 4 – Cromatograma da solução de controlo a 1500mg/L, colunas VF-5ms (em cima), VF-624ms (em baixo)

De forma a garantir que todos os voláteis em estudo fossem devidamente identificados e indubitavelmente distinguidos dos demais, foram utilizadas duas colunas capilares com polaridades diferentes. A coluna utilizada na identificação e quantificação de todos os VOCs é a VF-5ms da *Varian*. A segunda, VF-624ms, foi utilizada como coluna de confirmação no caso de falsos positivos, uma vez que as ordens de retenção e de eluição diferem da primeira coluna, permitindo esta verificação.

Tabela 6 – Tempos de retenção das substâncias em estudo nas duas colunas cromatográficas (VF5-ms e VF-624ms).

Analito	t/min.	
	VF-5ms (min.)	VF-624ms (min.)
Acetaldeído	1,59	1,19
Metanol	1,65	1,18
Etanol	2,20	1,32
Dietil-éter	2,33	1,50
Acetona	2,59	1,45
2-Propanol	2,74	1,47
Acetonitrilo (Padrão interno)	2,89	1,44
t-Butanol	3,23	1,61
n-Propanol	4,18	1,81
Metil-etil-cetona	5,05	2,15
Acetato de etilo	5,19	2,34
2-Butanol	5,52	2,21
Isobutanol	6,76	2,55
n-Butanol	7,71	3,16
3-Metil-1-butanol	9,10	5,24
2-Metil-1-butanol	9,15	5,40
1-Pentanol	9,68	6,53

4.2. VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO DESENVOLVIDO

O método desenvolvido foi validado de acordo com os parâmetros descritos na norma SWGTOX, que se dividem em qualitativos e quantitativos.⁵⁰ Uma vez que, no presente estudo, todas as substâncias foram identificadas e quantificadas, todos os critérios apresentados na tabela 7 foram aplicados a todas elas, sendo apresentados, de seguida, os resultados obtidos para cada uma.

Tabela 7 – Parâmetros de validação do método analítico desenvolvido

Parâmetro	Qualitativo	Quantitativo
Especificidade/seletividade	•	•
Limite de deteção	•	•
Limite de quantificação		•
Linearidade e modelo de calibração		•
Repetibilidade		•
Precisão intermédia		•
Exatidão		•
Estabilidade	•	•
Robustez	•	•
Carryover	•	•
Bias		•
Análise de interferentes	•	•

4.2.1. SELETIVIDADE/ESPECIFICIDADE

De forma a avaliar a seletividade do método em estudo, procedeu-se, numa primeira fase, ao agrupamento aleatório de 24 amostras biológicas brancas (sangue urina e humor vítreo) de acordo com a tabela 8. Após preparação de *pools* de volume adequado de cada uma destas matrizes, estas foram homogeneizadas, tendo sido, posteriormente, preparadas duas alíquotas a partir de cada *pool*. A primeira foi analisada diretamente, apenas com a adição padrão interno, sendo que a segunda foi fortificada com a mistura de substâncias em análise à concentração de 100 mg/L.

Tabela 8 – Agrupamento de amostras brancas para o estudo da seletividade

Código	Tipo de amostra	Idade	Sexo	Informação	Análises
A1	SP	55	M	Cadáver no domicílio.	A, DA, MD, P
	SP	42	M	Acidente de carro. Insulinodependente	A,DA,MD
	SP	65	M	Queda de um lugar elevado	A,DA,MD,P
A2	SP	55	M	Enforcamento e intoxicação com pesticidas	A,DA,MD,P
	SP	89	M	Causa desconhecida	A,DA,MD,V
	SP	35	M	Acidose metabólica grave.	DA, MD
A3	SP	55	M	Causa desconhecida	DA, MD, P
	Sg	39	F	Carbonização	A, MD, MC
	SP	35	F	Inconsciente no wc com esquentador	A,DA,MD,MC,P
A4	SP	44	M	Decapitação por comboio.	A,D,MD,MC,P
	SP	79	M	Morte natural.	A, MD
	SP	64	M	Acidente de trator	A, DA
A5	SP	52	M	Afogamento	A,MD
	SP	88	M	Combustão	A,MD,DA
	SP	78	F	Morte súbita em casa.	A, MD, DA, P
A6	SP	52	F	Fumadora. Incêndio em casa.	A, DA, MD, MC, P
	SP	64	M	Morte súbita. Insulinodependente.	A, DA, MD, P
	SP	52	M	Morte numa estufa a pintar carros.	A, DA, MD, P, V
A7	Sg	59	M	Peão. Interveniente em acidente.	A, DA
	Sg	-	M	-	A
	Sg	44	M	Condutor. Interveniente em acidente.	A, DA
A8	H2O	-	-	-	-
A9	Urina	-	-	-	-
A10	Humor Vítreo	62	F	Causa Desconhecida	A, MD

Abreviaturas: SP (Sangue Periférico); Sg (Sangue); M (Masculino); F (Feminino); A (Alcoolemia); DA (Drogas de Abuso); MD (Medicamentos); P (Pesticidas); MC (Monóxido de Carbono) V (Voláteis); - (Informação não disponível).

Através da análise dos resultados obtidos, foi possível concluir acerca da inexistência de falsos positivos e negativos. Assim, a percentagem de ambos foi de 0%, cumprindo-se os critérios de aceitação dos parâmetros avaliados (0% para falsos positivos e menos de 10% para falsos negativos). Desta forma, as alíquotas fortificadas apresentaram resultados positivos (confirmados através da análise dos tempos de retenção) e as não fortificadas, resultados negativos, tal como seria de esperar (figuras 5 e 6). É possível, ainda, observar a ocorrência de uma contaminação aos tempos de retenção de 3.09 e 1.8 minutos nas colunas VF-5ms e VF-624ms, respetivamente que, no entanto, não interferiu na correta interpretação dos resultados e consequente quantificação e identificação das substâncias voláteis em estudo.

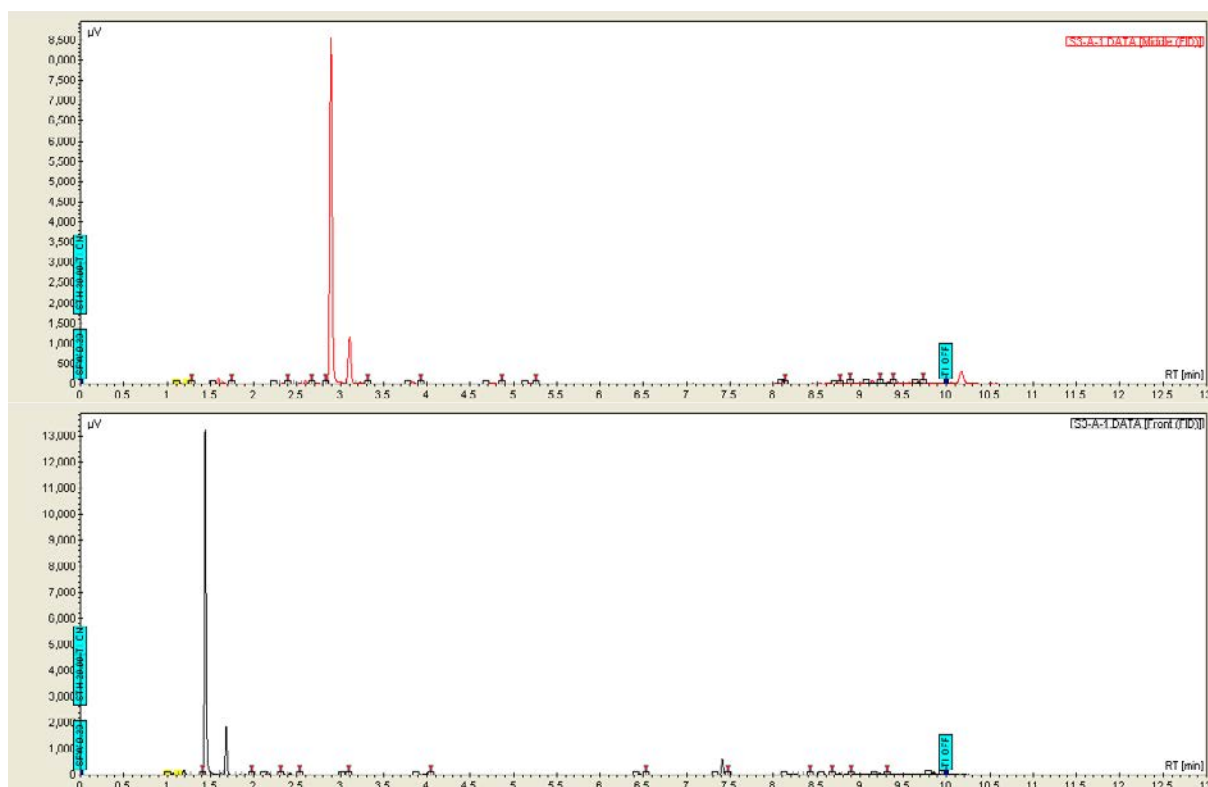


Figura 5 – Cromatograma obtido para a amostra de sangue sem fortificação - colunas VF-5ms (em cima) e VF-624ms (em baixo)

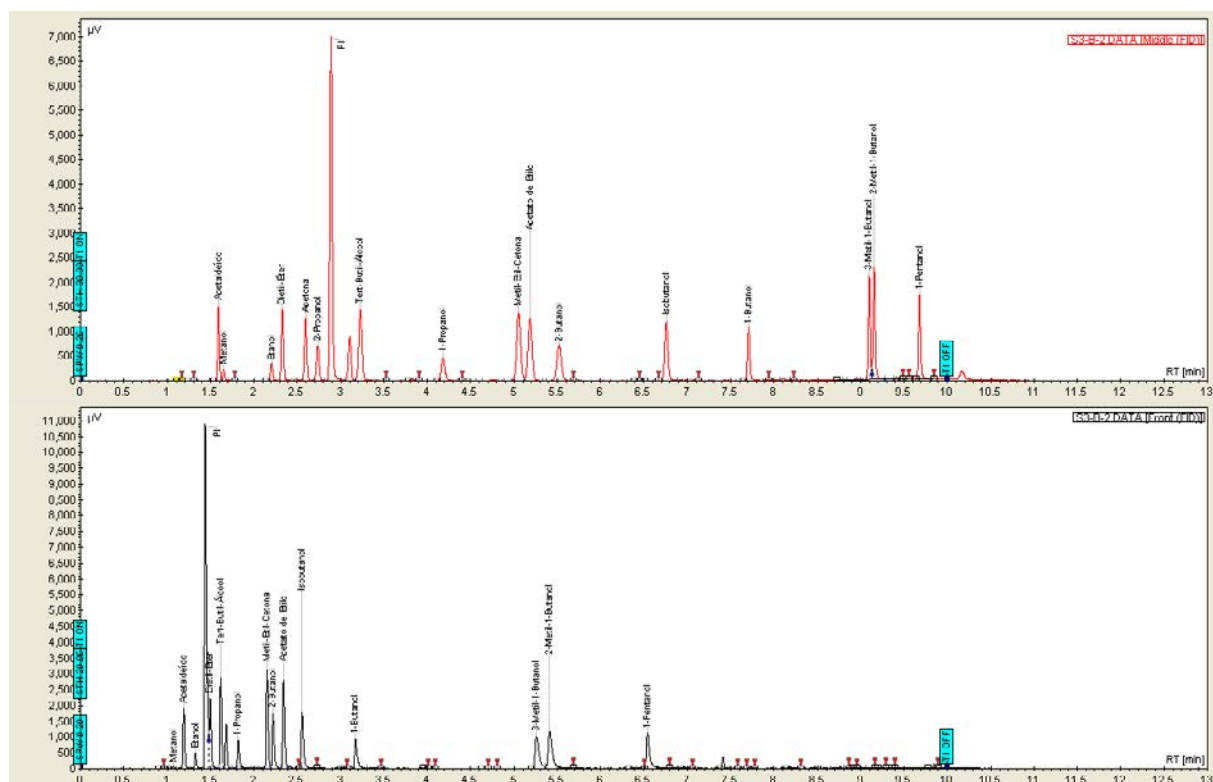


Figura 6 – Cromatogramas obtidos para a amostra de sangue fortificada com os analitos em estudo, 100 mg/L – colunas VF-5ms (em cima) e VF-624ms (em baixo)

4.2.2. INTERFERENTES

De forma a estudar a possibilidade de presença de interferentes que possam condicionar a correta interpretação dos resultados analíticos obtidos, selecionaram-se e analisaram-se, individualmente, as substâncias: diclorometano, *n*-hexano, 1-clorobutano, clorofórmio, tolueno, trimetilclorosilano (TMS), amoníaco, *m*-xileno, *p*-xileno e *o*-xileno.

A coluna utilizada para a análise das diferentes substâncias é a VF-5ms, sendo que a coluna VF-624ms é utilizada com a função de confirmação dos resultados obtidos, devendo ser sempre tomada em conta.

Os primeiros 4 compostos exibiram tempos de retenção diferentes de qualquer uma das substâncias analisadas no presente estudo, eluindo dentro do intervalo de corrida de 13 minutos. Em relação às substâncias *m*-xileno, *p*-xileno, *o*-xileno e amoníaco estas não eluem neste intervalo de tempo, não interferindo, deste modo, nos resultados obtidos.

Apesar de o tolueno e o trimetilclorosilano possuírem tempos de retenção próximos aos dos compostos em estudo, cada uma destas substâncias é identificada de diferentes forma nas duas colunas. Assim, devido a esta separação, é possível averiguar a presença destes compostos numa amostra. Na tabela 9, encontram-se apresentados os tempos de retenção obtidos para os possíveis interferentes.

Tabela 9 – Tempos de retenção das substâncias interferentes

Analito	t/min.	
	VF-624ms	VF-5ms
Diclorometano	1.68	3.11
<i>n</i> -Hexano	2.16	3.83
1-Clorobutano	2.93	6.36
Clorofórmio	2.52	5.80
Tolueno	6.46	9.15
TMS	1.87	5.03
Amoníaco	-	-
<i>m</i> -Xileno	-	-
<i>p</i> -Xileno	-	-
<i>o</i> -Xileno	-	-

4.2.3. ANÁLISE DOS LIMITES DE DETEÇÃO E QUANTIFICAÇÃO

A análise dos limites de detecção e quantificação das substâncias em estudo foi elaborada com base na preparação de curvas de calibração. Procedeu-se, assim, à fortificação de amostras brancas com concentrações próximas às do limite de detecção previsto. Optou-se por concentrações entre 1 e 90 mg/L para a elaboração das soluções de trabalho (de acordo com o ponto 3.1.4.2.) e posterior obtenção das respetivas curvas de calibração.

Após análise e tratamento dos dados, calcularam-se os Limites de Detecção (LOD) e de Quantificação (LOQ) através das equações (1), secção 2.8.4., e (2), secção 2.8.5, encontrando-se os resultados obtidos evidenciados, de forma resumida, na tabela 10. Os resultados pormenorizados encontram-se no anexo 7.1.

Tabela 10 – Resultados obtidos para os limites de detecção e de quantificação das substâncias em estudo

Composto	Equação da reta	R ²	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)
Acetaldeído	Y=0.0007x+0.0024	0.9989	4	11
Metanol	Y=0.0002x+0.0004	0.9954	7	21
Etanol	Y=0.0007x-0.001	0.9950	8	24
Dietil-éter	Y=0.0117x-0.0232	0.9978	6	17
Acetona	Y=0.0025x+0.0015	0.9998	2	5
2-Propanol	Y=0.0015x+0.0009	0.9996	2	7
t-Butanol	Y=0.0036x+0.0149	0.9987	5	15
n-Propanol	Y=0.0014x-0.0021	0.9970	7	20
Metil-etil-cetona	Y=0.0052x-0.0002	0.9998	1	4
Acetato de etilo	Y=0.0057x-0.0025	0.9998	2	5
2-Butanol	Y=0.0032x-0.001	0.9991	3	10
Isobutanol	Y=0.0029x-0.0006	0.9991	4	11
n-Butanol	Y=0.003x-0.0027	0.9980	5	16
3-Metil-1-butanol	Y=0.0045x-0.0017	0.9988	5	12
2-Metil-1-butanol	Y=0.0044x+0.0008	0.9995	3	8
1-Pentanol	Y=0.0035x-0.0017	0.9984	5	14

O critério para a determinação dos limites de detecção e quantificação é a obtenção de um coeficiente de determinação superior a 95% e 98%, respetivamente. Todas as retas possuíram um coeficiente de correlação superior a 0.99, tendo sido obtidos valores de limites de detecção entre 1 e 8 mg/L e limites de quantificação entre 4 e 24 mg/L para o grupo de substâncias estudadas.

4.2.4. LINEARIDADE

De forma a analisar a linearidade do método em estudo, utilizaram-se dez calibradores, devidamente distanciados ao longo do intervalo de concentrações em estudo.

Após obtenção dos resultados, avaliou-se o coeficiente de determinação, os resíduos, a interceção da reta na origem e a homocedasticidade, encontrando-se os resultados de cada um dos parâmetros evidenciados na tabela 11. Todos os resultados da linearidade encontram-se no anexo 7.2.

Tabela 11 – Resultados obtidos na avaliação da linearidade do método (Fc: F crítico; Fexp. F experimental)

Composto	TR/min.	Equação da reta	R ²	Intervalo da interceção do Y0		Homocedasticidade	
				95% sup.	95%inf.	Fcri.	Fexp.
Acetaldeído	1.58	Y=0.0025x+0.0307	0.9961	+0.1890	-0.1275	6.4	1074.8
Metanol	1.64	Y=0.0003x-0.0161	0.9911	+0.0074	-0.0396	6.4	201.9
Etanol	2.19	Y=0.0007x-0.0359	0.9922	+0.0132	-0.0850	6.4	105.4
Dietil-éter	2.31	Y=0.0141x+0.0808	0.9943	+1.123	-0.9612	6.4	1410.3
Acetona	2.58	Y=0.0023x+0.0051	0.9983	+0.1032	-0.0930	6.4	1420.7
2-Propanol	2.72	Y=0.0015x-0.0461	0.9972	+0.0335	-0.1256	6.4	712.2
t-Butanol	3.21	Y=0.0038x-0.107	0.9981	+0.0591	-0.2730	6.4	1413.1
n-Propanol	4.16	Y=0.0014x+0.0564	0.9939	+0.0560	-0.1689	6.4	1025.2
Metil-etil-cetona	5.02	Y=0.0057x+0.0446	0.9975	+0.3333	-0.2441	6.4	1108.4
Acetato de etilo	5.16	Y=0.0067x+0.091	0.9956	+0.5389	-0.3569	6.4	763.6
2-Butanol	5.49	Y=0.0028x-0.0668	0.9981	+0.0608	-0.1944	6.4	1890.7
Isobutanol	6.74	Y=0.0034x-0.0654	0.9986	+0.0616	-0.1924	6.4	5177.5
n-Butanol	7.69	Y=0.0022x-0.0687	0.9959	+0.0767	-0.2141	6.4	3359.0
3-Metil-1-butanol	9.09	Y=0.0037x-0.1057	0.9976	+0.0800	-0.2914	6.4	14395.3
2-Metil-1-butanol	9.14	Y=0.0041x-0.072	0.9979	+0.1207	-0.2648	6.4	10293.4
1-Pentanol	9.66	Y=0.0034x-0.0988	0.997	+0.0918	-0.2893	6.4	15329.2

Na avaliação deste parâmetro foi possível concluir que todas as substâncias cumpriram os critérios de validação, nomeadamente em termos de coeficiente de correlação (>0.99), interceção da reta na origem, e distribuição residual. A homocedasticidade não se verificou para nenhuma das substâncias (anexo 7.3.), tendo sido aplicado, desta forma, um fator de ponderação (anexo 7.4.). Este fator foi selecionado tendo em conta os desvios, resíduos, coeficiente de correlação e, ainda, estabilidade da reta. Assim atribui-se um fator de ponderação de $1/x^2$ para todos os analitos, com exceção do etanol, metanol, dietil-éter, *t*-butanol e metil-etil-cetona aos quais foi conferido um fator de $1/x$.

4.2.5. VERIFICAÇÃO DO LIMAR ANALÍTICO DE QUANTIFICAÇÃO

De forma a testar o limite de quantificação das substâncias voláteis em estudo, procedeu-se à preparação de cinco replicados independentes, à concentração de 50 mg/L (ponto mais baixo da gama de trabalho).

Após obtenção dos resultados, calculou-se o coeficiente de variação (%CV) e o erro em relação ao valor teórico ($|\%RE|$), tal como apresentado na tabela 12.

Tabela 12 – Resultados obtidos no teste ao limiar analítico de quantificação

Composto	Média (mg/L)	Desvio Padrão (%)	CV (%)	Erro (%)
Acetaldeído	49.0	2.3	4.7	1.9
Metanol	53.1	3.7	7.0	6.2
Etanol	47.2	0.7	1.6	5.5
Dietil-éter	47.6	2.5	5.3	4.7
Acetona	52.9	1.9	3.6	5.8
2-Propanol	46.5	2.2	4.7	7.0
<i>t</i> -Butanol	50.5	1.4	2.7	1.0
<i>n</i> -Propanol	55.0	0.5	0.9	9.9
Metil-etil-cetona	47.2	1.7	3.7	5.7
Acetato de etilo	52.2	2.0	3.8	4.3
2-Butanol	47.4	1.3	2.7	5.1
Isobutanol	47.8	1.7	3.6	4.4
<i>n</i> -Butanol	53.5	2.0	3.8	6.7
3-Metil-1-butanol	54.4	1.2	2.2	8.7
2-Metil-1-butanol	49.6	1.4	2.7	0.7
1-Pentanol	51.5	1.8	3.4	2.9

Os resultados obtidos demonstram a obtenção de um coeficiente de variação, bem como um erro $\leq 10\%$ para todas as substâncias, com médias bastante próximas ao valor real.

4.2.6. REPETIBILIDADE

A repetibilidade foi estudada em simultâneo com a precisão intermédia, tendo sido injetadas soluções às concentrações de 100, 800 e 1500 mg/L em quintuplicado (anexo 7.3.). Os resultados obtidos para os tempos de retenção relativos, média das concentrações obtidas, desvios padrão e coeficientes de variação encontram-se apresentados na tabela 13. Os restantes resultados localizam-se no anexo 7.5.

Tabela 13 – Resultados obtidos na avaliação da repetibilidade

Composto	Concentração (mg/L)	TRR	Média $A_{sub.}/A_{PI}$	Desv. Pad. $A_{sub.}/A_{PI}$	CV (%) $A_{sub.}/A_{PI}$
Acetaldeído	100	0.551	0.250	0.011	4.4
	800	0.549	2.135	0.053	2.5
	1500	0.549	3.898	0.082	2.1
Metanol	100	0.573	0.030	0.001	4.9
	800	0.573	0.241	0.014	6.0
	1500	0.573	0.481	0.023	4.7
Etanol	100	0.763	0.061	0.002	3.6
	800	0.763	0.515	0.025	4.9
	1500	0.763	1.036	0.036	3.5
Dietil-éter	100	0.806	1.373	0.088	6.4
	800	0.806	13.511	0.397	2.9
	1500	0.806	25.111	1.421	5.6
Acetona	100	0.898	0.241	0.006	2.6
	800	0.897	2.038	0.034	1.7
	1500	0.897	3.765	0.050	1.3
2-Propanol	100	0.948	0.141	0.004	3.1
	800	0.948	1.192	0.024	2.0
	1500	0.948	2.307	0.038	1.6
t-Butanol	100	1.118	0.390	0.010	2.6
	800	1.118	3.269	0.013	0.4
	1500	1.118	6.187	0.034	0.6
n-Propanol	100	1.448	0.129	0.005	3.5
	800	1.447	1.101	0.033	3.0
	1500	1.448	2.160	0.052	2.4
Metil-etil-cetona	100	1.749	0.553	0.020	3.6
	800	1.750	4.733	0.095	2.0
	1500	1.750	8.697	0.161	1.8
Acetato de etilo	100	1.795	0.643	0.033	5.0
	800	1.795	5.733	0.140	2.4
	1500	1.795	10.470	0.294	2.8

Tabela 13 – (continuação)

Composto	Concentração (mg/L)	TRR	Média $A_{sub.}/A_{PI}$	Desv. Pad. $A_{sub.}/A_{PI}$	CV (%) $A_{sub.}/A_{PI}$
2-Butanol	100	1.910	0.274	0.007	2.7
	800	1.910	2.297	0.016	0.7
	1500	1.910	4.374	0.034	0.8
Isobutanol	100	2.341	0.317	0.007	2.1
	800	2.341	2.669	0.007	0.3
	1500	2.334	5.032	0.034	0.7
n-Butanol	100	2.674	0.211	0.006	2.8
	800	2.674	1.793	0.028	1.6
	1500	2.674	3.433	0.055	1.6
3-Metil-1-butanol	100	3.156	0.342	0.007	2.1
	800	3.156	2.925	0.011	0.4
	1500	3.156	5.522	0.060	1.1
2-Metil-1-butanol	100	3.177	0.409	0.008	2.0
	800	3.177	3.341	0.011	0.3
	1500	3.177	6.222	0.067	1.1
1-Pentanol	100	3.358	0.326	0.008	2.5
	800	3.358	2.748	0.009	0.3
	1500	3.358	5.161	0.073	1.4

4.2.7. PRECISÃO INTERMÉDIA

Para avaliar a precisão intermédia, analisaram-se diferentes curvas de calibração com sete pontos, durante cinco dias e, simultaneamente, três controlos às concentrações baixa, média e alta da gama de trabalho (100 mg/L, 800 mg/L e 1500 mg/L). Desta forma, foi possível estudar as principais fontes de variabilidade que simulam o normal funcionamento do laboratório (e.g. diferentes curvas de calibração, dias e condições laboratoriais).

Prepararam-se, assim, soluções com concentrações entre 50 e 2000 mg/L devidamente distanciadas, tendo sido os resultados obtidos analisados através da ferramenta ANOVA (fator único) como apresentado na tabela 14. Todos os resultados obtidos para a precisão intermédia encontram-se no anexo 7.6.

Tabela 14 – Resultados obtidos no estudo da precisão intermédia

Composto	Concentração (mg/L)	CV (%)
Acetaldeído	100	12.2
	800	13.7
	1500	14.3
Metanol	100	16.5
	800	4.6
	1500	4.7
Etanol	100	5.7
	800	4.1
	1500	3.3
Dietyl-éter	100	13.6
	800	16.7
	1500	16.6
Acetona	100	5.7
	800	4.7
	1500	6.1
2-Propanol	100	5.9
	800	2.9
	1500	5.9
t-Butanol	100	4.2
	800	4.0
	1500	2.1
n-Propanol	100	6.0
	800	3.6
	1500	6.6
Metil-etil-cetona	100	3.5
	800	3.8
	1500	4.0
Acetato de etilo	100	4.1
	800	4.8
	1500	4.8
2-Butanol	100	5.0
	800	3.4
	1500	3.4
Isobutanol	100	3.7
	800	2.1
	1500	2.0
n-Butanol	100	4.3
	800	2.8
	1500	4.3
3-Metil-1-butanol	100	4.2
	800	2.1
	1500	2.4
2-Metil-1-butanol	100	3.5
	800	3.4
	1500	2.3
1-Pentanol	100	6.2
	800	2.5
	1500	3.6

Tal como é possível observar e, sendo este parâmetro avaliado através do coeficiente de variação, obtiveram-se valores abaixo de 10% para todas as substâncias, exceto para o acetaldeído, dietyl-éter e metanol, este à concentração mais baixa, garantindo-se, ainda assim, um CV(%) abaixo de 20% para estes analitos, de acordo com a norma SWGTOX.

4.2.8. LIMITE DE REPETIBILIDADE

O cálculo do limite de repetibilidade absoluto, para um intervalo de confiança de 95% é efetuado a partir da equação $1.96\sqrt{2} \times S_r$ ou, de forma mais simplificada $2.8 \times S_r$. O valor do limite de repetibilidade relativo obtém-se dividindo o resultado obtido nesta equação, pela concentração utilizada. Desta forma, obtêm-se os limites dentro dos quais todas as medições devem ser inseridas.

Calculou-se o limite de repetibilidade relativo para cada uma das substâncias às concentrações de 100, 800 e 1500mg/L, obtendo-se valores de 9%, 11% e 14%, respetivamente. De acordo com estes resultados, optou-se pelo valor obtido para a concentração mais baixa (tabela 15), uma vez que este permite a obtenção de um maior rigor nos resultados obtidos. Os limites de repetibilidade obtidos para as concentrações de 800 e 1500 mg/L encontram-se em anexo (7.7).

Tabela 15 – Resultados obtidos para o limite de repetibilidade relativo à concentração de 100 mg/L

Composto	Limite de repetibilidade relativo (%)
Acetaldeído	5.9
Metanol	20.7
Etanol	24.9
Dietil-éter	5.9
Acetona	5.0
2-Propanol	8.4
t-Butanol	6.7
n-Propanol	10.4
Metil-etil-cetona	5.0
Acetato de etilo	3.4
2-Butanol	9.0
Isobutanol	6.7
n-Butanol	10.4
3-Metil-1-butanol	5.0
2-Metil-1-butanol	3.9
1-Pentanol	6.2
Média	= 9%

4.2.9. EXATIDÃO

A exatidão foi estudada em simultâneo com a precisão intermédia, tendo sido avaliada nas três concentrações (baixa, média e alta), como apresentado. Obtiveram-se, tal como se verifica na tabela 16, resultados que satisfazem os critérios do laboratório, para todas as substâncias em estudo. Os resultados pormenorizados encontram-se no anexo 7.6.

Tabela 16 – Resultados obtidos na avaliação da exatidão do método

Composto	Concentração (mg/L)	Exatidão (%)
Acetaldeído	100	104.8
	800	104.7
	1500	104.1
Metanol	100	96.0
	800	101.1
	1500	100.4
Etanol	100	100.9
	800	100.1
	1500	100.1
Dietyl-éter	100	94.0
	800	98.4
	1500	97.0
Acetona	100	104.8
	800	104.9
	1500	105.5
2-Propanol	100	98.1
	800	101.3
	1500	101.0
<i>t</i> -Butanol	100	104.2
	800	103.4
	1500	102.5
<i>n</i> -Propanol	100	95.1
	800	99.8
	1500	100.7
Metil-etil-cetona	100	104.8
	800	103.7
	1500	104.3
Acetato de etilo	100	103.6
	800	103.0
	1500	102.3
2-Butanol	100	99.8
	800	100.9
	1500	100.2
Isobutanol	100	100.9
	800	102.1
	1500	101.5
<i>n</i> -Butanol	100	98.3
	800	101.6
	1500	100.8
3-Metil-1-butanol	100	100.9
	800	103.5
	1500	102.2
2-Metil-1-butanol	100	100.4
	800	100.5
	1500	100.3
1-Pentanol	100	98.4
	800	100.9
	1500	99.6

4.2.10. BIAS

Aliado ao estudo da precisão e da exatidão, calculou-se o *bias* associado a cada uma das substâncias em estudo (anexo 7.8.). Os resultados obtidos encontram-se resumidos na tabela 17.

Tabela 17 - Resultados obtidos na análise do *Bias*

Composto	Concentração (mg/L)	Média (mg/L)	Bias (%)
Acetaldeído	100	104.8	4.8
	800	837.3	4.7
	1500	1561.0	4.1
Metanol	100	96.0	4.0
	800	808.8	1.1
	1500	1505.1	0.3
Etanol	100	100.9	0.9
	800	801.0	0.1
	1500	1501.1	0.1
Dietyl-éter	100	94.0	6.0
	800	787.3	1.6
	1500	1454.5	3.0
Acetona	100	104.8	4.8
	800	839.5	4.9
	1500	1582.8	5.5
2-Propanol	100	98.1	1.9
	800	810.1	1.3
	1500	1514.8	1.0
t-Butanol	100	104.2	4.2
	800	827.0	3.4
	1500	1537.2	2.5
n-Propanol	100	95.1	4.9
	800	798.4	0.2
	1500	1510.9	0.7
Metil-etil-cetona	100	103.0	3.0
	800	827.8	3.5
	1500	1563.4	4.2
Acetato de etilo	100	103.6	3.6
	800	823.9	3.0
	1500	1534.9	2.3
2-Butanol	100	99.8	0.2
	800	807.3	0.9
	1500	1502.9	0.2
Isobutanol	100	100.9	0.9
	800	816.7	2.1
	1500	1522.9	1.5
n-Butanol	100	98.3	1.7
	800	813.1	1.6
	1500	1511.4	0.8
3-Metil-1-butanol	100	101.0	1.0
	800	822.2	2.8
	1500	1521.8	1.4
2-Metil-1-butanol	100	100.4	0.4
	800	804.0	0.5
	1500	1505.0	0.3
1-Pentanol	100	98.4	1.6
	800	807.2	0.9
	1500	1494.4	0.4

O *bias* máximo obtido para as substâncias em estudo foi de 6.0%, bastante abaixo dos 20% e, até, dos 10% (norma SWGTOX).

4.2.11. ROBUSTEZ

A robustez pode ser avaliada através de diferentes parâmetros. No presente estudo foram avaliados os que se encontram, de seguida, apresentados.

- Utilização de diferentes pipetas;
- Utilização de diferentes doseadores;
- Substituição do liner;
- Execução por outro técnico.

Para todas as alterações efetuadas foi possível verificar a obtenção de resultados concordantes e reprodutíveis.

4.2.12. ARRASTAMENTO

O presente parâmetro foi estudado para as concentrações de 2000 mg/L, 1500 mg/L e 1000 mg/L. Foram, para isso, injetados *vials* com a mistura das substâncias em estudo, tendo sido colocada, entre cada um, uma amostra branca. Verificou-se a inexistência de arrastamento para qualquer uma das concentrações, o que é um resultado bastante positivo.

4.2.13. ESTABILIDADE

4.2.13.1. Estabilidade da reta de calibração

De forma a estudar o presente parâmetro, foram elaboradas retas em três dias diferentes (dias 1, 2 e 4), utilizando-se os mesmos calibradores.

Após obtenção de todas as retas para as substâncias em estudo, foi possível verificar que, ao quarto dia, o metanol e o etanol perderam a estabilidade (figura 7), apresentando um coeficiente de correlação de 0.9570 e 0.9620, respetivamente. Desta forma, conclui-se que, nestas condições, os calibradores devem ser preparados em cada dia de utilização. Por outro lado, a resposta do equipamento em função da concentração dos analitos, determinada no dia da sua preparação, demonstrou manter estabilidade, pelo que, neste caso, não existe a necessidade de reprodução diária da curva de calibração. As restantes curvas obtidas ao 4º dia encontram-se no anexo 7.9.1.

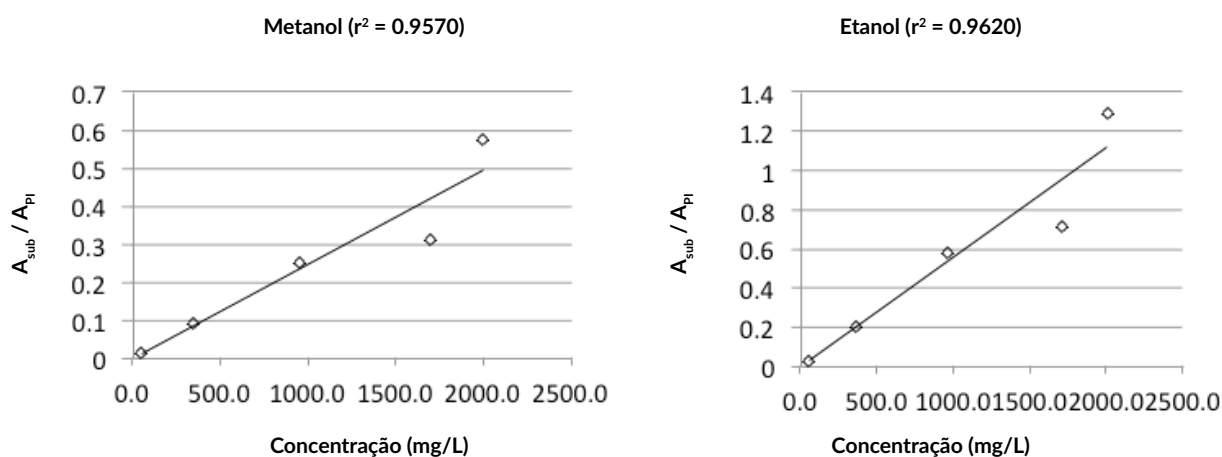


Figura 7 – Retas de calibração para metanol (esquerda) e etanol (direita) obtidas 4 dias após a preparação das soluções padrão.

4.2.13.2. Estabilidade dos controlos de qualidade internos

Os controlos de qualidade foram injetados, juntamente com os calibradores, durante três dias (1, 2 e 4). A estabilidade foi estudada para cada uma das substâncias às concentrações de 100, 800 e 1500 mg/L com um critério de aceitação de 10%. Para o dietil-éter, a 100 mg/L, e partindo da média entre área substância/área do PI, obtida ao primeiro dia, o valor mínimo aceitável seria de 1.4594 e máximo de 1.7836. Uma vez que, ao quarto dia, o valor obtido não se encontrou dentro do intervalo de aceitação (tabela 18), conclui-se que este composto perdeu estabilidade. Em relação aos restantes, todos perderam estabilidade ao 4º dia para a concentração de 800 mg/L, encontrando-se os resultados no anexo 7.9.2.

Tendo em conta este resultado, recomenda-se que os controlos de qualidade sejam preparados no dia da sua utilização e descartados após o seu uso.

Tabela 18 – Estabilidade do dietil-éter à concentração de 100 mg/L

	Área _{sub.} /Área _{PI}		
	Dia 1	Dia 2	Dia 4
	1,5396	1,7601	1,1931
	1,6777	1,6994	1,1662
	1,6473	1,7551	1,2542
Média	1,6215	1,7382	1,2045

4.2.13.3. Estabilidade das amostras biológicas

Dada a importância da estabilidade das substâncias em estudo, optou-se pela fortificação de amostras de sangue, urina e humor vítreo, cada uma a ambas as concentrações: baixa (100 mg/L) e alta (1500 mg/L). Numa primeira fase, analisaram-se, em triplicado, os primeiros *vials* de cada uma das concentrações para cada matriz, procedendo-se ao congelamento dos restantes.

A análise repetiu-se passados 1 e 15 dias. No processo de homogeneização das amostras verificou-se a existência de coágulos sanguíneos à concentração de 1500 mg/L em ambos os intervalos de tempo. Considerando-se a hipótese de esta se encontrar relacionada com a temperatura do congelador (-20 °C), optou-se pela repetição da experiência a uma temperatura de -10 °C, tendo sido, porém, obtidos os mesmos resultados. Tendo em conta a literatura, apesar de todas as substâncias em estudo poderem ser produzidas durante a putrefação, não existem casos da sua identificação conjunta a concentrações tão elevadas. Assim, este fator poderá ser uma explicação para os resultados obtidos, uma vez que não se verifica para a concentração mais baixa utilizada. Os resultados obtidos foram processados tendo sido feita uma comparação entre a a média da razão das áreas das substância/área do PI, obtida antes e após o congelamento das amostras, a cada concentração. Todas as substâncias que mantiveram a estabilidade ao 15º dia foram seriadas de acordo com a tabela 19. Os dados pormenorizados encontram-se em anexo (7.9.3.)

Conclui-se, desta forma, que a estabilidade das substâncias varia de acordo com a matriz em que estão inseridas, bem como com a concentração a que se encontram. Também foi possível verificar que o dietil-éter perde a estabilidade imediatamente no primeiro dia de congelamento no sangue e urina para as concentrações de 100 e 1500 mg/L e no humor vítreo aos 1500 mg/L. A estabilidade do acetaldeído deixou de se verificar ao 1º dia de congelamento e para as duas concentrações em estudo na matriz urina.

