



Euclides Viriato Gomes Landim

# VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO ANALÍTICO PARA A DETERMINAÇÃO DE ETANOL EM HUMOR VÍTREO EM ÂMBITO FORENSE

Mestrado em Química Forense

Departamento de Química

FCTUC

JULHO DE 2013



UNIVERSIDADE DE COIMBRA



Euclides Viriato Gomes Landim

**VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO  
ANALÍTICO PARA A DETERMINAÇÃO DO  
ETANOL EM HUMOR VÍTREO EM  
ÂMBITO FORENSE**

Dissertação apresentada para provas de Mestrado em Química Forense

Orientadores:

Mestre João Miguel Gouveia Franco  
Mestre Carla Maria Pinto Monteiro

Co-orientadora:

Professora Doutora Maria Ermelinda da Silva Eusébio

JULHO DE 2013

Universidade de Coimbra



A minha família pela dedicação, carinho e respeito, mesmo distante apoiaram e deram forças para continuar.

**DEDICO**



## **Agradecimentos**

É com muita satisfação que estou a expressar os meus profundos agradecimentos, a todos aqueles que de forma direta ou indireta, contribuíram para a realização deste mestrado.

Ao senhor professor Doutor Francisco Corte Real por ter dado oportunidade de realizar este mestrado num serviço com capacidades técnicas e científicas que permitiram a realização da minha formação e deste trabalho.

Ao Mestre João Miguel Franco que sempre acreditou na minha vontade em aprender, mas também por ter aceitado orientar este trabalho.

À Mestra Carla Monteiro que desde o início trabalhou na realização deste trabalho de forma incansável, dando todo o apoio necessário, mas também pela orientação deste trabalho.

À Professora Doutora Maria Ermelinda Eusébio pelos conhecimentos transmitidos como professora e por se disponibilizar em co-orientar este trabalho.

Aos funcionários do Serviço de Química e Toxicologia Forense do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P. de Coimbra, que sempre mostraram disponível em colaborar, partilhando o conhecimento e a experiência.

À Bacharel Alda Claro que sempre se disponibilizou para ajudar na parte prática deste trabalho.

À Dra. Cristina Cordeiro pela disponibilidade em me ceder as amostras de humor vítreo utilizadas na realização deste estudo.

Ao fundo solidário do Instituto Universitário Justiça e Paz e ao Fundo de Apoio Social da Universidade de Coimbra pelo apoio financeiro.

Aos professores do Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra que colaboraram para tornar o meu conhecimento mais amplo na área da Química.

Aos meus amigos que me apoiaram prontamente dando apoio moral para concretizar este mestrado.

E por fim, mas não menos importante agradeço aos colegas do Mestrado que mostraram disponível em ajudar, partilhando os conhecimentos, em especial a colega Tânia Firmino que sempre disponibilizou em ajudar.



## Índice geral

Agradecimentos.....	I
Índice geral.....	III
Índice de tabelas.....	VII
Índice de gráficos.....	IX
Índice de Figuras.....	XI
Lista de abreviaturas.....	XIII
Resumo.....	XV
Abstract.....	XVII
Capítulo I-Introdução.....	1
1.1 Justificação do tema.....	1
1.2 Objetivos.....	3
Capítulo II- Revisão da bibliografia.....	5
2.1 Substância em análise-Etanol.....	5
2.2 Humor vítreo como amostra forense.....	9
2.3 Cromatografia de gás com detetor de ionização de chama e sistema de injeção de <i>headspace</i> (HS-GC/FID).....	10
2.3.1 Cromatografia de gás (GC).....	10
2.3.2 Detetor de ionização de chama-FID.....	11
2.3.3 Modo de injeção por <i>headspace</i> .....	12
2.4 Validação do método analítico.....	12
2.4.1 Parâmetros de validação.....	13
2.4.1.1 Especificidade e seletividade.....	13
2.4.1.2 Modelo de calibração.....	14
2.4.1.3 Linearidade.....	14
2.4.1.4 Gama de trabalho.....	15
2.4.1.5 Precisão.....	15
2.4.1.6 Robustez.....	16
2.4.1.7 Limites de deteção e de quantificação.....	16

2.4.1.8 Estabilidade .....	17
2.4.1.9 Arrastamento ( <i>carryover</i> ).....	18
2.4.1.10 Exatidão.....	18
Capitulo III- Trabalho experimental .....	19
3.1 Material e métodos .....	19
3.1.1 Amostras biológicas .....	19
3.1.2 Padrões .....	19
3.1.3 Instrumentação analítica.....	19
3.1.4 Descrição dos métodos.....	21
3.1.5.1 Preparação de calibradores e padrão interno.....	22
3.1.5.2 Procedimento Operacional .....	23
3.2 Resultados e discussão .....	25
3.2.1 Identificação das substâncias .....	25
3.2.2 Validação de método.....	26
3.2.2.1 Especificidade e seletividade .....	26
3.2.2.2 Linearidade.....	29
3.2.2.2 Limites de deteção e quantificação .....	31
3.2.2.4 Repetibilidade.....	33
3.2.2.5 Precisão intermédia .....	34
3.2.2.6 Exatidão.....	36
3.2.2.7 Avaliação do fenómeno de arrastamento ( <i>Carryover</i> ).....	37
3.2.2.8 Teste aos limiares analíticos.....	37
3.2.2.9 Estabilidade .....	38
3.3 Aplicação do método analítico a amostras de humor vítreo em casos reais. ....	41
3.4 Comparação dos resultados da aplicação do método a amostras de HV (GCFI001 e GCFI002) .....	42
Capitulo IV- Conclusão.....	45
Referências bibliográficas .....	47
Anexos.....	51
Anexo -I.....	53

Anexo-II .....	57
Anexo-III .....	61
Anexo-IV .....	63
Anexo-V .....	87
Anexo VI .....	91
Anexo VII.....	93
Anexo VIII.....	99
Anexo IX .....	101



## Índice de tabelas

Tabela I Concentração de etanol em alguns tipos de bebidas, Adaptado de LOGAN, 2013.5	
Tabela II Efeitos psicológicos e comportamentais resultantes do aumento da concentração de álcool no sangue, Adaptado de HOFFMANN et al.; 1996.....	7
Tabela III- Algumas característica dos sistemas cromatográficos utilizados.....	20
Tabela IV-Preparação da curva de calibração .....	21
Tabela V-Preparação da curva de calibração .....	23
Tabela VI. Preparação de amostras de controlo .....	24
Tabela VII. Tempos de retenção de etanol e do padrão interno, nos diferentes sistemas cromatográfico.....	25
Tabela VIII- Informação das amostras de HV usadas na preparação de <i>pools</i> .....	26
Tabela IX- Preparação de pools para o teste de especificidade/seletividade .....	28
Tabela X- Resultados obtidos no estudo da especificidade/seletividade .....	28
Tabela XI- Resultados obtidos no estudo da especificidade/seletividade.....	29
Tabela XII- Calibradores para o teste de linearidade .....	30
Tabela XIII-Resultados do teste de linearidade nos dois equipamentos (GCFI001/GCFI002) .....	31
Tabela XIV-Calibradores para o estudo dos limites de detecção e de quantificação.....	32
Tabela XV-Resultados dos limites obtidos nos dois equipamentos .....	33
Tabela XVI- Resultados obtidos nos dois equipamentos (controlo a 0.49 g/L e 1.19 g/L), no estudo de repetibilidade .....	34

Tabela XVII- Valores de coeficiente de variação obtidas no estudo de precisão intermédia .....	35
Tabela XVIII- Resumo dos resultados de %CV e de recuperação média no teste de exatidão .....	36
Tabela XIX- Resultados obtidos no estudo dos limerares analíticos de quantificação (gama baixa 0.1 g/L) .....	37
Tabela XX- Resultados obtidos no estudo dos limerares analíticos de quantificação (gama média/alta 5.01 g/L) .....	38
Tabela XXI- Dados estatísticos (FID1 A/FID1 A), estudo da estabilidade .....	39
Tabela XXII- Dados estatísticos (FID2 B/FID2 B), estudo da estabilidade .....	39
Tabela XXIII Dados estatísticos ( <i>Front/Front</i> ), estudo da estabilidade .....	40
Tabela XXIV Dados estatísticos ( <i>Middle/Middle</i> ), estudo da estabilidade .....	40
Tabela XXV- Concentração do etanol em amostras reais de HV .....	42
Tabela XXVI- Dados estatísticos ( <i>Varian 450</i> ) .....	43
Tabela XXVII- Dados estatísticos (Agilent 6890N) .....	43
Tabela XXVIII-Dados estatísticos (Agilent6890N/ Varian 450).....	44

## Índice de gráficos

Gráficos 1- Comparação das colunas FID1 A/ FID1 A, estudo de estabilidade .....	39
Gráficos 2 Comparação das colunas FID2 B/ FID2 B, estudo da estabilidade .....	39
Gráficos 3- Comparação das colunas <i>Front/ Front</i> , estudo da estabilidade.....	40
Gráficos 4 Comparação das colunas <i>Middle/ Middle</i> , estudo da estabilidade .....	40
Gráficos 5- Comparação das colunas <i>Middle/ front</i> .....	43
Gráficos 6- Comparação das colunas FID1 A/FID2 B.....	43
Gráficos 7- Comparação da coluna FID1 A/ <i>Middle</i> .....	44





## Índice de Figuras

Figura 1- Esquema da biotransformação do etanol. ....	8
Figura 2- Recolha de amostra de HV, Adaptado de OLIVEIRA DINIS et al.,2010.....	9
Figura 3- Esquema de um cromatógrafo de gás, Adaptado de Dawling, 2011. ....	11
Figura 4- Corte transversal de um detetor FID, adaptado de DAWLING, 2008. ....	11
Figura 5-Análise de etanol em modo de injeção por <i>headspace</i> , Adaptado de TIAFT, 2013. .....	12
Figura 6- Equipamento GC de marca <i>Agilent</i> 6890N.....	20
Figura 7- Equipamento GC de marca <i>Varian</i> 450.....	20
Figura 9. Cromatograma obtidas para a solução de controlo 1.19 g/L no sistema GCFI002 .....	25
Figura 10. Cromatograma obtidas para a solução de controlo 1.19 g/L no sistema GCFI001 .....	25