Tendo em conta que a estabilidade ao longo dos dias é bastante variável de substância para substância, e considerando o facto de o *bias* máximo do método ser de 6.0 para a concentração de 100 mg/L e os 5.5 para a concentração de 1500 mg/L (bastante abaixo dos 10% aceitáveis), recomenda-se que todas as amostras com informação de putrefação, das quais seja requisitada a pesquisa de substâncias voláteis, sejam analisadas no menor intervalo de tempo possível, preferencialmente no dia da requisição.

Tabela 19 – Substâncias que permaneceram estáveis ao final de 15 dias, nas diferentes matrizes biológicas

	Sangue	Urina	Humor vítreo
100 mg/L	Acetaldeído	Metanol	Metanol
	Acetona	Etanol	<i>n</i> -Propanol
	Metil-etil-cetona	Acetona	Metil-etil-cetona
	Acetato de etilo	2-Propanol	2-Butanol
		Metil-etil-cetona	1-Pentanol
		Acetato de etilo	
		2-Butanol	
		3-Metil-1-butanol	
		2-Metil-1-butanol	
		1-Pentanol	
1500 mg/L	Metil-etil-cetona	Acetona	Acetaldeído
	Acetato de etilo	Metil-etil-cetona	Metanol
	Isobutanol	Acetato de etilo	Etanol
	<i>n</i> -Butanol	Isobutanol	Acetona
	3-Metil-1-butanol	3-Metil-1-butanol	2-Propanol
	2-Metil-1-butanol	1-Pentanol	<i>t</i> -Butanol
	1-Pentanol		<i>n</i> -Propanol
			Metil-etil-cetona
			Acetato de etilo
			2-Butanol
			Acetato de etilo
			Isobutanol
			<i>n</i> -Butanol
			3-Metil-1-butanol
		2-Metil-1-butanol	
		1-Pentanol	

4.3 APLICAÇÃO DO MÉTODO DESENVOLVIDO A CASOS REAIS

A validação deste método analítico tem como principal objetivo, a identificação das substâncias em estudo de forma precisa e exata. Ao longo do presente trabalho, foi possível comprovar que o método desenvolvido cumpriu todos os requisitos esperados, sendo apenas necessário um volume de 100 µL por injeção para a obtenção de resultados fiáveis e consistentes.

Desta forma, e tendo em conta o âmbito deste estudo, foram selecionados casos reais, que deram entrada no Serviço de Química e Toxicologia Forenses da Delegação do Centro do INMLCF, fora do prazo legal de análise e em que existisse informação de putrefação e/ou submersão em água. Apenas casos positivos para o etanol foram analisados, sendo que, numa primeira fase, todas as amostras foram analisadas qualitativamente. Do total de casos reais analisados, 4 foram do sexo feminino e os restantes do sexo masculino, com idades, no total, compreendidas entre os 18 e os 91 anos. Neste estudo, foi possível detetar todas as substâncias nas diferentes matrizes, tendo sido os resultados obtidos seriados de acordo com a informação disponível (putrefação e/ou submersão), de acordo com as tabelas 20 e 21.

Tabela 20 – Substâncias detetadas nas diferentes matrizes, em casos de putrefação, sem informação de submersão

	1		2		3		4		5	
	SP	SC	HV	SP	SC	SP	SC	SC	SP	
Acetaldeído	•	•	•	•	•	•	•	•	•	
Metanol			•				•			
Etanol	•	•	•	•	•	•	•	•	•	
Dietil-éter	•		•	•	•	•	•	•	•	
Acetona	•	•	•	•	•	•	•	•	•	
2-Propanol	•	•	•		•	•	•	•	•	
<i>t</i> -Butanol	•		•	•	•	•	•	•		
<i>n</i> -Propanol	•	•		•	•	•	•	•	•	
Metil-etil-cetona								•		
Acetato de etilo				•	•	•	•	•		
2-Butanol	•	•		•				•		
Isobutanol	•	•		•	•	•	•	•		
<i>n</i> -Butanol	•	•	•	•	•	•	•	•	•	
3-Metil-1-butanol	•	•	•	•	•	•	•	•	•	
2-Metil-1-butanol	•			•	•		•	•		
1-Pentanol	•		•	•	•	•	•	•	•	

Tabela 20 – Continuação

	6		7		8		9	10
	SP	U	SP	SC	SP	SC	U	HV
Acetaldeído	•	•	•	•	•	•	•	•
Metanol		•			•		•	•
Etanol	•	•	•	•	•	•	•	•
Dietil-éter	•	•		•	•		•	•
Acetona	•	•	•	•	•	•	•	•
2-Propanol	•	•	•	•	•	•	•	•
<i>t</i> -Butanol	•	•		•	•	•	•	•
<i>n</i> -Propanol	•	•	•	•	•	•	•	•
Metil-etil-cetona	•	•	•	•		•	•	•
Acetato de etilo	•	•	•	•	•		•	•
2-Butanol	•	•						•
Isobutanol	•	•	•	•		•	•	•
<i>n</i> -Butanol	•	•	•	•	•	•	•	•
3-Metil-1-butanol	•	•	•	•	•	•	•	•
2-Metil-1-butanol			•	•	•	•	•	•
1-Pentanol	•	•	•	•	•	•	•	•

Abreviaturas: SP (Sangue Periférico); SC (Sangue Cardíaco); U (Urina); HV (Humor Vítreo).

Tabela 21 – Substâncias detetadas nas diferentes matrizes, em casos de submersão

	1			2		
	SP	SC	U	SP	SC	U
Acetaldeído	•	•	•	•	•	•
Metanol	•	•	•	•	•	•
Etanol	•	•	•	•	•	•
Dietil-éter	•	•	•			•
Acetona	•	•		•	•	•
2-Propanol		•		•	•	•
t-Butanol			•			
n-Propanol	•	•	•			
Metil-etil-cetona		•		•		•
Acetato de etilo	•	•	•	•		•
2-Butanol						
Isobutanol						
n-Butanol	•	•	•			
3-Metil-1-butanol	•	•				
2-Metil-1-butanol						
1-Pentanol	•	•			•	

Tabela 21 – Continuação

	3			4		5	6
	SP	SC	U	U	SC	SP	SP
Acetaldeído	•	•	•	•	•	•	•
Metanol	•	•	•	•		•	
Etanol	•	•	•	•	•	•	•
Dietil-éter	•		•	•	•	•	•
Acetona	•	•	•	•	•	•	•
2-Propanol	•	•	•	•	•	•	•
t-Butanol			•	•			•
n-Propanol		•	•	•	•	•	•
Metil-etil-cetona					•	•	•
Acetato de etilo		•			•		•
2-Butanol							•
Isobutanol	•	•			•	•	•
n-Butanol	•	•		•	•	•	•
3-Metil-1-butanol	•	•	•		•	•	•
2-Metil-1-butanol		•			•		•
1-Pentanol	•	•			•	•	•

Abreviaturas: SP (Sangue Periférico); SC (Sangue Cardíaco); U (Urina).

Tal como referido na literatura, em situações de putrefação é esperada a deteção de uma ou mais substâncias voláteis em estudo, sendo que nos 10 casos analisados, não existiu nenhum em que não fosse detetado algum destes compostos. Para além disto, nos casos para os quais existia mais do que uma matriz, verificou-se que, para além da sua deteção no sangue periférico, foi possível comprovar a existência de algumas das substâncias voláteis nas restantes matrizes. Foi ainda, possível, comprovar a produção de *t*-butanol após a morte, substância causadora de alguma controvérsia. Em relação às amostras de casos de submersão, para as quais se esperava a deteção de *n*-butanol, foi possível identificar esta substância em todos os casos, exceto num. Uma possível explicação será o facto de que apenas a submersão, tal como anteriormente mencionado, não é suficiente para a produção deste composto, devendo existir condições que promovam a sua formação post-mortem (e.g. tempo e temperatura da água).

De seguida, passou-se à análise quantitativa das substâncias. É de salientar que, tal como comprovado pela análise da estabilidade das substâncias em estudo, o fator tempo tem um papel de grande importância na alteração das concentrações obtidas. Tendo em conta que as amostras utilizadas apresentavam um tempo mínimo de armazenamento de 2 anos, apenas foi possível quantificar as substâncias: etanol, *n*-butanol, acetaldeído, metanol, 2-propanol, 2-butanol e acetona, tal como apresentado nas tabelas 22 e 23. Todas as restantes, que foram detetadas, apresentavam uma estimativa de concentração inferior à do primeiro calibrador (50 mg/L), pelo que não foram quantificadas.

Apesar de, tal como referido ao longo do presente estudo, a urina ter uma função de orientação e complementaridade dos resultados obtidos, a quantificação nesta matriz foi efetuada nos casos reais analisados, de forma a confirmar na prática o que se encontra mencionado na literatura.

Tabela 22 – Análise quantitativa dos casos de putrefação, sem informação de submersão

Resultados obtidos para as substâncias voláteis (mg/L)				
Caso	Sangue Periférico	Sangue Cardíaco	Urina	Humor vítreo
1	Etanol = 70	Sem amostra	Sem amostra	Sem amostra
	<i>n</i> -Butanol = 265			
2	Sem amostra	Etanol = 260	Sem amostra	Etanol = 62
		<i>n</i> -Propanol = 50		
		Acetaldeído = 70		
3	Etanol = 250	Etanol = 1010	Sem amostra	Sem amostra
	Acetaldeído = 60	<i>n</i> -Propanol = 60		
		Acetaldeído = 60		
4	Etanol = 920	Etanol = 670	Sem amostra	Sem amostra
	<i>n</i> -Butanol = 140	<i>n</i> -Butanol = 100		
	<i>n</i> -Propanol = 50	2-Propanol = 80		
	Acetaldeído = 100	Acetaldeído = 80		
5	Etanol = 150	Etanol = 380	Sem amostra	Sem amostra
	<i>n</i> -Butanol = 500	<i>n</i> -Butanol = 350		
6	Etanol = 489	Sem amostra	Etanol = 1000	Sem amostra
	<i>n</i> -Butanol = 290		<i>n</i> -Butanol = 180	
	<i>n</i> -Propanol = 50		<i>n</i> -Propanol = 100	
	Acetaldeído = 180			
7	Etanol = 802	Etanol = 820	Sem amostra	Sem amostra
	<i>n</i> -Propanol = 80	<i>n</i> -Propanol = 80		
	2-Propanol = 90	2-Propanol = 120		
	Acetona = 260	Acetona = 280		
	Acetaldeído = 78	Acetaldeído = 110		
8	Etanol = 739	Etanol = 1620	Etanol = 1080	Sem amostra
	Acetaldeído = 60	Acetaldeído = 120		
9	Sem amostra	Sem amostra	Sem amostra	Etanol = 740
				<i>n</i> -Propanol = 62
				Acetaldeído = 120
10	Sem amostra	Sem amostra	Sem amostra	Etanol = 129
				<i>n</i> -Butanol = 371

Tabela 23 – Análise quantitativa dos casos com informação de submersão

Resultados obtidos para as substâncias voláteis (mg/L)				
Caso	Sangue Periférico	Sangue Cardíaco	Urina	Humor vítreo
1	Etanol = 2170	Etanol = 1850	Etanol = 3420	Sem amostra
		Acetaldeído = 60		
2	Etanol = 3220	Etanol = 2920	Etanol = 5120	Sem amostra
	Metanol = 90	Metanol = 90	Metanol = 140	
3	Etanol = 710	Etanol = 1080	Etanol = 820	Sem amostra
4	Etanol = 140	Sem amostra		Sem amostra
5	Etanol = 210	Sem amostra	Sem amostra	Sem amostra
	<i>n</i> -Butanol = 110			
6	Etanol = 680	Sem amostra	Sem amostra	Sem amostra
	<i>n</i> -Butanol = 340			
	<i>n</i> -Propanol = 60			
	Acetaldeído = 110			

Por último, nenhum dos casos estudados pode ser analisado no que respeita à produção endógena de etanol, tendo em conta o tempo decorrido entre a receção das amostras e a sua análise (prazo de, pelo menos 2 anos), que influencia a estabilidade das amostras, e a ausência de disponibilidade, em simultâneo, das três matrizes (sangue, urina e humor vítreo), condição fundamental na avaliação deste tipo de produção.



PARTE V

CONCLUSÕES

A distinção entre a produção de etanol durante o processo putrefativo e o seu consumo antes da morte continua a ser um desafio para a toxicologia forense. De facto, esta possibilidade, leva ao levantamento de questões quando todas as condições favoráveis a esta formação se verificam. Assim, o presente estudo pretendeu aliar duas das formas de maior utilidade no auxílio desta distinção: uso de diferentes matrizes biológicas (sangue, urina e humor vítreo) e análise de substâncias voláteis com produção endógena em casos putrefativos (etanol, 3-metil-1-butanol, 2-metil-1-butanol, 1-pentanol, acetaldeído, 2-propanol, acetato de etilo, metil-etil-cetona, acetona, 2-butanol, metanol, *t*-butanol, dietil-éter, isobutanol, *n*-butanol e *n*-propanol).

Desenvolveu-se e validou-se um método analítico através da utilização de GC-FID-HS: equipamento utilizado no Serviço de Química e Toxicologia Forenses – Delegação do Centro, para a análise de etanol e outros compostos voláteis.

O método demonstrou ser capaz de analisar 16 substâncias voláteis concomitantemente com o padrão interno selecionado (acetonitrilo), num intervalo de tempo de apenas 13 minutos, com precisão, exatidão e seletividade bastante satisfatórias.

Uma vez que se trata de uma técnica de *headspace*, não é necessário recorrer a uma extração, anterior à injeção das amostras biológicas, o que torna o processo rápido e eficiente. Para além disto, o método validado permite o uso de apenas 100 µL de amostra em cada injeção, o que o torna muito útil na medida em que, muitas das vezes, um dos grandes problemas a enfrentar na análise de amostras biológicas é o facto de não existirem em volumes suficientes para a quantidade de análises pretendidas à mesma matriz.

O facto de ser um método de deteção e quantificação de um número elevado de substâncias, levou à necessidade de criação de uma rampa de temperaturas que varia entre os 40 °C e os 100 °C, garantindo, assim, a eluição de todas elas, com indubitável distinção entre tempos de retenção.

Ao longo do estudo, foi possível verificar que a estabilidade de algumas substâncias em solução aquosa, ainda que armazenadas a baixas temperaturas, não se verificava. Assim, entendeu-se que, para a obtenção de resultados fiáveis e concordantes, os controlos de qualidade internos teriam de ser elaborados no dia da sua utilização, com injeção imediata, sem processo de refrigeração. A resposta do equipamento demonstrou ser estável durante todo o processo.

Devido à perda de estabilidade de algumas substâncias nas matrizes biológicas, comprovada no estudo efetuado seria interessante realizar a análise de amostras reais, com informação de

putrefação/submersão no momento da sua receção e em diferentes intervalos de tempo após o seu armazenamento.

Em futuros estudos, tornar-se-ia também, interessante, a análise de outras matrizes relevantes no estudo da produção de etanol durante a putrefação (e.g. cérebro) e a inclusão de outras substâncias voláteis produzidas durante este processo e que não foram estudadas, por impossibilidade da sua obtenção em tempo útil para o presente trabalho. Para além disto, e tal como anteriormente mencionado, o presente método alia duas das formas de estudo da produção post-mortem de etanol: pesquisa em diversas matrizes e o estudo de vários voláteis. Uma outra forma de grande interesse seria a análise microbiológica das amostras, de forma a relacionar os micróbios e fermentos encontrados com a produção de determinado tipo de volátil.

Por último e como mencionado, foram criados procedimentos para a determinação qualitativa e quantitativa de substâncias voláteis com produção endógena em situações de putrefação, com o objetivo da sua implementação na rotina do SQTf-Delegação do Centro (anexo 7.10).



PARTE VI

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. O'Neal CL, Poklis A. Postmortem production of ethanol and factors that influence interpretation: A critical review. *Am J Forensic Med Pathol.* 1996;17(1):8-20. doi:10.1097/00000433-199603000-00002
2. Alcohol and Violence. Capítulo 1(Drinking Over the Life Span: Issues of Biology, Behavior, and Risk):54-66. <https://pubs.niaaa.nih.gov/publications/10report/chap01c.pdf>. Visitado pela última vez em: 27 de novembro de 2018
3. Modelli MES, Lourenco SM. Alcohol Influence in Violent Deaths. *J Forensic Res.* 2016;7(3):1-6. doi:10.4172/2157-7145.1000328
4. Issa SY, Aldossary M, Almazroua MK, et al. Patterns of violent deaths associated with positive ethanol finding in Eastern Province, Saudi Arabia. *Egypt J Forensic Sci.* 2016;6(4):388-395. doi:10.1016/J.EJFS.2016.05.003
5. Kelly AT, Mozayani A. An Overview of Alcohol Testing and Interpretation in the 21st Century. *J Pharm Pract.* 2012;25(1):30-36. doi:10.1177/0897190011431149
6. Johnson RD, Lewis RJ, Angier MK, Vu NT. The Formation of Ethanol in Postmortem Tissues.; 2004. <http://libraryonline.erau.edu/online-full-text/faa-aviation-medicine-reports/AM04-04.pdf>. Visitado pela última vez em: 27 de novembro de 2018
7. Tiscione NB, Alford I, Yeatman DT, Xiaoqin S. Ethanol analysis by *headspace* gas chromatography with simultaneous flame-ionization and mass spectrometry detection. *J Anal Toxicol.* 2011;35:501-511. doi:10.1093/anatox/35.7.501
8. Kugelberg FC, Jones AW. Interpreting results of ethanol analysis in postmortem specimens: A review of the literature. *Forensic Sci Int.* 2007;165:10-29. doi:10.1016/j.forsciint.2006.05.004
9. Jones AW, Holmgren P. Uncertainty in estimating blood ethanol concentrations by analysis of vitreous humour. *J Clin Pathol.* 2001;54:699-702. doi:10.1136/jcp.54.9.699
10. Boumba VA, Ziavrou KS, Vougiouklakis T. Biochemical pathways generating post-mortem volatile compounds co-detected during forensic ethanol analyses. *Forensic Sci Int.* 2008;174:133-151. doi:10.1016/j.forsciint.2007.03.018

11. Ziavrou K, Boumba VA, Vougiouklakis TG. Insights into the origin of postmortem ethanol. *Int J Toxicol*. 2005;24(2):69-77. doi:10.1080/10915810590936391
12. Ioan BG, Manea C, Hanganu B, Statescu L, Solovastru LG, Manoilescu I. The Chemistry Decomposition in Human Corpses. *Rev Chim*. 2017;68(6):1352-1356. https://www.researchgate.net/profile/Cristiana_Manea/publication/318772231_The_chemistry_decomposition_in_human_corpses/links/5989be06aca27266adadfb70/The-chemistry-decomposition-in-human-corpses.pdf. Visitado pela última vez em: 20 de dezembro de 2018
13. INMLCF. Norma procedimental: recomendações para colheita e acondicionamento de amostras em toxicologia forense. <http://www.inmlcf.mj.pt/wdinmlWebsite/Data/file/OutrasInformacoes/PareceresOrientacoesServico/Normas/NP-INMLCF-009-Rev01.pdf>. Visitado pela última vez em: 27 de dezembro de 2018.
14. Jones AW. Determination of Liquid/Air Partition Coefficients for Dilute Solutions of Ethanol in Water, Whole Blood, and Plasma. *J Anal Toxicol*. 1983;7(4):193-197. doi:10.1093/jat/7.4.193
15. Bévalot F, Cartiser N, Bottinelli C, Fanton L, Guitton J. Vitreous humor analysis for the detection of xenobiotics in forensic toxicology: a review. *Forensic Toxicol*. 2016;34(1):12-40. doi:10.1007/s11419-015-0294-5
16. Boumba VA, Economou V, Kourkoumelis N, Gousia P, Papadopoulou C, Vougiouklakis T. Microbial ethanol production: Experimental study and multivariate evaluation. *Forensic Sci Int*. 2012;215(1-3):189-198. doi:10.1016/j.forsciint.2011.03.003
17. Chun H-J, Poklis JL, Poklis A, Wolf CE. Development and Validation of a Method for Alcohol Analysis in Brain Tissue by *Headspace* Gas Chromatography with Flame Ionization Detector. *J Anal Toxicol*. 2016;40(8):653-658. doi:10.1093/jat/bkw075
18. Corry J. Possible Sources of Ethanol Ante- and Post-mortem: its Relationship to the Biochemistry and Microbiology of Decomposition. *J Appl Bacteriol*. 1978;44(1):1-56. doi:10.1111/j.1365-2672.1978.tb00776.x
19. Paczkowski S, Schütz S. Post-mortem volatiles of vertebrate tissue. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2011;91(4):917-935. doi:10.1007/s00253-011-3417-x

20. D. J. Blackmore. The Bacterial Production of Ethyl Alcohol. 1958;8(2-3)73-78. doi:[https://doi.org/10.1016/S0015-7368\(68\)70447-3](https://doi.org/10.1016/S0015-7368(68)70447-3)
21. Bazmi E, Behnoush B, Akhgari M. Interpretation of Ethanol Analysis in Postmortem Specimens. 2008;2(1). doi:10.1016/j.forsciint.2006.05.004
22. Caplan YH, Levine B. Vitreous Humor in the Evaluation of Postmortem Blood Ethanol Concentrations*. J Anal Toxicol. 1990;14(5):305-307. doi:10.1093/jat/14.5.305
23. Kanchan T. Encyclopedia of Forensic and Legal Medicine.; 2016;148-157. doi:10.1016/B978-0-12-800034-2.00339-6
24. Honey D, Caylor C, Luthi R, Kerrigan S. Comparative alcohol concentrations in blood and vitreous fluid with illustrative case studies. J Anal Toxicol. 2005;29(5):365-369. doi:10.1093/jat/29.5.365
25. Leikin JB, Watson WA. Post-mortem toxicology: What the dead can and cannot tell us. J Toxicol - Clin Toxicol. 2003;41(1):47-56. doi:10.1081/CLT-120018270
26. Dennis V. Canfield et al. Selection of an Internal Standard for Postmortem Ethanol Analysis. 1998. <https://apps.dtic.mil/dtic/tr/fulltext/u2/a339340.pdf>. Visitado pela última vez em: 27 de dezembro de 2018.
27. Huckenbeck W, Freudenstein P, Bonte W. Neoformation of ethanol and congeners in blood. 1989. http://www.icadtsinternational.com/files/documents/1989_126.pdf. Visitado pela última vez em 29 dezembro de 2018.
28. Wiomore JG, Chow BLC. Case report: Detection of neo-formation of ethanol in a postmortem blood sample using n-propanol and a urine sample. J Can Soc Forensic Sci. 2000;33(3):145-149. doi:10.1080/00085030.2000.10757510
29. Behnoush B, Bazmi E, Akhgari M, Nazari SSH, Iravani FS. Evaluation of Ethanol and n-propanol in Victims. Iran J Toxicol. 2010;3(3):311-316. http://ijt.arakmu.ac.ir/files/site1/user_files_3a0bf3/godadmin-A-10-2-29-f160d4e.pdf. Visitado pela última vez em: 2 de janeiro de 2019.

30. Countryman S, Kelly K, Fernandez C. Critical Factors in Selecting an Internal Standard for Accurate Determination of Blood Alcohols in Post Mortem Samples. :2-5. <https://phenomenex.blob.core.windows.net/documents/2fc9aab0-d265-49f8-a7aa-e794a97a8a11.pdf>. Visitado pela última vez em 3 de janeiro de 2019.
31. Payne-James J, Byard RW. Encyclopedia of Forensic and Legal Medicine. <https://books.google.pt/books?id=gticBAAAQBAJ&lpg=PT885&dq=volatiles%20that%20indicates%20de%20formation%20post%20mortem%20of%20ethanol&hl=pt-PT&pg=PT885#v=onepage&q&f=false>. Visitado pela última vez em: 28 de maio de 2019.
32. Gubala W. n-Butanol in blood as the indicator of how long a dead body lay in water. *Forensic Sci Int.* 1990;46:127-128. doi:[https://doi.org/10.1016/0379-0738\(90\)90149-S](https://doi.org/10.1016/0379-0738(90)90149-S)
33. Boumba VA, Kourkoumelis N, Gousia P, Economou V, Papadopoulou C, Vougiouklakis T. Modeling microbial ethanol production by *E. coli* under aerobic/anaerobic conditions: Applicability to real postmortem cases and to postmortem blood derived microbial cultures. *Forensic Sci Int.* 2013;232(1-3):191-198. doi:10.1016/j.forsciint.2013.07.021
34. Bernal E. Determination of Volatile Substances in Forensic Samples by Static *Headspace* Gas Chromatography. http://cdn.intechopen.com/pdfs/30590/InTech-Determination_of_volatile_substances_in_forensic_samples_by_static_headspace_gas_chromatography.pdf Visitado pela última vez em 4 de janeiro de 2019.
35. Boumba VA, Kourkoumelis N, Ziavrou KS, Fragkouli K, Vougiouklakis T. Patterns of the most abundant volatiles detected in post-mortem blood. *Rom J Leg Med.* 2012;20(2):147-154. doi:10.4323/rjlm.2012.147
36. Neal CLO, Li CEW, Levine B, Kunsman G, Poklis A. Gas chromatographic procedures for determination of ethanol in postmortem blood using t-butanol and methyl ethyl ketone as internal standards. *Forensic Sci Int.* 1996;83:31-38. doi:10.1016/0379-0738(96)02007-5
37. Wang Z, Jocelyn Paré JR. Instrumental Methods in Food Analysis. *Tech Instrum Anal Chem.* 1997;18:61-91. doi:10.1016/S0167-9244(97)80012-1
38. Coskun O. Separation techniques: Chromatography. *North Clin Istanbul.* 2016;3(2):156-160. doi:10.14744/nci.2016.32757

39. Holm T. Aspects of the mechanism of the flame ionization detector. *J Chromatogr A*. 1999;842:221-227. doi:10.1016/S0021-9673(98)00706-7
40. Portari GV, Marchini JS, Jordão AA. Validation of a Manual Gas Chromatography Method for Determining Volatile Compounds in Biological Fluids. *Lab Med*. 2008;39(1):42-45. doi:10.1309/EA876C1PVC0UXPH0
41. Michael J, Sifersingh NHS. *Headspace-Gas Chromatography*. *Gas Chromatography*, 2012:221-223. doi:10.1016/B978-0-12-385540-4.00030-4
42. Canfield D V., Brink CJD, Johnson RD, Lewis RJ, Dubowski KM. Postmortem Ethanol Testing Procedures Available to Accident Investigators. 2007:1-4. <https://apps.dtic.mil/dtic/tr/fulltext/u2/a473197.pdf>. Visitado pela última vez em 4 de fevereiro de 2019.
43. Ioan BG, Jitaru V, Damian R, Damian SI. Study on the relationship between the concentration of ethanol in the blood, urine and the vitreous humour. *Rom J Leg Med*. 2015;23(3):211-216. doi:10.4323/rjlm.2015.211
44. Cullen SA, Mayes RW. Alcohol discovered in the urine after death: Antemortem ingestion or post-mortem artefact? *Med Sci Law*. 2005;45(3):196-200. doi:10.1258/rsmmsl.45.3.196
45. Antonides H, Marinetti L. Ethanol Production in a Postmortem Urine Sample. *J Anal Toxicol*. 2011;35(7):516-518. doi:10.1093/anatox/35.7.516
46. Hunsaker DM. Postmortem Alcohol Interpretation. 1:307-308. https://page-one.springer.com/pdf/preview/10.1007/978-1-59259-786-4_14. Visitado pela última vez em: 7 de fevereiro de 2019.
47. Jones AW, Hylan L, Svensson E, Helander A. Storage of Specimens at 4 C or Addition of Sodium Fluoride (1%) Prevents Formation of Ethanol in Urine Inoculated with *Candida albicans*. *J Anal Toxicol*. 1999;23(5):333-336. doi:10.1093/jat/23.5.333
48. Kalra K. Method Development and Validation of Analytical Procedures. <http://cdn.intechweb.org/pdfs/23463.pdf>. Visitado pela última vez em: 7 de dezembro de 2018.

49. Fda, Cder, Beers, Donald. Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics Guidance for Industry.; 2015. <http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htm> and/or <http://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htm>. Visitado pela última vez em: 2 de janeiro de 2019.
50. Scientific Working Group for Forensic Toxicology (SWGTOX). Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology. *J Anal Toxicol*. 2013;37:452-474. doi:10.1093/jat/bkt054
51. Ribani M, Beatriz C, Bottoli G, Collins CH, Jardim ICSF, Melo LFC. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. 2004;27(5):771-780. doi:10.1016/j.msec.2014.12.030
52. International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use ich harmonised tripartite guideline validation of analytical procedures: text and methodology q2(r1). https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf. Visitado pela última vez em: 31 de dezembro de 2018.
53. Belouafa S, Habti F, Benhar S, et al. Statistical tools and approaches to validate analytical methods: methodology and practical examples. *Int J Metrol Qual Eng*. 2017. doi:10.1051/ijmqe/2016030
54. Agency EM. Guidance on Validation of Analytical Procedures. 2006;2(November 1994):1-15. doi:10.1136/bmj.333.7574.873-a
55. Causon R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis viewpoint and discussion. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*. 1997;689(1):175-180. doi:10.1016/S0378-4347(96)00297-6
56. Miller JN. Basic statistical methods for Analytical Chemistry. Part 2. Calibration and regression methods. A review. *Analyst*. 1991;116(1):3. doi:10.1039/an9911600003
57. Analysis of volatiles in aqueous and biological specimens by *headspace* gas chromatography. http://www.wsp.wa.gov/forensics/docs/toxicology/sop_manuals/sop_volatiles_07-24-2017.pdf. Visitado pela última vez em 22 de março de 2019.

58. Monteiro C, Franco JM, Proença P, et al. Qualitative and quantitative analysis of a group of volatile organic compounds in biological samples by HS-GC/FID: Application in practical cases. *Forensic Sci Int.* 2014;243:137-143. doi:10.1016/j.forsciint.2014.07.016

59. Chapter 1 Introduction: Fundamentals of ultrasound and basis of its analytical uses. In: ; 2007:1-34. doi:10.1016/S0167-9244(07)80017-5

60. PubChem. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>. Visitado pela última vez em 7 de janeiro de 2019

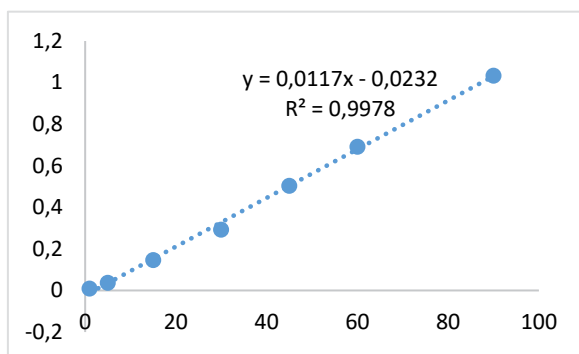


PARTE VII

ANEXOS

7.1. LIMITES DE DETEÇÃO E DE QUANTIFICAÇÃO

LIMITES DE DETEÇÃO E DE QUANTIFICAÇÃO DO DIETIL-ÉTER



SUMÁRIO DOS RESULTADOS

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,998885369
Quadrado de R	0,997771981
Quadrado de R ajustado	0,997326377
Erro-padrão	0,019536124
Observações	7

ANOVA

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significância</i>
Regressão	1	0,854593	0,854593	2239,146149	7,962E-08
Residual	5	0,001908	0,000382		
Total	6	0,856501			

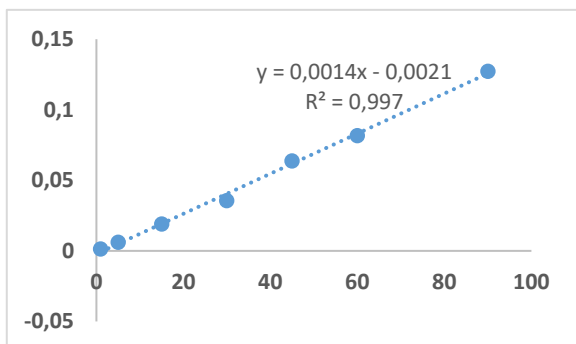
	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro-padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor P</i>	<i>95% inferior</i>	<i>95% superior</i>
Interceptar	-0,023190843	0,011409	-2,03263	0,097783032	-0,052519353	0,006137668
Variável X 1	0,011711317	0,000247	47,31962	7,962E-08	0,011075113	0,01234752

C. Teórica	Área dietil éter	Área acetoneitrilo	Área Subs./Área PI
1	3,1	307	0,010098
5	14,5	391,2	0,037065
15	37,4	253,2	0,147709
30	77,4	264,4	0,292738
45	117,3	232,3	0,50495
60	159,3	230,3	0,691706
90	243,7	235,6	1,03438

Conc.	Y previsto	Residuais
1	-0,0115	0,021598
5	0,0353	0,001765
15	0,1523	-0,00459
30	0,3278	-0,03506
45	0,5033	0,00165
60	0,6788	0,012906
90	1,0298	0,00458



LIMITE DE DETEÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO *n*-PROPANOL



SUMÁRIO DOS RESULTADOS

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,998481985
Quadrado de R	0,996966274
Quadrado de R ajustado	0,996359528
Erro-padrão	0,00276533
Observações	7

ANOVA

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significância</i>
Regressão	1	0,012565	0,012565	1643,138	1,72302E-07
Residual	5	3,82E-05	7,65E-06		
Total	6	0,012603			

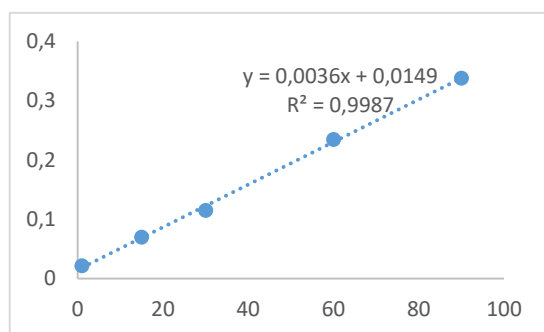
Erro-						
	<i>Coefficientes</i>	<i>padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor P</i>	<i>95% inferior</i>	<i>95% superior</i>
Interceptar	-0,002101737	0,001615	-1,3014	0,249857	-0,006253175	0,0020497
Variável X 1	0,001420071	3,5E-05	40,53564	1,72E-07	0,001330017	0,001510125

C. Teórica	Área <i>n</i> -propanol	Área acetoneitrilo	Área Subs./Área PI
1	0,4	307	0,0013029
5	2,4	391,2	0,006135
15	4,8	253,2	0,0189573
30	9,4	264,4	0,0355522
45	14,8	232,3	0,0637107
60	18,8	230,3	0,0816327
90	30	235,6	0,1273345

Observação	Y previsto	Residuais
1	-0,0007	0,002003
5	0,0049	0,001235
15	0,0189	5,73E-05
30	0,0399	-0,00435
45	0,0609	0,002811
60	0,0819	-0,00027
90	0,1239	0,003434



LIMITE DE DETEÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO t-BUTANOL



SUMÁRIO DOS RESULTADOS

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,999355443
Quadrado de R	0,998711302
Quadrado de R ajustado	0,998281735
Erro-padrão	0,005337931
Observações	5

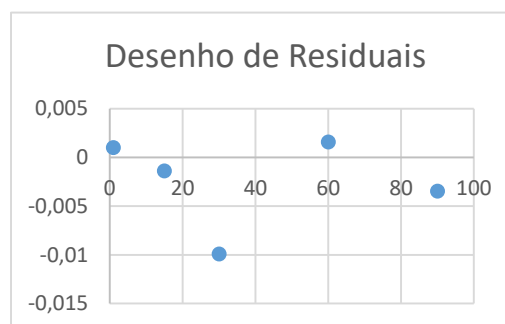
ANOVA

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significância</i>
Regressão	1	0,066245406	0,066245	2324,93	1,96419E-05
Residual	3	8,54805E-05	2,85E-05		
Total	4	0,066330886			

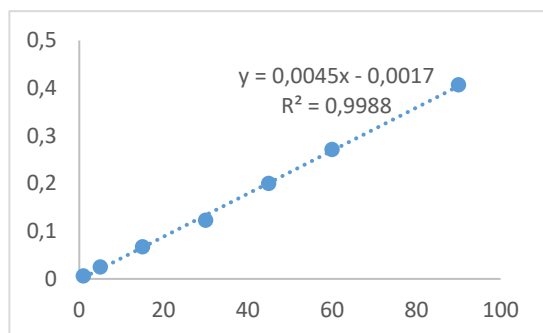
	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro-padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor P</i>	<i>95% inferior</i>	<i>95% superior</i>
Interceptar	0,014889517	0,003769934	3,949544	0,028953	0,002891906	0,026887129
Variável X 1	0,003589038	7,44343E-05	48,21753	1,96E-05	0,003352155	0,003825921

C. Teórica	Área t-butanol	Área acetonitrilo	Área Subs./Área PI
1	6,6	307	0,021498
15	17,6	253,2	0,06951
30	30,4	264,4	0,114977
60	54	230,3	0,234477
90	79,5	235,6	0,337436

Observação	Y previsto	Residuais
1	0,0205	0,000998
15	0,0709	-0,00139
30	0,1249	-0,00992
60	0,2329	0,001577
90	0,3409	-0,00346



LIMITE DE DETEÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO 3-METIL-1-BUTANOL



SUMÁRIO DOS RESULTADOS

<i>Estatística de regressão</i>	
R múltiplo	0,99940124
Quadrado de R	0,99880284
Quadrado de R ajustado	0,99856341
Erro-padrão	0,00551252
Observações	7

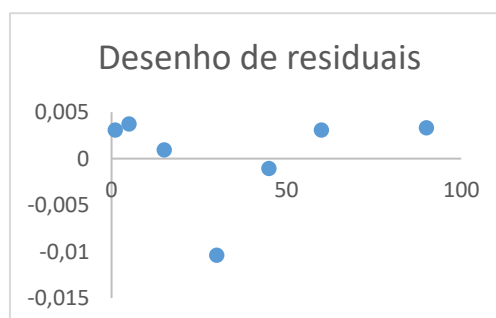
ANOVA

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significância</i>
Regressão	1	0,126764841	0,126765	4171,556	1,6844E-08
Residual	5	0,00015194	3,04E-05		
Total	6	0,12691678			

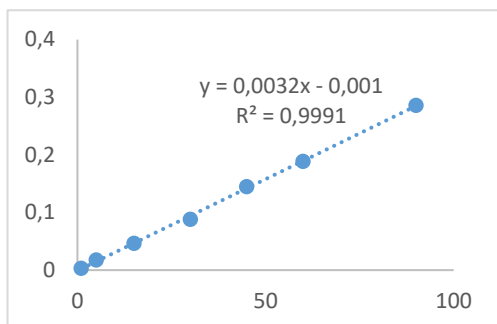
	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro-padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor P</i>	<i>95%</i>	
					<i>95% inferior</i>	<i>superior</i>
Interceptar	-0,0016812	0,003219367	-0,52221	0,623826	-0,009956834	0,006594461
Variável X 1	0,00451051	6,98355E-05	64,58758	1,68E-08	0,004330991	0,004690027

C. Teórica	Área 3-metil-1-butanol	Área acetoneitrilo	Área Subs./Área PI
1	1,8	307	0,005863
5	9,6	391,2	0,02454
15	16,9	253,2	0,066746
30	32,5	264,4	0,12292
45	46,4	232,3	0,199742
60	62,5	230,3	0,271385
90	95,8	235,6	0,406621

Observação	Y previsto	Residuais
1	0,0028	0,003063
5	0,0208	0,00374
15	0,0658	0,000946
30	0,1333	-0,01038
45	0,2008	-0,00106
60	0,2683	0,003085
90	0,4033	0,003321



LIMITE DE DETEÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO 2-BUTANOL



SUMÁRIO DOS RESULTADOS

<i>Estatística de regressão</i>	
R múltiplo	0,999563895
Quadrado de R	0,999127981
Quadrado de R ajustado	0,998953577
Erro-padrão	0,003313233
Observações	7

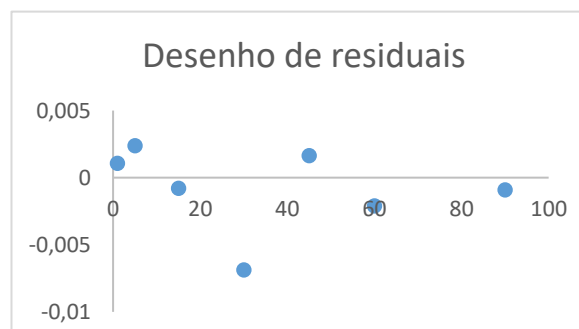
ANOVA

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significância</i>
Regressão	1	0,062888	0,062888	5728,82	7,62657E-09
Residual	5	5,49E-05	1,1E-05		
Total	6	0,062943			

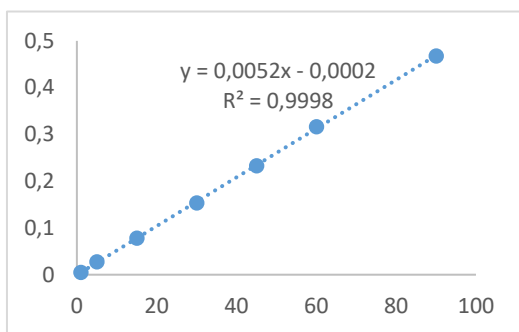
	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro-padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor P</i>	<i>95% inferior</i>	<i>95% superior</i>
Interceptar	0,000993607	0,001935	-0,5135	0,629478	-0,005967582	0,003980369
Variável X 1	0,003176952	4,2E-05	75,68897	7,63E-09	0,003069055	0,003284849

C. Teórica	Área 2-butanol	Área acetonitrilo	Área Subs./Área PI
1	1	307	0,003257
5	6,8	391,2	0,017382
15	11,7	253,2	0,046209
30	23,3	264,4	0,088124
45	33,6	232,3	0,144641
60	43,5	230,3	0,188884
90	67,4	235,6	0,286078

Observação	Y previsto	Residuais
1	0,0022	0,001057
5	0,015	0,002382
15	0,047	-0,00079
30	0,095	-0,00688
45	0,143	0,001641
60	0,191	-0,00212
90	0,287	-0,00092



LIMITE DE DETEÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA METIL-ETIL-CETONA



SUMÁRIO DOS RESULTADOS

<i>Estatística de regressão</i>	
R múltiplo	0,999923169
Quadrado de R	0,999846344
Quadrado de R ajustado	0,999815613
Erro-padrão	0,002279768
Observações	7

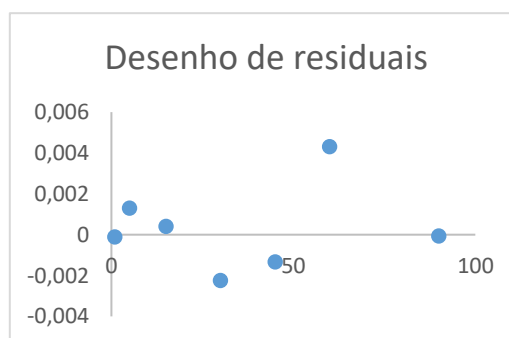
ANOVA

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significância</i>
Regressão	1	0,169097	0,169097	32535,28	9,93744E-11
Residual	5	2,6E-05	5,2E-06		
Total	6	0,169123			

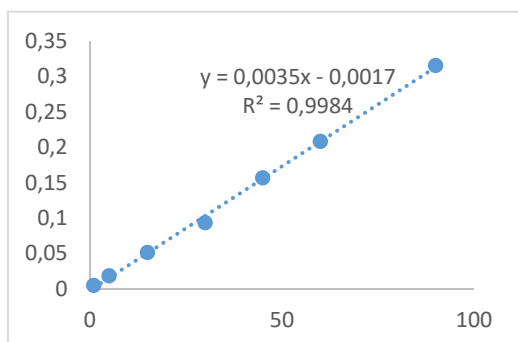
	<i>Erro-</i>					
	<i>Coefficientes</i>	<i>padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor P</i>	<i>95% inferior</i>	<i>95% superior</i>
Interceptar	-0,00021215	0,001331	-0,15935	0,879634	-0,003634644	0,003210337
Variável X 1	0,005209475	2,89E-05	180,3754	9,94E-11	0,005135233	0,005283717

C. Teórica	Área metil-etil-cetona	Área Acetonitrilo	Área Subs./Área PI
1	1,5	307	0,004886
5	10,6	391,2	0,027096
15	19,8	253,2	0,078199
30	40,6	264,4	0,153555
45	54	232,3	0,232458
60	72,8	230,3	0,316109
90	110,2	235,6	0,467742

Observação	Y previsto	Residuais
1	0,005	-0,00011
5	0,0258	0,001296
15	0,0778	0,000399
30	0,1558	-0,00224
45	0,2338	-0,00134
60	0,3118	0,004309
90	0,4678	-5,8E-05



LIMITE DE DETEÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO 1-PENTANOL



SUMÁRIO DOS RESULTADOS

<i>Estatística de regressão</i>	
R múltiplo	0,999218642
Quadrado de R	0,998437894
Quadrado de R ajustado	0,998125473
Erro-padrão	0,004882885
Observações	7

ANOVA

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significância</i>
Regressão	1	0,076196	0,076196	3195,807	3,2764E-08
Residual	5	0,000119	2,38E-05		
Total	6	0,076315			

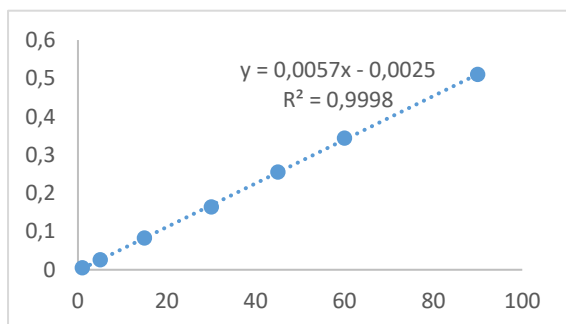
	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro-padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor P</i>	<i>95% inferior</i>	<i>95% superior</i>
Interceptar	-0,001674428	0,002852	-0,58718	0,582596	-0,009004835	0,005655979
Variável X 1	0,003496978	6,19E-05	56,53147	3,28E-08	0,003337964	0,003655991

C. Teórica	Área 1-pentanol	Área acetoneitrilo	Área Subs./Área PI
1	1,5	307	0,004886
5	7,2	391,2	0,018405
15	13	253,2	0,051343
30	24,7	264,4	0,093419
45	36,4	232,3	0,156694
60	48	230,3	0,208424
90	74,3	235,6	0,315365

Observação	Y previsto	Residuais
1	0,0018	0,003086
5	0,0158	0,002605
15	0,0508	0,000543
30	0,1033	-0,00988
45	0,1558	0,000894
60	0,2083	0,000124
90	0,3133	0,002065



LIMITE DE DETEÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO ACETATO DE ETILO



SUMÁRIO DOS RESULTADOS

<i>Estatística de regressão</i>	
R múltiplo	0,999896693
Quadrado de R	0,999793396
Quadrado de R ajustado	0,999752075
Erro-padrão	0,002895155
Observações	7

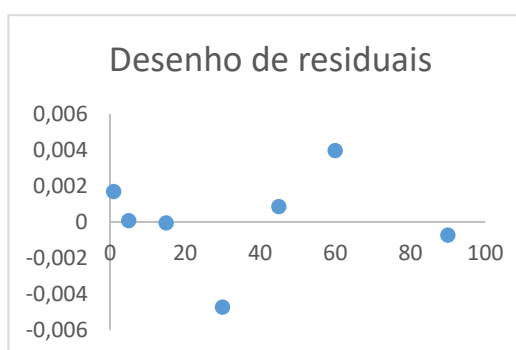
ANOVA

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significância</i>
Regressão	1	0,202808	0,202808	24195,86	2,08333E-10
Residual	5	4,19E-05	8,38E-06		
Total	6	0,20285			

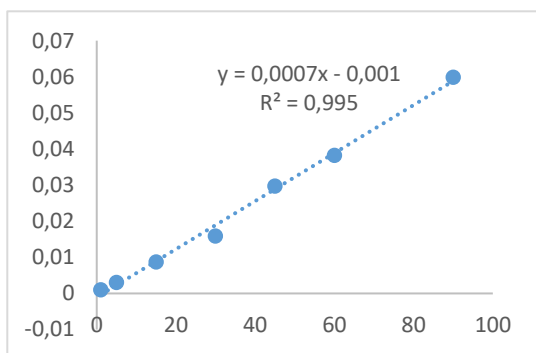
	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro-padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor P</i>	<i>95% inferior</i>	<i>95% superior</i>
Interceptar	-0,002533712	0,001691	-1,49853	0,19427	-0,006880049	0,001812625
Variável X 1	0,005705168	3,67E-05	155,5502	2,08E-10	0,005610886	0,00579945

C. Teórica	Área acetato de etilo	Área acetoneitrilo	Área Subs./Área PI
1	1,5	307	0,004886
5	10,2	391,2	0,026074
15	21	253,2	0,082938
30	43,3	264,4	0,163767
45	59,2	232,3	0,254843
60	79,1	230,3	0,343465
90	120,1	235,6	0,509762

Observação	Y previsto	Residuais
1	0,0032	0,001686
5	0,026	7,36E-05
15	0,083	-6,2E-05
30	0,1685	-0,00473
45	0,254	0,000843
60	0,3395	0,003965
90	0,5105	-0,00074



LIMITE DE DETEÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO ETANOL



SUMÁRIO DOS RESULTADOS

<i>Estatística de regressão</i>	
R múltiplo	0,997501654
Quadrado de R	0,995009549
Quadrado de R ajustado	0,994011459
Erro-padrão	0,001662356
Observações	7

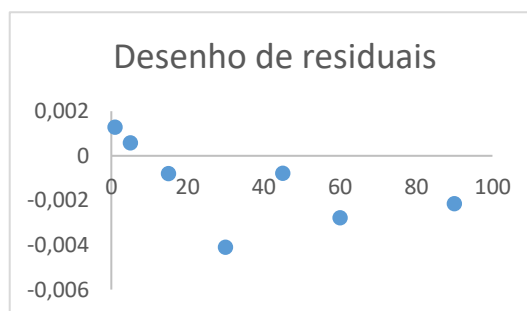
ANOVA

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significância</i>
Regressão	1	0,002754897	0,002755	996,9135	5,98417E-07
Residual	5	1,38171E-05	2,76E-06		
Total	6	0,002768714			

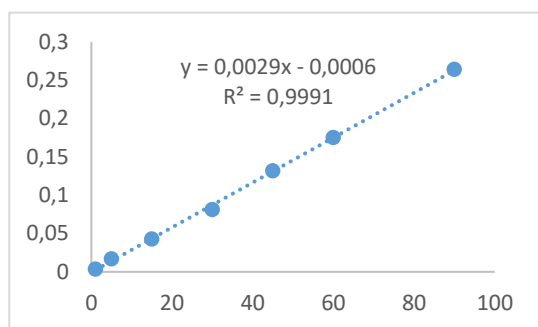
	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro-padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor P</i>	<i>95% inferior</i>	<i>95% superior</i>
Interceptar	-0,00102774	0,000970832	-1,05862	0,338213	-0,003523343	0,001467864
Variável X 1	0,000664934	2,10596E-05	31,57394	5,98E-07	0,000610799	0,00071907

C. Teórica	Área etanol	Área acetoneitrilo	Área Subs./Área PI
1	0,3	307	0,000977
5	1,2	391,2	0,003067
15	2,2	253,2	0,008689
30	4,2	264,4	0,015885
45	6,9	232,3	0,029703
60	8,8	230,3	0,038211
90	14,1	235,6	0,059847

Observação	Y previsto	Residuais
1	-0,0003	0,001277
5	0,0025	0,000567
15	0,0095	-0,00081
30	0,02	-0,00411
45	0,0305	-0,00008
60	0,041	-0,00279
90	0,062	-0,00215



LIMITE DE DETEÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO ISOBUTANOL



SUMÁRIO DOS RESULTADOS

<i>Estatística de regressão</i>	
R múltiplo	0,99955629
Quadrado de R	0,99911278
Quadrado de R ajustado	0,99893534
Erro-padrão	0,00308092
Observações	7

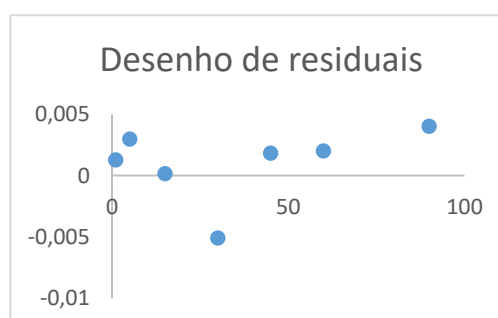
ANOVA

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significância</i>
Regressão	1	0,053446	0,053446	5630,592	7,96329E-09
Residual	5	4,75E-05	9,49E-06		
Total	6	0,053494			

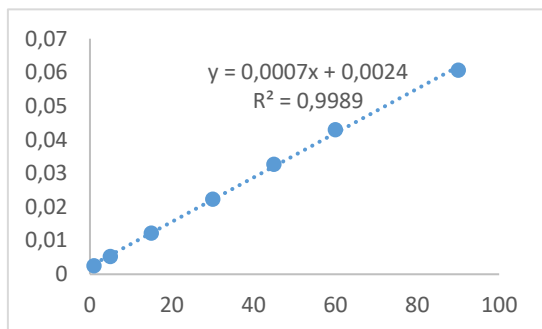
	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro-padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor P</i>	<i>95% inferior</i>	<i>95% superior</i>
Interceptar	-0,0005822	0,001799	-0,32357	0,759357	-0,005207426	0,00404302
Variável X 1	0,00292876	3,9E-05	75,03727	7,96E-09	0,002828431	0,003029094

C. Teórica	Área isobutanol	Área acetoneitrilo	Área Subs./Área PI
1	1,1	307	0,003583
5	6,6	391,2	0,016871
15	10,9	253,2	0,043049
30	21,5	264,4	0,081316
45	30,6	232,3	0,131726
60	40,4	230,3	0,175423
90	62,3	235,6	0,264431

Observação	Y previsto	Residuais
1	0,0023	0,001283
5	0,0139	0,002971
15	0,0429	0,000149
30	0,0864	-0,00508
45	0,1299	0,001826
60	0,1734	0,002023
90	0,2604	0,004031



LIMITE DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO ACETALDEÍDO



SUMÁRIO DOS RESULTADOS

<i>Estatística de regressão</i>	
R múltiplo	0,99946586
Quadrado de R	0,99893201
Quadrado de R ajustado	0,99871841
Erro-padrão	0,0007611
Observações	7

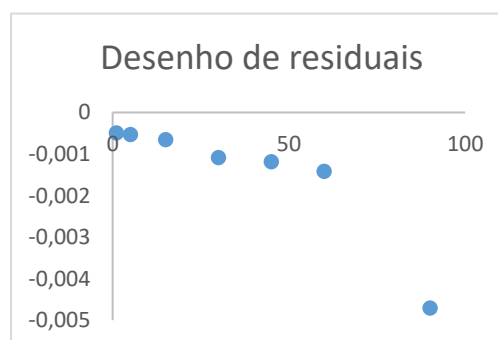
ANOVA

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significância</i>
Regressão	1	0,002709049	0,002709	4676,681	1,26609E-08
Residual	5	2,89634E-06	5,79E-07		
Total	6	0,002711945			

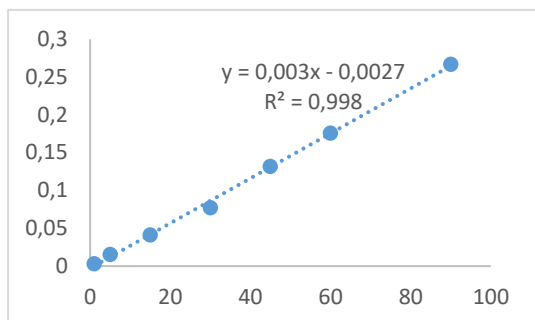
	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro-padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor P</i>	<i>95% inferior</i>	<i>95% superior</i>
Interceptar	0,00238925	0,000444488	5,375286	0,003002	0,001246656	0,00353184
Variável X 1	0,00065938	9,64197E-06	68,38626	1,27E-08	0,000634593	0,000684164

C. Teórica	Área acetaldéido	Área acetonitrilo	Área Subs./Área PI
1	0,8	307	0,002606
5	2,1	391,2	0,005368
15	3,1	253,2	0,012243
30	5,9	264,4	0,022315
45	7,6	232,3	0,032716
60	9,9	230,3	0,042987
90	14,3	235,6	0,060696

Observação	Y previsto	Residuais
1	0,0031	-0,00049
5	0,0059	-0,00053
15	0,0129	-0,00066
30	0,0234	-0,00109
45	0,0339	-0,00118
60	0,0444	-0,00141
90	0,0654	-0,0047



LIMITE DE DETEÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO N-BUTANOL



SUMÁRIO DOS RESULTADOS

<i>Estatística de regressão</i>	
R múltiplo	0,99899159
Quadrado de R	0,9979842
Quadrado de R ajustado	0,99758104
Erro-padrão	0,00471307
Observações	7

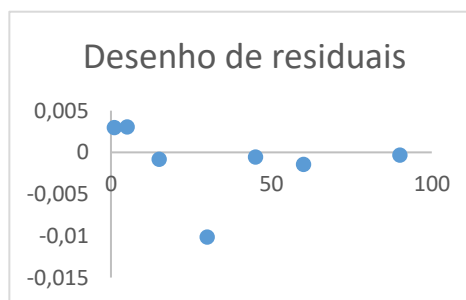
ANOVA

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significância</i>
Regressão	1	0,054986	0,054986	2475,404	6,19884E-08
Residual	5	0,000111	2,22E-05		
Total	6	0,055097			

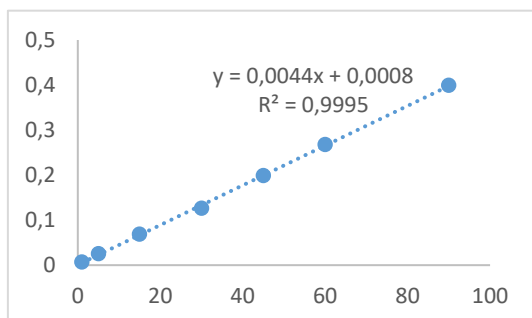
	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro-padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor P</i>	<i>95% inferior</i>	<i>95% superior</i>
Interceptar	-0,00271448	0,002752	-0,98619	0,369326	-0,009789952	0,004361001
Variável X 1	0,00297066	5,97E-05	49,75343	6,2E-08	0,002817178	0,003124145

C. Teórica	Área n-butanol	Área Acetonitrilo	Área Subs./Área PI
1	1	307	0,003257
5	6	391,2	0,015337
15	10,5	253,2	0,041469
30	20,4	264,4	0,077156
45	30,6	232,3	0,131726
60	40,5	230,3	0,175858
90	62,9	235,6	0,266978

Observação	Y previsto	Residuais
1	0,0003	0,002957
5	0,0123	0,003037
15	0,0423	-0,00083
30	0,0873	-0,01014
45	0,1323	-0,00057
60	0,1773	-0,00144
90	0,2673	-0,00032



LIMITE DE DETEÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO 2-METIL-1-BUTANOL



SUMÁRIO DOS RESULTADOS

<i>Estatística de regressão</i>	
R múltiplo	0,99972975
Quadrado de R	0,99945958
Quadrado de R ajustado	0,9993515
Erro-padrão	0,00362219
Observações	7

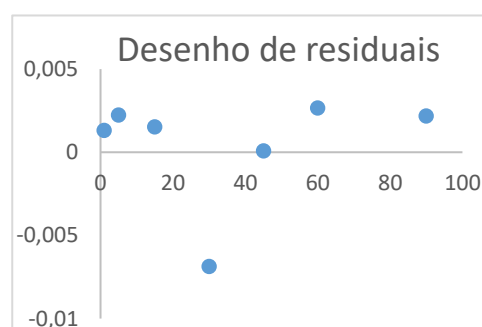
ANOVA

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significância</i>
Regressão	1	0,12132373	0,121324	9247,05	2,30565E-09
Residual	5	6,5601E-05	1,31E-05		
Total	6	0,12138933			

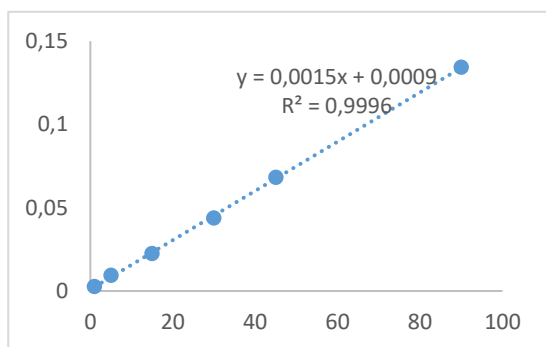
	<i>Erro-</i>					
	<i>Coefficientes</i>	<i>padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor P</i>	<i>95% inferior</i>	<i>95% superior</i>
Interceptar	0,00080934	0,00211539	0,382597	0,717743	-0,004628452	0,006247139
Variável X 1	0,00441264	4,5888E-05	96,16158	2,31E-09	0,004294686	0,004530603

C. Teórica	Área 2-metil-1-butanol	Área acetoneitrilo	Área Subs./Área PI
1	2	307	0,006515
5	9,8	391,2	0,025051
15	17,3	253,2	0,068325
30	33,3	264,4	0,125946
45	46,2	232,3	0,198881
60	61,6	230,3	0,267477
90	94	235,6	0,398981

Observação	Y previsto	Residuais
1	0,0052	0,001315
5	0,0228	0,002251
15	0,0668	0,001525
30	0,1328	-0,00685
45	0,1988	8,08E-05
60	0,2648	0,002677
90	0,3968	0,002181



LIMITE DE DETEÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO 2-PROPANOL



SUMÁRIO DOS RESULTADOS

<i>Estatística de regressão</i>	
R múltiplo	0,99982458
Quadrado de R	0,99964918
Quadrado de R ajustado	0,99956148
Erro-padrão	0,00102815
Observações	6

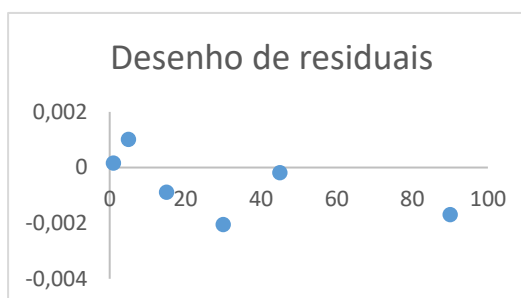
ANOVA

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significância</i>
Regressão	1	0,012048713	0,012049	11397,98	4,61574E-08
Residual	4	4,22837E-06	1,06E-06		
Total	5	0,012052942			

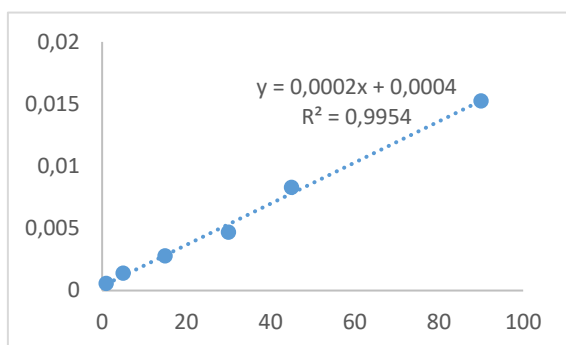
	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro-padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor P</i>	<i>95% inferior</i>	<i>95% superior</i>
Interceptar	0,00094455	0,000600458	1,573058	0,190813	-0,000722583	0,002611693
Variável X 1	0,00147875	1,3851E-05	106,7613	4,62E-08	0,001440293	0,001517206

<i>C. Teórica</i>	<i>Área 2-propanol</i>	<i>Área acetoneitrilo</i>	<i>Área Subs./Área PI</i>
1	0,9	352,7	0,002552
5	2,7	287,1	0,009404
15	8,1	359,9	0,022506
30	13,1	298,8	0,043842
45	18,9	277,1	0,068206
90	37	275,7	0,134204

<i>Observação</i>	<i>Y previsto</i>	<i>Residuais</i>
1	0,0024	0,000152
5	0,0084	0,001004
15	0,0234	-0,00089
30	0,0459	-0,00206
45	0,0684	-0,00019
90	0,1359	-0,0017



LIMITE DE DETEÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO METANOL



SUMÁRIO DOS RESULTADOS

<i>Estatística de regressão</i>	
R múltiplo	0,997691472
Quadrado de R	0,995388274
Quadrado de R ajustado	0,994235343
Erro-padrão	0,000418431
Observações	6

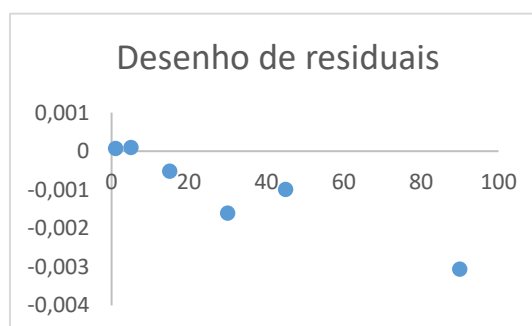
ANOVA

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significância</i>
Regressão	1	0,00015116	0,000151	863,3542	7,9878E-06
Residual	4	7,00337E-07	1,75E-07		
Total	5	0,00015186			

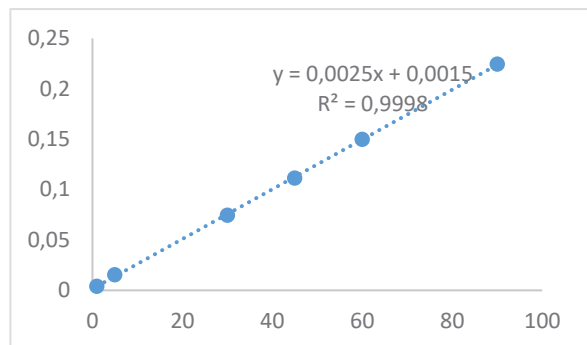
	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro-padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor P</i>	<i>95% inferior</i>	<i>95% superior</i>
Interceptar	0,000358506	0,000244371	1,467056	0,216258	-0,000319977	0,001036989
Variável X 1	0,000165631	5,637E-06	29,38289	7,99E-06	0,00014998	0,000181282

C. Teórica	Área metanol	Área acetonitrilo	Área Subs./Área PI
1	0,2	352,7	0,000567
5	0,4	287,1	0,001393
15	1	359,9	0,002779
30	1,4	298,8	0,004685
45	2,3	277,1	0,0083
90	4,2	275,7	0,015234

Observação	Y previsto	Residuais
1	0,0005	6,70542E-05
5	0,0013	9,32428E-05
15	0,0033	-0,00052145
30	0,0063	-0,001614592
45	0,0093	-0,000999747
60	0,0183	-0,00306605



LIMITE DE DETEÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA ACETONA



SUMÁRIO DOS RESULTADOS

<i>Estadística de regressão</i>	
R múltiplo	0,99992468
Quadrado de R	0,99984937
Quadrado de R ajustado	0,99981172
Erro-padrão	0,00114972
Observações	6

ANOVA

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significância</i>
Regressão	1	0,035097454	0,035097	26551,75	8,50856E-09
Residual	4	5,2874E-06	1,32E-06		
Total	5	0,035102742			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro-padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor P</i>	<i>95%</i>	
					<i>95% inferior</i>	<i>superior</i>
Interceptar	0,00154122	0,000748742	2,058417	0,108647	-0,000537618	0,003620065
Variável X 1	0,002469	1,51522E-05	162,9471	8,51E-09	0,002426929	0,002511068

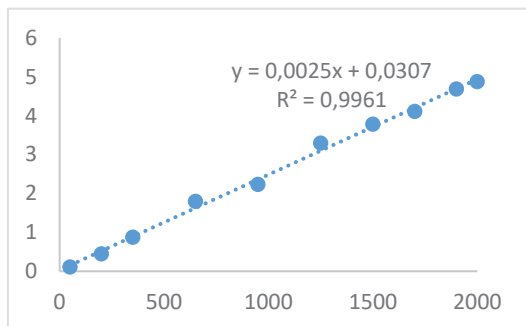
C. Teórica	Área acetona	Área acetoneitrilo	Área Subs./Área PI
1	1,2	307	0,003909
5	6	391,2	0,015337
30	19,7	264,4	0,074508
45	25,9	232,3	0,111494
60	34,5	230,3	0,149805
90	52,9	235,6	0,224533

Observação	Y previsto	Residuais
1	0,004	-9,1E-05
5	0,014	0,001337
15	0,0765	-0,00199
30	0,114	-0,00251
45	0,1515	-0,0017
60	0,2265	-0,00197



7.2. LINEARIDADE

LINEARIDADE DO ACETALDEÍDO



SUMÁRIO DOS RESULTADOS

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,998028
Quadrado de R	0,996059
Quadrado de R ajustado	0,995566
Erro-padrão	0,118016
Observações	10

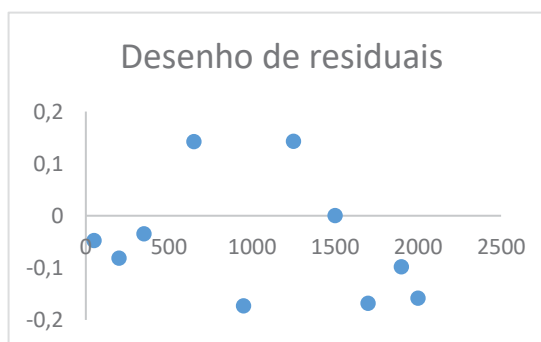
ANOVA

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significância</i>
Regressão	1	28,16062	28,16062	2021,919	6,61E-11
Residual	8	0,111421	0,013928		
Total	9	28,27204			

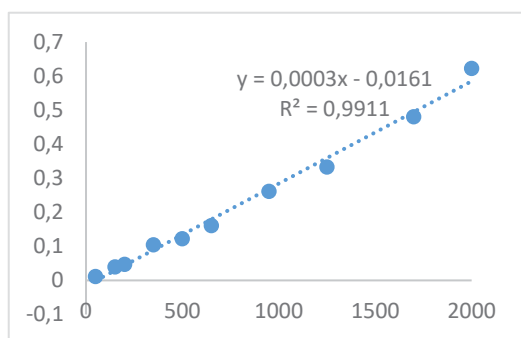
	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro-padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor P</i>	<i>95% inferior</i>	<i>95% superior</i>
Interceptar	0,030728	0,068634	0,447714	0,666235	-0,12754	0,1889986
Variável X 1	0,002455	5,46E-05	44,96575	6,61E-11	0,002329	0,0025809

C.Teórica	Área acetaldeído	Área PI	Área Sub./Área PI
50	29	267,6	0,108371
200	94,1	209,4	0,449379
350	183,1	210,2	0,871075
650	368,6	205	1,798049
950	498,8	223,4	2,232766
1250	694	210,4	3,298479
1500	932,5	246,6	3,781427
1700	922,9	224,4	4,112745
1900	1101,9	235,3	4,682958
2000	1021,8	209,7	4,872675

Observação	Y previsto	Residuais
1	0,1557	-0,04733
2	0,5307	-0,08132
3	0,9057	-0,03462
4	1,6557	0,142349
5	2,4057	-0,17293
6	3,1557	0,142779
7	3,7807	0,000727
8	4,2807	-0,16795
9	4,7807	-0,09774
10	5,0307	-0,15802



LINEARIDADE DO METANOL



SUMÁRIO DOS RESULTADOS

<i>Estadística de regressão</i>	
R múltiplo	0,995533
Quadrado de R	0,991087
Quadrado de R ajustado	0,989972
Erro-padrão	0,020482
Observações	10

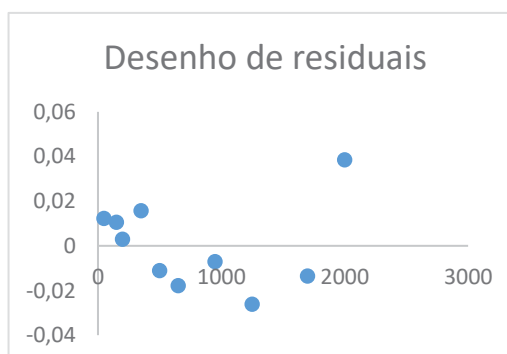
ANOVA

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significância</i>
Regressão	1	0,37316	0,37316	889,5253	1,73E-09
Residual	8	0,003356	0,00042		
Total	9	0,376516			

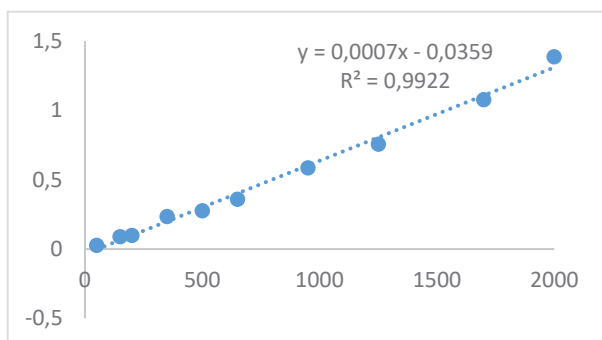
	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro-padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor P</i>	<i>95% inferior</i>	<i>95% superior</i>
Interceptar	-0,01612	0,010185	-1,58228	0,152244	-0,0396	0,007371
Variável X 1	0,000301	1,01E-05	29,82491	1,73E-09	0,000277	0,000324

C.Teórica	Área metanol	Área PI	Área Sub./Área PI
50	3	267,6	0,011211
150	9,2	233,2	0,039451
200	9,8	209,4	0,0468
350	22	210,2	0,104662
500	24,9	202,8	0,122781
650	33	205	0,160976
950	58,5	223,4	0,261862
1250	70	210,4	0,3327
1700	107,8	224,4	0,480392
2000	130,5	209,7	0,622318

Observação	Y previsto	Residuais
1	-0,0011	0,012311
2	0,0289	0,010551
3	0,0439	0,0029
4	0,0889	0,015762
5	0,1339	-0,01112
6	0,1789	-0,01792
7	0,2689	-0,00704
8	0,3589	-0,0262
9	0,4939	-0,01351
10	0,5839	0,038418



LINEARIDADE DO ETANOL



SUMÁRIO DOS RESULTADOS

<i>Estadística de regressão</i>	
R múltiplo	0,9961
Quadrado de R	0,992215
Quadrado de R ajustado	0,991242
Erro-padrão	0,04282
Observações	10

ANOVA

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significância</i>
Regressão	1	1,869442	1,869442	1019,594	1,01E-09
Residual	8	0,014668	0,001834		
Total	9	1,884111			

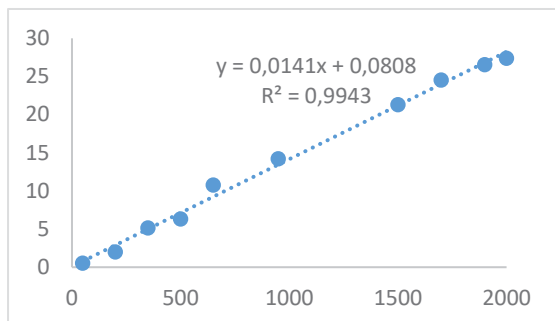
	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro-padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor P</i>	<i>95% inferior</i>	<i>95% superior</i>
Interceptar	-0,03595	0,021293	-1,68821	0,129848	-0,08505	0,013155
Variável X 1	0,000673	2,11E-05	31,93108	1,01E-09	0,000624	0,000721

C. Teórica	Área etanol	Área PI	Área Sub./Área PI
50	7,2	267,6	0,026906
150	20,8	233,2	0,089194
200	20,6	209,4	0,098376
350	49,4	210,2	0,235014
500	55,8	202,8	0,275148
650	73,5	205	0,358537
950	130,9	223,4	0,585944
1250	158,9	210,4	0,755228
1700	241,8	224,4	1,07754
2000	290,6	209,7	1,385789

Observação	Y previsto	Residuais
1	-0,0009	0,027806
2	0,0691	0,020094
3	0,1041	-0,00572
4	0,2091	0,025914
5	0,3141	-0,03895
6	0,4191	-0,06056
7	0,6291	-0,04316
8	0,8391	-0,08387
9	1,1541	-0,07656
10	1,3641	0,021689



LINEARIDADE DO DIETIL-ÉTER



SUMÁRIO DOS RESULTADOS

<i>Estatística de regressão</i>	
R múltiplo	0,997168
Quadrado de R	0,994343
Quadrado de R ajustado	0,993636
Erro-padrão	0,82982
Observações	10

ANOVA

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significância</i>
Regressão	1	968,3738	968,3738	1406,292	2,81E-10
Residual	8	5,508808	0,688601		
Total	9	973,8826			

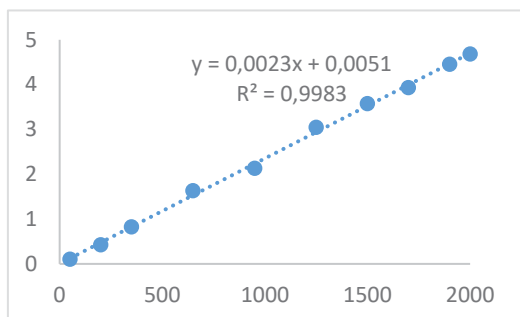
	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro-padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor P</i>	<i>95% inferior</i>	<i>95% superior</i>
Interceptar	0,080843	0,451899	0,178897	0,862466	-0,9612	1,123
Variável X 1	0,014078	0,000375	37,50055	2,81E-10	0,013212	0,014944

C. Teórica	Área dietil-éter	Área PI	Área Sub./Área PI
50	147,2	267,6	0,550075
200	418,6	209,4	1,999045
350	1078,1	210,2	5,128925
500	1285	202,8	6,336292
650	2207,9	205	10,77024
950	3173,8	223,4	14,2068
1500	5252,9	246,6	21,3013
1700	5509,1	224,4	24,55036
1900	6242,5	235,3	26,52996
2000	5746	209,7	27,40105

Observação	Y previsto	Residuais
1	0,7858	-0,23573
2	2,9008	-0,90176
3	5,0158	0,113125
4	7,1308	-0,79451
5	9,2458	1,524444
6	13,4758	0,731004
7	21,2308	0,070498
8	24,0508	0,499557
9	26,8708	-0,34084
10	28,2808	-0,87975



LINEARIDADE DA ACETONA



SUMÁRIO DOS RESULTADOS

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,99917
Quadrado de R	0,998341
Quadrado de R ajustado	0,998133
Erro-padrão	0,073148
Observações	10

ANOVA

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significância</i>
Regressão	1	25,75421	25,75421	4813,269	2,07E-12
Residual	8	0,042805	0,005351		
Total	9	25,79701			