### Lista de abreviaturas

ADH	Álcool desidrogenase
AE	Amostra de ensaio
ALDH	Aldeído desidrogenase
AP	Amostra primária
ATP	Adenosina trifosfato
CQI	Controlo de qualidade interna
CV	Coefficiente de variação
DPR	Desvio padrão relativo
e.g.	<i>exemple gratia</i> , por exemplo
et al.	<i>et alii</i> , e outros
FID	Detetor de ionização de chama
GC	Cromatografia de gás
HV	Humor vítreo
ICH	do inglês <i>International Conference on Harmonisation</i>
IEC	do inglês <i>International Electrotechnical Commission</i>
INMLCF	Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P.
ISO	do inglês <i>International Organization for Standardization</i>
LD	Limite de deteção
LQ	Limite de quantificação
MEOS	Sistema microssomal de oxidação do etanol
P.O	Procedimento operacional

PI	Padrão Interno
Rpm	Rotações por minutos
SNC	Sistema nervoso central
SQTF	Serviço de Química e Toxicologia Forenses da delegação do Centro do INMLCF
TE	Toma de ensaio
TRR	Tempo de retenção relativo

## Resumo

O etanol ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ ) é uma substância consumida desde tempos remotos, que pode ser obtido pela fermentação de açúcar existente em produtos de origem vegetal tais como frutos, caules e raízes. A sua vasta utilização em bebidas alcoólicas, na indústria farmacêutica, na produção de perfumes e/ou como solvente químico, torna-o uma das substâncias atualmente mais utilizadas.

Embora considerada uma substância psicotrópica pela sua atuação ao nível do sistema nervoso central (SNC), a sua comercialização é permitida e o seu consumo quase que incentivado. Uma elevada taxa de álcool no sangue, quando associada a atividades como a condução, aumenta significativamente o risco de ocorrência de acidentes graves. Por essa razão, a sua deteção e quantificação no sangue é muito importante em âmbito forense e corresponde, por esse motivo, a uma percentagem muito significativa do total das análises requisitadas ao Serviço de Química e Toxicologia Forenses (SQTF) do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P. (INMLCF). A tolerância, do ponto de vista social, relativamente ao seu consumo, resulta também numa maior contestação por parte dos indivíduos envolvidos em situações de condução sob o efeito do álcool. Apesar de ser preferível que a deteção e quantificação do etanol seja feita em sangue, existem casos em que não se dispõe deste tipo de amostra para análise (e.g. cadáver em elevado estado de decomposição). O humor vítreo surge como uma matriz alternativa, devido às suas características e localização anatómica.

O objetivo deste trabalho foi o de validar um método analítico para deteção e quantificação do etanol em amostras de humor vítreo. Estes ensaios são efectuados no SQTF com recurso a HS-GC/FID, usando uma solução aquosa de *n*-propanol (100 mg/L) como padrão interno. Este método, amplamente utilizado em toxicologia forense, permite cumprir os requisitos e critérios definidos para este tipo de análises. A separação cromatográfica foi realizada utilizando duas colunas capilares com fases estacionárias de diferentes polaridades, a fim de garantir o cumprimento dos critérios de identificação recomendados para este tipo de análise. O método traduziu-se numa boa separação cromatográfica em ambos os sistemas GC/FID utilizados neste trabalho com o etanol e o padrão interno a eluírem entre os 5 e os 6 min, respetivamente.

O processo de validação consistiu na avaliação objetiva de cada um dos parâmetros estabelecidos no procedimento de validação de métodos quantitativos em vigor no SQTf da Delegação do Centro do INMLCF.

Após a validação, este método foi aplicado a amostras reais de humor vítreo que foram selecionadas entre os processos enviados ao SQTf para a realização de análises de rotina. Embora os dois equipamentos utilizados possuam diferentes modos de injeção, os resultados obtidos foram concordantes, o que permitiu também obter ilações positivas sobre a robustez do ensaio.

Palavras-chaves: Validação de métodos, Toxicologia Forense, Etanol, Humor vítreo, Cromatografia gás.

## **Abstract**

Ethanol ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ ) is a substance that is consumed since ancient times. It is obtained by fermentation of sugar existing in vegetable products such as fruits, stems and roots. Its widespread use in alcoholic beverages, pharmaceutical industries, in the production of perfumes and / or as chemical solvents, explains why it is one of the substances most used by mankind.

Although considered a psychotropic substance acting mainly in the central nervous system, their marketing is permitted and consumption almost encouraged. The high level of alcohol in the blood, when associated to activities such as driving, triggers serious problems. Therefore, their detection and quantification in blood is very important in forensics and corresponds not only to the most significant proportion of the analyzes required to the Service of Chemistry and Forensic Toxicology of the National Institute of Legal Medicine and Forensic Sciences, but also with greater appeal by individuals involved. Although being preferable that the detection and quantitation of ethanol is performed in blood, there are cases where this type of sample is not available for analysis (eg high decomposition of the body), so the vitreous humor appears as an alternative due to their characteristics and anatomical location.

The aim of this study was the validation of an analytical method for detection and quantification of ethanol in samples of vitreous humor. The determination of ethanol in samples of vitreous humor is made in the Service of Chemistry and Forensic Toxicology using HS-GC/FID, as gas chromatography is a widely used technique in the field of chemistry and forensic toxicology, responding to almost all the class of toxicologically relevant compounds. Prior to chromatographic analysis, all samples, including the calibrators, were diluted. For this purpose, 100  $\mu\text{L}$  of vitreous humor were diluted in 1 ml of n-propanol aqueous solution (100 mg/L), used as internal standard. The chromatographic separation was performed using two capillary columns with different polarities in order to ensure compliance with the identification criteria recommended for this type of analysis. The method provides good separation on both chromatographic equipments. The tested substance and the internal standard were eluted in a time interval of 5 min for the GCFI001 and 6 min for the GCFI002.

The validation process included the evaluation of each of the parameters established for the validation procedure of quantitative methods adopted in the Service of Chemistry and Forensic Toxicology of the National Institute of Legal Medicine and Forensic Sciences – Centre Branch. After validation of the method, it was applied to real samples of vitreous humor selected among the routine analyses from the Service of Chemistry and Forensic Toxicology. Although the two devices have different modes of injection, the results were consistent, which proves that the method provides reliable results and that the requirements for the specific intended use or application have been met.

Keywords: Method validation, Forensic Toxicology, Ethanol, Vitreous humor, Gas Chromatography.



## Capítulo I-Introdução

### 1.1 Justificação do tema

O etanol,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ , é uma substância produzida a partir da fermentação de cereais, raiz, caule e frutos. Muito frequentemente designada apenas por álcool, é o membro desta família química que se encontra em concentração relativamente elevada nas bebidas alcoólicas. É, também muito utilizado na indústria farmacêutica, na produção de perfumes e como solvente químico.

O consumo do álcool ocorre por via oral. Apesar de ser uma substância lícita, o álcool, quando consumido de forma excessiva passa a constituir um problema. Além dos acidentes de viação, acidentes de trabalho e da violência associada a embriaguez, o consumo do álcool a longo prazo, dependendo das doses, frequência e circunstâncias, pode provocar dependência. É considerada uma substância psicotrópica por atuar no SNC, provocando mudança no comportamento de quem o consome.

A elevada taxa do etanol no sangue, quando associado a atividades como, por exemplo, a condução, pode levar a consequências graves. Por este motivo o doseamento de álcool no sangue corresponde não só à percentagem mais significativa das análises requisitadas ao serviço de Química e Toxicologia Forense do INMLCF, IP, mas também a que resulta em maior contestação por parte dos indivíduos envolvidos nesse mesmo processo. Estas análises são efetuadas no serviço de Química e Toxicologia Forense das delegações do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, IP, tanto em cadáveres como em indivíduos vivos intervenientes em acidentes de viação ou intercetados pelas autoridades policiais no ato da condução, o que explica o elevado volume de análises efetuadas neste serviço.

Sempre que possível, a determinação e quantificação do álcool é feita em amostras de sangue. Contudo, a sua determinação noutras matrizes biológicas pode revelar-se bastante importante. Isto pode acontecer nos casos em que a amostra de sangue disponível se revela insuficiente ou esteja num estado considerado inadequado (e.g. putrefação, contaminação por outros fluidos biológicos como o conteúdo gástrico). Dentro das amostras consideradas alternativas o humor vítreo surge como uma das mais interessantes. O humor vítreo é um fluido que se encontra na cavidade posterior do olho, preenchendo o espaço entre o

cristalino e a retina, sendo formado por uma matriz simples e estável. Por estar alojado em local anatomicamente isolado e protegido, e por isso menos sujeito a contaminação, a pesquisa de álcool nesta matriz pode revelar-se fundamental para a interpretação de resultados em que exista a suspeita de ter ocorrido contaminação ou síntese endógena de álcool devido a fenômenos de putrefação.

É por estes motivos que sendo o humor vítreo utilizado como uma das matrizes alternativas na área da toxicologia forense, decidimos validar o método utilizado para a análise de confirmação e quantificação de etanol em amostras de humor vítreo, de forma a garantir uma maior fiabilidade nos resultados apresentados por este serviço.

A forma mais usual para a determinação de etanol e compostos relacionados em fluidos biológicos recorre à cromatografia de gás com amostragem por *headspace* associada a detetores de ionização em chama. Uma vez que o Serviço de QTF dispõe, de dois cromatógrafos de gás com amostragem por *headspace* associados a detetores de ionização em chama utilizados em trabalho de rotina para a quantificação de etanol em sangue, decidimos efetuar a validação do método cromatográfico em cada um dos equipamentos.