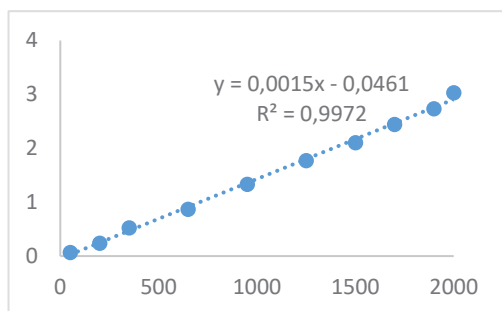
	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro-padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor P</i>	<i>95% inferior</i>	<i>95% superior</i>
Interceptar	0,005112	0,042541	0,120159	0,90732	-0,0930	0,103211
Variável X 1	0,002348	3,38E-05	69,37773	2,07E-12	0,00227	0,002426

C. Teórica	Área acetona	Área PI	Área Sub./Área PI
50	28,9	267,6	0,107997
200	89,2	209,4	0,425979
350	174,1	210,2	0,828259
650	335	205	1,634146
950	475,9	223,4	2,13026
1250	641,4	210,4	3,048479
1500	881,4	246,6	3,574209
1700	882,5	224,4	3,932709
1900	1048,6	235,3	4,456439
2000	981,8	209,7	4,681927

Observação	Y previsto	Residuais
1	0,1201	-0,0121
2	0,4651	-0,03912
3	0,8101	0,018159
4	1,5001	0,134046
5	2,1901	-0,05984
6	2,8801	0,168379
7	3,4551	0,119109
8	3,9151	0,017609
9	4,3751	0,081339
10	4,6051	0,076827



LINEARIDADE DO 2-PROPANOL



SUMÁRIO DOS RESULTADOS

<i>Estatística de regressão</i>	
R múltiplo	0,998622
Quadrado de R	0,997247
Quadrado de R ajustado	0,996902
Erro-padrão	0,059311
Observações	10

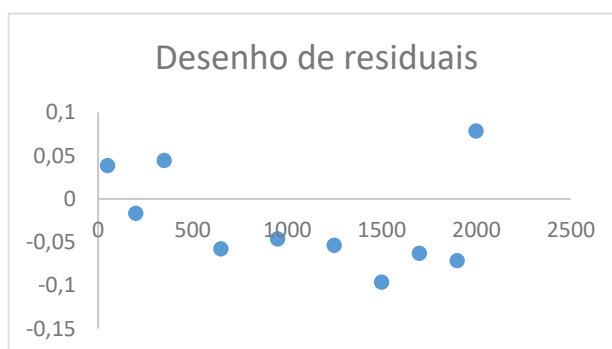
ANOVA

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significância</i>
Regressão	1	10,19254	10,19254	2897,442	1,57E-11
Residual	8	0,028142	0,003518		
Total	9	10,22068			

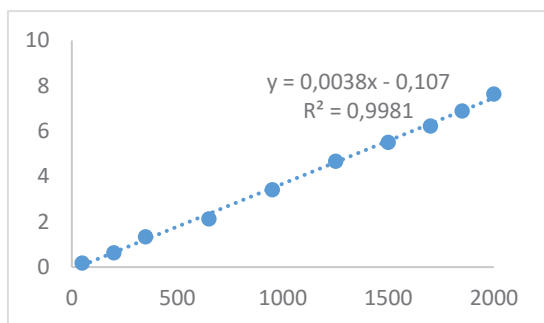
	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro-padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor P</i>	<i>95% inferior</i>	<i>95% superior</i>
Interceptar	-0,04608	0,034493	-1,33598	0,218311	-0,1256	0,033459
Variável X 1	0,001477	2,74E-05	53,82789	1,57E-11	0,001414	0,00154

C. Teórica	Área 2-Propanol	Área PI	Área Sub./Área PI
50	18,1	267,6	0,067638
200	49,7	209,4	0,237345
350	110	210,2	0,523311
650	178,6	205	0,87122
950	297,7	223,4	1,332587
1250	373,5	210,4	1,77519
1500	519,8	246,6	2,107867
1700	547,8	224,4	2,441176
1900	643	235,3	2,732682
2000	635,9	209,7	3,032427

Observação	Y previsto	Residuais
1	0,0289	0,038738
2	0,2539	-0,01656
3	0,4789	0,044411
4	0,9289	-0,05768
5	1,3789	-0,04631
6	1,8289	-0,05371
7	2,2039	-0,09603
8	2,5039	-0,06272
9	2,8039	-0,07122
10	2,9539	0,078527



LINEARIDADE DO t-BUTANOL



SUMÁRIO DOS RESULTADOS

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,999075
Quadrado de R	0,99815
Quadrado de R ajustado	0,997919
Erro-padrão	0,123484
Observações	10

ANOVA

	gl	SQ	MQ	F	F de significância
Regressão	1	65,812	65,812	4316,048	3,21E-12
Residual	8	0,121986	0,015248		
Total	9	65,93398			

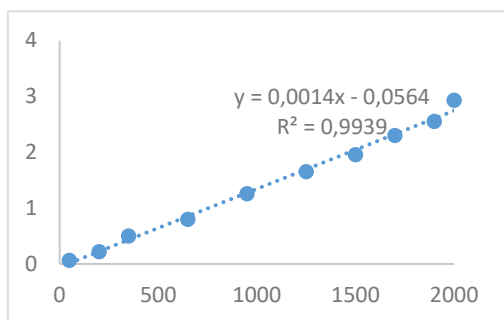
	Coefficientes	Erro-padrão	Stat t	valor P	95% inferior	95% superior
Interceptar	-0,10696	0,072023	-1,48508	0,175824	-0,2730	0,0591
Variável X 1	0,003787	5,76E-05	65,69664	3,21E-12	0,003654	0,003919

C. Teórica	Área t-butanol	Área PI	Área Sub./Área PI
50	48,9	267,6	0,182735
200	134,6	209,4	0,642789
350	281,4	210,2	1,338725
650	438,8	205	2,140488
950	763,8	223,4	3,418979
1250	985	210,4	4,681559
1500	1360	246,6	5,515004
1700	1398,5	224,4	6,232175
1850	1459,2	211,6	6,89603
2000	1602,3	209,7	7,640916

Observação	Y previsto	Residuais
1	0,083	0,099735
2	0,653	-0,01021
3	1,223	0,115725
4	2,363	-0,22251
5	3,503	-0,08402
6	4,643	0,038559
7	5,593	-0,078
8	6,353	-0,12083
9	6,923	-0,02697
10	7,493	0,147916



LINEARIDADE DO n-PROPANOL



SUMÁRIO DOS RESULTADOS

<i>Estatística de regressão</i>	
R múltiplo	0,996948
Quadrado de R	0,993906
Quadrado de R ajustado	0,993144
Erro-padrão	0,08384
Observações	10

ANOVA

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significância</i>
Regressão	1	9,171415	9,171415	1304,76	3,78E-10
Residual	8	0,056234	0,007029		
Total	9	9,227648			

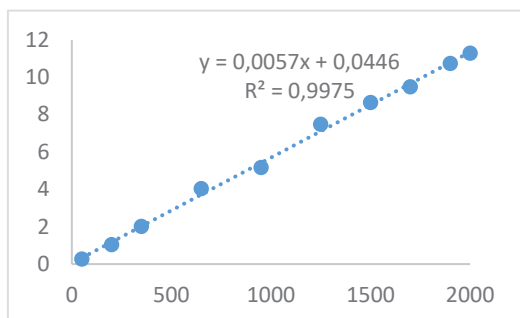
	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro-padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor P</i>	<i>95% inferior</i>	<i>95% superior</i>
Interceptar	-0,05645	0,048759	-1,15768	0,280389	-0,16888	0,055991
Variável X 1	0,001401	3,88E-05	36,12146	3,78E-10	0,001312	0,00149

C. Teórica	Área n-propanol	Área PI	Área Sub./Área PI
50	16,4	267,6	0,061286
200	45,5	209,4	0,217287
350	104,7	210,2	0,498097
650	163,5	205	0,797561
950	280,1	223,4	1,253805
1250	347,7	210,4	1,652567
1500	482,6	246,6	1,957015
1700	516	224,4	2,299465
1900	600,5	235,3	2,552061
2000	613,9	209,7	2,927515

Observação	Y previsto	Residuais
1	0,0136	0,047686
2	0,2236	-0,00631
3	0,4336	0,064497
4	0,8536	-0,05604
5	1,2736	-0,0198
6	1,6936	-0,04103
7	2,0436	-0,08658
8	2,3236	-0,02413
9	2,6036	-0,05154
10	2,7436	0,183915



LINEARIDADE DA METIL-ETIL-CETONA



SUMÁRIO DOS RESULTADOS

<i>Estatística de regressão</i>	
R múltiplo	0,998761
Quadrado de R	0,997524
Quadrado de R ajustado	0,997214
Erro-padrão	0,215288
Observações	10

ANOVA

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significância</i>
Regressão	1	149,3816	149,3816	3222,993	1,03E-11
Residual	8	0,37079	0,046349		
Total	9	149,7524			

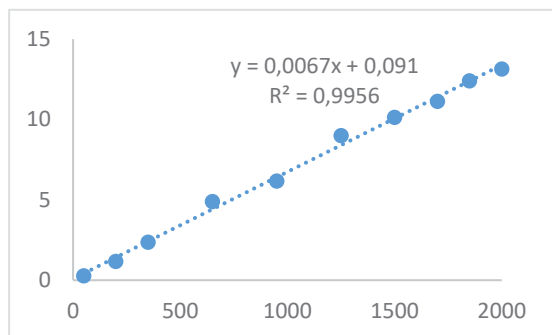
	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro-padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor P</i>	<i>95% inferior</i>	<i>95% superior</i>
Interceptar	0,044628	0,125204	0,356442	0,730727	-0,2441	0,3333
Variável X 1	0,005654	9,96E-05	56,77141	1,03E-11	0,005425	0,005884

C. Teórica	Área metil-etil-cetona	Área PI	Área Sub./Área PI
50	67,8	267,6	0,253363
200	216,1	209,4	1,031996
350	422,3	210,2	2,009039
650	827,3	205	4,03561
950	1153,5	223,4	5,163384
1250	1571,8	210,4	7,470532
1500	2130,4	246,6	8,639092
1700	2126,7	224,4	9,477273
1900	2527,2	235,3	10,74033
2000	2365,3	209,7	11,27945

Observação	Y previsto	Residuais
1	0,3296	-0,07624
2	1,1846	-0,1526
3	2,0396	-0,03056
4	3,7496	0,28601
5	5,4596	-0,29622
6	7,1696	0,300932
7	8,5946	0,044492
8	9,7346	-0,25733
9	10,8746	-0,13427
10	11,4446	-0,16515



LINEARIDADE DO ACETATO DE ETILO



SUMÁRIO DOS RESULTADOS

<i>Estatística de regressão</i>	
R múltiplo	0,997822
Quadrado de R	0,995648
Quadrado de R ajustado	0,995104
Erro-padrão	0,333033
Observações	10

ANOVA

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significância</i>
Regressão	1	202,995	202,995	1830,251	9,83E-11
Residual	8	0,887288	0,110911		
Total	9	203,8823			

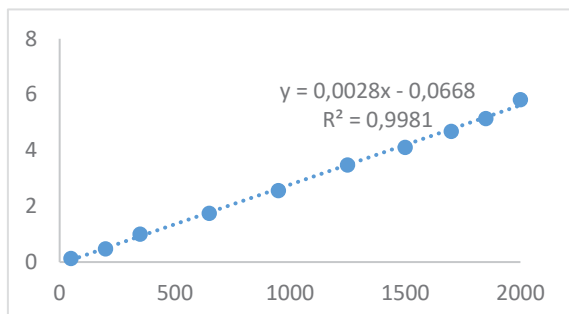
	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro-padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor P</i>	<i>95% inferior</i>	<i>95% superior</i>
Interceptar	0,091014	0,194246	0,468549	0,651894	-0,35692	0,538946
Variável X 1	0,00665	0,000155	42,78144	9,83E-11	0,006292	0,007009

C. Teórica	Área acetato de etilo	Área PI	Área Sub./Área PI
50	72,8	267,6	0,272048
200	245,3	209,4	1,171442
350	497,8	210,2	2,368221
650	1006	205	4,907317
950	1377,5	223,4	6,16607
1250	1895,7	210,4	9,009981
1500	2499,1	246,6	10,13423
1700	2500,4	224,4	11,1426
1850	2627,8	211,6	12,41871
2000	2756,9	209,7	13,14688

Observação	Y previsto	Residuais
1	0,426	-0,15395
2	1,431	-0,25956
3	2,436	-0,06778
4	4,446	0,461317
5	6,456	-0,28993
6	8,466	0,543981
7	10,141	-0,00677
8	11,481	-0,3384
9	12,486	-0,06729
10	13,491	-0,34412



LINEARIDADE DO 2-BUTANOL



SUMÁRIO DOS RESULTADOS

<i>Estatística de regressão</i>	
R múltiplo	0,999031
Quadrado de R	0,998063
Quadrado de R ajustado	0,99782
Erro-padrão	0,094843
Observações	10

ANOVA

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significância</i>
Regressão	1	37,07121	37,07121	4121,244	3,86E-12
Residual	8	0,071961	0,008995		
Total	9	37,14317			

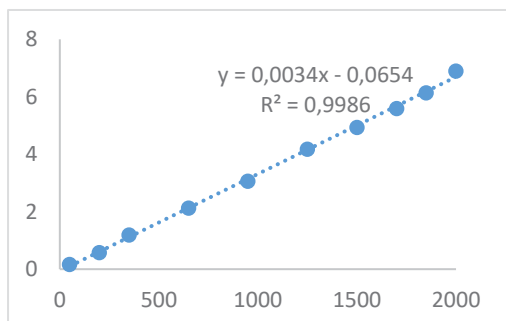
	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro-padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor P</i>	<i>95% inferior</i>	<i>95% superior</i>
Interceptar	-0,06679	0,055318	-1,20739	0,261764	-0,19436	0,060773
Variável X 1	0,002842	4,43E-05	64,19692	3,86E-12	0,00274	0,002944

C. Teórica	Área 2-butanol	Área PI	Área Sub./Área PI
50	35,6	267,6	0,133034
200	99,8	209,4	0,4766
350	211,3	210,2	1,005233
650	357,4	205	1,743415
950	572,9	223,4	2,564458
1250	732,9	210,4	3,483365
1500	1014,1	246,6	4,112328
1700	1052	224,4	4,688057
1850	1088,9	211,6	5,14603
2000	1220,4	209,7	5,819742

Observação	Y previsto	Residuais
1	0,0732	0,059834
2	0,4932	-0,0166
3	0,9132	0,092033
4	1,7532	-0,00979
5	2,5932	-0,02874
6	3,4332	0,050165
7	4,1332	-0,02087
8	4,6932	-0,00514
9	5,1132	0,03283
10	5,5332	0,286542



LINEARIDADE DO ISOBUTANOL



SUMÁRIO DOS RESULTADOS

<i>Estatística de regressão</i>	
R múltiplo	0,99932
Quadrado de R	0,998641
Quadrado de R ajustado	0,998471
Erro-padrão	0,09442
Observações	10

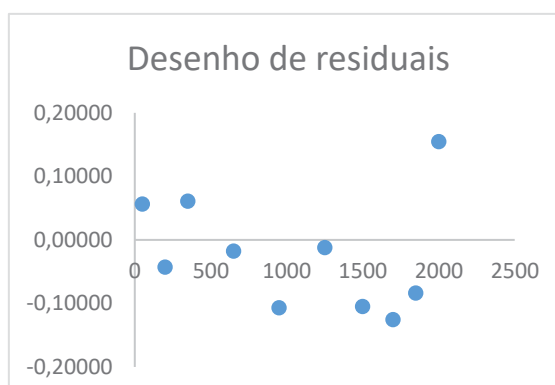
ANOVA

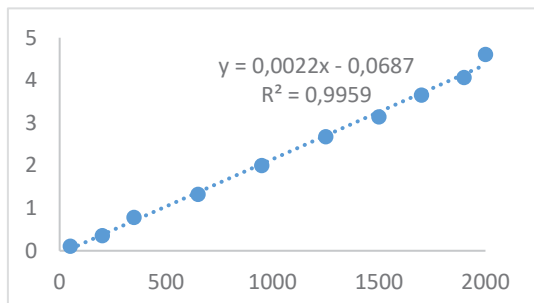
	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significância</i>
Regressão	1	52,40877	52,40877	5878,613	9,33238E-13
Residual	8	0,071321	0,008915		
Total	9	52,4801			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro-padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor P</i>	<i>95% inferior</i>	<i>95% superior</i>
Interceptar	-0,06542	0,055072	-1,18785	0,268961	-0,192412583	0,061579
Variável X 1	0,003379	4,41E-05	76,67212	9,33E-13	0,003277429	0,003481

C.Teórica	Área isobutanol	Área PI	Área Sub./Área PI
50	43,1	267,6	0,161061
200	119,8	209,4	0,572111
350	249,2	210,2	1,185538
650	436,1	205	2,127317
950	683,1	223,4	3,057744
1250	877,9	210,4	4,172529
1500	1215,7	246,6	4,929846
1700	1254,2	224,4	5,589127
1850	1299,5	211,6	6,141304
2000	1444,7	209,7	6,889366

Observação	Y previsto	Residuais
1	0,1046	0,05646
2	0,6146	-0,04249
3	1,1246	0,06094
4	2,1446	-0,01728
5	3,1646	-0,10686
6	4,1846	-0,01207
7	5,0346	-0,10475
8	5,7146	-0,12547
9	6,2246	-0,08330
10	6,7346	0,15477



LINEARIDADE DO *n*-BUTANOL


SUMÁRIO DOS RESULTADOS

<i>Estatística de regressão</i>	
R múltiplo	0,99796
Quadrado de R	0,995924
Quadrado de R ajustado	0,995414
Erro-padrão	0,108437
Observações	10

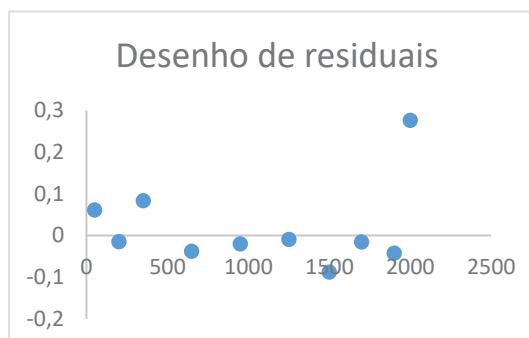
ANOVA

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significância</i>
Regressão	1	22,98299	22,98299	1954,584	7,56E-11
Residual	8	0,094068	0,011759		
Total	9	23,07705			

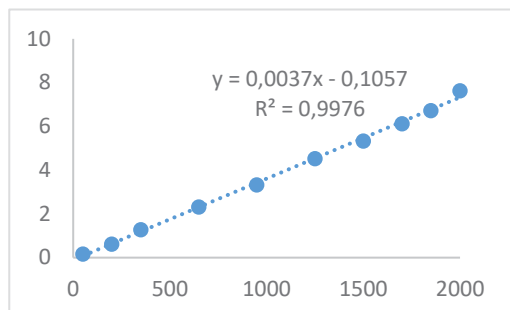
	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro-padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor P</i>	<i>95% inferior</i>	<i>95% superior</i>
Interceptar	-0,06869	0,063063	-1,08919	0,307788	-0,21411	0,076736
Variável X 1	0,002218	5,02E-05	44,21068	7,56E-11	0,002102	0,002334

C.Teórica	Área <i>n</i>-butanol	Área PI	Área Sub./Área PI
50	27,4	267,6	0,102392
200	74,6	209,4	0,356256
350	164,9	210,2	0,784491
650	271,2	205	1,322927
950	446,9	223,4	2,000448
1250	562,1	210,4	2,671578
1500	775	246,6	3,142741
1700	820,2	224,4	3,65508
1900	957,3	235,3	4,068423
2000	966,2	209,7	4,607535

Observação	Y previsto	Residuais
1	0,3713	-0,01504
2	0,7013	0,083191
3	1,3613	-0,03837
4	2,0213	-0,02085
5	2,6813	-0,00972
6	3,2313	-0,08856
7	3,6713	-0,01622
8	4,1113	-0,04288
9	4,3313	0,276235
10	0,0413	0,061092



LINEARIDADE DO 3-METIL-1-BUTANOL



SUMÁRIO DOS RESULTADOS

<i>Estatística de regressão</i>	
R múltiplo	0,9988
Quadrado de R	0,997602
Quadrado de R ajustado	0,997302
Erro-padrão	0,138051
Observações	10

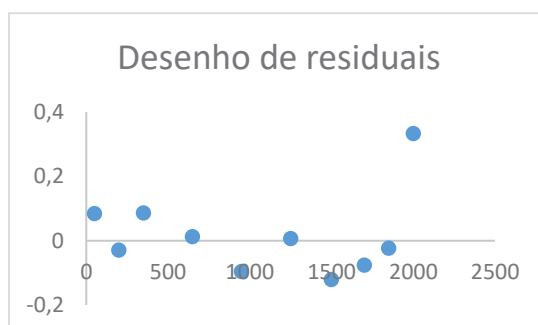
ANOVA

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significância</i>
Regressão	1	63,4271	63,4271	3328,098	9,05E-12
Residual	8	0,152465	0,019058		
Total	9	63,57956			

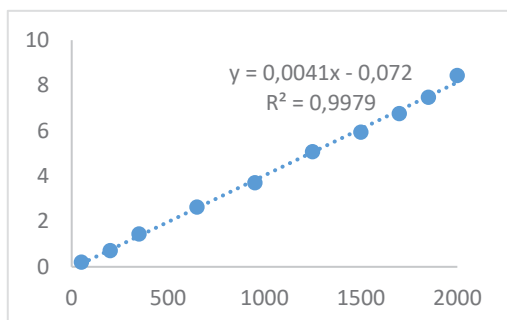
	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro-padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor P</i>	<i>95% inferior</i>	<i>95% superior</i>
Interceptar	-0,10571	0,08052	-1,31285	0,225639	-0,2914	0,0800
Variável X 1	0,003717	6,44E-05	57,68967	9,05E-12	0,003569	0,003866

C.Teórica	Área 3-Metil-1-Butanol	Área PI	Área Sub./Área PI
50	44	267,6	0,164425
200	126,8	209,4	0,60554
350	268,2	210,2	1,275928
650	474,1	205	2,312683
950	740,2	223,4	3,313339
1250	952,3	210,4	4,526141
1500	1312,8	246,6	5,323601
1700	1370,9	224,4	6,10918
1850	1421,1	211,6	6,715974
2000	1599,6	209,7	7,62804

Observação	Y previsto	Residuais
1	0,0793	0,085125
2	0,6343	-0,02876
3	1,1893	0,086628
4	2,2993	0,013383
5	3,4093	-0,09596
6	4,5193	0,006841
7	5,4443	-0,1207
8	6,1843	-0,07512
9	6,7393	-0,02333
10	7,2943	0,33374



LINEARIDADE DO 2-METIL-1-BUTANOL



SUMÁRIO DOS RESULTADOS

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,99894
Quadrado de R	0,997882
Quadrado de R ajustado	0,997617
Erro-padrão	0,143286
Observações	10

ANOVA

	gl	SQ	MQ	F	F de significância
Regressão	1	77,37567	77,37567	3768,759	5,51E-12
Residual	8	0,164246	0,020531		
Total	9	77,53991			

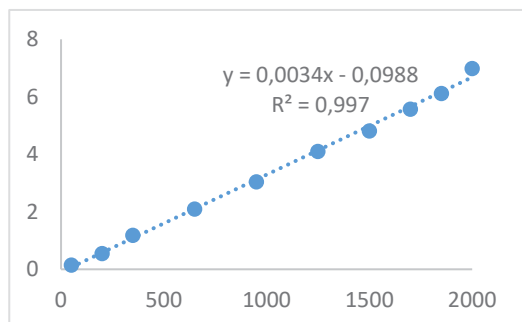
	Coefficientes	Erro-padrão	Stat t	valor P	95% inferior	95% superior
Interceptar	-0,07203	0,083573	-0,8619	0,413829	-0,2648	0,1207
Variável X 1	0,004106	6,69E-05	61,39022	5,51E-12	0,003952	0,00426

C.Teórica	Área 2-Metil-1Butanol	Área PI	Área Sub./Área PI
50	52,9	267,6	0,197683
200	148,3	209,4	0,708214
350	305,2	210,2	1,451951
650	539,6	205	2,632195
950	826,7	223,4	3,700537
1250	1068,7	210,4	5,079373
1500	1464,9	246,6	5,940389
1700	1517	224,4	6,76025
1850	1583,5	211,6	7,483459
2000	1769,1	209,7	8,436338

Observação	Y previsto	Residuais
1	0,133	0,064683
2	0,748	-0,03979
3	1,363	0,088951
4	2,593	0,039195
5	3,823	-0,12246
6	5,053	0,026373
7	6,078	-0,13761
8	6,898	-0,13775
9	7,513	-0,02954
10	8,128	0,308338



LINEARIDADE DO 1-PENTANOL



SUMÁRIO DOS RESULTADOS

<i>Estatística de regressão</i>	
R múltiplo	0,998481
Quadrado de R	0,996964
Quadrado de R ajustado	0,996585
Erro-padrão	0,141672
Observações	10

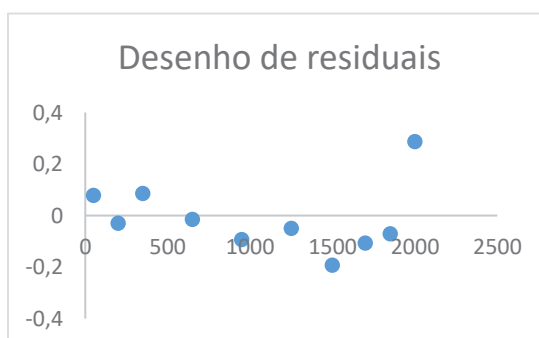
ANOVA

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significância</i>
Regressão	1	52,73353	52,73353	2627,366	2,32E-11
Residual	8	0,160567	0,020071		
Total	9	52,8941			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro-padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor P</i>	<i>95% inferior</i>	<i>95% superior</i>
Interceptar	-0,09878	0,082632	-1,19544	0,266147	-0,2893	0,0918
Variável X 1	0,00339	6,61E-05	51,25784	2,32E-11	0,003237	0,003542

C.Teórica	Área 1-Pentanol	Área PI	Área Sub./Área PI
50	39,8	267,6	0,148729
200	115,5	209,4	0,551576
350	247,4	210,2	1,176974
650	429,7	205	2,096098
950	678,6	223,4	3,037601
1250	862,9	210,4	4,101236
1500	1185,7	246,6	4,808191
1700	1250,7	224,4	5,573529
1850	1294,9	211,6	6,119565
2000	1465,5	209,7	6,988555

Observação	Y previsto	Residuais
1	0,0712	0,077529
2	0,5812	-0,02962
3	1,0912	0,085774
4	2,1112	-0,0151
5	3,1312	-0,0936
6	4,1512	-0,04996
7	5,0012	-0,19301
8	5,6812	-0,10767
9	6,1912	-0,07163
10	6,7012	0,287355



7.3. ESTUDO DA HOMOCEDASTICIDADE

HOMOCEDASTICIDADE DO ACETALDEÍDO

	Área sub.	Área PI	Área sub./Área PI	Concentração real (mg/L)	Variância (S ²)
50 mg/L	22,9	206	0,111165	32,76	5,437807
	24,6	201,9	0,121842	37,11	
	24	205,7	0,116675	35,01	
	24,5	201,5	0,121588	37,01	
	22,9	209,1	0,109517	32,09	

	Área sub.	Área PI	Área sub./Área PI	Concentração real (mg/L)	Variância (S ²)
2000 mg/L	1034,8	211,1	4,901942	1984,171	5844.63
	1035,6	211,7	4,891828	1980,051	
	1068,9	203	5,265517	2132,265	
	1086,1	228	4,763596	1927,819	
	1027,2	208,8	4,91954	1991,339	

HOMOCEDASTICIDADE DO METANOL

	Área sub.	Área PI	Área sub./Área PI	Concentração real (mg/L)	Variância (S ²)
50 mg/L	2,7	206	0,013107	97,23	10.79512
	2,7	201,9	0,013373	98,11	
	2,7	205,7	0,013126	97,29	
	2,6	201,5	0,012903	96,55	
	3,2	209,1	0,015304	104,54	

	Área sub.	Área PI	Área sub./Área PI	Concentração real (mg/L)	Variância (S ²)
2000 mg/L	132,8	211,1	0,629086	2146,719	2179.939
	130,8	211,7	0,617855	2109,354	
	132,3	203	0,651724	2222,042	
	142,3	228	0,624123	2130,207	
	134,4	208,8	0,643678	2195,271	

HOMOCEASTICIDADE DO ETANOL

	Área sub.	Área PI	Área sub./Área PI	Concentração real (mg/L)	Variância (S ²)
50 mg/L	5,7	206	0,02767	94,56768	33.71658
	5,1	201,9	0,02526	90,98535	
	5,5	205,7	0,026738	93,18234	
	7,1	201,5	0,035236	105,8145	
	6,3	209,1	0,030129	98,22337	

	Área sub.	Área PI	Área sub./Área PI	Concentração real (mg/L)	Variância (S ²)
2000 mg/L	293	211,1	1.387968	2116,681	3555.328
	288,6	211,7	1,36325	2079,938	
	297,7	203	1,466502	2233,425	
	319,6	228	1,401754	2137,176	
	299,1	208,8	1,432471	2182,837	

HOMOCEASTICIDADE DO DIETIL-ÉTER

	Área sub.	Área PI	Área sub./Área PI	Concentração real (mg/L)	Variância (S ²)
50 mg/L	147,5	206	0,716019	45,11795	15.30637
	149,3	201,9	0,739475	46,78405	
	144,5	205,7	0,702479	44,15617	
	164,8	201,5	0,817866	52,35234	
	140,5	209,1	0,671927	41,98599	

	Área sub.	Área PI	Área sub./Área PI	Concentração real (mg/L)	Variância (S ²)
2000 mg/L	7322,1	211,1	34.68546	2458,042	21587.22
	7695	211,7	36,34861	2576,179	
	7079,6	203	34,87488	2471,496	
	7040,7	228	30,88026	2187,75	
	7347,3	208,8	35,18822	2493,754	

HOMOCEDASTICIDADE DA ACETONA

	Área sub.	Área PI	Área sub./Área PI	Concentração real (mg/L)	Variância (S ²)
50 mg/L	24,1	206	0,11699	47,65255	4.053645
	25,4	201,9	0,125805	51,40694	
	25,3	205,7	0,122995	50,20999	
	25,6	201,5	0,127047	51,93607	
	24,5	209,1	0,117169	47,72859	

	Área sub.	Área PI	Área sub./Área PI	Concentração real (mg/L)	Variância (S ²)
2000 mg/L	1035,5	211,1	4,905258	2087,123	5758.874
	1028	211,7	4,855928	2066,112	
	1073	203	5,285714	2249,171	
	1110,2	228	4,869298	2071,806	
	1035,7	208,8	4,960249	2110,545	

HOMOCEDASTICIDADE DO 2-PROPANOL

	Área sub.	Área PI	Área sub./Área PI	Concentração real (mg/L)	Variância (S ²)
50 mg/L	14,8	206	0,071845	79,84251	712.2347
	14,1	201,9	0,069837	78,48292	
	15,2	205,7	0,073894	81,23004	
	16,2	201,5	0,080397	85,63291	
	15,6	209,1	0,074605	81,71171	

	Área sub.	Área PI	Área sub./Área PI	Concentração real (mg/L)	Variância (S ²)
2000 mg/L	669,8	211,1	3,172904	2179,42	5159.546
	653,4	211,7	3,086443	2120,882	
	685,2	203	3,375369	2316,5	
	732,7	228	3,213596	2206,971	
	678,2	208,8	3,248084	2230,321	

HOMOCEASTICIDADE DO *t*-BUTANOL

	Área sub.	Área PI	Área sub./Área PI	Concentração real (mg/L)	Variância (S ²)
50 mg/L	39	206	0,18932	78,24512	1413.125
	38,4	201,9	0,190193	78,47561	
	40,6	205,7	0,197375	80,37223	
	42,2	201,5	0,209429	83,5557	
	41,1	209,1	0,196557	80,15616	

	Área sub.	Área PI	Área sub./Área PI	Concentração real (mg/L)	Variância (S ²)
2000 mg/L	1710.6	211.1	8.103269	2168,249	6387.239
	1682,5	211,7	7,947567	2127,129	
	1775,9	203	8,748276	2338,589	
	1864,9	228	8,179386	2188,351	
	1724,6	208,8	8,259579	2209,529	

HOMOCEASTICIDADE DO *n*-PROPANOL

	Área sub.	Área PI	Área sub./Área PI	Concentração real (mg/L)	Variância (S ²)
50 mg/L	13.8	206	0,06699	88,10302	6.355632
	11,8	201,9	0,058445	82,00367	
	13,3	205,7	0,064657	86,43783	
	12,7	201,5	0,063027	85,27444	
	14	209,1	0,066954	88,07684	

	Área sub.	Área PI	Área sub./Área PI	Concentração real (mg/L)	Variância (S ²)
2000 mg/L	642.8	211.1	3.045002	2213,653	6516.093
	627,7	211,7	2,965045	2156,584	
	664,4	203	3,272906	2376,319	
	702,6	228	3,081579	2239,759	
	645,9	208,8	3,093391	2248,19	

HOMOCEDASTICIDADE DA METIL-ETIL-CETONA

	Área sub.	Área PI	Área sub./Área PI	Concentração real (mg/L)	Variância (S ²)
50 mg/L	52,7	206	0,255825	37,35103	4.82537
	56,8	201,9	0,281327	41,86118	
	56,9	205,7	0,276616	41,02803	
	57,1	201,5	0,283375	42,22325	
	54,6	209,1	0,261119	38,28726	

	Área sub.	Área PI	Área sub./Área PI	Concentração real (mg/L)	Variância (S ²)
2000 mg/L	2350,5	211,1	11,13453	2350,5	5348,422
	2335,7	211,7	11,03307	2335,7	
	2431,9	203	11,9798	2431,9	
	2496,7	228	10,95044	2496,7	
	2340	208,8	11,2069	2340	

HOMOCEDASTICIDADE DO ACETATO DE ETILO

	Área sub.	Área PI	Área sub./Área PI	Concentração real (mg/L)	Variância (S ²)
50 mg/L	62,4	206	0,302913	31,86341	7.87424
	67,4	201,9	0,333829	36,51227	
	66,2	205,7	0,321828	34,70772	
	68,9	201,5	0,341935	37,73131	
	62,6	209,1	0,299378	31,33195	

	Área sub.	Área PI	Área sub./Área PI	Concentração real (mg/L)	Variância (S ²)
2000 mg/L	2943,1	211,1	13,94173	2082,745	6012,977
	2940,7	211,7	13,89088	2075,098	
	2999,6	203	14,77635	2208,247	
	3040,3	228	13,33465	1991,457	
	2905,9	208,8	13,91715	2079,047	

HOMOCEASTICIDADE DO 2-BUTANOL

	Área sub.	Área PI	Área sub./Área PI	Concentração real (mg/L)	Variância (S ²)
50 mg/L	29,1	206	0,141262	73,20859	4.584054
	28,4	201,9	0,140664	72,99802	
	28,9	205,7	0,140496	72,93896	
	31,2	201,5	0,154839	77,98585	
	30,1	209,1	0,14395	74,15448	

	Área sub.	Área PI	Área sub./Área PI	Concentração real (mg/L)	Variância (S ²)
2000 mg/L	1293,1	211,1	6,125533	2178,922	8667.217
	1258,1	211,7	5,942844	2114,638	
	1351,3	203	6,65665	2365,808	
	1409,3	228	6,18114	2198,489	
	1289	208,8	6,173372	2195,755	

HOMOCEASTICIDADE DO ISOBUTANOL

	Área sub.	Área PI	Área sub./Área PI	Concentração real (mg/L)	Variância (S ²)
50 mg/L	33,6	206	0,163107	67,62938	2.168791
	33,4	201,9	0,165428	68,31644	
	34,7	205,7	0,168692	69,28235	
	35,5	201,5	0,176179	71,49787	
	35,5	209,1	0,169775	69,60284	

	Área sub.	Área PI	Área sub./Área PI	Concentração real (mg/L)	Variância (S ²)
2000 mg/L	1541,8	211,1	7,303648	2180,804	11229.02
	1479,7	211,7	6,989608	2087,867	
	1614,7	203	7,954187	2373,325	
	1663,8	228	7,297368	2178,946	
	1510,7	208,8	7,235153	2160,534	

HOMOCEASTICIDADE DO *n*-BUTANOL

	Área sub.	Área PI	Área sub./Área PI	Concentração real (mg/L)	Variância (S ²)
50 mg/L	20,1	206	0,097573	74,96346	5.660381
	19,1	201,9	0,094601	73,62366	
	20,8	205,7	0,101118	76,56197	
	21,9	201,5	0,108685	79,97365	
	21,2	209,1	0,101387	76,68315	

	Área sub.	Área PI	Área sub./Área PI	Concentração real (mg/L)	Variância (S ²)
2000 mg/L	1066,5	211,1	5,052108	2308,858	19013,33
	1009,2	211,7	4,767123	2180,365	
	1129,1	203	5,562069	2538,789	
	1143,1	228	5,013596	2291,494	
	1017,9	208,8	4,875	2229,004	

HOMOCEASTICIDADE DO 3-METIL-1-BUTANOL

	Área sub.	Área PI	Área sub./Área PI	Concentração real (mg/L)	Variância (S ²)
50 mg/L	35,1	206	0,170388	74,27361	3.528158
	34,3	201,9	0,169886	74,13849	
	36,5	205,7	0,177443	76,17135	
	37,7	201,5	0,187097	78,76835	
	36,6	209,1	0,175036	75,52384	

	Área sub.	Área PI	Área sub./Área PI	Concentração real (mg/L)	Variância (S ²)
2000 mg/L	1867	211,1	8,84415	2407,605	50788,79
	1694,7	211,7	8,005196	2181,918	
	2042,4	203	10,06108	2734,973	
	1940,7	228	8,511842	2318,211	
	1681,9	208,8	8,055077	2195,336	

HOMOCEASTICIDADE DO 2-METIL-1-BUTANOL

	Área sub.	Área PI	Área sub./Área PI	Concentração real (mg/L)	Variância (S ²)
50 mg/L	42,9	206	0,208252	68,26578	4.019434
	41,8	201,9	0,207033	67,96882	
	43,9	205,7	0,213418	69,5238	
	45,4	201,5	0,22531	72,42035	
	42,8	209,1	0,204687	67,39733	

	Área sub.	Área PI	Área sub./Área PI	Concentração real (mg/L)	Variância (S ²)
2000 mg/L	2043,3	211,1	9,679299	2375,024	41373,52
	1882,9	211,7	8,89419	2183,804	
	2223,7	203	10,95419	2685,535	
	2136,8	228	9,37193	2300,162	
	1871,9	208,8	8,965038	2201,06	

HOMOCEASTICIDADE DO 1-PENTANOL

	Área sub.	Área PI	Área sub./Área PI	Concentração real (mg/L)	Variância (S ²)
50 mg/L	28,7	206	0,13932	70,24663	6.265376
	27,5	201,9	0,136206	69,32781	
	31,1	205,7	0,151191	73,74881	
	31,4	201,5	0,155831	75,1178	
	29,3	209,1	0,140124	70,48382	