## 1.2 Objetivos

A análise e a interpretação dos resultados da taxa de etanol em âmbito forense, nas diferentes matrizes usualmente analisadas, têm sido alvo de polêmica, principalmente quando se suspeita da ocorrência de contaminação ou de síntese endógena de álcool devido a fenômenos de putrefação. Uma vez que o humor vítreo é menos suscetível a esses fenômenos devido a sua localização anatômica, tornou-se pertinente validar um método analítico destinado a permitir conhecer com graus adequados de precisão e exatidão, a concentração de etanol neste tipo de amostras, utilizando-se como referência o procedimento de validação em vigor no SQTf.

Assim, constituiu objetivo específico deste trabalho a validação de um método utilizado para determinação de etanol em amostras de humor vítreo em dois sistemas GC/FID disponíveis no SQTf, equipados com injetores de *headspace*.

Após a validação procedeu-se à sua aplicação em amostras reais de humor vítreo rececionadas no SQTf e destinadas a realização de análises toxicológicas forenses. As análises foram efetuadas em paralelo em ambos os equipamentos de forma a comparar os resultados obtidos e a robustez dos ensaios.



## Capítulo II- Revisão da bibliografia

### 2.1 Substância em análise-Etanol

O etanol também denominado de álcool etílico é, à temperatura ambiente, um líquido incolor e com odor característico. É produzido a partir do açúcar existente em produtos de origem vegetal tais como frutos, caules e raízes. A matéria-prima é submetida a fermentação alcoólica, a qual envolve a atuação de micro-organismos. A emergência do consumo de álcool em todas as civilizações, apesar de algumas religiões, como o Islão, a terem restringido ou proibido, parece ser remotamente uma consequência da revolução neolítica e mais recentemente, da produção massiva de matérias-primas, bem como do avanço das novas tecnologias de fermentação.

A concentração de álcool em cada tipo de bebida depende do grau de fermentação, da percentagem de aditivos, entre outros fatores. Na tabela I são apresentadas as concentrações médias de etanol em alguns tipos de bebidas.

Tabela I Concentração de etanol em alguns tipos de bebidas, Adaptado de LOGAN, 2013.

Bebida	Concentração alcoólica (% V/V)
Cerveja	5
Vinhos de mesa (tinto, branco)	11
Vinhos fortificados (porto, vermute)	18
Bebidas destiladas (uísque, vodca, rum)	40-65

Para além de se encontrar presente em bebidas alcoólicas, o etanol é também utilizado como combustível, desinfetante doméstico e solvente orgânico, com uma vasta utilização nas indústrias de perfumaria e farmacêutica. Na medicina é utilizado no extermínio de vida microbiana nociva e, em algumas situações, para atenuar os efeitos tóxicos resultantes da ingestão de metanol. Este mecanismo de proteção deve-se à capacidade do álcool etílico para inibir a oxidação metabólica do metanol. No entanto, o seu maior impacto na sociedade encontra-se, de facto, associado ao consumo de bebidas alcoólicas.

O álcool é ingerido essencialmente por via oral. No entanto, sendo uma substância volátil, pode também ser absorvido por inalação. Poucos minutos após ingestão, o álcool passa

para a corrente sanguínea onde, dependendo naturalmente da quantidade ingerida, pode manter-se durante horas, exercendo uma ação significativa sobre o SNC. A longo prazo, tratando-se de uma utilização crônica e exagerada, o álcool atua provocando alterações significativas em diversos outros órgãos vitais como o fígado (e.g. hepatopatia, cirrose), coração (e.g. alterações cardíacas como a miocardite), estômago (e.g. gastrite, úlceras), intestino (e.g. transtornos na absorção de vitaminas ou outros nutrientes) ou sangue (e.g. anemia, diminuição das defesas imunitárias) (MELONI, 2004).

Quando ingerido em pequenas doses o álcool pode desencadear sensações de desinibição e euforia. Contudo, à medida que a sua concentração no sangue aumenta, o indivíduo passa a apresentar uma diminuição da resposta aos estímulos que se traduz no surgimento de sonolência, turvação da visão, descoordenação muscular, diminuição da capacidade de reação e de manter a atenção e compreensão. A ingestão de uma elevada quantidade de álcool num curto intervalo de tempo pode mesmo conduzir ao coma e à morte do indivíduo por depressão do SNC. De uma forma resumida, apresentam-se na tabela II os efeitos psicológicos e comportamentais num indivíduo à medida que a concentração do etanol no sangue vai aumentando no organismo. É no entanto de referir que as alterações no comportamento do indivíduo dependem do sexo, da velocidade de absorção e do grau de tolerância desenvolvida (MUMENTHALER, 1999).

**Tabela II Efeitos psicológicos e comportamentais resultantes do aumento da concentração de álcool no sangue, Adaptado de HOFFMANN et al.; 1996.**

<b>Concentração (g/L)</b>	<b>Estágio</b>	<b>Sintomas</b>
0.1 a 0.6	Sobriedade	Nenhuma influência aparente
0.3 a 1.2	Euforia	Perda de eficiência, diminuição da atenção, julgamento e controlo
0.9 a 2.5	Excitação	Instabilidade das emoções, descoordenação muscular, menor inibição, perda de julgamento crítico
1.8 a 3.0	Confusão	Vertigens, desequilíbrio, dificuldade na fala e distúrbios sensoriais
2.7 a 4.0	Estupor	Apatia e inércia geral, vômitos, incontinência urinária e fecal
3.5 a 5.0	Coma	Inconsciência, anestesia
> 5	Morte	Paragem respiratória

Alguns dos efeitos atrás mencionados são responsáveis pela ação negativa que o álcool tem na capacidade para a condução e conseqüente ocorrência de acidentes de viação. Mas os problemas relacionados com o consumo de álcool não se prendem apenas com este tipo de situações. Podem surgir, também, associados a suicídios ou crimes, como por exemplo homicídios e violência familiar. Constitui também preocupação o consumo de álcool, bem como de outras drogas de abuso, no local de trabalho.

Como outras substâncias, o etanol, ao ser ingerido sofre um conjunto de transformações ao longo das fases de absorção, distribuição, metabolismo e eliminação.

A fração que é absorvida pelo estômago e pela parede do intestino delgado passa para a corrente sanguínea sem sofrer qualquer transformação química. O álcool atinge todos os tecidos do corpo e afeta a maioria das funções vitais, pois é uma pequena molécula solúvel em água e em lípidos. Uma vez no sangue, o álcool é transportado até aos diversos órgãos, incluindo o fígado. O fígado é o órgão mais severamente afetado pelo alcoolismo (LIBER, 1997), pois é neste órgão que se encontra a maioria das enzimas metabolizadoras.

A metabolização do álcool ocorre praticamente toda a nível hepático. O hepatócito tem três principais vias para o metabolismo do etanol, cada uma localizada num compartimento subcelular diferente. A via principal envolve a ADH que se localiza no citosol; uma segunda via é o sistema microsossómico de oxidação do etanol MEOS que se localiza no retículo endoplasmático; e finalmente o mecanismo envolvendo a catalase que ocorre nos peroxissomas. Todas estas vias resultam na produção de acetaldeído, um metabolito altamente tóxico (Figura 1) (LIEBER, 1997). O acetaldeído formado é oxidado pela ALDH a acetato, o qual é então convertido a acetil-CoA pela acetato-CoA ligase numa reação dependente de ATP.

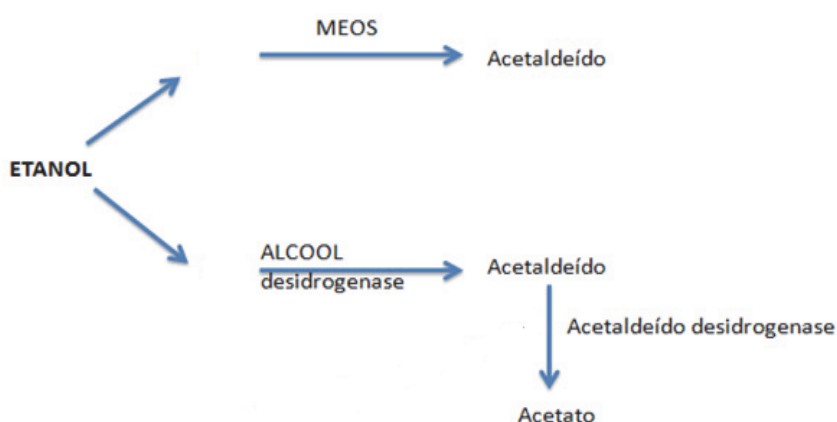


Figura 1- Esquema da biotransformação do etanol.

A eliminação do álcool ocorre principalmente através do metabolismo e apenas uma pequena parte do álcool absorvido é excretado de forma inalterada na respiração (0.7%), no suor (0.1%) e na urina (0.3%) (HOLFORD, 1987).

O etanol foi determinado pela primeira vez em urina há mais de um século utilizando dicromato de potássio o qual em meio ácido, oxida o etanol a ácido acético, que de seguida era quantificado por métodos volumétricos. O maior avanço prático ocorreu em 1922, quando Widmark descreveu o seu método de micro-difusão (JONES, 2013).

Desde então diferentes métodos têm sido associados a diferentes tipos de técnicas, como por exemplo técnicas espectrofotométricas ou cromatográficas (TISCIONE, 2011).



## 2.2 Humor vítreo como amostra forense

O humor vítreo é um líquido incolor viscoso, que se encontra na cavidade do olho entre a córnea e o cristalino sendo facilmente obtido sem a necessidade de se proceder a uma autópsia. A recolha desta matriz faz-se por aspiração direta do olho usando uma seringa de 5 a 10mL e uma agulha de calibre 20. A agulha é inserida através do canto externo do olho até que a sua extremidade atinja a parte central do globo ocular. (Figura 2) Com a técnica adequada cerca de 2 a 3ml podem ser removidos em cada olho de um adulto, enquanto até cerca de 1ml de amostra pode ser recolhido num recém-nascido (COE, 1993).

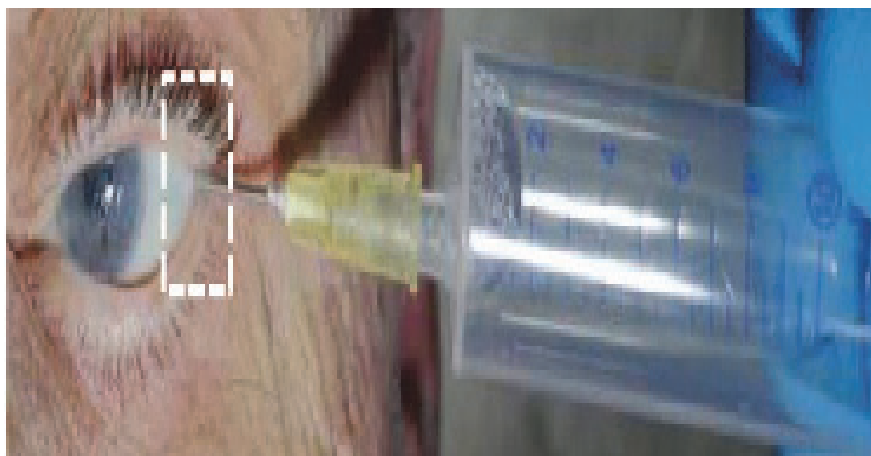


Figura 2- Recolha de amostra de HV, Adaptado de OLIVEIRA DINIS et al.,2010.

A pesquisa de etanol e de outros compostos voláteis em casos forenses é realizada preferencialmente em amostras de sangue e/ou urina. Quando são obtidas em cadáveres em situações de morte traumática e/ou quando os corpos se encontram em estado de decomposição, o humor vítreo pode constituir a única matriz disponível para a análise toxicológica do álcool. A localização anatómica faz do humor vítreo uma amostra alternativa para a confirmação *postmortem* do consumo de etanol, pois é menos suscetível a contaminação por fenómenos de difusão, sendo também menos provável, nesta matriz, a ocorrência de contaminação externa, com o desenvolvimento de flora microbiana e possibilidade de síntese endógena de álcool. (JONES, 2008).

## **2.3 Cromatografia de gás com detetor de ionização de chama e sistema de injeção de *headspace* (HS-GC/FID).**

### **2.3.1 Cromatografia de gás (GC)**

A parte experimental deste trabalho fez-se com recurso a cromatografia de gás (GC). GC é uma técnica de separação amplamente utilizado em toxicologia forense, na indústria farmacêutica e em química industrial, aplicável a analitos termicamente estáveis e suficientemente voláteis até uma temperatura máxima de cerca de 400°C.

Em cromatografia de gás, os componentes de uma mistura são separadas por distribuição seletiva entre uma fase estacionária contida na coluna cromatográfica e uma fase móvel, que é um gás inerte tal como o hélio ou um gás não reativo tal como o azoto. O processo cromatográfico é levado a cabo a temperatura controlada, dependendo a separação dos componentes da mistura da sua pressão de vapor e da afinidade para a fase estacionária.

Assim, os componentes da mistura deverão migrar a velocidades diferentes na coluna cromatográfica, tendo cada substância um  $t_r$  característico, definido como o intervalo de tempo compreendido entre a injeção e a respetiva resposta no detetor. Tradicionalmente a identificação dos componentes era feita exclusivamente com base nos tempos de retenção. Contudo, este procedimento pode ser insuficiente se o analista tiver que discriminar compostos diferentes, que apresentam  $t_r$  muito próximos e eventualmente sobrepostos. Por essa razão, poderá ser necessário o uso de detetores capazes de fornecer informação relativamente à estrutura molecular dos compostos ou, em alternativa, a utilização de duas colunas capazes de discriminar corretamente as substâncias de interesse (e.g colunas com polaridades suficientemente diferentes) (DAWLING,2011). Na figura 3 está representado, em esquema, um cromatógrafo de gás.

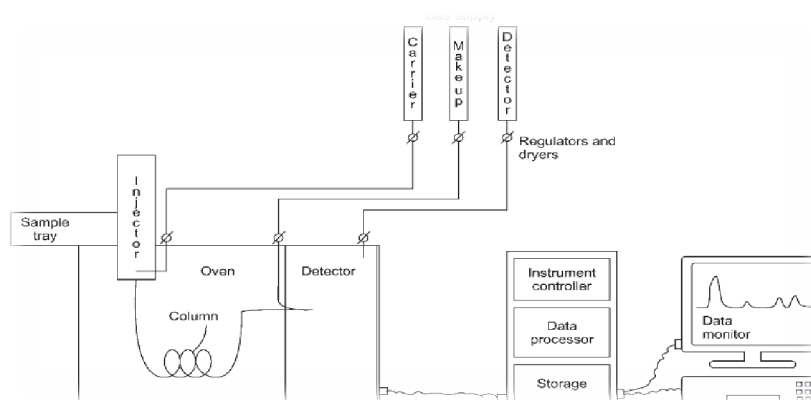


Figura 3- Esquema de um cromatógrafo de gás, Adaptado de Dawling, 2011.

### 2.3.2 Detetor de ionização de chama-FID

O detetor de ionização de chama (Figura 4) baseia-se no princípio de que a condutibilidade elétrica de um gás é diretamente proporcional à concentração de partículas carregadas nele contido. A fonte de ionização do detetor FID é uma chama que resulta da combustão de um fluxo gasoso criado por mistura de hidrogénio com ar, que por sua vez se usa para queimar o efluente da coluna. A interação do efluente com a chama leva à ionização das substâncias originando espécies químicas com carga elétrica. Um eléctrodo, de carga positiva, deflete para um coletor, de carga oposta, as espécies químicas carregadas produzindo uma corrente elétrica de grandeza proporcional à quantidade de compostos ionizados pela chama (HEARN, 2008).

Este é um dos detetores mais utilizados em cromatografia de gás devido à sua sensibilidade, respondendo a quase todas as classes de compostos orgânicos que contêm átomos de carbono ligados a átomos de hidrogénio, com a exceção do ácido fórmico. De uma forma geral não responde aos contaminantes mais comuns do gás de arraste (DAWLING, 2011).

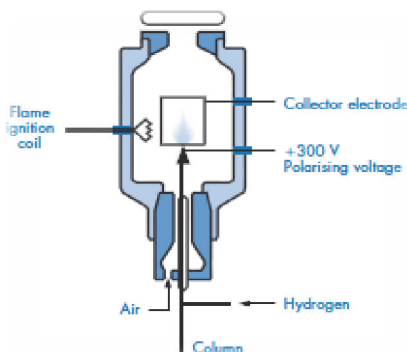


Figura 4- Corte transversal de um detetor FID, adaptado de DAWLING, 2008.

### 2.3.3 Modo de injeção por *headspace*

A cromatografia de gás acoplada a um injetor de *headspace* é muito usada em laboratórios de toxicologia forense para análise de etanol e muitas outras substâncias voláteis presentes em amostras biológicas.

Nesta técnica, a amostra, contendo analitos voláteis, é introduzida num vial hermeticamente fechado que é incubado a uma temperatura controlada. As substâncias voláteis, por exemplo etanol, transferir-se-ão, pelo menos parcialmente, para o espaço livre acima da superfície da amostra (Figura 5), denominado de *headspace*. Depois de atingido o equilíbrio, injeta-se um volume adequado do *headspace* no sistema analítico. A concentração da substância volátil na fase de vapor ao atingir o estado de equilíbrio é proporcional à concentração na fase líquida. A temperatura de equilíbrio é controlada e varia consoante as características do analito a ser estudado (JONES, 2003).

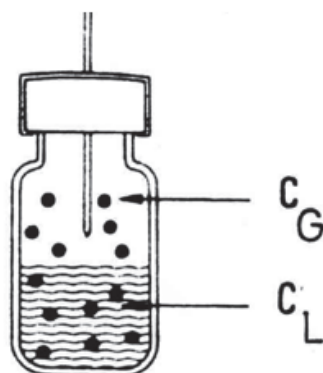


Figura 5-Análise de etanol em modo de injeção por *headspace*, Adaptado de TIAFT, 2013.

Uma das vantagens do *headspace* é a possibilidade da determinação de componentes voláteis da amostra em estudo de forma direta. Além disso, esta técnica protege a coluna cromatográfica da contaminação por resíduos não voláteis da matriz.

### 2.4 Validação do método analítico

Antes da implementação de qualquer método analítico para a análise de amostras de rotina num laboratório é necessário proceder à sua validação. A capacidade de um método analítico em detetar e quantificar com segurança um analito com interesse toxicológico forense é extremamente importante. Validar um método significa comprovar, através do fornecimento de evidência objetiva, que os requisitos para uma aplicação ou uso

específicos pretendidos foram atendidos. (ISO/IEC 17025, 2005). Entre outros aspetos, e sendo a validação do método um processo realizado através de testes analíticos, deve assegurar-se a sua capacidade de distinguir as substâncias de interesse de possíveis interferentes.

#### **2.4.1 Parâmetros de validação**

No processo de validação do método analítico foram avaliados vários parâmetros cuja conformidade, relativamente a critérios previamente definidos, teve de ser evidenciada. Para o método em estudo foram considerados os seguintes parâmetros analíticos de validação: especificidade e seletividade, limiares analíticos, linearidade, precisão intermédia, exatidão, repetibilidade, estabilidade, robustez, reprodutibilidade e arrastamento (*carryover*).

##### **2.4.1.1 Especificidade e seletividade**

O termo especificidade é muitas vezes utilizado como sinónimo de seletividade uma vez que ambos abordam a capacidade de um método para detetar um analito de interesse na presença de outros componentes da matriz. Ambos se relacionam com o grau de interferência de outras substâncias na identificação do analito. Um método é específico quando tem a capacidade para identificar e quantificar unicamente o analito na presença de outras substâncias, endógenas ou exógenas, numa amostra em condições exigidas pelo método (ERMER, 2005). Um método instrumental seletivo tem a capacidade de avaliar de forma inequívoca a substância em exame, mesmo na presença de interferentes com propriedades similares, presentes numa amostra complexa. A seletividade deve garantir que a resposta analítica se deve exclusivamente ao composto de interesse. Como existem poucos métodos capazes de identificar uma única substância, o termo seletividade talvez seja o mais adequado. Este parâmetro, por ser habitualmente o primeiro passo a ser estudado, deve ser periodicamente reavaliado, quer durante a validação quer depois da sua disponibilização ao uso em condições de rotina. De fato algumas amostras podem sofrer degradação, gerando compostos que não foram observados inicialmente e que podem coeluir com a substância de interesse (RIBANI, 2004).