	Área sub.	Área PI	Área sub./Área PI	Concentração real (mg/L)	Variância (S ²)
2000 mg/L	1802	211,1	8,536239	2547,571	96042,94
	1882,9	211,7	8,89419	2242,2	
	2223,7	203	10,95419	2974,77	
	2136,8	228	9,37193	2390,142	
	1871,9	208,8	8,965038	2214,723	

7.4. PONDERAÇÃO

Composto	Ponderação	R ²	CV _{PI} (%)
Acetaldeído	1/x ²	0.996506	9.04
Metanol	1/x	0.992266	8.85
Etanol	1/x	0.992168	8.85
Dietyl-éter	1/x	0.993789	9.38
Acetona	1/x ²	0.997995	9.04
2-Propanol	1/x ²	0.995445	9.04
t-Butanol	1/x	0.998194	9.11
1-Propanol	1/x ²	0.993491	9.04
Metil-etil-cetona	1/x	0.998274	9.04
Acetato de etilo	1/x ²	0.995832	9.11
2-Butanol	1/x ²	0.997033	9.11
Isobutanol	1/x ²	0.997425	9.11
1-Butanol	1/x ²	0.995280	9.04
3-Metil-1-butanol	1/x ²	0.996841	9.11
2-Metil-1-butanol	1/x ²	0.997602	9.11
1-Pentanol	1/x ²	0.996663	9.11

7.5. REPETIBILIDADE

REPETIBILIDADE DO ACETALDEÍDO

100 mg/L

TR (min)	TR _{PI} (min)	TRR	Área	Área _{PI}	A/A _{PI}
1,59	2,88	0,552	58	243	0,240
1,59	2,88	0,552	54	206	0,263
1,58	2,88	0,549	53	222	0,239
1,58	2,88	0,549	51	195	0,259
1,59	2,88	0,552	53	214	0,246
	Média	0,551		Média	0,250
	Desv. Pad. (s)	0,002		Desv. Pad. (s)	0,011
	CV (%)	0,345		CV (%)	4,372

800 mg/L

TR (min)	TR _{PI} (min)	TRR	Área	Área _{PI}	A/A _{PI}
1,59	2,88	0,552	432	210	2,055
1,58	2,88	0,549	441	208	2,117
1,58	2,88	0,549	475	220	2,161
1,58	2,88	0,549	434	198	2,197
1,58	2,88	0,549	428	200	2,145
	Média	0,549		Média	2,135
	Desv. Pad. (s)	0,002		Desv. Pad. (s)	0,053
	CV (%)	0,283		CV (%)	2,501

1500 mg/L

TR (min)	TR _{PI} (min)	TRR	Área	Área _{PI}	A/A _{PI}
1,58	2,88	0,549	817	208	3,929
1,59	2,88	0,552	824	211	3,900
1,58	2,88	0,549	814	203	4,006
1,58	2,88	0,549	809	209	3,872
1,58	2,88	0,549	816	216	3,783
	Média	0,549		Média	3,898
	Desv. Pad. (s)	0,002		Desv. Pad. (s)	0,082
	CV (%)	0,283		CV (%)	2,092

REPETIBILIDADE DO METANOL

100 mg/L

TR (min)	TR _{PI} (min)	TRR	Área	Área _{PI}	A/A _{PI}
1,65	2,88	0,573	7	243	0,028
1,65	2,88	0,573	6	206	0,031
1,65	2,88	0,573	7	222	0,032
1,65	2,88	0,573	6	195	0,029
1,65	2,88	0,573	7	214	0,031
	Média	0,573		Média	0,030
	Desv. Pad. (s)	0,000		Desv. Pad. (s)	0,001
	CV (%)	0,000		CV (%)	4,913

800 mg/L

TR (min)	TR _{PI} (min)	TRR	Área	Área _{PI}	A/A _{PI}
1,65	2,88	0,573	56	210	0,266
1,65	2,88	0,573	50	208	0,242
1,65	2,88	0,573	51	220	0,233
1,65	2,88	0,573	45	198	0,230
1,65	2,88	0,573	47	200	0,234
	Média	0,573		Média	0,241
	Desv. Pad. (s)	0,000		Desv. Pad. (s)	0,014
	CV (%)	0,000		CV (%)	6,015

1500 mg/L

TR (min)	TR _{PI} (min)	TRR	Área	Área _{PI}	A/A _{PI}
1,65	2,88	0,573	103	208	0,494
1,65	2,88	0,573	95	211	0,450
1,65	2,88	0,573	94	203	0,463
1,65	2,88	0,573	104	209	0,498
1,65	2,88	0,573	108	216	0,500
	Média	0,573		Média	0,481
	Desv. Pad. (s)	0,000		Desv. Pad. (s)	0,023
	CV (%)	0,000		CV (%)	4,726

REPETIBILIDADE DO ETANOL

100 mg/L

TR (min)	TR _{PI} (min)	TRR	Área	Área _{PI}	A/A _{PI}
2,2	2,88	0,764	15	243	0,060
2,19	2,88	0,760	13	206	0,063
2,2	2,88	0,764	14	222	0,063
2,19	2,88	0,760	11	195	0,058
2,2	2,88	0,764	14	214	0,063
	Média	0,763		Média	0,061
	Desv. Pad. (s)	0,002		Desv. Pad. (s)	0,002
	CV (%)	0,249		CV (%)	3,649

800 mg/L

TR (min)	TR _{PI} (min)	TRR	Área	Área _{PI}	A/A _{PI}
2,2	2,88	0,764	117,6	210	0,560
2,2	2,88	0,764	106,5	208	0,511
2,2	2,88	0,764	110,9	220	0,504
2,19	2,88	0,760	99	198	0,502
2,19	2,88	0,760	100	200	0,500
	Média	0,763		Média	0,515
	Desv. Pad. (s)	0,002		Desv. Pad. (s)	0,025
	CV (%)	0,249		CV (%)	4,874

1500 mg/L

TR (min)	TR _{PI} (min)	TRR	Área	Área _{PI}	A/A _{PI}
2,19	2,88	0,760	219	208	1,052
2,2	2,88	0,764	211	211	0,999
2,19	2,88	0,760	202	203	0,996
2,2	2,88	0,764	222	209	1,065
2,2	2,88	0,764	231	216	1,068
	Média	0,763		Média	1,036
	Desv. Pad. (s)	0,002		Desv. Pad. (s)	0,036
	CV (%)	0,249		CV (%)	3,462

REPETIBILIDADE DO DIETIL ÉTER

100 mg/L

TR (min)	TR _{PI} (min)	TRR	Área	Área _{PI}	A/A _{PI}
2,32	2,88	0,806	310	243	1,279
2,32	2,88	0,806	302	206	1,469
2,32	2,88	0,806	289	222	1,299
2,32	2,88	0,806	284	195	1,457
2,32	2,88	0,806	291	214	1,358
	Média	0,806		Média	1,373
	Desv. Pad. (s)	0,000		Desv. Pad. (s)	0,088
	CV (%)	0,000		CV (%)	6,390

800 mg/L

TR (min)	TR _{PI} (min)	TRR	Área	Área _{PI}	A/A _{PI}
2,32	2,88	0,806	2764,1	210	13,156
2,32	2,88	0,806	2788,1	208	13,379
2,32	2,88	0,806	2909,2	220	13,230
2,32	2,88	0,806	2791	198	14,132
2,32	2,88	0,806	2727	200	13,657
	Média	0,806		Média	13,511
	Desv. Pad. (s)	0,000		Desv. Pad. (s)	0,397
	CV (%)	0,000		CV (%)	2,935

1500 mg/L

TR (min)	TR _{PI} (min)	TRR	Área	Área _{PI}	A/A _{PI}
2,32	2,88	0,806	5385	208	25,914
2,32	2,88	0,806	5373	211	25,442
2,32	2,88	0,806	5400	203	26,585
2,32	2,88	0,806	5166	209	24,743
2,32	2,88	0,806	4936	216	22,873
	Média	0,806		Média	25,111
	Desv. Pad. (s)	0,000		Desv. Pad. (s)	1,421
	CV (%)	0,000		CV (%)	5,658

REPETIBILIDADE DA ACETONA

100 mg/L

TR (min)	TR _{PI} (min)	TRR	Área	Área _{PI}	A/A _{PI}
2,59	2,88	0,899	57	243	0,237
2,59	2,88	0,899	51	206	0,250
2,58	2,88	0,896	52	222	0,234
2,58	2,88	0,896	48	195	0,244
2,59	2,88	0,899	51	214	0,240
	Média	0,898		Média	0,241
	Desv. Pad. (s)	0,002		Desv. Pad. (s)	0,006
	CV (%)	0,212		CV (%)	2,580

800 mg/L

TR (min)	TR _{PI} (min)	TRR	Área	Área _{PI}	A/A _{PI}
2,59	2,88	0,899	417,1	210	1,985
2,59	2,88	0,899	422,4	208	2,027
2,58	2,88	0,896	452,3	220	2,057
2,58	2,88	0,896	410	198	2,073
2,58	2,88	0,896	409	200	2,048
	Média	0,897		Média	2,038
	Desv. Pad. (s)	0,002		Desv. Pad. (s)	0,034
	CV (%)	0,212		CV (%)	1,665

1500 mg/L

TR (min)	TR _{PI} (min)	TRR	Área	Área _{PI}	A/A _{PI}
2,58	2,88	0,896	784	208	3,774
2,58	2,88	0,896	795	211	3,764
2,58	2,88	0,896	778	203	3,833
2,58	2,88	0,896	786	209	3,764
2,59	2,88	0,899	797	216	3,692
	Média	0,897		Média	3,765
	Desv. Pad. (s)	0,002		Desv. Pad. (s)	0,050
	CV (%)	0,173		CV (%)	1,324

REPETIBILIDADE DO 2-PROPANOL

100 mg/L

TR (min)	TR _{PI} (min)	TRR	Área	Área _{PI}	A/A _{PI}
2,73	2,88	0,948	34	243	0,140
2,73	2,88	0,948	30	206	0,145
2,73	2,88	0,948	32	222	0,142
2,73	2,88	0,948	26	195	0,134
2,73	2,88	0,948	31	214	0,144
	Média	0,948		Média	0,141
	Desv. Pad. (s)	0,000		Desv. Pad. (s)	0,004
	CV (%)	0,000		CV (%)	3,070

800 mg/L

TR (min)	TR _{PI} (min)	TRR	Área	Área _{PI}	A/A _{PI}
2,73	2,88	0,948	259,6	210	1,236
2,73	2,88	0,948	246,7	208	1,184
2,73	2,88	0,948	259,7	220	1,181
2,73	2,88	0,948	233	198	1,179
2,73	2,88	0,948	236	200	1,181
	Média	0,948		Média	1,192
	Desv. Pad. (s)	0,000		Desv. Pad. (s)	0,024
	CV (%)	0,000		CV (%)	2,046

1500 mg/L

TR (min)	TR _{PI} (min)	TRR	Área	Área _{PI}	A/A _{PI}
2,73	2,88	0,948	480	208	2,308
2,73	2,88	0,948	482	211	2,283
2,73	2,88	0,948	459	203	2,259
2,73	2,88	0,948	492	209	2,354
2,73	2,88	0,948	503	216	2,333
	Média	0,948		Média	2,307
	Desv. Pad. (s)	0,000		Desv. Pad. (s)	0,038
	CV (%)	0,000		CV (%)	1,651

REPETIBILIDADE DO T-BUTANOL

100 mg/L

TR (min)	TR _{PI} (min)	TRR	Área	Área _{PI}	A/A _{PI}
3,22	2,88	1,118	95	243	0,393
3,22	2,88	1,118	83	206	0,404
3,22	2,88	1,118	85	222	0,384
3,22	2,88	1,118	74	195	0,377
3,22	2,88	1,118	84	214	0,390
	Média	1,118		Média	0,390
	Desv. Pad. (s)	0,000		Desv. Pad. (s)	0,010
	CV (%)	0,000		CV (%)	2,574

800 mg/L

TR (min)	TR _{PI} (min)	TRR	Área	Área _{PI}	A/A _{PI}
3,22	2,88	1,118	690,3	210	3,286
3,22	2,88	1,118	677,6	208	3,251
3,22	2,88	1,118	719,9	220	3,274
3,22	2,88	1,118	646	198	3,270
3,22	2,88	1,118	652	200	3,263
	Média	1,118		Média	3,269
	Desv. Pad. (s)	0,000		Desv. Pad. (s)	0,013
	CV (%)	0,000		CV (%)	0,388

1500 mg/L

TR (min)	TR _{PI} (min)	TRR	Área	Área _{PI}	A/A _{PI}
3,22	2,88	1,118	1287	208	6,194
3,22	2,88	1,118	1308	211	6,191
3,22	2,88	1,118	1252	203	6,162
3,22	2,88	1,118	1303	209	6,239
3,22	2,88	1,118	1327	216	6,151
	Média	1,118		Média	6,187
	Desv. Pad. (s)	0,000		Desv. Pad. (s)	0,034
	CV (%)	0,000		CV (%)	0,553

REPETIBILIDADE DO 1-PROPANOL

100 mg/L

TR (min)	TR _{PI} (min)	TRR	Área	Área _{PI}	A/A _{PI}
4,17	2,88	1,448	31	243	0,128
4,17	2,88	1,448	27	206	0,133
4,17	2,88	1,448	29	222	0,132
4,17	2,88	1,448	24	195	0,122
4,17	2,88	1,448	28	214	0,131
	Média	1,448		Média	0,129
	Desv. Pad. (s)	0,000		Desv. Pad. (s)	0,005
	CV (%)	0,000		CV (%)	3,504

800 mg/L

TR (min)	TR _{PI} (min)	TRR	Área	Área _{PI}	A/A _{PI}
4,17	2,88	1,448	243,6	210	1,159
4,17	2,88	1,448	227,2	208	1,090
4,17	2,88	1,448	239,7	220	1,090
4,16	2,88	1,444	214	198	1,083
4,17	2,88	1,448	216	200	1,082
	Média	1,447		Média	1,101
	Desv. Pad. (s)	0,002		Desv. Pad. (s)	0,033
	CV (%)	0,107		CV (%)	3,002

1500 mg/L

TR (min)	TR _{PI} (min)	TRR	Área	Área _{PI}	A/A _{PI}
4,17	2,88	1,448	454	208	2,184
4,17	2,88	1,448	447	211	2,116
4,17	2,88	1,448	425	203	2,095
4,17	2,88	1,448	461	209	2,207
4,17	2,88	1,448	475	216	2,201
	Média	1,448		Média	2,160
	Desv. Pad. (s)	0,000		Desv. Pad. (s)	0,052
	CV (%)	0,000		CV (%)	2,390

REPETIBILIDADE DA METIL ETIL CETONA

100 mg/L

TR (min)	TR _{PI} (min)	TRR	Área	Área _{PI}	A/A _{PI}
5,04	2,88	1,750	131	243	0,539
5,04	2,88	1,750	119	206	0,578
5,04	2,88	1,750	119	222	0,533
5,03	2,88	1,747	111	195	0,570
5,04	2,88	1,750	117	214	0,546
	Média	1,749		Média	0,553
	Desv. Pad. (s)	0,002		Desv. Pad. (s)	0,020
	CV (%)	0,089		CV (%)	3,550

800 mg/L

TR (min)	TR _{PI} (min)	TRR	Área	Área _{PI}	A/A _{PI}
5,04	2,88	1,750	963,4	210	4,585
5,04	2,88	1,750	980,2	208	4,703
5,04	2,88	1,750	1050,8	220	4,779
5,04	2,88	1,750	956	198	4,838
5,04	2,88	1,750	951	200	4,760
	Média	1,750		Média	4,733
	Desv. Pad. (s)	0,000		Desv. Pad. (s)	0,095
	CV (%)	0,000		CV (%)	2,018

1500 mg/L

TR (min)	TR _{PI} (min)	TRR	Área	Área _{PI}	A/A _{PI}
5,04	2,88	1,750	1818	208	8,750
5,04	2,88	1,750	1842	211	8,720
5,04	2,88	1,750	1808	203	8,902
5,04	2,88	1,750	1807	209	8,655
5,04	2,88	1,750	1825	216	8,459
	Média	1,750		Média	8,697
	Desv. Pad. (s)	0,000		Desv. Pad. (s)	0,161
	CV (%)	0,000		CV (%)	1,853

REPETIBILIDADE DO ACETATO DE ETILO

100 mg/L

TR (min)	TR _{PI} (min)	TRR	Área	Área _{PI}	A/A _{PI}
5,17	2,88	1,795	149	243	0,613
5,17	2,88	1,795	140	206	0,683
5,17	2,88	1,795	137	222	0,616
5,17	2,88	1,795	131	195	0,672
5,17	2,88	1,795	136	214	0,633
	Média	1,795		Média	0,643
	Desv. Pad. (s)	0,000		Desv. Pad. (s)	0,033
	CV (%)	0,000		CV (%)	5,057

800 mg/L

TR (min)	TR _{PI} (min)	TRR	Área	Área _{PI}	A/A _{PI}
5,17	2,88	1,795	1162,1	210	5,531
5,17	2,88	1,795	1185,9	208	5,690
5,17	2,88	1,795	1265,7	220	5,756
5,17	2,88	1,795	1169	198	5,917
5,17	2,88	1,795	1152	200	5,771
	Média	1,795		Média	5,733
	Desv. Pad. (s)	0,000		Desv. Pad. (s)	0,140
	CV (%)	0,000		CV (%)	2,441

1500 mg/L

TR (min)	TR _{PI} (min)	TRR	Área	Área _{PI}	A/A _{PI}
5,17	2,88	1,795	2201	208	10,594
5,17	2,88	1,795	2222	211	10,523
5,17	2,88	1,795	2199	203	10,826
5,17	2,88	1,795	2167	209	10,377
5,17	2,88	1,795	2165	216	10,032
	Média	1,795		Média	10,470
	Desv. Pad. (s)	0,000		Desv. Pad. (s)	0,294
	CV (%)	0,000		CV (%)	2,809

REPETIBILIDADE DO 2-BUTANOL

100 mg/L

TR (min)	TR _{PI} (min)	TRR	Área	Área _{PI}	A/A _{PI}
5,51	2,88	1,913	67	243	0,277
5,5	2,88	1,910	58	206	0,283
5,5	2,88	1,910	60	222	0,272
5,5	2,88	1,910	51	195	0,263
5,5	2,88	1,910	59	214	0,273
	Média	1,910		Média	0,274
	Desv. Pad. (s)	0,002		Desv. Pad. (s)	0,007
	CV (%)	0,081		CV (%)	2,687

800 mg/L

TR (min)	TR _{PI} (min)	TRR	Área	Área _{PI}	A/A _{PI}
5,5	2,88	1,910	488,2	210	2,324
5,5	2,88	1,910	475,9	208	2,284
5,5	2,88	1,910	505,7	220	2,300
5,5	2,88	1,910	453	198	2,292
5,5	2,88	1,910	457	200	2,286
	Média	1,910		Média	2,297
	Desv. Pad. (s)	0,000		Desv. Pad. (s)	0,016
	CV (%)	0,000		CV (%)	0,699

1500 mg/L

TR (min)	TR _{PI} (min)	TRR	Área	Área _{PI}	A/A _{PI}
5,5	2,88	1,910	913	208	4,392
5,5	2,88	1,910	921	211	4,361
5,5	2,88	1,910	880	203	4,334
5,5	2,88	1,910	924	209	4,423
5,5	2,88	1,910	941	216	4,361
	Média	1,910		Média	4,374
	Desv. Pad. (s)	0,000		Desv. Pad. (s)	0,034
	CV (%)	0,000		CV (%)	0,780

REPETIBILIDADE DO ISOBUTANOL

100 mg/L

TR (min)	TR _{PI} (min)	TRR	Área	Área _{PI}	A/A _{PI}
6,75	2,88	2,344	77	243	0,317
6,74	2,88	2,340	67	206	0,327
6,74	2,88	2,340	70	222	0,313
6,74	2,88	2,340	60	195	0,310
6,74	2,88	2,340	68	214	0,318
	Média	2,341		Média	0,317
	Desv. Pad. (s)	0,002		Desv. Pad. (s)	0,007
	CV (%)	0,066		CV (%)	2,075

800 mg/L

TR (min)	TR _{PI} (min)	TRR	Área	Área _{PI}	A/A _{PI}
6,74	2,88	2,340	563,4	210	2,682
6,74	2,88	2,340	556	208	2,668
6,75	2,88	2,344	587	220	2,669
6,74	2,88	2,340	526	198	2,665
6,74	2,88	2,340	532	200	2,663
	Média	2,341		Média	2,669
	Desv. Pad. (s)	0,002		Desv. Pad. (s)	0,007
	CV (%)	0,066		CV (%)	0,270

1500 mg/L

TR (min)	TR _{PI} (min)	TRR	Área	Área _{PI}	A/A _{PI}
6,75	2,88	2,344	1051	208	5,056
6,75	2,88	2,344	1059	211	5,015
6,75	2,88	2,344	1017	203	5,009
6,75	2,88	2,344	1061	209	5,079
6,75	2,88	2,344	1079	216	5,002
	Média	2,344		Média	5,032
	Desv. Pad. (s)	0,000		Desv. Pad. (s)	0,034
	CV (%)	0,000		CV (%)	0,669

REPETIBILIDADE DO *n*-BUTANOL**100 mg/L**

TR (min)	TR _{PI} (min)	TRR	Área	Área _{PI}	A/A _{PI}
7,7	2,88	2,674	51	243	0,211
7,7	2,88	2,674	45	206	0,218
7,7	2,88	2,674	47	222	0,213
7,7	2,88	2,674	39	195	0,202
7,7	2,88	2,674	46	214	0,212
	Média	2,674		Média	0,211
	Desv. Pad. (s)	0,000		Desv. Pad. (s)	0,006
	CV (%)	0,000		CV (%)	2,796

800 mg/L

TR (min)	TR _{PI} (min)	TRR	Área	Área _{PI}	A/A _{PI}
7,7	2,88	2,674	386,9	210	1,842
7,7	2,88	2,674	372,9	208	1,789
7,7	2,88	2,674	392,3	220	1,784
7,7	2,88	2,674	351	198	1,775
7,7	2,88	2,674	354	200	1,774
	Média	2,674		Média	1,793
	Desv. Pad. (s)	0,000		Desv. Pad. (s)	0,028
	CV (%)	0,000		CV (%)	1,558

1500 mg/L

TR (min)	TR _{PI} (min)	TRR	Área	Área _{PI}	A/A _{PI}
7,7	2,88	2,674	722	208	3,475
7,7	2,88	2,674	717	211	3,394
7,7	2,88	2,674	683	203	3,362
7,7	2,88	2,674	729	209	3,492
7,7	2,88	2,674	743	216	3,443
	Média	2,674		Média	3,433
	Desv. Pad. (s)	0,000		Desv. Pad. (s)	0,055
	CV (%)	0,000		CV (%)	1,590

REPETIBILIDADE DO 3-METIL-1-BUTANOL

100 mg/L

TR (min)	TR _{PI} (min)	TRR	Área	Área _{PI}	A/A _{PI}
9,09	2,88	3,156	82	243	0,339
9,09	2,88	3,156	73	206	0,355
9,09	2,88	3,156	76	222	0,341
9,09	2,88	3,156	66	195	0,336
9,09	2,88	3,156	73	214	0,340
	Média	3,156		Média	0,342
	Desv. Pad. (s)	0,000		Desv. Pad. (s)	0,007
	CV (%)	0,000		CV (%)	2,107

800 mg/L

TR (min)	TR _{PI} (min)	TRR	Área	Área _{PI}	A/A _{PI}
9,09	2,88	3,156	615,5	210	2,930
9,09	2,88	3,156	608,5	208	2,920
9,09	2,88	3,156	648,5	220	2,949
9,09	2,88	3,156	580	198	2,935
9,09	2,88	3,156	584	200	2,925
	Média	3,156		Média	2,932
	Desv. Pad. (s)	0,000		Desv. Pad. (s)	0,011
	CV (%)	0,000		CV (%)	0,381

1500 mg/L

TR (min)	TR _{PI} (min)	TRR	Área	Área _{PI}	A/A _{PI}
9,09	2,88	3,156	1163	208	5,598
9,09	2,88	3,156	1159	211	5,487
9,09	2,88	3,156	1121	203	5,517
9,09	2,88	3,156	1161	209	5,561
9,09	2,88	3,156	1175	216	5,446
	Média	3,156		Média	5,522
	Desv. Pad. (s)	0,000		Desv. Pad. (s)	0,060
	CV (%)	0,000		CV (%)	1,083

REPETIBILIDADE DO 2-METIL-1-BUTANOL

100 mg/L

TR (min)	TR _{PI} (min)	TRR	Área	Área _{PI}	A/A _{PI}
9,15	2,88	3,177	99	243	0,408
9,15	2,88	3,177	87	206	0,423
9,15	2,88	3,177	90	222	0,403
9,15	2,88	3,177	80	195	0,411
9,15	2,88	3,177	86	214	0,403
	Média	3,177		Média	0,409
	Desv. Pad. (s)	0,000		Desv. Pad. (s)	0,008
	CV (%)	0,000		CV (%)	1,986

800 mg/L

TR (min)	TR _{PI} (min)	TRR	Área	Área _{PI}	A/A _{PI}
9,15	2,88	3,177	698,1	210	3,323
9,15	2,88	3,177	696,4	208	3,342
9,15	2,88	3,177	737	220	3,352
9,15	2,88	3,177	661	198	3,348
9,15	2,88	3,177	668	200	3,343
	Média	3,177		Média	3,341
	Desv. Pad. (s)	0,000		Desv. Pad. (s)	0,011
	CV (%)	0,000		CV (%)	0,336

1500 mg/L

TR (min)	TR _{PI} (min)	TRR	Área	Área _{PI}	A/A _{PI}
9,15	2,88	3,177	1312	208	6,311
9,15	2,88	3,177	1307	211	6,190
9,15	2,88	3,177	1264	203	6,222
9,15	2,88	3,177	1305	209	6,252
9,15	2,88	3,177	1324	216	6,133
	Média	3,177		Média	6,222
	Desv. Pad. (s)	0,000		Desv. Pad. (s)	0,067
	CV (%)	0,000		CV (%)	1,073

REPETIBILIDADE DO 1-PENTANOL

100 mg/L

TR (min)	TR _{PI} (min)	TRR	Área	Área _{PI}	A/A _{PI}
9,67	2,88	3,358	79	243	0,325
9,67	2,88	3,358	70	206	0,339
9,67	2,88	3,358	72	222	0,326
9,67	2,88	3,358	62	195	0,316
9,67	2,88	3,358	70	214	0,326
	Média	3,358		Média	0,326
	Desv. Pad. (s)	0,000		Desv. Pad. (s)	0,008
	CV (%)	0,000		CV (%)	2,542

800 mg/L

TR (min)	TR _{PI} (min)	TRR	Área	Área _{PI}	A/A _{PI}
9,67	2,88	3,358	578,4	210	2,753
9,67	2,88	3,358	573,2	208	2,750
9,67	2,88	3,358	606,4	220	2,758
9,67	2,88	3,358	542	198	2,743
9,67	2,88	3,358	546	200	2,735
	Média	3,358		Média	2,748
	Desv. Pad. (s)	0,000		Desv. Pad. (s)	0,009
	CV (%)	0,000		CV (%)	0,324

1500 mg/L

TR (min)	TR _{PI} (min)	TRR	Área	Área _{PI}	A/A _{PI}
9,67	2,88	3,358	1095	208	5,269
9,67	2,88	3,358	1079	211	5,109
9,67	2,88	3,358	1044	203	5,138
9,67	2,88	3,358	1086	209	5,202
9,67	2,88	3,358	1098	216	5,089
	Média	3,358		Média	5,161
	Desv. Pad. (s)	0,000		Desv. Pad. (s)	0,073
	CV (%)	0,000		CV (%)	1,424

7.6. PRECISÃO E EXATIDÃO

PRECISÃO E EXATIDÃO DO ACETALDEÍDO

Data	1° DIA ()	2° DIA ()	3° DIA ()	4° DIA ()	5° DIA ()
R²	0,9996	0,997953	0,996193	0,998345	0,999244
Declive	0,0021	0,0022	0,0025	0,0023	0,0022
Y0	-0,009	-0,012	-0,018	-0,009	0,004
Gama baixa 100 mg/L					
Replicado 1	95,7	108,3	101,2	85,6	117,7
Replicado 2	100,6	116,2	106,2	85,3	119,2
Replicado 3	100,4	120,0	104,3	90,4	120,3
Média	98,9	114,8	103,9	87,1	119,1
Recuperação	98,9	114,8	103,9	87,1	119,1
Concenc. Média	104,8				
Recuperação Média	104,8				
Repetibilidade (S_r)	2,1				
Between Run (S_{run})	10,7				
Precisão intermédia	10,9				
C.V (%)	12,2				
Gama média 800 mg/L					
Replicado 1	845,9	882,8	828,4	690,4	1019,0
Replicado 2	790,2	888,1	782,5	713,1	1001,6
Replicado 3	750,8	875,5	835,0	669,6	986,9
Média	795,6	882,1	815,3	691,0	1002,5
Recuperação	106,1	117,6	108,7	92,1	133,7
Concenc. Média	837,3				
Recuperação Média	111,6				
Repetibilidade (S_r)	25,6				
Between Run (S_{run})	92,7				
Precisão intermédia	96,2				
C.V (%)	13,7				
Gama alta 1500 mg/L					
Replicado 1	1440,0	1639,9	1467,5	1211,6	1886,1
Replicado 2	1698,4	1696,7	1421,9	1227,1	1797,8
Replicado 3	1515,8	1704,5	1481,1	1351,0	1875,9
Média	1551,4	1680,4	1456,8	1263,2	1853,3
Recuperação	206,9	224,0	194,2	168,4	247,1
Concenc. Média	1561,0				
Recuperação Média	208,1				
Repetibilidade (S_r)	76,4				
Between Run (S_{run})	168,7				
Precisão intermédia	185,2				
C.V (%)	14,3				

Data	1° DIA	2° DIA	3° DIA	4° DIA	5° DIA
Equação	$y = 0.002086x - 0.009180$	$y = 0.002174x - 0,011678$	$y = 0.002537x - 0.017936$	$y = 0.002272x - 0,008952$	$y = 0.002244x + 0.003884$
Gama baixa 100 mg/L					
Média	98,9	114,8	103,9	87,1	119,1
Recuperação	98,9	114,8	103,9	87,1	119,1
Média	104,8				
Desvio padrão	12,78				
C.V (%)	12,2				
N	5				
Texp	0,83				
Tcrit	2,78				
Incerteza de R%	5,7				
Incerteza padrão rel.	0,055				
Gama média 800 mg/L					
Média	795,6	882,1	815,3	691,0	1002,5
Recuperação	99,5	110,3	101,9	86,4	125,3
Concenc. Média	104,7				
Desvio padrão	14,38				
C.V (%)	13,7				
N	5				
Texp	0,73				
Terit	2,78				
Incerteza de R%	6,4				
Incerteza padrão rel.	0,064				
Gama alta 1500 mg/L					
Média	1551,4	1680,4	1456,8	1263,2	1853,3
Recuperação	103,4	112,0	97,1	84,2	123,6
Concenc. Média	104,1				
Desvio padrão	14,88				
C.V (%)	14,3				
N	5				
Texp	0,61				
Tcrit	2,78				
Incerteza de R%	6,7				
Incerteza padrão rel.	0,067				

PRECISÃO E EXATIDÃO DO METANOL

Data	1° DIA ()	2° DIA ()	3° DIA ()	4° DIA ()	5° DIA ()
R²	0,9937	0,990936	0,998982	0,99692	0,996828
Declive	0,0003	0,0003	0,0003	0,0003	0,0003
Y0	-0,004	0,001	0,009	-0,001	-0,005
Gama baixa 100 mg/L					
Replicado 1	102,5	90,4	71,8	95,9	96,2
Replicado 2	115,3	101,1	75,8	106,7	102,7
Replicado 3	124,9	97,3	64,3	89,4	106,4
Média	114,2	96,3	70,6	97,3	101,7
Recuperação	114,2	96,3	70,6	97,3	101,7
Concenc. Média	94,6				
Recuperação Média	94,6				
Repetibilidade (S_r)	7,4				
Between Run (S_{run})	14,1				
Precisão intermédia	16,0				
C.V (%)	16,5				
Gama média 800 mg/L					
Replicado 1	810,7	818,3	838,4	762,5	696,3
Replicado 2	844,5	869,5	850,4	763,1	768,5
Replicado 3	862,4	812,2	810,5	829,5	798,3
Média	839,2	833,3	833,1	785,0	754,4
Recuperação	111,9	111,1	111,1	104,7	100,6
Concenc. Média	835,2				
Recuperação Média	111,4				
Repetibilidade (S_r)	32,4				
Between Run (S_{run})	15,6				
Precisão intermédia	36,0				
C.V (%)	4,6				
Gama alta 1500 mg/L					
Replicado 1	1672,9	1616,4	1158,1	1483,5	1487,2
Replicado 2	1604,7	1564,5	1588,2	1501,9	1561,6
Replicado 3	1496,0	1517,3	1622,4	1260,2	1445,9
Média	1591,2	1566,1	1456,2	1415,2	1498,3
Recuperação	212,2	208,8	194,2	188,7	199,8
Concenc. Média	1537,8				
Recuperação Média	205,0				
Repetibilidade (S_r)	93,3				
Between Run (S_{run})	42,3				
Precisão intermédia	102,4				
C.V (%)	4,7				

Data	1° DIA	2° DIA	3° DIA	4° DIA	5° DIA
Equação	y = 0.000288x - 0.004036	y = 0.000268x + 0.000529	y = 0.000266x + 0.008616	y = 0.000288x - 0.000868	y = 0.000314x - 0.004956
Gama baixa 100 mg/L					
Média	114,2	96,3	70,6	97,3	101,7
Recuperação	114,2	96,3	70,6	97,3	101,7
Média	96,0				
Desvio padrão	15,89				
C.V (%)	16,5				
N	5				
Texp	0,56				
Tcrit	2,78				
Incerteza de R%	7,1				
Incerteza padrão rel.	0,074				
Gama média 800 mg/L					
Média	839,2	833,3	833,1	785,0	754,4
Recuperação	104,9	104,2	104,1	98,1	94,3
Concenc. Média	101,1				
Desvio padrão	4,70				
C.V (%)	4,6				
N	5				
Texp	0,54				
Tcrit	2,78				
Incerteza de R%	2,1				
Incerteza padrão rel.	0,021				
Gama alta 1500 mg/L					
Média	1591,2	1566,1	1456,2	1415,2	1498,3
Recuperação	106,1	104,4	97,1	94,3	99,9
Concenc. Média	100,4				
Desvio padrão	4,90				
C.V (%)	4,9				
N	5				
Texp	0,16				
Tcrit	2,78				
Incerteza de R%	2,2				
Incerteza padrão rel.	0,022				

PRECISÃO E EXATIDÃO DO ETANOL

Data	1º DIA ()	2º DIA ()	3º DIA ()	4º DIA ()	5º DIA ()
R²	0,9942	0,992818	0,999535	0,997476	0,997094
Declive	0,0006	0,0006	0,0006	0,0007	0,0007
Y0	-0,007	-0,005	-0,004	-0,001	-0,012
Gama baixa 100 mg/L					
Replicado 1	102,9	100,7	101,6	94,4	97,5
Replicado 2	108,8	103,0	111,7	96,9	99,6
Replicado 3	112,0	95,3	97,9	86,0	104,6
Média	107,9	99,7	103,7	92,4	100,6
Recuperação	107,9	99,7	103,7	92,4	100,6
Concenc. Média	100,9				
Recuperação Média	100,9				
Repetibilidade (S_r)	6,3				
Between Run (S_{run})	4,4				
Precisão intermédia	10,9				
C.V (%)	5,7				
Gama média 800 mg/L					
Replicado 1	801,4	790,3	826,8	781,2	723,6
Replicado 2	832,4	808,3	857,2	774,3	784,1
Replicado 3	845,6	785,8	821,1	837,1	744,0
Média	826,5	794,8	835,1	797,5	750,5
Recuperação	110,2	106,0	111,3	106,3	100,1
Concenc. Média	810,6				
Recuperação Média	108,1				
Repetibilidade (S_r)	27,5				
Between Run (S_{run})	20,3				
Precisão intermédia	34,2				
C.V (%)	4,1				
Gama alta 1500 mg/L					
Replicado 1	1607,0	1540,2	1228,4	1482,2	1525,1
Replicado 2	1591,2	1481,0	1554,5	1539,6	1607,7
Replicado 3	1479,7	1448,7	1589,1	1338,4	1499,3
Média	1559,3	1490,0	1457,3	1453,4	1544,1
Recuperação	207,9	198,7	194,3	193,8	205,9
Concenc. Média	1524,7				
Recuperação Média	203,3				
Repetibilidade (S_r)	81,8				
Between Run (S_{run})	1,9				
Precisão intermédia	81,8				
C.V (%)	3,3				

Data	1° DIA	2° DIA	3° DIA	4° DIA	5° DIA
Equação	$y = 0.000644x - 0.007291$	$y = 0.000645x - 0.005037$	$y = 0.000635x - 0.003743$	$y = 0.000655x - 0.000893$	$y = 0.000685x - 0.011749$
Gama baixa 100 mg/L					
Média	107,9	99,7	103,7	92,4	100,6
Recuperação	107,9	99,7	103,7	92,4	100,6
Média	100,9				
Desvio padrão	5,72				
C.V (%)	5,7				
N	5				
Texp	0,34				
Tcrit	2,78				
Incerteza de R%	2,6				
Incerteza padrão rel.	0,025				
Gama média 800 mg/L					
Média	826,5	794,8	835,1	797,5	750,5
Recuperação	103,3	99,3	104,4	99,7	93,8
Concenc. Média	100,1				
Desvio padrão	4,15				
C.V (%)	4,1				
N	5				
Texp	0,06				
Tcrit	2,78				
Incerteza de R%	1,9				
Incerteza padrão rel.	0,019				
Gama alta 1500 mg/L					
Média	1559,3	1490,0	1457,3	1453,4	1544,1
Recuperação	104,0	99,3	97,2	96,9	102,9
Concenc. Média	100,1				
Desvio padrão	3,26				
C.V (%)	3,3				
N	5				
Texp	0,04				
Tcrit	2,78				
Incerteza de R%	1,5				
Incerteza padrão rel.	0,015				

PRECISÃO E EXATIDÃO DO DIETIL-ÉTER

Data	1° DIA ()	2° DIA ()	3° DIA ()	4° DIA ()	5° DIA ()
R²	0,9925	0,99874	0,998045	0,998575	0,996684
Declive	0,0150	0,0143	0,0155	0,0142	0,0170
Y0	-0,106	-0,243	-0,028	-0,128	0,061
Gama baixa 100 mg/L					
Replicado 1	110,0	86,1	88,4	89,4	82,5
Replicado 2	119,3	94,2	90,5	91,3	81,8
Replicado 3	117,2	93,2	88,1	96,8	80,8
Média	115,5	91,1	89,0	92,5	81,7
Recuperação	115,5	91,1	89,0	92,5	81,7
Concenc. Média	94,0				
Recuperação Média	94,0				
Repetibilidade (S_r)	2,1				
Between Run (S_{run})	11,2				
Precisão intermédia	11,4				
C.V (%)	13,6				
Gama média 800 mg/L					
Replicado 1	1033,9	743,6	783,8	691,5	703,6
Replicado 2	1040,9	784,9	768,9	781,4	702,9
Replicado 3	967,4	738,0	740,4	716,4	612,3
Média	1014,1	755,5	764,4	729,8	672,9
Recuperação	135,2	100,7	101,9	97,3	89,7
Concenc. Média	884,8				
Recuperação Média	118,0				
Repetibilidade (S_r)	45,6				
Between Run (S_{run})	102,4				
Precisão intermédia	112,1				
C.V (%)	16,7				
Gama alta 1500 mg/L					
Replicado 1	1960,7	1366,1	1081,0	1277,6	1372,1
Replicado 2	1779,6	1567,9	1269,8	1173,2	1245,3
Replicado 3	1823,2	1562,3	1413,0	1572,1	1353,9
Média	1854,5	1498,8	1254,6	1341,0	1323,8
Recuperação	247,3	199,8	167,3	178,8	176,5
Concenc. Média	1487,2				
Recuperação Média	198,3				
Repetibilidade (S_r)	139,1				
Between Run (S_{run})	150,0				
Precisão intermédia	204,6				
C.V (%)	16,6				