O ideal seria ter-se uma ausência total de interferentes, embora tal seja difícil, sendo mesmo impossível, de atingir, sobretudo quando as análises são realizadas em amostras

biológicas complexas. Na prática será necessário aceitar a presença de pequenas quantidades de interferentes, desde que esse fato não afete a precisão e/ou a exatidão dos resultados analíticos (DADGAR, 1995).

Há diversas formas de avaliar a seletividade de um método. Uma delas é através da análise de um conjunto de amostras brancas, demonstrando-se a ausência de sinais analíticos da substância que se pretende estudar. Um outro procedimento consiste na análise de um conjunto de matriz fortificada com concentrações conhecidas do analito (KARNES, 1991; CAUSON, 1997).

#### **2.4.1.2 Modelo de calibração**

Em termos práticos, a calibração é uma ferramenta básica que tem como objetivo assegurar a obtenção de resultados quantitativos fiáveis. Contudo, é de salientar que a seleção do modelo de calibração que melhor se adapta ao desempenho de um método analítico é fundamental na avaliação da capacidade deste para fornecer resultados corretos (BURROWS, 1993). O processo começa com a preparação de soluções contendo concentrações conhecidas do analito em estudo (calibradores), após o que se procede à sua análise instrumental de acordo com um procedimento analítico definido. Para cada um destes calibradores o equipamento gera um sinal proporcional à concentração da substância. Com os dados obtidos é então possível gerar uma representação gráfica (curva de calibração). Para tal, as respostas analíticas são representadas no eixo  $y$  e as correspondentes concentrações no eixo  $x$ . A decisão quanto ao melhor ajustamento (e.g. reta, curva) entre os pontos de calibração requer uma avaliação cuidada, por isso terá influência não só no cálculo das concentrações como também no valor dos limites de deteção e de quantificação do método (MILLER, 1991).

#### **2.4.1.3 Linearidade**

A linearidade de um procedimento analítico é a capacidade que este tem de produzir resultados diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, numa dada gama de concentração. É muito comum o uso da regressão linear para demonstrar a linearidade do método, pelo que se recomenda um mínimo de cinco níveis de concentração dentro da gama de trabalho, com um mínimo de três testes independentes (ICH Q2 A e Q2 B, 2006).

É frequente o uso do coeficiente de correlação ( $r$ ) no teste da linearidade. Este apresenta valores entre  $-1 \leq r \leq +1$ , sendo que quanto mais próximo de 1 ou -1, melhor será o ajuste da função matemática escolhida, aos valores representados. No entanto, apenas o valor do coeficiente de correlação não é suficiente para garantir o ajuste linear. Para evitar o problema de falta de ajuste, recomenda-se a representação gráfica e a análise cuidadosa dos resíduos do sinal analítico (RIBEIRO, 2008). Considera-se que um coeficiente de correlação igual ou superior que 0.999 é evidência de um ajuste dos dados pela linha de regressão (RIBANI, 2004). De igual modo recomenda-se a avaliação de  $r$  a um nível de confiança de 95% (ERMER, 2005).

#### **2.4.1.4 Gama de trabalho**

A gama de trabalho corresponde ao intervalo entre a concentração superior e inferior da substância em exame, que atenda aos requisitos de precisão e exatidão. Quando se pretende quantificar uma substância é imprescindível definir a gama de trabalho prevenindo assim ações de extrapolação que podem conduzir a resultados não suportados pela validação do método (SWARTZ, 1998).

Considera-se gama de trabalho o intervalo de concentrações abrangido pela calibração e para o qual é possível documentar valores de precisão e exatidão aceitáveis (HARTMANN, 1998).

#### **2.4.1.5 Precisão**

Um dos testes analíticos mais importantes no processo de validação do método é a análise da precisão. A precisão é definida como o grau de concordância (grau de dispersão) entre uma série de medições obtidas a partir da amostragem múltipla de uma mesma amostra homogênea, em condições bem definidas. A precisão é habitualmente expressa como uma estimativa do desvio padrão ( $S$ ) ou desvio padrão relativo (DPR), também conhecido como coeficiente de variação (CV%), de uma série de medições. Geralmente são considerados três níveis de precisão: a repetibilidade, a precisão intermédia e a reprodutibilidade (ICH, 1994).

$S = \sqrt{\frac{(x_i - \bar{x})^2}{N-1}}$ ;  $DPR$  ou  $CV\% = \frac{s}{\bar{x}} \times 100$ , onde  $x_i$  é o valor individual de uma determinação,  $\bar{x}$  é a média aritmética das determinações,  $s$  é o desvio padrão e  $N$  é o número de determinações.

A repetibilidade ou precisão intra-ensaio expressa a precisão do método analítico obtida nas mesmas condições de trabalho e num curto intervalo de tempo. Por sua vez, a precisão intermédia expressa a influência das variações que ocorrem normalmente num laboratório, nomeadamente: diferentes analistas e equipamentos ou execução das tarefas em dias distintos. A reprodutibilidade refere-se à comparação de resultados obtidos em laboratórios diferentes (e.g. ensaios de aptidão) (ICH, 1994). Regra geral, a reprodutibilidade é utilizada como forma de evidenciar a capacidade de um laboratório para emitir resultados fiáveis e, para uma dada amostra, equivalentes aos emitidos por laboratórios da mesma área de atuação.

#### **2.4.1.6 Robustez**

A robustez define-se como sendo a capacidade do método para resistir a pequenas variações que podem ocorrer durante as análises de rotina. O estudo deste parâmetro adquire, certamente, maior importância quando se pretende aplicar o método por um longo período de tempo e/ou aplicá-lo em diferentes laboratórios. A sua avaliação é feita normalmente na parte final do desenvolvimento/validação de um método, com o objetivo de investigar de forma sistemática os procedimentos/condições que necessitam de um rigoroso controlo durante a sua aplicação na rotina (DADGAR, 1995; HARTMANN, 1998). Alguns dos aspetos a avaliar podem ser, por exemplo, o impacto da mudança do analista, a ocorrência de grandes intervalos de tempo entre os períodos operacionais, pequenas modificações instrumentais ou alterações nas condições cromatográficas (BRESSOLLE, 1996).

#### **2.4.1.7 Limites de deteção e de quantificação**

O LD representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detetada, mas não necessariamente quantificada, utilizando um determinado procedimento experimental (ICH, 1995). Este pode ser determinado por três processos distintos: a



avaliação visual, a relação sinal/ruído e o método baseado em parâmetros da curva de calibração (MILLER, 1991).

A avaliação do LD pelo método visual faz-se adicionando uma concentração conhecida do analito à matriz, até que o respetivo sinal analítico possa ser distinguido do ruído. Este método (sinal/ruído) é aplicado apenas em procedimentos analíticos que evidenciem o ruído da linha da base. A razão sinal/ruído define-se como sendo a razão entre a intensidade da amostra, para dada concentração do analito e o sinal analítico gerado na análise de uma amostra branca. Assim, é estabelecida uma concentração mínima para a qual a substância pode ser facilmente detetada (RIBANI, 2004). A razão sinal/ruído deve ser pelo menos igual a 3. O LD, se estimado a partir da curva de calibração, é calculado com base nos dados obtidos a partir da análise de uma curva de calibração preparada com calibradores fortificados com concentrações correspondentes a gama baixa da respetiva gama de trabalho. Pode determinar-se a partir da equação que se segue:  $LD = 3.3 \times \frac{S_{x/y}}{b}$ , onde  $S$  é a estimativa do desvio padrão da resposta, que pode ser a estimativa do desvio padrão do branco, da equação da linha de regressão ou do coeficiente linear da equação e  $b$  é o declive ou coeficiente angular da curva analítica.

Da mesma forma, o LQ representa a menor concentração da substância em exame que pode ser medida, utilizando um determinado procedimento experimental, dentro de valores de precisão e exatidão considerados aceitáveis. (ICH, 1995). Os critérios aplicados ao LD, aplicam-se à LQ, utilizando a relação 10:1. Pode determinar-se o LQ, procedendo ao cálculo a partir da equação que se segue:  $LQ = 10 \times \frac{S_{x/y}}{b}$ .

#### **2.4.1.8 Estabilidade**

A avaliação da estabilidade do analito em matrizes biológicas é um pré-requisito para se obter um método bioanalítico fiável quando se pretende a quantificação, pois sem esta garantia, os subsequentes dados são questionáveis. Existem vários fatores que podem alterar a estabilidade, nomeadamente a temperatura, o tempo de conservação, a concentração de analito, o tipo de fluido biológico, etc. (ROZET, 2011).

Normalmente, a avaliação da estabilidade na matriz biológica é feito por comparação das respostas das amostras, sujeitas a condições definidas de temperatura e tempo, com as

respostas das amostras preparadas no momento da análise. Os ensaios de estabilidade das amostras devem decorrer nas mesmas condições a que estas são sujeitas durante a rotina laboratorial, de forma a averiguar se o analito sofre degradação à temperatura de conservação.

#### **2.4.1.9 Arrastamento (*carryover*)**

Numa análise cromatográfica é relevante ter em atenção os interferentes que podem aparecer no resultado final. Resíduos de amostras de uma injeção anterior podem ser detetados durante a análise das injeções subsequentes. A influencia de análise de amostras anteriores pode ocorrer quando a agulha da injeção, a coluna cromatográfica, o detetor e/ou outros componentes do cromatógrafo estão contaminados, o que pode ter consequências significativas nos resultados quer qualitativos quer quantitativos. Esta avaliação pode ser feita com base na análise de amostras brancas (amostra isenta do analito de interesse) após a análise de amostras fortificadas com concentrações elevadas do respetivo analito.

No estudo do *carryover*, são realizadas injeções intercaladas de amostras brancas e de amostras fortificadas (e.g. calibradores de concentração média/alta). Posteriormente procede-se a uma análise visual dos cromatogramas obtidos e se não aparecerem picos referentes ao analito em estudo nos cromatogramas resultante da injeção dos brancos, tal significa que as análises anteriores não tem impacto nas subsequentes, podendo o parâmetro ser validado.

#### **2.4.1.10 Exatidão**

A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados num determinado ensaio e um valor de referência aceite como verdadeiro. A exatidão está associada à existência de erros sistemáticos e pode expressar-se, por exemplo em termos de percentagem de recuperação de uma quantidade conhecida do analito adicionado à amostra. A exatidão de um método pode ser avaliada com recurso a materiais de referência, comparação de métodos, e como se disse anteriormente, a ensaios de recuperação (RIBANI, 2004).

## **Capítulo III- Trabalho experimental**

### **3.1 Material e métodos**

#### **3.1.1 Amostras biológicas**

As amostras de humor vítreo foram colhidas no âmbito de autópsias realizadas no serviço de patologia forense da Delegação do Centro do INMLCF, I.P., no período compreendido entre o último semestre de 2012 e o primeiro trimestre de 2013.

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

#### **3.1.2 Padrões**

As soluções de trabalho utilizadas na elaboração da curva de calibração e na preparação do controlo qualidade interno devem provir, sempre que possível, de fontes independentes. Por essa razão o padrão do etanol utilizado para preparar os calibradores foi adquirido à marca comercial Merck (Merck KGaA, Darmstadt) enquanto o utilizado na preparação dos controlos foi adquirido à marca comercial Panreack (Panreac ITW, Barcelona) apresentando ambos uma pureza superior a 99.9%.

O padrão interno utilizado foi o n-propanol, adquirido à firma Merck. Esta substância foi escolhida por apresentar propriedades físico-químicas e comportamento cromatográficos semelhantes ao da substância em estudo.

As soluções foram preparadas com água ultra pura Milli-Q obtida com sistema Millipore (França).

#### **3.1.3 Instrumentação analítica**

Foi utilizado um equipamento da marca Agilent GC 6890N (Agilent, Santa Clara, California) (Figura 6) com detetor de ionização de chama e acoplado a um injetor *headspace* G1888 de volume fixo-*loop* (GCFI001- designação segundo o código interno no SQTf) e um equipamento GC de marca Varian 450 (Agilent, Santa Clara, California) (Figura 7) com detetor de ionização de chama e equipado com um amostrador automático COMBIPAL (CTC Analytics, Zwingen, Suíça) (GCFI002- designação segundo o código interno no SQTf).



Figura 6- Equipamento GC de marca *Agilent 6890N*



Figura 7- Equipamento GC de marca *Varian 450*

Tabela III- Algumas características dos sistemas cromatográficos utilizados

Componente	Principais Características
Injetor automático	Injeção de <i>Headspace</i>
GCFI001	Coluna analítica 1: DB-ALC1 30 m x 0.320 mm x 1.80 $\mu\text{m}$ (Agilent 123-9134) – FID1 A. Coluna analítica 2: DB-ALC2 30 m x 0.320 mm x 1.20 $\mu\text{m}$ (Agilent 123-9234) – FID2 B.
GCFI002	Coluna analítica 1: VF-624 30m x 0.25 mm x 1.40 $\mu\text{m}$ (Varian CP 910215) – <i>Middle</i> . Coluna analítica 2: VF-5 30 m x 0.25 mm x 0.50 $\mu\text{m}$ (Varian CP 98945) – <i>Front</i> .
Detetor	FID

Ambos os equipamentos têm duas colunas analíticas que diferem pela espessura da fase estacionária e polaridade. No que diz respeito ao GCFI001 a coluna DB-ALC1 tem uma espessura de 1.80 $\mu\text{m}$  o que leva a que as substâncias em estudo apresentem tempos de retenção superiores quando comparados com a coluna DB-ALC2 que tem uma espessura de 1.20  $\mu\text{m}$ . Ou seja, a primeira coluna induz maior demora na eluição das substâncias em comparação com a segunda. O mesmo se passa com o equipamento GCFI002, em que a

coluna analítica VF-624 apresenta uma espessura de 1.40 $\mu$ m e a VF-5 uma espessura de 0.50 $\mu$ m.

Os equipamentos diferem no sistema de injeção. No equipamento GCFI001 o sistema de injeção é constituído por um *loop*, que, no momento da injeção, é preenchido com a amostra de *headspace*, a qual é depois transferida para o sistema cromatográfico. No equipamento GCFI002 a injeção é feita com recurso a uma seringa integrada no amostrador automático.

### 3.1.4 Descrição dos métodos

Tabela IV-Preparação da curva de calibração

Equipamento GC (Agilent 6890N)	Equipamento GC (Varian 450)
Temperatura do injetor 150 °C	Temperatura do injetor 200 °C
Modo de injeção <i>split</i> 3,68:1	Temperatura do forno 35 °C (isotérmico)
Temperatura do forno 40 °C (isotérmico)	Tempo de corrida 6 min
Tempo de corrida 5 min	Temperatura dos detetores 290 °C
Temperatura dos detetores 250 °C	Fluxo de gás de arraste (hélio) 2.5 mL/min
Fluxo de gás de arraste (hélio) 2,7 mL/min	Fluxo de hidrogénio 30 mL/min
Fluxo de hidrogénio 40 mL/min	Fluxo de ar 300 mL/min
Fluxo de ar 450 mL/min	Fluxo de azoto 25 mL/min
Fluxo de azoto 45 mL/min	Temperatura da seringa 70 °C
Temperatura do injetor 40 °C	Temperatura da amostra 55.0 °C
Temperatura do <i>loop</i> 90 °C	Tempo de incubação 12 min
Temperatura da linha de transferência 90°C	Agitação da amostra 250 rotações por minutos
Tempo de incubação 20 min	Agitador On 5 segundos
Tempo de ciclo do GC 5,2 min	Agitador Off 2 segundos

### 3.1.5 Procedimento analítico

#### 3.1.5.1 Preparação de calibradores e padrão interno

##### 3.1.5.1.1 Soluções precursoras de padrões de referência

- ✓ Solução contendo 10.24 g/L de etanol (dissolver 13 mL de etanol com concentração de 789 g/L em água desionizada até perfazer um volume de 1000mL.)
- ✓ Solução contendo 41.97 g/L de etanol (dissolver 13 mL de etanol com concentração de 789 g/L em água desionizada até perfazer um volume de 250 mL.)
- ✓ Solução contendo 10 g/L de 1-propanol (dissolver 12.5 mL de 1-propanol 800 g/L em água desionizada até perfazer um volume de 1000 mL.)

##### 3.1.5.1.2 Soluções de trabalho (calibradores, controles e solução de trabalho de PI)

- i. Solução contendo 0.10 g/L de etanol (dissolver em água desionizada 10 mL da solução 10.24 g/L até perfazer um volume de 1000 mL.)
- ii. Solução contendo 0.50 g/L de etanol (dissolver em água desionizada 6 mL da 41.97 g/L até perfazer um volume de 500 mL.)
- iii. Solução contendo 1.19 g/L de etanol (dissolver em água desionizada 14.5 mL da solução 41.97 g/L até perfazer um volume de 500 mL.)
- iv. Solução contendo 3.10 g/L de etanol (dissolver em água desionizada 18.5 mL da solução 41.97 g/L até perfazer um volume de 250 mL.)
- v. Solução contendo 5.01 g/L de etanol (dissolver em água desionizada 30.5 mL da solução 41.97 g/L até perfazer um volume de 250 mL.)
- vi. Solução contendo 0.1 g/L de 1-propanol (dissolver em água desionizada 50 mL da solução 10 g/L até perfazer um volume de 5000 mL.)

Todas as soluções devem estar identificadas e conter informação sobre a sua validade, devendo ser armazenadas no frigorífico (2-8°C).

### 3.1.5.2 Procedimento Operacional

#### 3.1.5.2.1 Procedimento

- ✓ Homogeneização das AP

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

- ✓ Identificação das amostras de ensaio e tomas de ensaio

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

- ✓ Diluição das TE e adição de PI

Para vias de 10 mL, adicionar: 0.1 mL de amostra e 1 mL de solução de trabalho de PI.

Depois de preparadas e caso não sejam analisadas de imediato, as TE devem ser mantidas refrigeradas (2-8°C).

#### 3.1.5.2.2 Preparação da curva de calibração

Os calibradores são preparados tal como descrito no ponto 3.1.5.2.1 substituindo o volume de amostra por um volume igual da respetiva solução de trabalho de acordo com a tabela V.

Tabela V-Preparação da curva de calibração

	Solução de trabalho	Solução 0.1 g/L de 1-propanol (PI)
Calibrador 1 (0.1 g/L)	3.1.5.1.2 i	1 mL
Calibrador 2 (0.50 g/L)	3.1.5.1.2 ii	1 mL
Calibrador 3 (1.19 g/L)	3.1.5.1.2 iii	1 mL
Calibrador 4 (3.10 g/L)	3.1.5.1.2 iv	1 mL
Calibrador 5 (5.01 g/L)	3.1.5.1.2 v	1 mL

### 3.1.5.2.3 Preparação do CQI

O resultado da análise de amostras controlo positivas é utilizado para estabelecer o intervalo de aceitação do tempo de retenção relativo (TRR) correspondente ao etanol. Por seu lado, a amostra controlo negativa permite avaliar, em cada sequência analítica, o efeito de matriz. Estas amostras devem ser preparadas e analisadas em simultâneo com as amostras de rotina.