Data	1º DIA	2º DIA	3º DIA	4º DIA	5º DIA
	y =				
	0.014955x -	y = 0.014333x -	y = 0.015489x -	y = 0.014223x -	y = 0.016962x +
Equação	0.105764	0.242904	0.028105	0.128144	0.060788
Gama baixa 100 mg/L					
Média	115,5	91,1	89,0	92,5	81,7
Recuperação	115,5	91,1	89,0	92,5	81,7
Média	94,0				
Desvio padrão	12,74				
C.V (%)	13,6				
N	5				
Texp	1,06				
Terit	2,78				
Incerteza de R%	5,7				
Incerteza padrão rel.	0,061				
Gama média 800 mg/L					
Média	1014,1	755,5	764,4	729,8	672,9
Recuperação	126,8	94,4	95,5	91,2	84,1
Concenc. Média	98,4				
Desvio padrão	16,46				
C.V (%)	16,7				
N	5				
Texp	0,22				
Terit	2,78				
Incerteza de R%	7,4				
Incerteza padrão rel.	0,074				
Gama alta 1500 mg/L					
Média	1854,5	1498,8	1254,6	1341,0	1323,8
Recuperação	123,6	99,9	83,6	89,4	88,3
Concenc. Média	97,0				
Desvio padrão	16,05				
C.V (%)	16,6				
N	5				
Texp	0,42				
Terit	2,78				
Incerteza de R%	7,2				
Incerteza padrão rel.	0,072				

PRECISÃO E EXATIDÃO DA ACETONA

Data	1° DIA ()	2° DIA ()	3° DIA ()	4° DIA ()	5° DIA ()
R²	0,9998	0,999374	0,999558	0,99847	0,999691
Declive	0,0026	0,0026	0,0023	0,0025	0,0024
Y0	0,003	-0,004	-0,005	-0,003	0,001
Gama baixa 100 mg/L					
Replicado 1	96,2	101,5	106,9	100,0	110,3
Replicado 2	96,7	105,6	110,2	99,8	110,8
Replicado 3	98,1	108,2	111,7	103,5	113,1
Média	97,0	105,1	109,6	101,1	111,4
Recuperação	97,0	105,1	109,6	101,1	111,4
Concenc. Média	104,8				
Recuperação Média	104,8				
Repetibilidade (S_r)	1,8				
Between Run (S_{run})	5,0				
Precisão intermédia	5,3				
C.V (%)	5,7				
Gama média 800 mg/L					
Replicado 1	851,1	823,5	874,2	819,0	928,6
Replicado 2	781,1	820,2	894,9	835,0	915,1
Replicado 3	755,5	822,8	833,0	804,4	833,2
Média	795,9	822,2	867,4	819,5	892,3
Recuperação	106,1	109,6	115,6	109,3	119,0
Concenc. Média	839,4				
Recuperação Média	111,9				
Repetibilidade (S_r)	34,8				
Between Run (S_{run})	27,9				
Precisão intermédia	44,6				
C.V (%)	4,7				
Gama alta 1500 mg/L					
Replicado 1	1440,5	1530,6	1674,5	1454,8	1744,8
Replicado 2	1585,6	1550,6	1574,8	1493,7	1707,3
Replicado 3	1504,8	1549,9	1616,8	1565,5	1746,6
Média	1510,3	1543,7	1622,1	1504,7	1732,9
Recuperação	201,4	205,8	216,3	200,6	231,1
Concenc. Média	1582,7				
Recuperação Média	211,0				
Repetibilidade (S_r)	38,7				
Between Run (S_{run})	61,9				
Precisão intermédia	73,1				
C.V (%)	6,1				

Data	1° DIA	2° DIA	3° DIA	4° DIA	5° DIA
Equação	y = 0.002558x + 0.002980	y = 0.002594x - 0.003918	y = 0.002283x - 0.005425	y = 0.002484x - 0.003270	y = 0.002364x + 0.001197
Gama baixa 100 mg/L					
Média	97,0	105,1	109,6	101,1	111,4
Recuperação	97,0	105,1	109,6	101,1	111,4
Média	104,8				
Desvio padrão	5,95				
C.V (%)	5,7				
N	5				
Texp	1,82				
Tcrit	2,78				
Incerteza de R%	2,7				
Incerteza padrão rel.	0,025				
Gama média 800 mg/L					
Média	795,9	822,2	867,4	819,5	892,3
Recuperação	99,5	102,8	108,4	102,4	111,5
Concenc. Média	104,9				
Desvio padrão	4,91				
C.V (%)	4,7				
N	5				
Texp	2,25				
Tcrit	2,78				
Incerteza de R%	2,2				
Incerteza padrão rel.	0,022				
Gama alta 1500 mg/L					
Média	1510,3	1543,7	1622,1	1504,7	1732,9
Recuperação	100,7	102,9	108,1	100,3	115,5
Concenc. Média	105,5				
Desvio padrão	6,41				
C.V (%)	6,1				
N	5				
Texp	1,92				
Tcrit	2,78				
Incerteza de R%	2,9				
Incerteza padrão rel.	0,029				

PRECISÃO E EXATIDÃO DO 2-PROPANOL

Data	1° DIA ()	2° DIA ()	3° DIA ()	4° DIA ()	5° DIA ()
R²	0,9983	0,996469	0,999672	0,997913	0,996756
Declive	0,0014	0,0014	0,0014	0,0015	0,0015
Y0	0,003	0,002	-0,007	0,002	-0,008
Gama baixa 100 mg/L					
Replicado 1	93,0	97,8	103,1	97,5	98,4
Replicado 2	87,7	100,1	111,2	97,3	97,8
Replicado 3	88,9	99,3	103,3	94,3	101,8
Média	89,9	99,1	105,9	96,4	99,3
Recuperação	89,9	99,1	105,9	96,4	99,3
Concenc. Média	98,3				
Recuperação Média	98,3				
Repetibilidade (S_r)	3,0				
Between Run (S_{run})	5,4				
Precisão intermédia	6,1				
C.V (%)	5,9				
Gama média 800 mg/L					
Replicado 1	752,3	823,2	832,1	812,7	802,5
Replicado 2	779,4	823,8	853,4	811,4	833,5
Replicado 3	781,1	823,4	798,8	842,0	782,8
Média	770,9	823,5	828,1	822,0	806,2
Recuperação	102,8	109,8	110,4	109,6	107,5
Concenc. Média	807,5				
Recuperação Média	107,7				
Repetibilidade (S_r)	25,5				
Between Run (S_{run})	6,7				
Precisão intermédia	26,3				
C.V (%)	2,9				
Gama alta 1500 mg/L					
Replicado 1	1517,1	1568,5	1377,7	1505,1	1609,1
Replicado 2	1185,3	1546,4	1528,9	1581,2	1663,9
Replicado 3	1446,7	1521,4	1563,0	1506,1	1603,6
Média	1383,0	1545,5	1489,9	1530,8	1625,6
Recuperação	184,4	206,1	198,6	204,1	216,7
Concenc. Média	1472,8				
Recuperação Média	196,4				
Repetibilidade (S_r)	89,1				
Between Run (S_{run})	81,6				
Precisão intermédia	120,8				
C.V (%)	5,9				

Data	1º DIA	2º DIA	3º DIA	4º DIA	5º DIA
Equação	$y = 0.001394x + 0,002500$	$y = 0.001408x + 0.001937$	$y = 0.001443x - 0.006878$	$y = 0.001456x + 0.001516$	$y = 0.001478x - 0,007676$
Gama baixa 100 mg/L					
Média	89,9	99,1	105,9	96,4	99,3
Recuperação	89,9	99,1	105,9	96,4	99,3
Média	98,1				
Desvio padrão	5,77				
C.V (%)	5,9				
N	5				
Texp	0,74				
Tcrit	2,78				
Incerteza de R%	2,6				
Incerteza padrão rel.	0,026				
Gama média 800 mg/L					
Média	770,9	823,5	828,1	822,0	806,2
Recuperação	96,4	102,9	103,5	102,8	100,8
Concenc. Média	101,3				
Desvio padrão	2,93				
C.V (%)	2,9				
N	5				
Texp	0,97				
Tcrit	2,78				
Incerteza de R%	1,3				
Incerteza padrão rel.	0,013				
Gama alta 1500 mg/L					
Média	1383,0	1545,5	1489,9	1530,8	1625,6
Recuperação	92,2	103,0	99,3	102,1	108,4
Concenc. Média	101,0				
Desvio padrão	5,91				
C.V (%)	5,9				
N	5				
Texp	0,38				
Tcrit	2,78				
Incerteza de R%	2,6				
Incerteza padrão rel.	0,026				

PRECISÃO E EXATIDÃO DO *t*-BUTANOL

Data	1º DIA ()	2º DIA ()	3º DIA ()	4º DIA ()	5º DIA ()
R²	0,9996	0,999654	0,999911	0,999321	0,999265
Declive	0,0037	0,0037	0,0037	0,0037	0,0039
Y0	0,001	-0,002	-0,013	-0,005	-0,014
Gama baixa 100 mg/L					
Replicado 1	105,9	100,5	106,0	106,6	99,4
Replicado 2	101,5	98,5	112,6	109,7	97,8
Replicado 3	104,5	102,4	108,7	108,0	101,4
Média	104,0	100,5	109,1	108,1	99,5
Recuperação	104,0	100,5	109,1	108,1	99,5
Concenc. Média	104,5				
Recuperação Média	104,5				
Repetibilidade (S_r)	2,4				
Between Run (S_{run})	3,8				
Precisão intermédia	4,5				
C.V (%)	4,2				
Gama média 800 mg/L					
Replicado 1	882,6	799,0	845,0	857,7	796,3
Replicado 2	838,9	799,4	867,3	845,5	808,6
Replicado 3	823,2	800,9	806,8	883,1	751,3
Média	848,2	799,8	839,7	862,1	785,4
Recuperação	113,1	106,6	112,0	114,9	104,7
Concenc. Média	829,2				
Recuperação Média	110,6				
Repetibilidade (S_r)	29,3				
Between Run (S_{run})	20,9				
Precisão intermédia	36,0				
C.V (%)	4,0				
Gama alta 1500 mg/L					
Replicado 1	1579,6	1500,7	1485,7	1598,0	1551,1
Replicado 2	1419,1	1506,3	1529,3	1594,5	1565,3
Replicado 3	1561,1	1489,2	1575,4	1557,5	1547,2
Média	1519,9	1498,7	1530,1	1583,3	1554,5
Recuperação	202,7	199,8	204,0	211,1	207,3
Concenc. Média	1516,3				
Recuperação Média	202,2				
Repetibilidade (S_r)	49,2				
Between Run (S_{run})	12,8				
Precisão intermédia	50,9				
C.V (%)	2,1				

Data	1º DIA	2º DIA	3º DIA	4º DIA	5º DIA
Equação	$y = 0.003664x + 0.001310$	$y = 0.003742x - 0.001949$	$y = 0.003679x - 0,013133$	$y = 0.003725x - 0.004933$	$y = 0.003904x - 0.013872$
Gama baixa 100 mg/L					
Média	104,0	100,5	109,1	108,1	99,5
Recuperação	104,0	100,5	109,1	108,1	99,5
Média	104,2				
Desvio padrão	4,33				
C.V (%)	4,2				
N	5				
Texp	2,18				
Tcrit	2,78				
Incerteza de R%	1,9				
Incerteza padrão rel.	0,019				
Gama média 800 mg/L					
Média	848,2	799,8	839,7	862,1	785,4
Recuperação	106,0	100,0	105,0	107,8	98,2
Concenc. Média	103,4				
Desvio padrão	4,10				
C.V (%)	4,0				
N	5				
Texp	1,84				
Tcrit	2,78				
Incerteza de R%	1,8				
Incerteza padrão rel.	0,018				
Gama alta 1500 mg/L					
Média	1519,9	1498,7	1530,1	1583,3	1554,5
Recuperação	101,3	99,9	102,0	105,6	103,6
Concenc. Média	102,5				
Desvio padrão	2,17				
C.V (%)	2,1				
N	5				
Texp	2,56				
Tcrit	2,78				
Incerteza de R%	1,0				
Incerteza padrão rel.	0,010				

PRECISÃO E EXATIDÃO DO *n*-PROPANOL

Data	1° DIA ()	2° DIA ()	3° DIA ()	4° DIA ()	5° DIA ()
R²	0,9975	0,993876	0,999619	0,997875	0,995244
Declive	0,0013	0,0013	0,0014	0,0014	0,0014
Y0	-0,001	0,001	-0,007	-0,002	-0,010
Gama baixa 100 mg/L					
Replicado 1	92,2	99,1	104,0	94,4	93,6
Replicado 2	85,2	94,4	107,3	95,5	95,1
Replicado 3	87,7	89,2	100,9	88,5	99,2
Média	88,4	94,2	104,0	92,8	96,0
Recuperação	88,4	94,2	104,0	92,8	96,0
Concenc. Média	95,5				
Recuperação Média	95,5				
Repetibilidade (S_r)	3,7				
Between Run (S_{run})	5,0				
Precisão intermédia	6,2				
C.V (%)	6,0				
Gama média 800 mg/L					
Replicado 1	713,5	816,9	826,3	801,2	760,6
Replicado 2	781,2	823,3	850,3	801,7	799,6
Replicado 3	791,9	812,4	798,5	843,9	756,9
Média	762,2	817,6	825,1	815,6	772,4
Recuperação	101,6	109,0	110,0	108,7	103,0
Concenc. Média	801,6				
Recuperação Média	106,9				
Repetibilidade (S_r)	25,5				
Between Run (S_{run})	10,1				
Precisão intermédia	27,5				
C.V (%)	3,6				
Gama alta 1500 mg/L					
Replicado 1	1515,3	1573,0	1466,4	1503,5	1558,6
Replicado 2	1079,2	1530,9	1627,3	1576,4	1628,6
Replicado 3	1426,7	1510,4	1663,6	1455,0	1552,0
Média	1340,4	1538,1	1585,7	1511,6	1579,7
Recuperação	178,7	205,1	211,4	201,6	210,6
Concenc. Média	1488,1				
Recuperação Média	198,4				
Repetibilidade (S_r)	119,6				
Between Run (S_{run})	101,9				
Precisão intermédia	157,1				
C.V (%)	6,6				

Data	1° DIA	2° DIA	3° DIA	4° DIA	5° DIA
Equação	$y = 0.001296x - 0.001098$	$y = 0.001323x + 0.001321$	$y = 0.001356x - 0.007277$	$y = 0.001378x - 0.001780$	$y = 0.001406x - 0.010011$
Gama baixa 100 mg/L					
Média	88,4	94,2	104,0	92,8	96,0
Recuperação	88,4	94,2	104,0	92,8	96,0
Média	95,1				
Desvio padrão	5,75				
C.V (%)	6,0				
N	5				
Texp	1,91				
Terit	2,78				
Incerteza de R%	2,6				
Incerteza padrão rel.	0,027				
Gama média 800 mg/L					
Média	762,2	817,6	825,1	815,6	772,4
Recuperação	95,3	102,2	103,1	102,0	96,5
Concenc. Média	99,8				
Desvio padrão	3,62				
C.V (%)	3,6				
N	5				
Texp	0,11				
Terit	2,78				
Incerteza de R%	1,6				
Incerteza padrão rel.	0,016				
Gama alta 1500 mg/L					
Média	1340,4	1538,1	1585,7	1511,6	1579,7
Recuperação	89,4	102,5	105,7	100,8	105,3
Concenc. Média	100,7				
Desvio padrão	6,68				
C.V (%)	6,6				
N	5				
Texp	0,25				
Terit	2,78				
Incerteza de R%	3,0				
Incerteza padrão rel.	0,030				

PRECISÃO E EXATIDÃO DA METIL-ETIL-CETONA

Data	1° DIA ()	2° DIA ()	3° DIA ()	4° DIA ()	5° DIA ()
R²	0,9998	0,999129	0,999374	0,998074	0,999475
Declive	0,0051	0,0053	0,0053	0,0053	0,0055
Y0	-0,005	0,000	-0,012	0,001	0,003
Gama baixa 100 mg/L					
Replicado 1	104,6	96,0	103,6	101,3	98,6
Replicado 2	108,0	100,1	107,1	100,1	99,9
Replicado 3	109,1	102,5	108,0	105,1	101,0
Média	107,2	99,5	106,2	102,2	99,8
Recuperação	107,2	99,5	106,2	102,2	99,8
Concenc. Média	104,3				
Recuperação Média	104,3				
Repetibilidade (S_r)	1,8				
Between Run (S_{run})	2,9				
Precisão intermédia	3,4				
C.V (%)	3,5				
Gama média 800 mg/L					
Replicado 1	939,3	787,4	848,6	839,6	841,9
Replicado 2	822,0	790,8	868,4	868,3	821,9
Replicado 3	827,8	784,7	807,4	823,6	745,5
Média	863,0	787,6	841,5	843,8	803,1
Recuperação	115,1	105,0	112,2	112,5	107,1
Concenc. Média	830,7				
Recuperação Média	110,8				
Repetibilidade (S_r)	34,1				
Between Run (S_{run})	12,8				
Precisão intermédia	36,4				
C.V (%)	3,8				
Gama alta 1500 mg/L					
Replicado 1	1591,0	1466,1	1594,4	1486,8	1579,5
Replicado 2	1761,6	1502,3	1513,5	1512,2	1517,1
Replicado 3	1641,8	1503,0	1571,3	1635,5	1574,8
Média	1664,8	1490,4	1559,7	1544,8	1557,2
Recuperação	222,0	198,7	208,0	206,0	207,6
Concenc. Média	1571,7				
Recuperação Média	209,6				
Repetibilidade (S_r)	60,2				
Between Run (S_{run})	51,6				
Precisão intermédia	79,3				
C.V (%)	4,0				

Data	1° DIA	2° DIA	3° DIA	4° DIA	5° DIA
Equação	y = 0.005146x - 0.005065	y = 0.005312x - 0.000305	y = 0.005258x - 0.011984	y = 0.005316x + 0.001394	y = 0.005528x + 0.003055
Gama baixa 100 mg/L					
Média	116,1	99,5	106,2	102,2	99,8
Recuperação	116,1	99,5	106,2	102,2	99,8
Média	104,8				
Desvio padrão	6,88				
C.V (%)	6,6				
N	5				
Texp	1,55				
Terit	2,78				
Incerteza de R%	3,1				
Incerteza padrão rel.	0,029				
Gama média 800 mg/L					
Média	871,9	787,6	841,5	843,8	803,1
Recuperação	109,0	98,5	105,2	105,5	100,4
Concenc. Média	103,7				
Desvio padrão	4,24				
C.V (%)	4,1				
N	5				
Texp	1,95				
Terit	2,78				
Incerteza de R%	1,9				
Incerteza padrão rel.	0,019				
Gama alta 1500 mg/L					
Média	1673,7	1490,4	1559,7	1544,8	1557,2
Recuperação	111,6	99,4	104,0	103,0	103,8
Concenc. Média	104,3				
Desvio padrão	4,46				
C.V (%)	4,3				
N	5				
Texp	2,18				
Terit	2,78				
Incerteza de R%	2,0				
Incerteza padrão rel.	0,020				

PRECISÃO E EXATIDÃO DO ACETATO DE ETILO

Data	1° DIA ()	2° DIA ()	3° DIA ()	4° DIA ()	5° DIA ()
R²	0,9994	0,9978	0,998956	0,996033	0,99894
Declive	0,0066	0,0070	0,0067	0,0069	0,0067
Y0	-0,048	-0,058	-0,040	-0,073	-0,016
Gama baixa 100 mg/L					
Replicado 1	97,2	94,6	102,6	107,0	103,7
Replicado 2	101,8	100,4	105,5	112,6	104,4
Replicado 3	101,5	102,6	106,7	110,0	103,8
Média	100,2	99,2	104,9	109,9	103,9
Recuperação	100,2	99,2	104,9	109,9	103,9
Concenc. Média	101,4				
Recuperação Média	101,4				
Repetibilidade (S_r)	1,2				
Between Run (S_{run})	3,2				
Precisão intermédia	3,4				
C.V (%)	4,1				
Gama média 800 mg/L					
Replicado 1	883,4	750,4	844,6	862,0	882,1
Replicado 2	849,0	766,3	857,9	830,2	857,7
Replicado 3	793,6	745,7	805,3	861,9	768,5
Média	842,0	754,1	835,9	851,4	836,1
Recuperação	112,3	100,5	111,5	113,5	111,5
Concenc. Média	810,7				
Recuperação Média	108,1				
Repetibilidade (S_r)	39,0				
Between Run (S_{run})	16,9				
Precisão intermédia	42,5				
C.V (%)	4,8				
Gama alta 1500 mg/L					
Replicado 1	1564,7	1380,9	1483,2	1539,5	1665,8
Replicado 2	1662,1	1463,4	1468,4	1483,7	1551,2
Replicado 3	1541,4	1460,1	1559,4	1548,9	1650,6
Média	1589,4	1434,8	1503,6	1524,0	1622,5
Recuperação	211,9	191,3	200,5	203,2	216,3
Concenc. Média	1509,3				
Recuperação Média	201,2				
Repetibilidade (S_r)	60,8				
Between Run (S_{run})	35,3				
Precisão intermédia	70,4				
C.V (%)	4,8				

Data	1º DIA	2º DIA	3º DIA	4º DIA	5º DIA
Equação	$y = 0.006582x - 0.048283$	$y = 0.006966x - 0.058042$	$y = 0.006711x - 0.039798$	$y = 0.006941x - 0.073210$	$y = 0.006740x - 0.016264$
Gama baixa 100 mg/L					
Média	100,2	99,2	104,9	109,9	103,9
Recuperação	100,2	99,2	104,9	109,9	103,9
Média	103,6				
Desvio padrão	4,26				
C.V (%)	4,1				
N	5				
Texp	1,90				
Tcrit	2,78				
Incerteza de R%	1,9				
Incerteza padrão rel.	0,018				
Gama média 800 mg/L					
Média	842,0	754,1	835,9	851,4	836,1
Recuperação	105,3	94,3	104,5	106,4	104,5
Concenc. Média	103,0				
Desvio padrão	4,94				
C.V (%)	4,8				
N	5				
Texp	1,35				
Tcrit	2,78				
Incerteza de R%	2,2				
Incerteza padrão rel.	0,022				
Gama alta 1500 mg/L					
Média	1589,4	1434,8	1503,6	1524,0	1622,5
Recuperação	106,0	95,7	100,2	101,6	108,2
Concenc. Média	102,3				
Desvio padrão	4,92				
C.V (%)	4,8				
N	5				
Texp	1,06				
Tcrit	2,78				
Incerteza de R%	2,2				
Incerteza padrão rel.	0,022				

PRECISÃO E EXATIDÃO DO 2-BUTANOL

Data	1° DIA ()	2° DIA ()	3° DIA ()	4° DIA ()	5° DIA ()
R ²	0,9992	0,998988	0,999917	0,99843	0,998234
Declive	0,0027	0,0027	0,0028	0,0028	0,0029
Y0	0,003	0,001	-0,011	-0,002	-0,009
Gama baixa 100 mg/L					
Replicado 1	97,6	102,2	106,0	101,3	93,3
Replicado 2	95,0	97,1	111,8	99,9	93,5
Replicado 3	96,8	102,2	105,5	96,5	98,0
Média	96,5	100,5	107,7	99,2	94,9
Recuperação	96,5	100,5	107,7	99,2	94,9
Concenc. Média	99,8				
Recuperação Média	99,8				
Repetibilidade (S _r)	3,2				
Between Run (S _{run})	3,9				
Precisão intermédia	5,0				
C.V (%)	5,0				
Gama média 800 mg/L					
Replicado 1	804,0	816,4	837,8	817,9	775,5
Replicado 2	791,2	813,5	860,9	827,6	789,3
Replicado 3	779,6	818,0	804,6	836,8	736,9
Média	791,6	816,0	834,4	827,4	767,2
Recuperação	105,5	108,8	111,3	110,3	102,3
Concenc. Média	807,3				
Recuperação Média	107,6				
Repetibilidade (S _r)	24,8				
Between Run (S _{run})	20,5				
Precisão intermédia	32,2				
C.V (%)	3,4				
Gama alta 1500 mg/L					
Replicado 1	1492,9	1538,2	1439,1	1496,0	1517,4
Replicado 2	1279,6	1527,1	1529,0	1561,5	1544,3
Replicado 3	1467,0	1518,8	1564,8	1552,9	1515,0
Média	1413,2	1528,0	1511,0	1536,8	1525,6
Recuperação	188,4	203,7	201,5	204,9	203,4
Concenc. Média	1484,1				
Recuperação Média	197,9				
Repetibilidade (S _r)	61,2				
Between Run (S _{run})	50,5				
Precisão intermédia	79,3				
C.V (%)	3,4				

Data	1º DIA	2º DIA	3º DIA	4º DIA	5º DIA
Equação	$y = 0.002722x + 0.002897$	$y = 0.002711x + 0.001067$	$y = 0.002760x - 0,011005$	$y = 0.002781x - 0,001582$	$y = 0.002939x - 0,008699$
Gama baixa 100 mg/L					
Média	96,5	100,5	107,7	99,2	94,9
Recuperação	96,5	100,5	107,7	99,2	94,9
Média	99,8				
Desvio padrão	4,97				
C.V (%)	5,0				
N	5				
Texp	0,10				
Tcrit	2,78				
Incerteza de R%	2,2				
Incerteza padrão rel.	0,022				
Gama média 800 mg/L					
Média	791,6	816,0	834,4	827,4	767,2
Recuperação	99,0	102,0	104,3	103,4	95,9
Concenc. Média	100,9				
Desvio padrão	3,46				
C.V (%)	3,4				
N	5				
Texp	0,59				
Tcrit	2,78				
Incerteza de R%	1,5				
Incerteza padrão rel.	0,015				
Gama alta 1500 mg/L					
Média	1413,2	1528,0	1511,0	1536,8	1525,6
Recuperação	94,2	101,9	100,7	102,5	101,7
Concenc. Média	100,2				
Desvio padrão	3,40				
C.V (%)	3,4				
N	5				
Texp	0,13				
Tcrit	2,78				
Incerteza de R%	1,5				
Incerteza padrão rel.	0,015				

PRECISÃO E EXATIDÃO DO ISOBUTANOL

Data	1° DIA ()	2° DIA ()	3° DIA ()	4° DIA ()	5° DIA ()
R²	0,9996	0,999611	0,999938	0,998458	0,998716
Declive	0,0031	0,0032	0,0032	0,0032	0,0033
Y0	0,004	0,000	-0,009	-0,002	-0,009
Gama baixa 100 mg/L					
Replicado 1	101,3	99,0	104,3	100,6	98,9
Replicado 2	96,7	96,8	110,7	100,5	96,7
Replicado 3	98,6	101,3	107,3	99,2	101,3
Média	98,9	99,0	107,4	100,1	98,9
Recuperação	98,9	99,0	107,4	100,1	98,9
Concenc. Média	101,8				
Recuperação Média	101,8				
Repetibilidade (S_r)	2,4				
Between Run (S_{run})	3,5				
Precisão intermédia	4,2				
C.V (%)	3,7				
Gama média 800 mg/L					
Replicado 1	844,1	807,3	842,2	818,7	813,8
Replicado 2	813,6	798,8	866,9	827,7	814,9
Replicado 3	804,9	804,5	804,3	829,5	759,3
Média	820,9	803,5	837,8	825,3	796,0
Recuperação	109,5	107,1	111,7	110,0	106,1
Concenc. Média	820,7				
Recuperação Média	109,4				
Repetibilidade (S_r)	26,7				
Between Run (S_{run})	4,8				
Precisão intermédia	27,1				
C.V (%)	2,1				
Gama alta 1500 mg/L					
Replicado 1	1551,6	1512,2	1467,8	1488,5	1562,9
Replicado 2	1387,5	1502,6	1537,9	1547,9	1580,8
Replicado 3	1525,6	1500,7	1566,1	1548,6	1563,2
Média	1488,2	1505,2	1523,9	1528,3	1569,0
Recuperação	198,4	200,7	203,2	203,8	209,2
Concenc. Média	1505,8				
Recuperação Média	200,8				
Repetibilidade (S_r)	44,9				
Between Run (S_{run})	27,9				
Precisão intermédia	52,9				
C.V (%)	2,0				

Data	1º DIA	2º DIA	3º DIA	4º DIA	5º DIA
Equação	$y = 0.003067x + 0.003542$	$y = 0.003161x - 0.000404$	$y = 0.003203x - 0.008973$	$y = 0.003230x - 0.002359$	$y = 0.003281x - 0.009337$
Gama baixa 100 mg/L					
Média	98,9	99,0	107,4	100,1	98,9
Recuperação	98,9	99,0	107,4	100,1	98,9
Média	100,9				
Desvio padrão	3,70				
C.V (%)	3,7				
N	5				
Texp	0,53				
Tcrit	2,78				
Incerteza de R%	1,7				
Incerteza padrão rel.	0,016				
Gama média 800 mg/L					
Média	820,9	803,5	837,8	825,3	796,0
Recuperação	102,6	100,4	104,7	103,2	99,5
Concenc. Média	102,1				
Desvio padrão	2,11				
C.V (%)	2,1				
N	5				
Texp	2,22				
Tcrit	2,78				
Incerteza de R%	0,9				
Incerteza padrão rel.	0,009				
Gama alta 1500 mg/L					
Média	1488,2	1505,2	1523,9	1528,3	1569,0
Recuperação	99,2	100,3	101,6	101,9	104,6
Concenc. Média	101,5				
Desvio padrão	2,02				
C.V (%)	2,0				
N	5				
Texp	1,69				
Tcrit	2,78				
Incerteza de R%	0,9				
Incerteza padrão rel.	0,009				

PRECISÃO E EXATIDÃO DO *n*-BUTANOL

Data	1° DIA ()	2° DIA ()	3° DIA ()	4° DIA ()	5° DIA ()
R²	0,9987	0,997495	0,99992	0,998137	0,997118
Declive	0,0021	0,0021	0,0022	0,0022	0,0022
Y0	-0,001	0,001	-0,011	0,000	-0,011
Gama baixa 100 mg/L					
Replicado 1	96,2	99,7	103,5	99,2	94,7
Replicado 2	91,1	97,4	109,3	97,7	94,2
Replicado 3	93,4	101,9	101,7	93,9	100,3
Média	93,6	99,7	104,8	96,9	96,4
Recuperação	93,6	99,7	104,8	96,9	96,4
Concenc. Média	99,4				
Recuperação Média	99,4				
Repetibilidade (S_r)	3,7				
Between Run (S_{run})	3,4				
Precisão intermédia	5,0				
C.V (%)	4,3				
Gama média 800 mg/L					
Replicado 1	774,3	830,2	830,4	821,5	790,3
Replicado 2	800,7	821,1	859,0	828,5	804,8
Replicado 3	803,2	824,0	800,6	846,6	759,8
Média	792,7	825,1	830,0	832,2	785,0
Recuperação	105,7	110,0	110,7	111,0	104,7
Concenc. Média	815,9				
Recuperação Média	108,8				
Repetibilidade (S_r)	24,0				
Between Run (S_{run})	12,0				
Precisão intermédia	26,9				
C.V (%)	2,8				
Gama alta 1500 mg/L					
Replicado 1	1548,9	1567,9	1354,5	1518,1	1555,8
Replicado 2	1208,3	1537,6	1538,9	1585,1	1606,0
Replicado 3	1473,4	1535,8	1559,5	1521,5	1558,0
Média	1410,2	1547,1	1484,3	1541,6	1573,3
Recuperação	188,0	206,3	197,9	205,5	209,8
Concenc. Média	1480,5				
Recuperação Média	197,4				
Repetibilidade (S_r)	87,8				
Between Run (S_{run})	61,2				
Precisão intermédia	107,0				
C.V (%)	4,3				

Data	1º DIA	2º DIA	3º DIA	4º DIA	5º DIA
	y = 0.002066x				
Equação	- 0.000963	y = 0.002105x + 0,000758	y = 0.002151x - 0.010640	y = 0.002167x + 0.000173	y = 0.002216x - 0.010551
Gama baixa 100 mg/L					
Média	93,6	99,7	104,8	96,9	96,4
Recuperação	93,6	99,7	104,8	96,9	96,4
Média	98,3				
Desvio padrão	4,25				
C.V (%)	4,3				
N	5				
Texp	0,90				
Tcrit	2,78				
Incerteza de R%	1,9				
Incerteza padrão rel.	0,019				
Gama média 800 mg/L					
Média	792,7	825,1	830,0	832,2	785,0
Recuperação	99,1	103,1	103,8	104,0	98,1
Concenc. Média	101,6				
Desvio padrão	2,79				
C.V (%)	2,8				
N	5				
Texp	1,30				
Tcrit	2,78				
Incerteza de R%	1,2				
Incerteza padrão rel.	0,012				
Gama alta 1500 mg/L					
Média	1410,2	1547,1	1484,3	1541,6	1573,3
Recuperação	94,0	103,1	99,0	102,8	104,9
Concenc. Média	100,8				
Desvio padrão	4,34				
C.V (%)	4,3				
N	5				
Texp	0,39				
Tcrit	2,78				
Incerteza de R%	1,9				
Incerteza padrão rel.	0,019				

PRECISÃO E EXATIDÃO DO 3-METIL-1-BUTANOL

Data	1° DIA ()	2° DIA ()	3° DIA ()	4° DIA ()	5° DIA ()
R²	0,9992	0,999147	0,999982	0,998313	0,998617
Declive	0,0034	0,0036	0,0035	0,0036	0,0036
Y0	-0,001	-0,018	-0,016	-0,006	-0,012
Gama baixa 100 mg/L					
Replicado 1	98,0	103,4	103,3	100,2	97,9
Replicado 2	96,6	107,3	108,4	98,6	95,2
Replicado 3	97,9	105,7	105,6	97,5	99,7
Média	97,5	105,5	105,8	98,7	97,6
Recuperação	97,5	105,5	105,8	98,7	97,6
Concenc. Média	102,9				
Recuperação Média	102,9				
Repetibilidade (S_r)	1,8				
Between Run (S_{run})	4,0				
Precisão intermédia	4,4				
C.V (%)	4,2				
Gama média 800 mg/L					
Replicado 1	830,7	834,1	838,9	810,7	817,5
Replicado 2	814,6	823,4	865,4	829,3	811,9
Replicado 3	801,9	864,9	802,5	823,8	762,7
Média	815,7	840,8	835,6	821,3	797,4
Recuperação	108,8	112,1	111,4	109,5	106,3
Concenc. Média	830,7				
Recuperação Média	110,8				
Repetibilidade (S_r)	28,8				
Between Run (S_{run})	7,8				
Precisão intermédia	29,9				
C.V (%)	2,1				
Gama alta 1500 mg/L					
Replicado 1	1552,0	1556,6	1420,4	1490,7	1568,9
Replicado 2	1363,4	1541,0	1543,6	1535,9	1581,8
Replicado 3	1506,6	1489,3	1561,5	1539,8	1574,8
Média	1474,0	1529,0	1508,5	1522,2	1575,1
Recuperação	196,5	203,9	201,1	203,0	210,0
Concenc. Média	1503,8				
Recuperação Média	200,5				
Repetibilidade (S_r)	48,6				
Between Run (S_{run})	34,7				
Precisão intermédia	59,7				
C.V (%)	2,4				

Data	1° DIA	2° DIA	3° DIA	4° DIA	5° DIA
Equação	$y = 0.003392x - 0.000971$	$y = 0.003642x - 0.017687$	$y = 0.003536x - 0,016169$	$y = 0.003570x - 0.005970$	$y = 0.003601x - 0.012175$
Gama baixa 100 mg/L					
Média	97,5	104,9	105,8	98,7	97,6
Recuperação	97,5	104,9	105,8	98,7	97,6
Média	100,9				
Desvio padrão	4,08				
C.V (%)	4,0				
N	5				
Texp	0,50				
Tcrit	2,78				
Incerteza de R%	1,8				
Incerteza padrão rel.	0,018				
Gama média 800 mg/L					
Média	815,7	869,4	835,6	821,3	797,4
Recuperação	102,0	108,7	104,4	102,7	99,7
Concenc. Média	103,5				
Desvio padrão	3,37				
C.V (%)	3,3				
N	5				
Texp	2,31				
Tcrit	2,78				
Incerteza de R%	1,5				
Incerteza padrão rel.	0,015				
Gama alta 1500 mg/L					
Média	1474,0	1584,9	1508,5	1522,2	1575,1
Recuperação	98,3	105,7	100,6	101,5	105,0
Concenc. Média	102,2				
Desvio padrão	3,10				
C.V (%)	3,0				
N	5				
Texp	1,58				
Tcrit	2,78				
Incerteza de R%	1,4				
Incerteza padrão rel.	0,014				

PRECISÃO E EXATIDÃO DO 2-METIL-1-BUTANOL

Data	1° DIA ()	2° DIA ()	3° DIA ()	4° DIA ()	5° DIA ()
R²	0,9997	0,999645	0,999946	0,99816	0,999239
Declive	0,0038	0,0040	0,0040	0,0040	0,0041
Y0	0,015	0,017	-0,001	0,006	-0,006
Gama baixa 100 mg/L					
Replicado 1	97,4	97,2	103,2	101,1	99,1
Replicado 2	96,5	98,2	108,9	101,4	98,3
Replicado 3	97,2	100,2	106,6	100,1	101,2
Média	97,0	98,5	106,2	100,8	99,6
Recuperação	97,0	98,5	106,2	100,8	99,6
Concenc. Média	100,6				
Recuperação Média	100,6				
Repetibilidade (S_r)	1,4				
Between Run (S_{run})	3,2				
Precisão intermédia	3,5				
C.V (%)	3,5				
Gama média 800 mg/L					
Replicado 1	829,1	799,9	835,5	816,8	818,3
Replicado 2	686,4	788,3	866,7	840,3	809,3
Replicado 3	788,0	796,9	801,3	827,3	756,1
Média	767,8	795,0	834,5	828,1	794,6
Recuperação	102,4	106,0	111,3	110,4	105,9
Concenc. Média	799,1				
Recuperação Média	106,5				
Repetibilidade (S_r)	42,1				
Between Run (S_{run})	22,3				
Precisão intermédia	47,6				
C.V (%)	3,4				
Gama alta 1500 mg/L					
Replicado 1	1524,7	1486,1	1429,9	1484,6	1546,1
Replicado 2	1375,8	1474,9	1528,7	1529,5	1555,3
Replicado 3	1486,7	1495,7	1547,9	1552,3	1556,8
Média	1462,4	1485,6	1502,2	1522,1	1552,7
Recuperação	195,0	198,1	200,3	202,9	207,0
Concenc. Média	1483,4				
Recuperação Média	197,8				
Repetibilidade (S_r)	36,9				
Between Run (S_{run})	36,4				
Precisão intermédia	51,9				
C.V (%)	2,3				