Assim prepararam-se dois *vials* contendo 0.1 mL da solução de trabalho de padrões primários e um terceiro vial em que a amostra foi substituída por uma porção equivalente de água desionizada (amostra branca) de acordo com a tabela VI. Estas amostras devem ser analisadas em simultâneo com as amostras de rotina.

**Tabela VI. Preparação de amostras de controlo**

	Solução de trabalho de padrões de referência	Solução 0.1 g/L de 1-propanol (PI)
Controlo positivo (0.50 g/L)	3.1.5.1.2 ii	1 mL
Controlo positivo (1.19 g/L)	3.1.5.1.2 iii	1 mL
Branco de Reagentes	—	1 mL



### 3.2 Resultados e discussão

#### 3.2.1 Identificação das substâncias

Com o objetivo de avaliar os critérios de identificação da substância com base nos tempos de retenção relativos, as amostras foram analisadas de acordo com as condições otimizadas para o método em validação.

Para isso foi preparado um controle de concentração de igual 1.19 g/L de modo a identificar o tempo de retenção. (TABELA VII)

Tabela VII. Tempos de retenção de etanol e do padrão interno, nos diferentes sistemas cromatográfico

Equipamentos	Colunas	Substâncias (t <sub>r</sub> )	Padrão interno (t <sub>r</sub> )
	DB-ALC1- FID1 A	2.609	4.625
GCFI001	DB-ALC2- FID2 B	2.425	3.940
	VF-624- Middle	2.423	4.907
GCFI002	VF-5 - Front	1.372	1.978

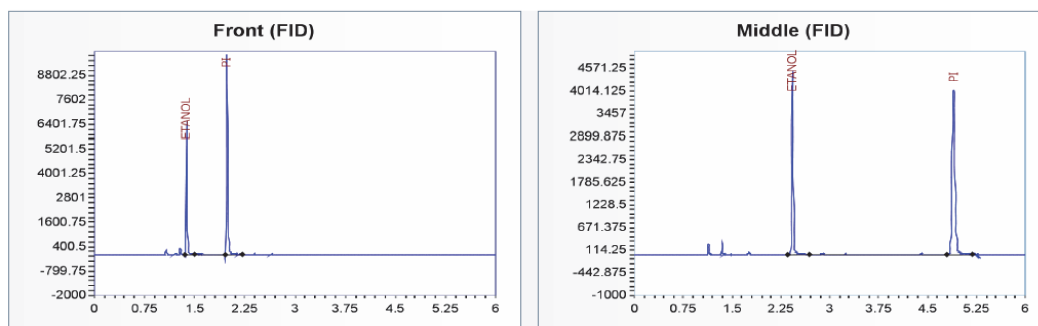


Figura 8. Cromatograma obtidas para a solução de controle 1.19 g/L no sistema GCFI002

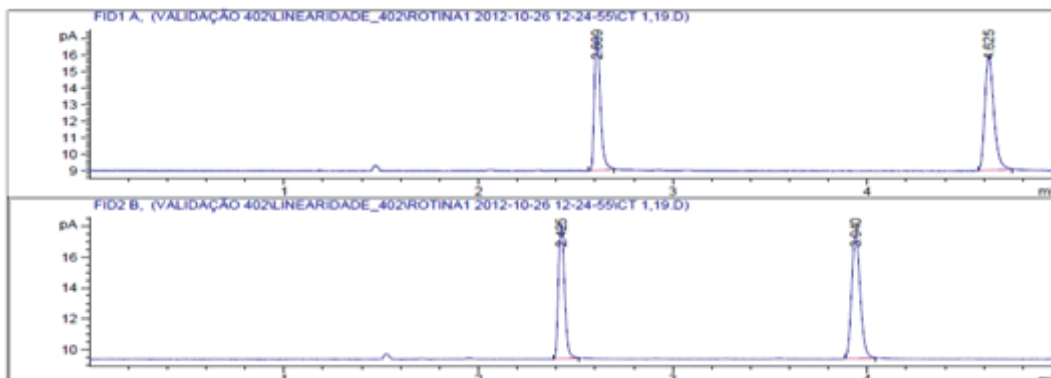


Figura 9. Cromatograma obtidas para a solução de controle 1.19 g/L no sistema GCFI001

### 3.2.2 Validação de método

#### 3.2.2.1 Especificidade e seletividade

Para o teste de especificidade/seletividade foram utilizadas 40 amostras, obtidas a partir de um conjunto de processos selecionados para este estudo (Tabela VIII).

Tabela VIII- Informação das amostras de HV usadas na preparação de pools

Amostra	Sexo	Idade	Informação disponível	Análises solicitadas
1	M	44	Acidente de viação	SAT
2	M	71	Acidente de trabalho	A
3	M	50	Causa desconhecida	SAT
4	M	73	Causa desconhecida	SAT
5	M	72	-----	A/MD
6	F	77	Suicídio	MD
7	M	23	Acidente de viação	A/DA
8	M	78	Suicídio	A/M/P
9	F	61	Causa desconhecida	SAT
10	M	59	Suicídio	A/DA/MD/P
11	M	57	Causa desconhecida	A/DA/MD/P
12	F	97	Causa desconhecida	SAT
13	F	77	-----	SAT
14	M	72	Causa desconhecida	SAT
15	M	48	Afogamento	SAT
16	F	94	Causa desconhecida	SAT
17	F	67	Causa desconhecida	SAT
18	M	39	Causa desconhecida	A/DA/MD/P
19	M	45	Causa desconhecida	SAT
20	M	74	Tiro	SAT
21	M	45	Causa desconhecida	A/MD/P
22	M	68	Causa desconhecida	SAT
23	M	47	-----	SAT
24	M	71	-----	A/MD/P
25	F	46	-----	A/DA/MD

(Continuação da Tabela VIII)

Amostra	Sexo	Idade	Informação disponível	Análises solicitadas
26	M	58	Causa desconhecida	SAT
27	M	88	Enforcamento	SAT
28	F	74	Acidente de viação	A/DA
29	F	73	Causa desconhecida	SAT
30	M	61	Causa desconhecida	SAT
31	M	83	Causa desconhecida	A/MD/P
32	M	53	-----	SAT
33	F	47	Enforcamento	SAT
34	F	87	Causa desconhecida	SAT
35	M	47	Suicídio	A/DA/MD/P
36	F	62	-----	A/DA/MD/P
37	F	68	Causa desconhecida	A/MD/P
38	M	68	Causa desconhecida	A/MD/P
39	M	35	Acidente de viação	A/DA
40	M	56	Suicídio	A/MD/P

Abreviaturas utilizadas na tabela: M- Masculino; F- Feminino; A- Alcoolémia; DA- Drogas de Abuso; MD- Medicamentos; (-----) – Informação não disponível; SAT- Sem Análises Toxicológicas, P- Pesticidas.

Foram utilizados dez (10) tubos para preparar as *pools*. A cada tubo foi adicionado 100µL de HV de quatro amostras diferentes de modo a que no final cada um ficou com um volume total de 400 µL.

Foram preparadas duas alíquotas, identificadas como **A** e **B**. As alíquotas **A**, às quais foram atribuídos os códigos *pools A*, foram preparadas adicionando 100 µL de amostras de HV a 1mL n-propanol (PI). Para alíquotas **B** (*pools B*), foram adicionadas, a 1 mL de n-propanol (PI), 100 µL de amostras de HV e 100 µL de etanol, com uma concentração de 0.10 g/L. (TABELA IX)

Repetiu-se este procedimento para os dois equipamentos envolvidos no estudo, e anteriormente descritos.

**Tabela IX- Preparação de pools para o teste de especificidade/seletividade**

<b>Pools - A</b>	<b>Pools - B</b>
P1A_402 = 100 µL (HV) +1 mL n-Propanol	P1B_402 = 100 µL (HV) +1 mL n-Propanol+100 µL (Etanol)
P2A_402= 100 µL (HV) +1 mL n-Propanol	P2B_402= 100 µL (HV) +1 mL n-Propanol+100 µL (Etanol)
P3A_402= 100 µL (HV) +1 mL n-Propanol	P3B_402= 100 µL (HV) +1 mL n-Propanol+100 µL (Etanol)
P4A_402= 100 µL (HV) +1 mL n-Propanol	P4B_402= 100 µL (HV) +1 mL n-Propanol+100 µL (Etanol)
P5A_402= 100 µL (HV) +1 mL n-Propanol	P5B_402= 100 µL (HV) +1 mL n-Propanol+100 µL (Etanol)
P6A_402= 100 µL (HV) +1 mL n-Propanol	P6B_402= 100 µL (HV) +1 mL n-Propanol+100 µL (Etanol)
P7A_402= 100 µL (HV) +1 mL n-Propanol	P7B_402= 100 µL (HV) +1 mL n-Propanol+100 µL (Etanol)
P7A_402= 100 µL (HV) +1 mL n-Propanol	P7B_402= 100 µL (HV) +1 mL n-Propanol+100 µL (Etanol)
P9A_402= 100 µL (HV) +1 mL n-Propanol	P9B_402= 100 µL (HV) +1 mL n-Propanol+100 µL (Etanol)
P10A_402= 100 µL (HV)+1 mL n-Propanol	P10B_402=100 µL (HV) +1 mL n-Propanol+100 µL (Etanol)

Dos cromatogramas obtidos para as amostras PA\_402, podemos verificar que as amostras de humor vítreo que não foram fortificadas estão isentas de sinal analítico correspondente ao etanol, o que quer dizer que a percentagem de falsos positivos foi de 0%. (TABELA X)

**Tabela X- Resultados obtidos no estudo da especificidade/seletividade**

<b>Código das Amostras</b>	<b>Resultados</b>	<b>Observações</b>
Pool-1 A_402	Negativo	-----
Pool-2 A_402	Negativo	-----
Pool-3 A_402	Negativo	-----
Pool-4 A_402	Negativo	-----
Pool-5 A_402	Negativo	-----
Pool-6 A_402	Negativo	-----
Pool-7 A_402	Negativo	-----
Pool-8 A_402	Negativo	-----
Pool-9 A_402	Negativo	-----
Pool-10 A_402	Negativo	-----
<b>Resultados de falsos positivos</b>		<b>0%</b>

Para as amostras PB\_402, todos os cromatogramas apresentaram um pico com o  $t_r$  do etanol. Os resultados revelaram uma percentagem de falsos negativos de 0%. (TABELA XI)

Tabela XI- Resultados obtidos no estudo da especificidade/seletividade

Código das Amostras	Resultados	Observações
Pool-1 B_402	Positivo	-----
Pool-2 B_402	Positivo	-----
Pool-3 B_402	Positivo	-----
Pool-4 B_402	Positivo	-----
Pool-5 B_402	Positivo	-----
Pool-6 B_402	Positivo	-----
Pool-7 B_402	Positivo	-----
Pool-8 B_402	Positivo	-----
Pool-9 B_402	Positivo	-----
Pool-10 B_402	Positivo	-----
<b>Resultados de falsos negativos</b>		<b>0%</b>

Podemos então concluir que a percentagem de falsos positivos e de falsos negativos é inferior ao limite de 10 % referido nos critérios de aceitação do procedimento de validação PO-SQTF-C-006 em vigor no SQTF.