Data	1º DIA	2º DIA	3º DIA	4º DIA	5º DIA
Equação	$y = 0.003814x + 0.014517$	$y = 0.003971x + 0.017060$	$y = 0.003977x - 0.000690$	$y = 0.004014x + 0.006429$	$y = 0.004076x - 0,006328$
Gama baixa 100 mg/L					
Média	97,0	98,5	106,2	100,8	99,6
Recuperação	97,0	98,5	106,2	100,8	99,6
Média	100,4				
Desvio padrão	3,52				
C.V (%)	3,5				
N	5				
Texp	0,28				
Tcrit	2,78				
Incerteza de R%	1,6				
Incerteza padrão rel.	0,016				
Gama média 800 mg/L					
Média	767,8	795,0	834,5	828,1	794,6
Recuperação	96,0	99,4	104,3	103,5	99,3
Concenc. Média	100,5				
Desvio padrão	3,42				
C.V (%)	3,4				
N	5				
Texp	0,33				
Tcrit	2,78				
Incerteza de R%	1,5				
Incerteza padrão rel.	0,015				
Gama alta 1500 mg/L					
Média	1462,4	1485,6	1502,2	1522,1	1552,7
Recuperação	97,5	99,0	100,1	101,5	103,5
Concenc. Média	100,3				
Desvio padrão	2,30				
C.V (%)	2,3				
N	5				
Texp	0,32				
Tcrit	2,78				
Incerteza de R%	1,0				
Incerteza padrão rel.	0,010				

PRECISÃO E EXATIDÃO DO 1-PENTANOL

Data	1° DIA ()	2° DIA ()	3° DIA ()	4° DIA ()	5° DIA ()
R ²	0,9990	0,99903	0,999946	0,998051	0,998219
Declive	0,0031	0,0032	0,0033	0,0033	0,0033
Y0	0,004	0,005	-0,012	-0,001	-0,012
Gama baixa 100 mg/L					
Replicado 1	95,5	98,0	103,5	98,4	97,0
Replicado 2	93,2	96,7	109,0	98,5	95,1
Replicado 3	92,1	100,1	105,0	95,6	98,7
Média	93,6	98,2	105,8	97,5	96,9
Recuperação	93,6	98,2	105,8	97,5	96,9
Concenc. Média	99,2				
Recuperação Média	99,2				
Repetibilidade (S _r)	2,2				
Between Run (S _{run})	4,1				
Precisão intermédia	4,7				
C.V (%)	6,2				
Gama média 800 mg/L					
Replicado 1	790,6	817,8	828,0	804,5	803,0
Replicado 2	795,2	803,7	862,8	826,3	800,1
Replicado 3	784,5	816,6	799,2	820,5	756,0
Média	790,1	812,7	830,0	817,1	786,4
Recuperação	105,3	108,4	110,7	108,9	104,8
Concenc. Média	810,9				
Recuperação Média	108,1				
Repetibilidade (S _r)	25,1				
Between Run (S _{run})	11,0				
Precisão intermédia	27,4				
C.V (%)	2,5				
Gama alta 1500 mg/L					
Replicado 1	1521,7	1527,2	1359,9	1481,6	1539,1
Replicado 2	1274,6	1503,4	1536,2	1520,7	1568,1
Replicado 3	1450,6	1529,4	1538,2	1509,4	1557,4
Média	1415,6	1520,0	1478,1	1503,9	1554,9
Recuperação	188,7	202,7	197,1	200,5	207,3
Concenc. Média	1471,2				
Recuperação Média	196,2				
Repetibilidade (S _r)	56,5				
Between Run (S _{run})	55,2				
Precisão intermédia	79,0				
C.V (%)	3,6				

Data	1º DIA	2º DIA	3º DIA	4º DIA	5º DIA
Equação	$y = 0.003141x + 0.003550$	$y = 0.003243x + 0.005475$	$y = 0.003269x - 0.011727$	$y = 0.003305x - 0.001302$	$y = 0.003323x - 0.012493$
Gama baixa 100 mg/L					
Média	93,6	98,2	105,8	97,5	96,9
Recuperação	93,6	98,2	105,8	97,5	96,9
Média	98,4				
Desvio padrão	4,51				
C.V (%)	4,6				
N	5				
Texp	0,79				
Tcrit	2,78				
Incerteza de R%	2,0				
Incerteza padrão rel.	0,021				
Gama média 800 mg/L					
Média	790,1	812,7	830,0	817,1	786,4
Recuperação	98,8	101,6	103,7	102,1	98,3
Concenc. Média	100,9				
Desvio padrão	2,32				
C.V (%)	2,3				
N	5				
Texp	0,87				
Tcrit	2,78				
Incerteza de R%	1,0				
Incerteza padrão rel.	0,010				
Gama alta 1500 mg/L					
Média	1415,6	1520,0	1478,1	1503,9	1554,9
Recuperação	94,4	101,3	98,5	100,3	103,7
Concenc. Média	99,6				
Desvio padrão	3,48				
C.V (%)	3,5				
N	5				
Texp	0,24				
Tcrit	2,78				
Incerteza de R%	1,6				
Incerteza padrão rel.	0,016				

7.7. LIMITE DE REPETIBILIDADE

800 mg/L

Composto	Limite de repetibilidade (%)
Acetaldeído	89,0
Metanol	11,3
Etanol	16,0
Dietil	16,0
Acetona	12,2
2-Propanol	8,9
t-Butanol	10,2
1-Propanol	8,9
Metil-Etil-Cetona	11,9
Acetato de etilo	13,6
2-butanol	8,7
Isobutanol	9,3
1-butanol	8,4
3-metil-1-butanol	10,1
2-metil-1-butanol	14,7
1-pentanol	8,8
Média	≈ 11%

1500 mg/L

Composto	Limite de repetibilidade (%)
Acetaldeído	14,3
Metanol	22,3
Etanol	28,7
Dietil	26,0
Acetona	7,2
2-Propanol	16,6
t-Butanol	9,2
1-Propanol	22,3
Metil-Etil-Cetona	11,2
Acetato de etilo	11,3
2-butanol	11,4
Isobutanol	8,4
1-butanol	16,4
3-metil-1-butanol	9,1
2-metil-1-butanol	6,9
1-pentanol	10,5
Média	≈ 14%

7.8. BIAS DO MÉTODO

BIAS DO ACETALDEÍDO

	100mg/L	800mg/L	1500mg/L
	95,68	845,7864	1439,825
	100,54	790,0781	1698,188
	100,43	750,733	1515,656
	108,3022	882,8152	1639,871
	116,2043	888,1043	1696,687
	119,9966	875,4534	1704,483
	101,1713	828,453	1467,665
	106,2541	782,5404	1421,996
	104,2655	835,103	1481,268
	85,58843	690,3883	1211,529
	85,29099	713,0736	1227,032
	90,36961	669,6049	1350,966
	117,7232	1019,022	1886,146
	119,1777	1001,626	1797,896
	120,2619	986,9144	1875,91
Média	104,75	837,313	1561,008
Erro (%)	4.750991	4.664126	4.067192

BIAS DO METANOL

	100mg/L	800mg/L	1500mg/L
	102,4479	810,4097	1672,302
	115,2349	844,1816	1604,118
	124,8171	862,1127	1495,446
	90,4161	818,1926	1616,202
	101,0695	869,432	1564,326
	97,33359	812,0755	1517,096
	71,70868	837,4981	1156,89
	75,76655	849,5489	1586,508
	64,20791	809,6639	1620,697
	96,05826	763,3418	1485,23
	106,8091	763,9203	1503,599
	89,47214	830,4506	1261,666
	96,11827	695,9836	1486,528
	102,6036	768,1367	1560,83
	106,3078	797,8776	1445,241
Média	96,02476	808,855	1505,112
Erro (%)	-3,97524	1,106879	0,340805

BIAS DO ETANOL

	100mg/L	800mg/L	1500mg/L
	102,9435	801,3582	1606,917
	108,798	832,354	1591,167
	111,9888	845,5663	1479,676
	100,6729	790,4829	1540,559
	103,0698	808,4888	1481,366
	95,34612	785,957	1449,064
	101,60	826,8803	1228,533
	111,70	857,3241	1554,63
	97,93	821,2088	1589,272
	94,37277	781,2605	1482,35
	96,88534	774,3534	1539,752
	86,01558	837,2234	1338,528
	97,5172	723,9034	1525,77
	99,67863	784,3907	1608,36
	104,6825	744,2751	1499,97
Média	100,8803	801,0018	1501,061
Erro (%)	0,880349	0,125224	0,07074

BIAS DO DIETIL-ÉTER

	100mg/L	800mg/L	1500mg/L
	110,0216	1033,926	1960,766
	119,2592	1040,889	1779,659
	117,2291	967,4281	1823,206
	86,05683	743,6244	1366,118
	94,15857	784,9225	1567,915
	93,21636	738,0214	1562,33
	88,37959	783,7805	1080,969
	90,54197	768,8932	1269,787
	88,07943	740,4261	1413,028
	89,37699	691,5391	1277,605
	91,28148	781,392	1173,181
	96,80514	716,4394	1572,119
	82,45189	703,6076	1372,121
	81,76057	702,908	1245,3
	80,82046	612,2911	1353,884
Média	93,96261	787,3393	1454,533
Erro (%)	-6,03739	-1,58259	-3,03116

BIAS DA ACETONA

	100mg/L	800mg/L	1500mg/L
	96,21463	850,9874	1440,322
	96,69902	780,9721	1585,457
	98,05099	755,3831	1504,62
	101,4794	823,4679	1530,46
	105,5875	820,1266	1550,5
	108,1827	822,7085	1549,732
	106,9498	874,3402	1674,845
	110,2198	895,0809	1575,087
	111,7479	833,1759	1617,126
	99,96892	819,0209	1454,862
	99,77187	835,0829	1493,773
	103,5306	804,4738	1565,562
	110,339	928,7703	1745,118
	110,7794	915,2492	1707,659
	113,1633	833,4037	1746,898
Média	104,8457	839,4829	1582,801
Erro (%)	4,845651	4,935362	5,520086

BIAS DO 2-PROPANOL

	100mg/L	800mg/L	1500mg/L
	96,21463	850,9874	1440,322
	96,69902	780,9721	1585,457
	98,05099	755,3831	1504,62
	101,4794	823,4679	1530,46
	105,5875	820,1266	1550,5
	108,1827	822,7085	1549,732
	106,9498	874,3402	1674,845
	110,2198	895,0809	1575,087
	111,7479	833,1759	1617,126
	99,96892	819,0209	1454,862
	99,77187	835,0829	1493,773
	103,5306	804,4738	1565,562
	110,339	928,7703	1745,118
	110,7794	915,2492	1707,659
	113,1633	833,4037	1746,898
Média	104,8457	839,4829	1582,801
Erro (%)	4,845651	4,935362	5,520086

BIAS DO *t*-BUTANOL

	100mg/L	800mg/L	1500mg/L
	105,8838	882,4425	1579,4
	101,5335	838,7527	1418,958
	104,4401	823,0781	1560,848
	100,4996	798,9194	1500,515
	98,49838	799,3304	1506,142
	102,4266	800,8392	1489,051
	105,9691	844,9566	1485,533
	112,5978	867,202	1529,203
	108,6508	806,694	1575,209
	106,5672	857,624	1597,939
	109,7383	845,4718	1594,456
	107,9912	883,1073	1557,425
	99,36935	796,3621	1551,106
	97,75582	808,6309	1565,376
	101,3843	751,3656	1547,224
Média	104,2204	826,9851	1537,226
Erro (%)	4,220395	3,37314	2,481716

BIAS DO 1-PROPANOL

	100mg/L	800mg/L	1500mg/L
	92,18754	713,3152	1514,826
	85,16454	780,9827	1078,897
	87,62728	791,6466	1426,245
	99,03052	816,7013	1572,616
	94,35878	823,1057	1530,52
	89,16763	812,2167	1509,957
	103,9438	826,1625	1466,173
	107,2663	850,2298	1627,059
	100,8542	798,4318	1663,354
	94,35555	800,9514	1502,953
	95,49438	801,4075	1575,844
	88,49353	843,6229	1454,491
	93,67377	760,865	1559,009
	95,14337	799,8454	1629,074
	99,25977	757,1133	1552,498
Média	95,06806	798,4399	1510,901
Erro (%)	-4,93194	-0,19502	0,726727

BIAS DA METIL-ETIL-CETONA

	100mg/L	800mg/L	1500mg/L
	104,568	939,3643	1591,023
	108,0343	822,0587	1761,692
	109,1481	827,7759	1641,871
	96,0051	787,3488	1466,057
	100,0992	790,7967	1502,245
	102,5197	784,6881	1502,967
	103,6132	848,5518	1594,431
	107,1371	868,4444	1513,459
	107,9974	807,4154	1571,314
	101,3038	839,6285	1486,837
	100,1248	868,2976	1512,199
	105,1012	823,6474	1635,537
	98,61107	841,8237	1579,453
	99,89121	821,8261	1517,01
	100,9609	745,4519	1574,747
Média	103,0077	827,808	1563,39
Erro (%)	3,007667	3,475995	4,225968

BIAS DO ACETATO DE ETILO

	100mg/L	800mg/L	1500mg/L
	97,18018	883,4015	1564,699
	101,771	848,983	1662,122
	101,5004	793,6316	1541,402
	94,55723	750,3991	1380,928
	100,4141	766,3147	1463,421
	102,6098	745,6712	1460,079
	102,5628	844,5553	1483,123
	105,5294	857,9013	1468,322
	106,6604	805,2932	1559,401
	107,0293	862,0457	1539,581
	112,6061	830,2095	1483,782
	109,973	861,9868	1548,937
	103,678	882,1902	1665,91
	104,3907	857,7794	1551,26
	103,7677	768,5422	1650,739
Média	103,6153	823,927	1534,914
Erro (%)	3,615344	2,990872	2,327578

BIAS DO 2-BUTANOL

	100mg/L	800mg/L	1500mg/L
	97,55637	803,9841	1492,915
	95,02041	791,2176	1279,554
	96,77478	779,6255	1466,974
	102,2476	816,4653	1538,225
	97,09537	813,5109	1527,133
	102,1946	818,0116	1518,817
	105,961	837,6881	1438,928
	111,7673	860,7702	1528,875
	105,4392	804,5133	1564,649
	101,275	817,762	1495,786
	99,90615	827,4185	1561,258
	96,50364	836,6426	1552,662
	93,31773	775,6024	1517,656
	93,46399	789,4587	1544,494
	98,01632	736,9881	1515,192
Média	99,76929	807,3106	1502,874
Erro (%)	-0,23071	0,913825	0,191627

BIAS DO ISOBUTANOL

	100mg/L	800mg/L	1500mg/L
	101,27	844,1768	1551,67
	96,71132	813,6359	1387,549
	98,58896	804,9375	1525,703
	98,99376	807,3789	1512,396
	96,85567	798,9087	1502,806
	101,335	804,5928	1500,882
	104,3283	842,0956	1467,629
	110,6524	866,7646	1537,666
	107,2954	804,1614	1565,925
	100,5824	818,604	1488,349
	100,4924	827,6048	1547,733
	99,21074	829,348	1548,344
	98,84301	813,7604	1562,731
	96,66389	814,8628	1580,668
	101,2854	759,2883	1563,09
Média	100,8739	816,6747	1522,876
Erro (%)	0,873904	2,084338	1,52507

BIAS DO *n*-BUTANOL

	100mg/L	800mg/L	1500mg/L
	96,22267	774,3862	1548,971
	91,09552	800,7068	1208,324
	93,41146	803,2947	1473,451
	99,74919	830,2492	1567,99
	97,37298	821,1644	1537,664
	101,8968	824,0243	1535,873
	103,4942	830,498	1354,573
	109,3565	859,0708	1539,052
	101,6726	800,6267	1559,628
	99,16273	821,5969	1518,231
	97,68801	828,5909	1585,182
	93,89383	846,6412	1521,61
	94,74899	790,3624	1555,917
	94,23099	804,896	1606,144
	100,3399	759,8848	1558,097
Média	98,28909	813,0662	1511,38
Erro (%)	-1,71091	1,633279	0,7587

BIAS DO 3-METIL-1-BUTANOL

	100mg/L	800mg/L	1500mg/L
	97,96322	830,6029	1551,906
	96,63594	814,5440	1363,326
	97,93603	801,8383	1506,528
	103,42744	834,1605	1556,717
	107,33916	823,4294	1541,157
	105,74070	864,9749	1489,397
	103,29092	838,9401	1420,441
	108,39028	865,4791	1543,715
	105,58860	802,4888	1561,584
	100,17670	810,7295	1490,835
	98,58930	829,3218	1536,005
	97,46804	823,8762	1539,909
	97,85881	817,4945	1568,799
	95,22170	811,8836	1581,683
	99,70386	762,6351	1574,679
Média	101,02205	822,1599	1521,779
Erro (%)	1,022047	2,769996	1,451951

BIAS DO 2-METIL-1-BUTANOL

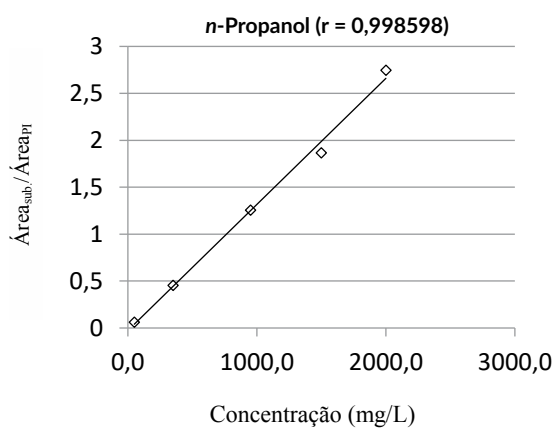
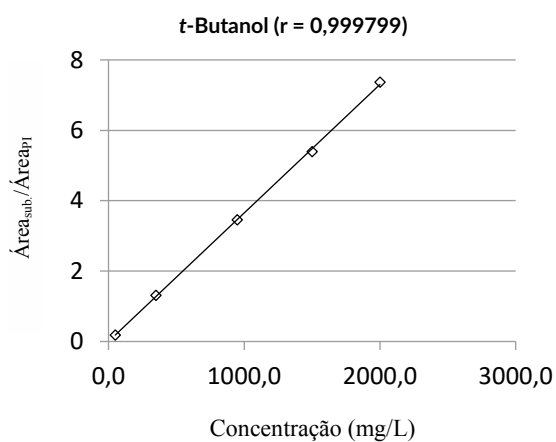
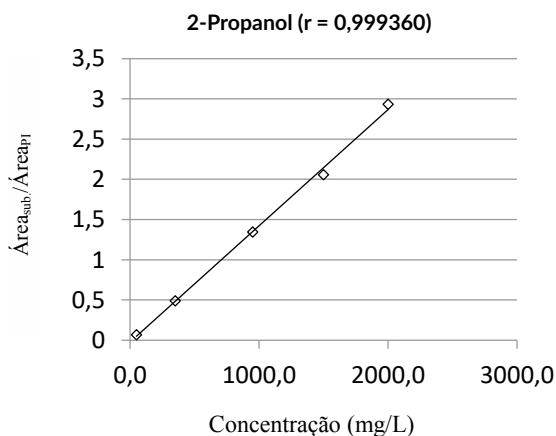
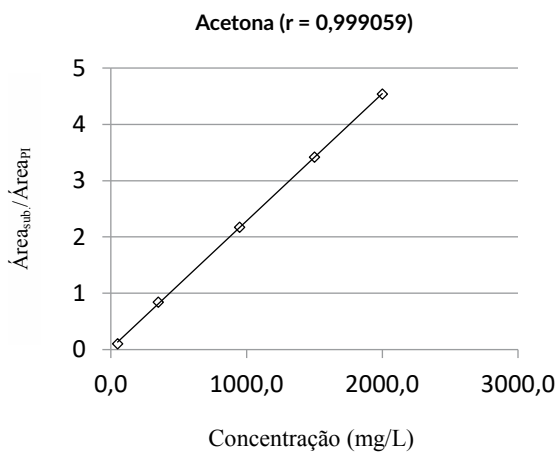
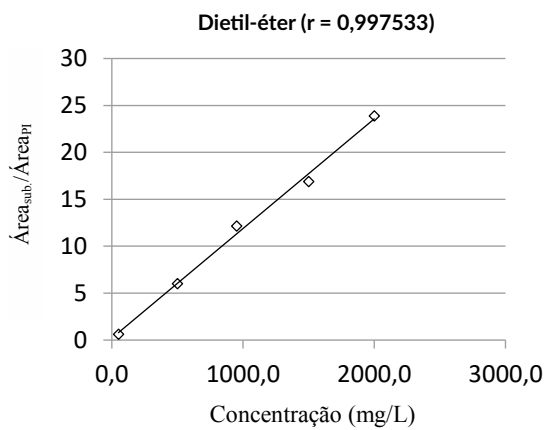
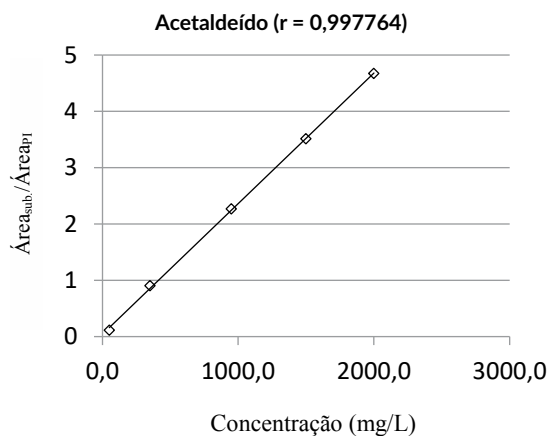
	100mg/L	800mg/L	1500mg/L
	97,43543	829,0456	1524,652
	96,44948	686,3296	1375,716
	97,24159	787,9431	1486,637
	97,19152	799,9477	1486,244
	98,24203	788,4195	1474,996
	100,1879	796,9485	1495,836
	103,2148	835,4383	1429,839
	108,8774	866,6493	1528,609
	106,5525	801,2202	1547,767
	101,0716	816,8648	1484,702
	101,3655	840,3614	1529,649
	100,1247	827,4149	1552,431
	99,13948	818,2433	1546,078
	98,346	809,3122	1555,199
	101,2294	756,068	1556,718
Média	100,4446	804,0138	1505,005
Erro (%)	0,444629	0,50172	0,333658

BIAS DO 1-PENTANOL

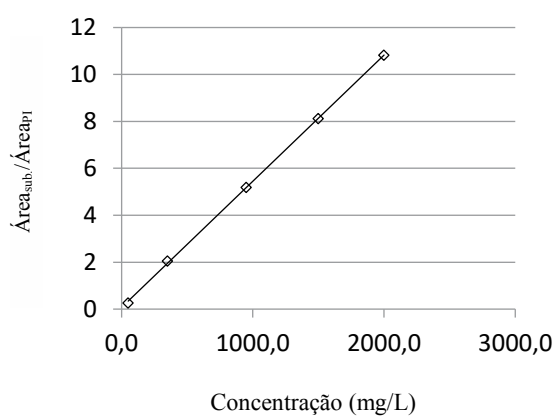
	100mg/L	800mg/L	1500mg/L
	95,51251	790,5099	1521,552
	93,15427	795,0792	1274,449
	92,05037	784,4426	1450,437
	97,98263	817,7134	1526,977
	96,67841	803,6111	1503,22
	100,0453	816,4739	1529,142
	103,5204	827,9398	1359,86
	108,9777	862,7613	1536,203
	104,9807	799,2144	1538,128
	98,42005	804,5165	1481,728
	98,48676	826,37	1520,833
	95,56282	820,5511	1509,483
	97,02512	802,9643	1538,98
	95,07337	800,0533	1568,013
	98,6633	755,9101	1557,246
Média	98,40891	807,2074	1494,417
Erro (%)	-1,59109	0,900924	-0,37221

7.9. ESTABILIDADE

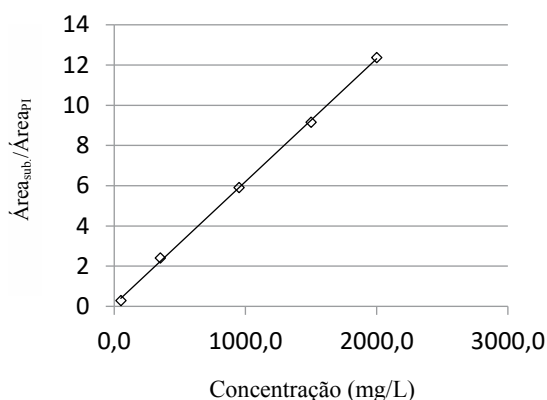
7.9.1. ESTABILIDADE DA RETA AO 4º DIA



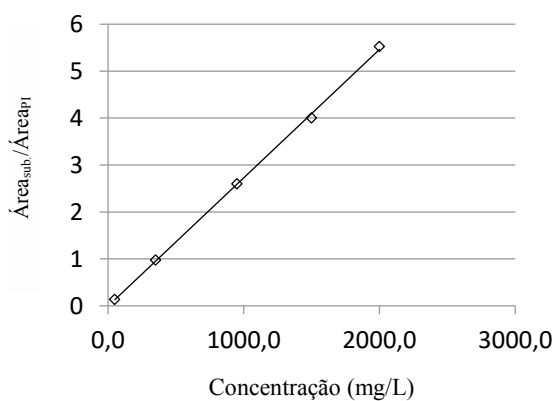
Metil-etil-cetona (r = 0,999366)



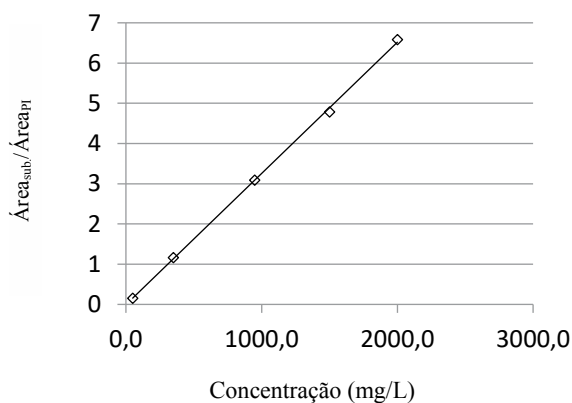
Acetato de etilo (r = 0,996874)



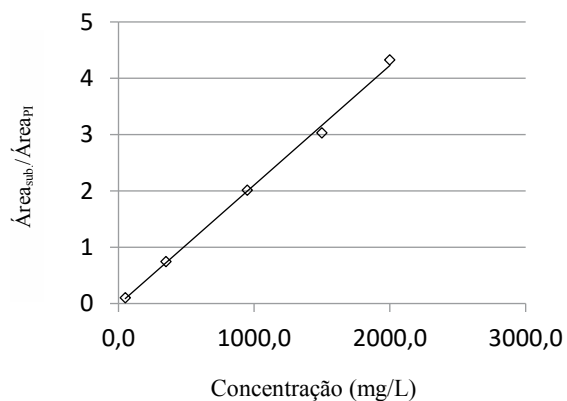
2-Butanol (r = 0,999693)



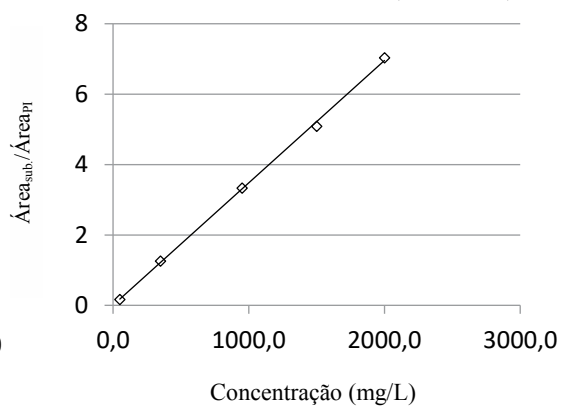
Isobutanol (r = 0,999641)

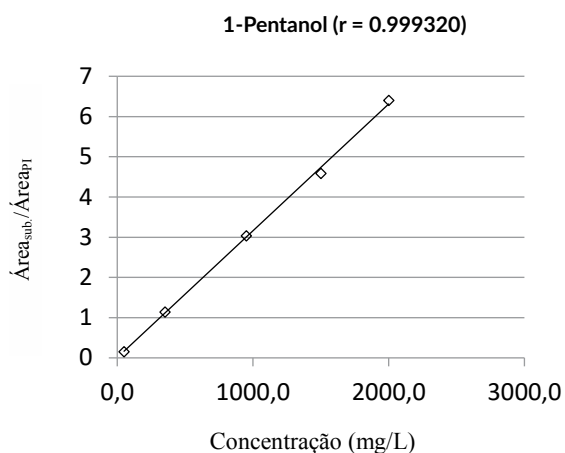
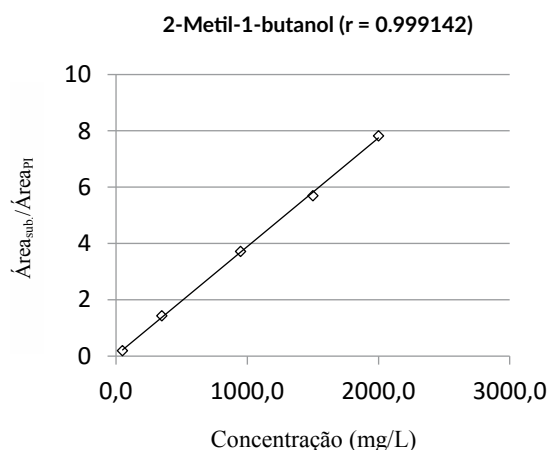


n-Butanol (r = 0,999284)



3-Metil-1-butanol (r = 999384)





7.9.2. ESTABILIDADE DOS CONTROLOS DE QUALIDADE INTERNOS

800 mg/L

Média: Área substância /Área PI.

Composto	Dia 0	Dia 1	Dia 4
Acetaldeído	2.0505	2.0976	2.3416
Metanol	0.2377	0.2477	0.2677
Etanol	0.5250	0.5493	0.5969
Acetona	2.0071	2.0728	2.3371
2-Propanol	1.2229	1.2803	1.4189
<i>t</i> -Butanol	3.2064	3.3265	3.7424
1-Propanol	1.1486	1.2033	1.3218
Metil-etil-cetona	4.6031	4.7138	5.3147
Acetato de etilo	5.8362	5.8854	6.4649
2-Butanol	2.3661	2.4595	2.7551
Isobutanol	2.7838	2.8957	3.2543
1-Butanol	1.8451	1.9297	2.1445
3-Metil-1-butanol	3.0444	3.1640	3.5630
2-Metil-1-butanol	3.4469	3.5845	4.0471
1-Pentanol	2.7918	2.9156	3.2850

7.9.3. ESTABILIDADE DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Sangue 100mg/L

Média: Área substância /Área PI.

Composto	Dia 0	Dia 1	Dia 15
Acetaldeído	0.206619	0.208955	0.20954
Metanol	0,026397	0.027131	0.029974
Etanol	0,055158	0.055234	0.061804
Dietil-éter	0,716799	0.568833	0.590281
Acetona	0,221669	0.223908	0.235921
2-Propanol	0,127827	0.129464	0.144727
<i>t</i> -Butanol	0,354595	0.375161	0.415978
<i>n</i> -Propanol	0,117374	0.118949	0.133371
Metil-etil-cetona	0,479465	0.484459	0.505146
Acetato de etilo	0,528608	0.514754	0.536255
2-Butanol	0,244079	0.247226	0.275641
Isobutanol	0,277458	0.28457	0.315305
<i>n</i> -Butanol	0,186027	0.188983	0.212151
3-Metil-1-butanol	0,295443	0.297599	0.329762
2-Metil-1-butanol	0,353138	0.359062	0.393837
1-Pentanol	0,280954	0.280993	0.315969

Sangue 1500mg/L

Média: Área substância /Área PI.

Composto	Dia 0	Dia 1	Dia 15
Acetaldeído	3,277621	3.049113	2.217749
Metanol	0,46674	0.476921	0.533938
Etanol	1,001004	1.049008	1.164861
Dietil-éter	12,06429	8.383951	8.821758
Acetona	3,434574	3.543432	3.808835
2-Propanol	2,218794	2.344767	2.552611
<i>t</i> -Butanol	5,87944	6.24207	6.765581
<i>n</i> -Propanol	2,080291	2.178054	2.369466
Metil-etil-cetona	7,755067	7.769885	8.364248
Acetato de etilo	8,500411	7.861111	8.352164
2-Butanol	4,158891	4.325524	4.65996
Isobutanol	4,78265	4.845315	5.206359
<i>n</i> -Butanol	3,287254	3.295924	3.554563
3-Metil-1-butanol	5,20301	4.931306	5.204495
2-Metil-1-butanol	5,848673	5.523703	5.835751
1-Pentanol	4,859347	4.458261	4.678311

Urina 100 mg/L**Média: Área substância /Área PI.**

Composto	Dia 0	Dia 1	Dia 15
Acetaldeído	0,215202	0.172694	0.12926
Metanol	0,027746	0.028813	0.028806
Etanol	0,05708	0.0569	0.061059
Dietil-éter	0,798395	0.710088	0.594941
Acetona	0,22386	0.226794	0.243382
2-Propanol	0,132732	0.133399	0.144378
<i>t</i> -Butanol	0,374969	0.388163	0.427998
<i>n</i> -Propanol	0,119443	0.122977	0.134038
Metil-etil-cetona	0,503185	0.510419	0.532006
Acetato de etilo	0,560071	0.554115	0.526132
2-Butanol	0,256406	0.254092	0.281323
Isobutanol	0,294155	0.29573	0.323902
<i>n</i> -Butanol	0,193826	0.194491	0.213564
3-Metil-1-butanol	0,315037	0.315291	0.345857
2-Metil-1-butanol	0,37711	0.378041	0.411946
1-Pentanol	0,301118	0.30223	0.323792

Urina 1500 mg/L**Média: Área substância /Área PI.**

Composto	Dia 0	Dia 1	Dia 15
Acetaldeído	3,380696	2.880919	1.932219
Metanol	0,43442	0.448316	0.481957
Etanol	0,934884	0.980975	1.068286
Dietil-éter	12,43649	9.791787	10.06276
Acetona	3,40341	3.417378	3.654401
2-Propanol	2,144493	2.167903	2.373103
<i>t</i> -Butanol	5,721718	5.819954	6.32874
<i>n</i> -Propanol	1,978539	2.043479	2.224085
Metil-etil-cetona	7,728434	7.660279	8.119094
Acetato de etilo	8,580515	8.092467	8.402827
2-Butanol	4,031505	4.101568	4.459927
Isobutanol	4,691072	4.693228	5.126656
<i>n</i> -Butanol	3,182917	3.204193	3.569829
3-Metil-1-butanol	5,118719	5.121829	5.59258
2-Metil-1-butanol	5,77669	5.74354	6.285276
1-Pentanol	4,767394	4.768614	5.218681


Humor vítreo 100 mg/L**Média: Área substância /Área PI.**

Composto	Dia 0	Dia 1	Dia 15
Acetaldeído	0,213007	0.219662	0.14454
Metanol	0,028448	0.030284	0.029773
Etanol	0,060102	0.06152	0.067882
Dietil-éter	0,765423	0.727516	0.633473
Acetona	0,2223	0.240484	0.252755
2-Propanol	0,135274	0.14267	0.150009
<i>t</i> -Butanol	0,370255	0.40554	0.442436
<i>n</i> -Propanol	0,123072	0.130652	0.13443
Metil-etil-cetona	0,485731	0.519104	0.510077
Acetato de etilo	0,525396	0.547824	0.432967
2-Butanol	0,257019	0.268799	0.28221
Isobutanol	0,294103	0.31092	0.335335
<i>n</i> -Butanol	0,19718	0.207324	0.220471
3-Metil-1-butanol	0,313967	0.329373	0.348074
2-Metil-1-butanol	0,373133	0.395568	0.412909
1-Pentanol	0,298895	0.314966	0.32242

Humor vítreo 1500 mg/L**Média: Área substância /Área PI.**

Composto	Dia 0	Dia 1	Dia 15
Acetaldeído	3,419308	3.345749	3.219917
Metanol	0,455023	0.411036	0.47503
Etanol	0,984636	0.960799	1.038479
Dietil-éter	12,0335	10.06061	9.58963
Acetona	3,436513	3.434448	3.58634
2-Propanol	2,197696	2.157184	2.328852
<i>t</i> -Butanol	5,834529	5.834922	6.270016
<i>n</i> -Propanol	2,047415	2.016558	2.177858
Metil-etil-cetona	7,745077	7.695465	7.983316
Acetato de etilo	8,420267	8.062992	8.173043
2-Butanol	4,12613	4.094446	4.406162
Isobutanol	4,755402	4.710743	5.084222
<i>n</i> -Butanol	3,184449	3.19759	3.457675
3-Metil-1-butanol	5,194869	5.138257	5.533565
2-Metil-1-butanol	5,846352	5.8024	6.233561
1-Pentanol	4,853845	4.797379	5.154456

7.10. PROCEDIMENTOS DE ENSAIO PARA A DETERMINAÇÃO QUALITATIVA E QUANTITATIVA DE SUBSTÂNCIAS VOLÁTEIS COM PRODUÇÃO ENDÓGENA EM SITUAÇÕES DE PUTREFAÇÃO


 INMLCF Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P. QUÍMICA E TOXICOLOGIA FORENSES	PROCEDIMENTO DE ENSAIO	PE-SQTF-C-403	
		Rev01	Pág. 1/11
ANÁLISE QUALITATIVA DE SUBSTÂNCIAS VOLÁTEIS EM SANGUE, URINA E HUMOR VÍTREO EM SITUAÇÕES DE PUTREFAÇÃO			

ÍNDICE

0. RECOMENDAÇÕES DE SEGURANÇA	3
1. OBJETIVOS	3
2. SIGLAS E DEFINIÇÕES	3
3. INTRODUÇÃO	4
4. ÂMBITO E RESPONSABILIDADES	4
5. PRINCÍPIO DO ENSAIO	5
6. REAGENTES E MATERIAIS	5
7. EQUIPAMENTOS	7
8. AMOSTRAGEM	8
9. PROCEDIMENTO	8
10. CONTROLO DE QUALIDADE INTERNO	10
11. AVALIAÇÃO, CÁLCULO E EXPRESSÃO DE RESULTADOS	10
12. CASOS ESPECIAIS	10
13. REGISTOS	10
14. REFERÊNCIAS (ordem alfabética)	11
15. ANEXOS	11

	NOME	CARGO	ASSINATURA ¹	DATA
Elaborado por	Mélanie Pinto	-	-	-
Verificado por	Carla Monteiro	ESML	-	-
Aprovado por	J. Miguel Franco	Diretor do SQTF		

¹Aplicável a documentos em suporte de papel

 QUÍMICA E TOXICOLOGIA FORENSES	PROCEDIMENTO DE ENSAIO	PE-SQTF-C-403	
		Rev01	Pág. 3/11
ANÁLISE QUALITATIVA DE SUBSTÂNCIAS VOLÁTEIS EM SANGUE, URINA E HUMOR VÍTREO EM SITUAÇÕES DE PUTREFAÇÃO			

0. RECOMENDAÇÕES DE SEGURANÇA


Antes de iniciar a execução deste procedimento de ensaio deverá ter lido as recomendações de segurança descritas no documento PG-SQTF-C-014 (Recomendações de segurança).

1. OBJETIVOS

Descrever o procedimento de deteção das seguintes substâncias: acetona, metanol, etanol, dietil-éter, *n*-propanol, isobutanol, *t*-butanol, acetaldeído, 3-metil-1-butanol, *n*-butanol, 2-butanol, metil-etil-cetona, 1-pentanol, 2-metil-1-butanol, acetato de etilo e 2-propanol em amostras de sangue, urina e humor vítreo por cromatografia gasosa com detetor de ionização de chama (FID) após injeção de headspace em equipamento HS-GC-FID (GCFI002).

2. SIGLAS E DEFINIÇÕES

Amostra de ensaio (AE)	Alíquota obtida a partir de uma AP e da qual são obtidas as tomas de ensaio;
Amostra primária (AP)	Amostra de sangue obtida in vivo ou post mortem, tal como recebida no SQTF;
Branco de reagentes	Amostra isenta da(s) substância(s) que se pretende(m) analisar;
CQI	Controlo de qualidade interno;
FID	Detetor de ionização de chama (do inglês: Flame Ionisation Detector);
GC	Cromatógrafo gasoso;
Headspace	Espaço livre no interior do <i>vial</i> que contém a amostra a analisar (do inglês);
INMLCF	Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P.;
p.a.	para análise;
PI	Padrão interno;
Sequência analítica	Conjunto de amostras analisadas contemporaneamente nas mesmas condições analíticas. Uma sequência analítica inclui as amostras de ensaio e os controlos de qualidade;
Série de amostras	Conjunto de amostras preparadas contemporaneamente de acordo com o respetivo procedimento de ensaio;
SQTF-C	Serviço de Química e Toxicologia Forenses da delegação do Centro;
Toma de ensaio (TE)	Alíquota obtida a partir de uma AE e sobre a qual se realiza o ensaio. Em alguns procedimentos pode coincidir com a AE;
TRR	Tempo de retenção relativo.

 QUÍMICA E TOXICOLOGIA FORENSES	PROCEDIMENTO DE ENSAIO	PE-SQTF-C-403	
		Rev01	Pág. 4/11
ANÁLISE QUALITATIVA DE SUBSTÂNCIAS VOLÁTEIS EM SANGUE, URINA E HUMOR VÍTREO EM SITUAÇÕES DE PUTREFAÇÃO			

3. INTRODUÇÃO

Considerada a substância psicoativa mais identificada em toxicologia post-mortem, o etanol assume um dos principais papéis no que toca a suicídio, mortes traumáticas, afogamento, acidentes fatais e crimes violentos (e.g. violações facilitadas). O facto de existir a possibilidade de produção endógena de etanol após a morte leva a que, muitas das vezes, seja necessário corroborar os resultados obtidos em diversas matrizes (e.g. urina e humor vítreo) de forma a confirmar acerca da origem do etanol detetado. Segundo a literatura, a análise de outros voláteis formados durante o processo de putrefação permite determinar se os valores obtidos para o etanol ocorreram ante ou post-mortem. No entanto, o presente método é complementar, não podendo ser utilizado como análise única.

4. ÂMBITO E RESPONSABILIDADES

Este procedimento deve ser utilizado pelo SQTF-C para quantificar a presença de substâncias voláteis em amostras de sangue, urina e humor vítreo obtidas *post-mortem*. A tabela I descreve as substâncias analisáveis e alguns dados relevantes da validação. As confirmações quantitativas podem ser efetuadas em amostras cuja concentração de etanol seja igual ou superior ao limite de deteção do método.

Tabela I. Substâncias analisadas e dados da validação para ambas as colunas (VF5MS e VF624 MS)

Substância	Código	Validação
Acetona	PP5491MK ²	GCFI002: Linearidade: 0.05 a 2 g/L; LD: 2g/L
Metanol	PP465RL ²	GCFI002: Linearidade: 0.05 a 2 g/L; LD: 7g/L
Etanol	PP542MK ²	GCFI002: Linearidade: 0.05 a 2 g/L; LD: 8g/L
Dietil-éter	PP508MK ²	GCFI002: Linearidade: 0.05 a 2 g/L; LD: 6g/L
<i>n</i> -Propanol	PP468MK ²	GCFI002: Linearidade: 0.05 a 2 g/L; LD: 7g/L
Isobutanol	PP672FK ²	GCFI002: Linearidade: 0.05 a 2 g/L; LD: 4g/L
<i>t</i> -Butanol	PP602FS ²	GCFI002: Linearidade: 0.05 a 2 g/L; LD: 5g/L
Acetaldeído	PP557MK ²	GCFI002: Linearidade: 0.05 a 2 g/L; LD: 4g/L
3-Metil-1-butanol	PP670RL ²	GCFI002: Linearidade: 0.05 a 2 g/L; LD: 4g/L
<i>n</i> -Butanol	PP562WR ²	GCFI002: Linearidade: 0.05 a 2 g/L; LD: 5g/L
2-Butanol	PP563WR ²	GCFI002: Linearidade: 0.05 a 2 g/L; LD: 3g/L
Metil-etil-cetona	PP611WR ²	GCFI002: Linearidade: 0.05 a 2 g/L; LD: 1g/L
1-Pentanol	PP671RL ²	GCFI002: Linearidade: 0.05 a 2 g/L; LD: 5g/L
2-Metil-1-butanol	PP683FK ²	GCFI002: Linearidade: 0.05 a 2 g/L; LD: 3g/L
Acetato de etilo	PP461MK ²	GCFI002: Linearidade: 0.05 a 2 g/L; LD: 2g/L
2-Propanol	PP467MK ²	GCFI002: Linearidade: 0.05 a 2 g/L; LD: 2g/L
Acetonitrilo (PI)	PP504RL ²	NA


Legenda da tabela

LD: limite de deteção; NA: não aplicável; PI: padrão interno.

² Soluções para preparação de controlos e calibradores.

MOD-CGQ-004 Rev01

A versão impressa deste documento não é controlada, exceto se possuir assinaturas originais na 1.ª página.

 QUÍMICA E TOXICOLOGIA FORENSES	PROCEDIMENTO DE ENSAIO	PE-SQTF-C-403	
		Rev01	Pág. 5/11
ANÁLISE QUALITATIVA DE SUBSTÂNCIAS VOLÁTEIS EM SANGUE, URINA E HUMOR VÍTREO EM SITUAÇÕES DE PUTREFAÇÃO			

Notas importantes:

- O método desenvolvido permite quantificar todas as substâncias voláteis em estudo.
- A quantificação é efetuada na coluna VF-5ms, tendo a coluna VF-624ms a função de validação dos resultados obtidos.
- A execução deste procedimento deve respeitar a matriz de qualificação em vigor e as responsabilidades de cada um dos cargos intervenientes, descritas no manual da qualidade ou outros documentos do sistema de gestão.

5. PRINCÍPIO DO ENSAIO

- Diluição da toma de ensaio com uma solução contendo o padrão interno;
- Passagem das substâncias voláteis para o headspace através de aquecimento;
- Injeção de um volume do vapor formado;
- Análise da amostra por GC-FID.

6. REAGENTES E MATERIAIS


Na execução deste procedimento devem ser utilizados materiais e reagentes de pureza e qualidade reconhecidas. Qualquer referência particular em relação a um determinado material ou reagente é feita junto do respetivo item. A modificação do grau de pureza de um reagente apenas pode ser feita para um grau superior ao descrito neste procedimento.

6.1. Reagentes

- 6.1.1. Água desionizada;
- 6.1.2. Acetonitrilo;
- 6.1.3. Acetona;
- 6.1.4. Metanol;
- 6.1.5. Etanol;
- 6.1.6. Dietil-éter;
- 6.1.7. *n*-Propanol;
- 6.1.8. Isobutanol;
- 6.1.9. *t*-Butanol;
- 6.1.10. Acetaldeído;
- 6.1.11. 3-Metil-1-butanol;
- 6.1.12. *n*-Butanol;
- 6.1.13. 2-Butanol;
- 6.1.14. Metil-etil-cetona;

MOD-CGQ-004 Rev01

A versão impressa deste documento não é controlada, exceto se possuir assinaturas originais na 1.ª página.

 QUÍMICA E TOXICOLOGIA FORENSES	PROCEDIMENTO DE ENSAIO		PE-SQTF-C-403	
			Rev01	Pág. 6/11
ANÁLISE QUALITATIVA DE SUBSTÂNCIAS VOLÁTEIS EM SANGUE, URINA E HUMOR VÍTREO EM SITUAÇÕES DE PUTREFAÇÃO				

- 6.1.15. 1-Pentanol;
- 6.1.16. 2-Metil-1-butanol;
- 6.1.17. Acetato de etilo;
- 6.1.18. 2-Propanol.

6.2. Material

- 6.2.1. Balões volumétricos de 5 mL;
- 6.2.3. Balões volumétricos de 50 mL;
- 6.2.4. Balões volumétricos de 1 L;
- 6.2.5. Frascos de vidro de 1 L;
- 6.2.6. Pipetas de vidro volumétrico de 10 e de 20 mL;
- 6.2.7. Micropipeta automática eletrônica de 10-300 µL;
- 6.2.8. Doseador de mão (e.g. Eppendorf Multipette Plus com *combitips* de 25 mL).
- 6.2.9. Suporte para *vials*;
- 6.2.10. Cápsulas de alumínio para *vials*;
- 6.2.11. *Vials* de 10 µL.

6.3. Preparação de soluções

6.3.1. Soluções precursoras de padrões de referência


6.3.1.1. Solução contendo 2.5g/L

Dissolva 158,2 µL de acetona, metanol e etanol, 176,2 µL de dietil éter, 156,2 µL de *n*-propanol e isobutanol, 160,2 µL de *t*-butanol e acetaldeído, 154,4µL de 3-metil-1butanol e *n*-butanol, 155,2 µL de 2-butanol, 155,6 µL de metil-etil-cetona, 152,4 µL de 1-pentanol, e 2-metil-1-butanol, 139.0 µL de acetato de etilo e 159,0 µL de 2-propanol em água desionizada, até perfazer um volume de 50mL. Homogeneíze a solução e coloque-a no ultrassons durante 10 minutos.

6.3.1.2. Repita o procedimento de forma a obter duas soluções de 2.5 g/L, uma vez que as soluções precursoras dos calibradores e controles devem ser independentes.

6.3.1.3. Solução contendo 10 g/L de acetoneitrilo

Dissolva 12,6 mL de acetoneitrilo em água desionizada até perfazer um volume de 1000 mL.

 QUÍMICA E TOXICOLOGIA FORENSES	PROCEDIMENTO DE ENSAIO	PE-SQTF-C-403	
		Rev01	Pág. 7/11
ANÁLISE QUALITATIVA DE SUBSTÂNCIAS VOLÁTEIS EM SANGUE, URINA E HUMOR VÍTREO EM SITUAÇÕES DE PUTREFAÇÃO			

6.3.3. Soluções de trabalho de padrões de referência (controles)

6.3.3.1. Solução contendo 0.1 g/L

Dissolva em água desionizada 200 µL da solução descrita em 6.3.1.2 até perfazer um volume de 5 mL. Coloque-a no ultrassons durante 10 minutos.

6.3.3.2. Solução contendo 0.8 g/L

Dissolva em água desionizada 1.6 mL da solução descrita em 6.3.1.2 até perfazer um volume de 5 mL. Coloque-a no ultrassons durante 10 minutos.

6.3.3.3. Solução contendo 1.5 g/L

Dissolva em água desionizada 3 mL da solução descrita em 6.3.1.2 até perfazer um volume de 5 mL. Coloque-a no ultrassons durante 10 minutos.

6.3.4. Soluções de trabalho de padrões de referência (solução de trabalho de PI)

Dissolva em água desionizada 10 mL da solução descrita em 6.3.1.3 até perfazer um volume de 1 L.

Notas importantes:

- As soluções precursoras de padrões de referência devem ser eliminadas após preparação das soluções secundárias subsequentes;
- Os controles de qualidade deverão ser eliminados após utilização, sendo necessária a sua elaboração diária.
- A pipeta automática eletrónica deverá ser utilizada na velocidade 8.
- Podem ser efetuadas adaptações de forma a garantir compatibilidade de utilização de equipamentos volumétricos.


7. EQUIPAMENTOS

7.1. Aparelhos de uso comum

- 7.1.1. Homogeneizador de amostras;
- 7.1.2. Hote (com filtros próprios para solventes);
- 7.1.3. Vórtex;
- 7.1.4. Ultrassons.

MOD-CGQ-004 Rev01

A versão impressa deste documento não é controlada, exceto se possuir assinaturas originais na 1.ª página.

 QUÍMICA E TOXICOLOGIA FORENSES	PROCEDIMENTO DE ENSAIO		PE-SQTF-C-403	
			Rev01	Pág. 8/11
ANÁLISE QUALITATIVA DE SUBSTÂNCIAS VOLÁTEIS EM SANGUE, URINA E HUMOR VÍTREO EM SITUAÇÕES DE PUTREFAÇÃO				

7.2. Instrumentos analíticos

7.2.1. GC-FID

Componente	Principais características
Injetor automático	Injeção de <i>headspace</i> .
GCFI002	Coluna analítica 1: VF-624 ms 30m x 0,25 mm x 1,40 µm (Varian CP 910215, ou equivalente); Coluna analítica 2: VF-5 ms 30m x 0,25 mm x 0,50 µm (Varian CP 8945, ou equivalente).
Detetor	FID

8. AMOSTRAGEM

Não aplicável.

9. PROCEDIMENTO

9.1. Homogeneização das AP

As AP devem ser homogeneizadas agitando suavemente durante pelo menos 10 minutos, até atingirem uma temperatura próxima da ambiente.

9.2. Identificação das tomas de ensaio

Durante a realização do ensaio todas as TE devem estar claramente identificadas (e.g. código interno da amostra).


9.3. Diluição das TE e adição de PI

Para *vials* de 10 mL adicione pela seguinte ordem:

- 1 mL de solução de trabalho de PI
- 0,1 mL de amostra

Nota importante:

Depois de preparadas, as TE devem ser imediatamente analisadas, sob risco de os resultados obtidos não serem viáveis no caso de esta condição não se verificar.

 QUÍMICA E TOXICOLOGIA FORENSES	PROCEDIMENTO DE ENSAIO	PE-SQTF-C-403	
		Rev01	Pág. 9/11
ANÁLISE QUALITATIVA DE SUBSTÂNCIAS VOLÁTEIS EM SANGUE, URINA E HUMOR VÍTREO EM SITUAÇÕES DE PUTREFAÇÃO			

9.5. Preparação do CQI


A análise das amostras controlo positivas serve para estabelecer os intervalos de tempo de retenção relativo (TRR) de cada uma das substâncias voláteis em análise. Assim, estas devem ser preparadas e analisadas em duplicado e em simultâneo com as amostras de rotina. Prepare seis *vials* contendo 0,1 mL da solução de trabalho de padrões primários respetiva e dois outros *vials* em que a amostra é substituída por uma porção equivalente de água desionizada (amostra branca) de acordo com a tabela III. Estas amostras devem ser analisadas em simultâneo com as amostras de rotina.

9.6. Análise das TE

As TE e CQI preparadas tal como especificado no ponto 9.3 são submetidas a uma análise de confirmação. Após preenchimento da Folha de Aceitação de Tempos de Retenção (MOD-SQTF-C-067) é realizada, para todas as amostras consideradas positivas, uma nova análise, de quantificação (ver PE-SQTF-C-404), através da medição de duas alíquota independentes da utilizada na análise de confirmação.

Tabela III. Preparação dos CQI

	Solução de trabalho de padrões de referência	Solução de PI a 0,1 g/L
Controlo positivo (0,1 g/L)	0,1 mL	1 mL
Controlo positivo (0,8 g/L)	0,1 mL	1 mL
Controlo positivo (1.5 g/L)	0,1 mL	1 mL
Controlo negativo	—	1 mL

 QUÍMICA E TOXICOLOGIA FORENSES	PROCEDIMENTO DE ENSAIO		PE-SQTF-C-403
			Rev01 Pág. 10/11
ANÁLISE QUALITATIVA DE SUBSTÂNCIAS VOLÁTEIS EM SANGUE, URINA E HUMOR VÍTREO EM SITUAÇÕES DE PUTREFAÇÃO			

9.7. Análise instrumental

Tabela IV. Principais parâmetros analíticos da análise instrumental

PARÂMETRO	DESCRIÇÃO
GCFI002	
Headspace	Temperaturas Forno: 80°C Seringa: 70°C
Modo de injeção	Seringa
Temperatura de injetor	90°C
Volume de injeção	0.5mL
Fluxo de gases	Hidrogénio: 30.0mL/min Ar: 300mL/min Azoto: 25.0 mL/min
Fluxo inicial	Hélio: 2,5 mL/min
Gradiente de temperaturas do GC	-Temperatura inicial: 40°C -Rampa de 20°C/min até aos 100°C (mantém-se durante 1 minuto) -Descida da temperatura até ao seu valor inicial (post-run)

10. CONTROLO DE QUALIDADE INTERNO

Não aplicável.

11. AVALIAÇÃO, CÁLCULO E EXPRESSÃO DE RESULTADOS


Não aplicável.

12. CASOS ESPECIAIS

Não aplicável.

13. REGISTOS

- MOD-SQTF-C-067 (Aceitação dos tempos de retenção);


 QUÍMICA E TOXICOLOGIA FORENSES	PROCEDIMENTO DE ENSAIO	PE-SQTF-C-403	
		Rev01	Pág. 11/11
ANÁLISE QUALITATIVA DE SUBSTÂNCIAS VOLÁTEIS EM SANGUE, URINA E HUMOR VÍTREO EM SITUAÇÕES DE PUTREFAÇÃO			

14. REFERÊNCIAS (ordem alfabética)

Não aplicável.

15. ANEXOS

Não aplicável.


 QUÍMICA E TOXICOLOGIA FORENSES	PROCEDIMENTO DE ENSAIO		PE-SQTF-C-404	
			Rev01	Pág. 1/11
QUANTIFICAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS VOLÁTEIS EM SANGUE, URINA E HUMOR VÍTREO EM SITUAÇÕES DE PUTREFAÇÃO				

ÍNDICE

0. RECOMENDAÇÕES DE SEGURANÇA	3
1. OBJETIVOS	3
2. SIGLAS E DEFINIÇÕES	3
3. INTRODUÇÃO	4
4. ÂMBITO E RESPONSABILIDADES	4
5. PRINCÍPIO DO ENSAIO	5
6. REAGENTES E MATERIAIS	5
7. EQUIPAMENTOS	8
8. AMOSTRAGEM	9
9. PROCEDIMENTO	9
10. CONTROLO DE QUALIDADE INTERNO	12
11. AVALIAÇÃO, CÁLCULO E EXPRESSÃO DE RESULTADOS	12
12. CASOS ESPECIAIS	12
13. REGISTOS	12
14. REFERÊNCIAS (ordem alfabética)	12
15. ANEXOS	12

	NOME	CARGO	ASSINATURA ¹	DATA
Elaborado por	Mélanie Pinto	-	-	-
Verificado por	Carla Monteiro	ESML	-	-
Aprovado por	J. Miguel Franco	Diretor do SQTF		

¹Aplicável a documentos em suporte de papel

 QUÍMICA E TOXICOLOGIA FORENSES	PROCEDIMENTO DE ENSAIO	PE-SQTF-C-404	
		Rev01	Pág. 3/11
QUANTIFICAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS VOLÁTEIS EM SANGUE, URINA E HUMOR VÍTREO EM SITUAÇÕES DE PUTREFAÇÃO			

0. RECOMENDAÇÕES DE SEGURANÇA


Antes de iniciar a execução deste procedimento de ensaio deverá ter lido as recomendações de segurança descritas no documento PG-SQTF-C-014 (Recomendações de segurança).

1. OBJETIVOS

Descrever o procedimento de quantificação das seguintes substâncias: acetona, metanol, etanol, dietil-éter, *n*-propanol, isobutanol, *t*-butanol, acetaldeído, 3-metil-1-butanol, *n*-butanol, 2-butanol, metil-etil-cetona, 1-pentanol, 2-metil-1-butanol, acetato de etilo e 2-propanol em amostras de sangue, urina e humor vítreo por cromatografia gasosa com detetor de ionização de chama (FID) após injeção de headspace em equipamento HS-GC-FID (GCFI002).

2. SIGLAS E DEFINIÇÕES

Amostra de ensaio (AE)	Alíquota obtida a partir de uma AP e da qual são obtidas as tomas de ensaio;
Amostra primária (AP)	Amostra de sangue obtida in vivo ou post mortem, tal como recebida no SQTF;
Branco de reagentes	Amostra isenta da(s) substância(s) que se pretende(m) analisar;
CQI	Controlo de qualidade interno;
FID	Detetor de ionização de chama (do inglês: Flame Ionisation Detector);
GC	Cromatógrafo gasoso;
Headspace	Espaço livre no interior do <i>vial</i> que contém a amostra a analisar (do inglês);
INMLCF	Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P.;
p.a.	para análise;
PI	Padrão interno;
Sequência analítica	Conjunto de amostras analisadas contemporaneamente nas mesmas condições analíticas. Uma sequência analítica inclui as amostras de ensaio e os controlos de qualidade;
Série de amostras	Conjunto de amostras preparadas contemporaneamente de acordo com o respetivo procedimento de ensaio;
SQTF-C	Serviço de Química e Toxicologia Forenses da delegação do Centro;
Toma de ensaio (TE)	Alíquota obtida a partir de uma AE e sobre a qual se realiza o ensaio. Em alguns procedimentos pode coincidir com a AE;
TRR	Tempo de retenção relativo.

 QUÍMICA E TOXICOLOGIA FORENSES	PROCEDIMENTO DE ENSAIO		PE-SQTF-C-404	
			Rev01	Pág. 4/11
QUANTIFICAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS VOLÁTEIS EM SANGUE, URINA E HUMOR VÍTREO EM SITUAÇÕES DE PUTREFAÇÃO				

3. INTRODUÇÃO

Considerada a substância psicoativa mais identificada em toxicologia post-mortem, o etanol assume um dos principais papéis no que toca a suicídio, mortes traumáticas, afogamento, acidentes fatais e crimes violentos (e.g. violações facilitadas). O facto de existir a possibilidade de produção endógena de etanol após a morte leva a que, muitas das vezes, seja necessário corroborar os resultados obtidos em diversas matrizes (e.g. urina e humor vítreo) de forma a confirmar acerca da origem do etanol detetado. Segundo a literatura, a análise de outros voláteis formados durante o processo de putrefação permite determinar se os valores obtidos para o etanol ocorreram ante ou post-mortem. No entanto, o presente método é complementar, não podendo ser utilizado como análise única.

4. ÂMBITO E RESPONSABILIDADES

Este procedimento deve ser utilizado pelo SQTF-C para quantificar a presença de substâncias voláteis em amostras de sangue, urina e humor vítreo obtidas *post mortem*. A tabela I descreve as substâncias analisáveis e alguns dados relevantes da validação. As confirmações quantitativas podem ser efetuadas em amostras cuja concentração de etanol seja igual ou superior ao limite de deteção do método.


Tabela I. Substâncias analisadas e dados da validação para ambas as colunas (VF5MS e VF624 MS)

Substância	Código	Validação
Acetona	PP5491MK ²	GCFI002: Linearidade: 0.05 a 2 g/L; LD: 2g/L
Metanol	PP465RL ²	GCFI002: Linearidade: 0.05 a 2 g/L; LD: 7g/L
Etanol	PP542MK ²	GCFI002: Linearidade: 0.05 a 2 g/L; LD: 8g/L
Dietil-éter	PP508MK ²	GCFI002: Linearidade: 0.05 a 2 g/L; LD: 6g/L
<i>n</i> -Propanol	PP468MK ²	GCFI002: Linearidade: 0.05 a 2 g/L; LD: 7g/L
Isobutanol	PP672FK ²	GCFI002: Linearidade: 0.05 a 2 g/L; LD: 4g/L
<i>t</i> -Butanol	PP602FS ²	GCFI002: Linearidade: 0.05 a 2 g/L; LD: 5g/L
Acetaldeído	PP557MK ²	GCFI002: Linearidade: 0.05 a 2 g/L; LD: 4g/L
3-Metil-1-butanol	PP670RL ²	GCFI002: Linearidade: 0.05 a 2 g/L; LD: 4g/L
<i>n</i> -Butanol	PP562WR ²	GCFI002: Linearidade: 0.05 a 2 g/L; LD: 5g/L
2-Butanol	PP563WR ²	GCFI002: Linearidade: 0.05 a 2 g/L; LD: 3g/L
Metil-etil-cetona	PP611WR ²	GCFI002: Linearidade: 0.05 a 2 g/L; LD: 1g/L
1-Pentanol	PP671RL ²	GCFI002: Linearidade: 0.05 a 2 g/L; LD: 5g/L
2-Metil-1-butanol	PP683FK ²	GCFI002: Linearidade: 0.05 a 2 g/L; LD: 3g/L
Acetato de etilo	PP461MK ²	GCFI002: Linearidade: 0.05 a 2 g/L; LD: 2g/L
2-Propanol	PP467MK ²	GCFI002: Linearidade: 0.05 a 2 g/L; LD: 2g/L
Acetonitrilo (PI)	PP504RL ²	NA

Legenda da tabela

LD: limite de deteção; NA: não aplicável; PI: padrão interno.

² Soluções para preparação de controlos e calibradores.

 QUÍMICA E TOXICOLOGIA FORENSES	PROCEDIMENTO DE ENSAIO	PE-SQTF-C-404	
		Rev01	Pág. 5/11
QUANTIFICAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS VOLÁTEIS EM SANGUE, URINA E HUMOR VÍTREO EM SITUAÇÕES DE PUTREFAÇÃO			

Notas importantes:

- O método desenvolvido permite quantificar todas as substâncias voláteis em estudo;
- A quantificação é efetuada na coluna VF-5ms, tendo a coluna VF-624ms a função de validação dos resultados obtidos;
- A execução deste procedimento deve respeitar a matriz de qualificação em vigor e as responsabilidades de cada um dos cargos intervenientes, descritas no manual da qualidade ou outros documentos do sistema de gestão.

5. PRINCÍPIO DO ENSAIO

- Diluição da toma de ensaio com uma solução contendo o padrão interno;
- Passagem das substâncias voláteis para o headspace através de aquecimento;
- Injeção de um volume do vapor formado;
- Análise da amostra por GC-FID.

6. REAGENTES E MATERIAIS


Na execução deste procedimento devem ser utilizados materiais e reagentes de pureza e qualidade reconhecidas. Qualquer referência particular em relação a um determinado material ou reagente é feita junto do respetivo item. A modificação do grau de pureza de um reagente apenas pode ser feita para um grau superior ao descrito neste procedimento.

6.1. Reagentes

- 6.1.1. Água desionizada;
- 6.1.2. Acetonitrilo;
- 6.1.3. Acetona;
- 6.1.4. Metanol;
- 6.1.5. Etanol;
- 6.1.6. Dietil-éter;
- 6.1.7. *n*-Propanol;
- 6.1.8. Isobutanol;
- 6.1.9. *t*-Butanol;
- 6.1.10. Acetaldeído;
- 6.1.11. 3-Metil-1-butanol;
- 6.1.12. *n*-Butanol;
- 6.1.13. 2-Butanol;
- 6.1.14. Metil-etil-cetona;

MOD-CGQ-004 Rev01

A versão impressa deste documento não é controlada, exceto se possuir assinaturas originais na 1.ª página.

 QUÍMICA E TOXICOLOGIA FORENSES	PROCEDIMENTO DE ENSAIO		PE-SQTF-C-404	
			Rev01	Pág. 6/11
QUANTIFICAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS VOLÁTEIS EM SANGUE, URINA E HUMOR VÍTREO EM SITUAÇÕES DE PUTREFAÇÃO				

- 6.1.15. 1-Pentanol;
- 6.1.16. 2-Metil-1-butanol;
- 6.1.17. Acetato de etilo;
- 6.1.18. 2-Propanol.

6.2. Material

- 6.2.1. Balões volumétricos de 5 mL;
- 6.2.3. Balões volumétricos de 50 mL;
- 6.2.4. Balões volumétricos de 1 L;
- 6.2.5. Frascos de vidro de 1 L;
- 6.2.6. Pipetas de vidro volumétrico de 10 e 20 mL;
- 6.2.7. Micropipeta automática eletrônica de 10-300 µL;
- 6.2.8. Doseador de mão (e.g. Eppendorf Multipette Plus com *combitips* de 25 mL).
- 6.2.9. Suporte para *vials*;
- 6.2.10. Cápsulas de alumínio para *vials*;
- 6.2.11. *Vials* de 10 µL.

6.3. Preparação de soluções

6.3.1. Soluções precursoras de padrões de referência


6.3.1.1. Solução contendo 2.5g/L

Dissolva 158,2 µL de acetona, metanol e etanol, 176,2 µL de dietil éter, 156,2 µL de *n*-propanol e isobutanol, 160,2 µL de *t*-butanol e acetaldeído, 154,4 µL de 3-metil-1butanol e *n*-butanol, 155,2 µL de 2-butanol, 155,6 µL de metil-etil-cetona, 152,4 µL de 1-pentanol, e 2-metil-1-butanol, 139,0 µL de acetato de etilo e 159,0 µL de 2-propanol em água desionizada, até perfazer um volume de 50mL. Homogeneíze a solução e coloque-a no ultrassons durante 10 minutos.

6.3.1.2. Repita o procedimento de forma a obter duas soluções de 2.5 g/L, uma vez que as soluções precursoras dos calibradores e controlos devem ser independentes.

6.3.1.3. Solução contendo 10 g/L de acetonitrilo

Dissolva 12,6 mL de acetonitrilo em água desionizada até perfazer um volume de 1000 mL.

 QUÍMICA E TOXICOLOGIA FORENSES	PROCEDIMENTO DE ENSAIO	PE-SQTF-C-404	
		Rev01	Pág. 7/11
QUANTIFICAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS VOLÁTEIS EM SANGUE, URINA E HUMOR VÍTREO EM SITUAÇÕES DE PUTREFAÇÃO			

6.3.2. Soluções de trabalho de padrões de referência (calibradores)

6.3.2.1. Solução contendo 0,05 g/L

Dissolva em água desionizada 100 µL da solução descrita em 6.3.1.1. até perfazer um volume de 5 mL. Coloque-a no ultrassons durante 10 minutos.

6.3.2.2. Solução contendo 0,35 g/L

Dissolva em água desionizada 700 µL da solução descrita em 6.3.1.1 até perfazer um volume de 5 mL. Coloque-a no ultrassons durante 10 minutos.

6.3.2.3. Solução contendo 0,65 g/L

Dissolva em água desionizada 1.3 mL da solução descrita em 6.3.1.1 até perfazer um volume de 5 mL. Coloque-a no ultrassons durante 10 minutos.

6.3.2.4. Solução contendo 0.95 g/L

Dissolva em água desionizada 1.9 mL da solução descrita em 6.3.1.1 até perfazer um volume de 5 mL. Coloque-a no ultrassons durante 10 minutos.

6.3.2.5. Solução contendo 1.25 g/L


Dissolva em água desionizada 2.5 mL da solução descrita em 6.3.1.1 até perfazer um volume de 5 mL. Coloque-a no ultrassons durante 10 minutos.

6.3.2.6. Solução contendo 1.7 g/L

Dissolva em água desionizada 3.4 mL da solução descrita em 6.3.1.1 até perfazer um volume de 5 mL. Coloque-a no ultrassons durante 10 minutos.

6.3.2.7. Solução contendo 2 g/L

Dissolva em água desionizada 4 mL da solução descrita em 6.3.1.1 até perfazer um volume de 5 mL. Coloque-a no ultrassons durante 10 minutos.

 QUÍMICA E TOXICOLOGIA FORENSES	PROCEDIMENTO DE ENSAIO		PE-SQTF-C-404	
			Rev01	Pág. 8/11
QUANTIFICAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS VOLÁTEIS EM SANGUE, URINA E HUMOR VÍTREO EM SITUAÇÕES DE PUTREFAÇÃO				

6.3.3. Soluções de trabalho de padrões de referência (controles)

6.3.3.1. Solução contendo 0.1 g/L

Dissolva em água desionizada 200 µL da solução descrita em 6.3.1.2 até perfazer um volume de 5 mL. Coloque-a no ultrassons durante 10 minutos.

6.3.3.2. Solução contendo 0.8 g/L

Dissolva em água desionizada 1.6 mL da solução descrita em 6.3.1.2 até perfazer um volume de 5 mL. Coloque-a no ultrassons durante 10 minutos.

6.3.3.3. Solução contendo 1.5 g/L

Dissolva em água desionizada 3 mL da solução descrita em 6.3.1.2 até perfazer um volume de 5 mL. Coloque-a no ultrassons durante 10 minutos.

6.3.4. Soluções de trabalho de padrões de referência (solução de trabalho de PI)

Dissolva em água desionizada 10 mL da solução descrita em 6.3.1.3 até perfazer um volume de 1 L.

Notas importantes:

- As soluções precursoras de padrões de referência devem ser eliminadas após preparação das soluções secundárias subsequentes;
- Os controles de qualidade deverão ser eliminados após utilização, sendo necessária a sua elaboração diária.
- A pipeta automática eletrônica deverá ser utilizada na velocidade 8.
- Podem ser efetuadas adaptações de forma a garantir compatibilidade de utilização de equipamentos volumétricos.

7. EQUIPAMENTOS

7.1. Aparelhos de uso comum

7.1.1. Homogeneizador de amostras;


7.1.2. Hote (com filtros próprios para solventes);

7.1.3. Vórtex;

7.1.4. Ultrassons.

MOD-CGQ-004 Rev01

A versão impressa deste documento não é controlada, exceto se possuir assinaturas originais na 1.ª página.

 QUÍMICA E TOXICOLOGIA FORENSES	PROCEDIMENTO DE ENSAIO		PE-SQTF-C-404	
		Rev01	Pág. 9/11	
QUANTIFICAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS VOLÁTEIS EM SANGUE, URINA E HUMOR VÍTREO EM SITUAÇÕES DE PUTREFAÇÃO				

7.2. Instrumentos analíticos

7.2.1. GC-FID

Componente	Principais características
Injetor automático	Injeção de <i>headspace</i> .
GCFI002	Coluna analítica 1: VF-624 ms 30m x 0,25 mm x 1,40 µm (Varian CP 910215, ou equivalente); Coluna analítica 2: VF-5 ms 30m x 0,25 mm x 0,50 µm (Varian CP 8945, ou equivalente).
Detetor	FID

8. AMOSTRAGEM

Não aplicável.

9. PROCEDIMENTO

9.1. Homogeneização das AP

As AP devem ser homogeneizadas agitando suavemente durante pelo menos 10 minutos, até atingirem uma temperatura próxima da ambiente.

9.2. Identificação das tomas de ensaio

Durante a realização do ensaio todas as TE devem estar claramente identificadas (e.g. código interno da amostra).


9.3. Diluição das TE e adição de PI

Para *vials* de 10 mL adicione pela seguinte ordem:

- 1 mL de solução de trabalho de PI
- 0,1 mL de amostra

Nota importante:

Depois de preparadas, as TE devem ser imediatamente analisadas, sob risco de os resultados obtidos não serem viáveis no caso de esta condição não se verificar.

 QUÍMICA E TOXICOLOGIA FORENSES	PROCEDIMENTO DE ENSAIO		PE-SQTF-C-404	
			Rev01	Pág. 10/11
QUANTIFICAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS VOLÁTEIS EM SANGUE, URINA E HUMOR VÍTREO EM SITUAÇÕES DE PUTREFAÇÃO				

9.4. Preparação da curva de calibração

A curva de calibração permite calcular a concentração das substâncias voláteis presentes nas amostras. Os calibradores são preparados tal como descritos no ponto 9.3, substituindo o volume de amostra por um volume igual da respetiva solução de trabalho (6.3.2) de acordo com a tabela II.

Tabela II. Preparação da curva de calibração


	Solução de trabalho de padrões de referência	Solução de PI a 0,1 g/L
Calibrador 1 (0.05 g/L)	0,1 mL	1 mL
Calibrador 2 (0.35 g/L)	0,1 mL	1 mL
Calibrador 3 (0.65 g/L)	0,1 mL	1 mL
Calibrador 4 (0.95 g/L)	0,1 mL	1 mL
Calibrador 5 (1.250 g/L)	0,1 mL	1 mL
Calibrador 6 (1.7 g/L)	0,1 mL	1 mL
Calibrador 7 (2 g/L)	0,1 mL	1 mL

Notas importantes:

- As curvas de calibração são construídas e memorizadas com recurso ao software fornecido pelos fabricantes dos equipamentos analíticos;
- Sempre que ocorra uma nova preparação de solução de trabalho de padrão interno deve ser construída uma nova curva de calibração;
- A verificação da curva de calibração pode ser feita através da análise do declive da reta e da utilização da carta de controlo, na qual os valores obtidos não devem ultrapassar os 10%.

9.5. Preparação do CQI

A análise das amostras controlo positivas serve para estabelecer os intervalos de tempo de retenção relativo (TRR) de cada uma das substâncias voláteis em análise. Assim, estas devem ser preparadas e analisadas em duplicado e em simultâneo com as amostras de rotina. Prepare seis *vials* contendo 0,1 mL da solução de trabalho de padrões primários respetiva e dois outros *vials* em que a amostra é substituída por uma porção equivalente de água desionizada (amostra branca) de acordo com a tabela III. Estas amostras devem ser analisadas em simultâneo com as amostras de rotina.

 QUÍMICA E TOXICOLOGIA FORENSES	PROCEDIMENTO DE ENSAIO	PE-SQTF-C-404	
		Rev01	Pág. 11/11
QUANTIFICAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS VOLÁTEIS EM SANGUE, URINA E HUMOR VÍTREO EM SITUAÇÕES DE PUTREFAÇÃO			

9.6. Análise das TE

Após preenchimento da Folha de Aceitação de Tempos de Retenção (MOD-SQTF-C-067) é realizada, para todas as amostras consideradas positivas, uma análise, de quantificação, através da medição de duas alíquotas independentes da utilizada na análise de confirmação. No final deste processo e anteriormente ao lançamento dos resultados, é preenchida a Folha de Aceitação dos Resultados (MOD-CGQ-013).


Tabela III. Preparação dos CQI

	Solução de trabalho de padrões de referência	Solução de PI a 0,1 g/L
Controlo positivo (0,1 g/L)	0,1 mL	1 mL
Controlo positivo (0,8 g/L)	0,1 mL	1 mL
Controlo positivo (1.5 g/L)	0,1 mL	1 mL
Controlo negativo	—	1 mL

9.7. Análise instrumental

Tabela IV. Principais parâmetros analíticos da análise instrumental

PARÂMETRO	DESCRIÇÃO
GCFI002	
Headspace	Temperaturas Forno: 80°C Seringa: 70°C
Modo de injeção	Seringa
Temperatura de injetor	90°C
Volume de injeção	0.5mL
Fluxo de gases	Hidrogénio: 30.0mL/min Ar: 300mL/min Azoto: 25.0 mL/min
Fluxo inicial	Hélio: 2,5 mL/min
Gradiente de temperaturas do GC	- Temperatura inicial: 40°C - Rampa de 20°C/min até aos 100°C (mantém-se durante 1 minuto) - Descida da temperatura até ao seu valor inicial (post-run)

 QUÍMICA E TOXICOLOGIA FORENSES	PROCEDIMENTO DE ENSAIO		PE-SQTF-C-404
			Rev01 Pág. 12/11
QUANTIFICAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS VOLÁTEIS EM SANGUE, URINA E HUMOR VÍTREO EM SITUAÇÕES DE PUTREFAÇÃO			

10. CONTROLO DE QUALIDADE INTERNO

Não aplicável.

11. AVALIAÇÃO, CÁLCULO E EXPRESSÃO DE RESULTADOS

Não aplicável.

12. CASOS ESPECIAIS

Não aplicável.

13. REGISTOS

- MOD-SQTF-C-067 (Aceitação dos tempos de retenção);
- MOD-SQTF-CGQ-013 (Aceitação dos resultados de etanol).

14. REFERÊNCIAS (ordem alfabética)

Não aplicável.

15. ANEXOS

Não aplicável.