### 3.2.2.2 Linearidade

Com o estudo da linearidade de um determinado método espera-se obter a proporcionalidade entre os resultados obtidos e a concentração da substância em análise dentro de uma determinada gama de trabalho. Para este caso específico, a linearidade foi estudada através da análise de 10 calibradores com concentrações distribuídas de maneira uniforme entre 0.10 g/L e 5.27 g/L (TABELA XII) que foram preparadas a partir da diluição sucessiva da solução de trabalho (etanol).

Tabela XII- Calibradores para o teste de linearidade

<b>Concentração dos calibradores (g/L)</b>	<b>Concentração da solução de trabalho (g/L)</b>	<b>Volume retirado da solução do trabalho (ml)</b>	<b>Volume da solução final (ml)</b>
5.27	790	0.1	15
4.48	5.3	8.5	10
3.58	4.5	8	10
3.04	3.6	8.5	10
2.44	3	8	10
1.95	2.4	8	10
1.27	1.9	6.5	10
0.95	1.3	7.5	10
0.52	0.9	5.5	10
0.1	0.5	2	10

Cada alíquota injetada no equipamento para obtenção da curva de calibração foi preparada de acordo com o procedimento descrito no ponto **3.1.5.2.1**.

A reta de calibração foi obtida a partir da razão entre as áreas do etanol e do padrão interno, em função de concentração da substância a ser quantificada. A avaliação da linearidade do método, teve em conta os seguintes critérios: análise visual dos valores residuais, o coeficiente de determinação e ordenada na origem, que não deve diferir significativamente de zero a um nível de confiança de 95%.

O coeficiente de determinação obtido superior a 0.999 e a análise dos residuais indica que estes estão distribuídos aleatoriamente em torno do zero. Este resultado foi obtido para dois equipamentos, CGFI001 e GCFI002, (TABELA XIII).

Tabela XIII-Resultados do teste de linearidade nos dois equipamentos (GCFI001/GCFI002)

Equipamentos	Colunas cromatográficas	Substância	Equação	r <sup>2</sup>	Erro padrão	Intercetar a ordenada na origem	
						95%inf	95%sup
GC-FI001	FID1 A	Etanol	$y = 0.67311x - 0.05908$	0.999391	0.03039	-0.097984	-0.02017
	FID2 B	Etanol	$y = 0.64737x - 0.04742$	0.999480	0.02701	-0.081999	-0.01285
GC-FI002	MIDDLE	Etanol	$y = 0.55756x - 0.04303$	0.999336	0.02629	-0.076680	-0.00938
	FRONT	Etanol	$y = 0.56194x - 0.04275$	0.9992849	0.02749	-0.077941	-0.00756

A linearidade do método demonstrou a homogeneidade da variância no intervalo da concentração de 0.10 g/L a 5.27 g/L, encontrando-se sempre um coeficiente de determinação superior a 0.99 para as duas colunas dos dois equipamentos em estudo. Os critérios de aceitação foram cumpridos com exceção do critério de inclusão do valor zero na interseção da reta na origem.

O tratamento dos dados para o estudo da linearidade foi efetuado com base na regressão linear. – Anexo I

### 3.2.2.2 Limites de deteção e quantificação

O estudo dos limites de deteção e quantificação foi efetuado com base na preparação de uma curva de calibração com 10 calibradores, em que as concentrações variaram entre 0.05 e 0.53 g/L, ou seja, na zona inferior da gama de trabalho, e distribuídos de forma uniforme. (TABELA XIV)

Tabela XIV-Calibradores para o estudo dos limites de detecção e de quantificação

Concentração dos calibradores (g/L)	Concentração da solução de trabalho (g/L)	Volume retirado da solução do trabalho (ml)	Volume da solução final (ml)
-----	790	0.1	15
0.53	5.27	1.5	15
0.42	0.53	8	10
0.34	0.42	8	10
0.27	0.34	8	10
0.22	0.27	8	10
0.17	0.22	8	10
0.14	0.17	8	10
0.08	0.14	6	10
0.07	0.08	8	10
0.05	0.07	7.5	10

A avaliação dos limites foi feita com base em parâmetros da curva analítica, aplicando as seguintes equações:  $LD = 3.3 \times \frac{S_{x/y}}{b}$  e  $LQ = 10 \times \frac{S_{x/y}}{b}$ , sendo a primeira utilizada para para o cálculo do limite de detecção e a segunda para o cálculo do limite de quantificação.

O valor mínimo detetado com segurança pelo método no equipamento GCFI001 foi de 0.03 g/L pela coluna FID1A e 0.02 g/L para a coluna FID2B. Para o equipamento GCFI002, em ambas as colunas os valores foram de 0.02 g/L.

Já no que diz respeito à quantificação o equipamento GCFI001 mostrou ser capaz de quantificar, com segurança, uma concentração de 0.08 g/L na coluna FID1A e 0.06 g/L na coluna FID2B. No equipamento GCFI002 o LQ obtido para a coluna *front* foi de 0.07 g/L e de 0.05 g/L para a *middle*. (TABELA XV)



Tabela XV-Resultados dos limites obtidos nos dois equipamentos

GC	Colunas	Equação da reta	$r^2$	Desvio		LD	LQ
				padrão de respostas	Declive		
FI001	FID1 A	$y = 0.57748X - 0.00779$	0.99785	0.00457	0.57748	<b>0.03</b>	<b>0.08</b>
	FID2 B	$y = 0.56787X - 0.00399$	0.99872	0.00346	0.56787	<b>0.02</b>	<b>0.06</b>
FI002	<i>Front</i>	$y = 0.49498X - 0.00158$	0.99839	0.00338	0.49498	<b>0.02</b>	<b>0.07</b>
	<i>Middle</i>	$y = 0.50492X - 0.00400$	0.99911	0.00256	0.50492	<b>0.02</b>	<b>0.05</b>

Os valores apresentados na tabela XV foram obtidos com base na análise da regressão, cujos resultados estão apresentados no anexo-II.

#### 3.2.2.4 Repetibilidade

A concordância entre os resultados de uma medição sucessiva efetuada num curto intervalo de tempo, nas mesmas condições, pelo mesmo analista e utilizando o mesmo procedimento e os mesmos instrumentos, é uma das condições para testar a repetibilidade.

A repetibilidade ou precisão intra-dia foi testada em conjunto com um dos dias da precisão intermédia. No estudo deste parâmetro foram preparados, por fortificação com etanol, cinco (5) replicados com uma concentração de 0.49 g/L (gama baixa) e cinco (5) replicados com uma concentração de 1.19 g/L (gama média). Após a análise, é obtida as respetivas áreas e os TRR para a substância em estudo, e para cada replicado, calculou-se a média das razões área da substância/área do PI, os desvios padrão e os coeficientes de variação.

Este parâmetro foi avaliado de acordo com os valores obtidos para %CV. De acordo com os valores do coeficiente de variação (CV <10%) obtidos (Tabela XVI), cumpriu-se o critério de aceitação de resultados em vigor no SQTf para ambas as colunas dos dois equipamentos utilizados na análise de etanol em amostras de humor vítreo.

Tabela XVI- Resultados obtidos nos dois equipamentos (controle a 0.49 g/L e 1.19 g/L), no estudo de repetibilidade

<i>Middle</i>						
Etanol	Repetibilidade TRR			Repetibilidade Área		
Controlo	Média	Desvio Padrão	%CV	Média	Desvio Padrão	%CV
0.49 g/L	0.495	0	0.04	0.259	0.001	0.37
1.19 g/L	0.495	0	0.03	0.640	0.004	0.59

<i>Front</i>						
Etanol	Repetibilidade TRR			Repetibilidade Área		
Controlo	Média	Desvio Padrão	%CV	Média	Desvio Padrão	%CV
0.49 g/L	0.695	0	0.05	0.264	0.010	0.37
1.19 g/L	0.694	0	0.02	0.646	0.003	0.50

<b>FID1 A</b>						
Etanol	Repetibilidade TRR			Repetibilidade Área		
Controlo	Média	Desvio Padrão	%CV	Média	Desvio Padrão	%CV
0.49 g/L	0.565	0	0.02	0.291	0.007	2.5
1.19 g/L	0.564	0	0.02	0.740	0.009	1.2

<b>FID2 B</b>						
Etanol	Repetibilidade TRR			Repetibilidade Área		
Controlo	Média	Desvio Padrão	%CV	Média	Desvio Padrão	%CV
0.49 g/L	0.616	0	0.01	0.290	0.007	2.3
1.19 g/L	0.615	0	0.02	0.721	0.009	1.2

Os restantes dados complementares e os cálculos efetuados encontram-se no anexo-III.

### 3.2.2.5 Precisão intermédia

Foram preparados cinco (5) calibradores com concentrações compreendidas entre 0.10 g/L e 5.01 g/L (ver ponto 3.1.5.2.2). Além dos calibradores foram incluídas na mesma série de análises uma amostra branca e os controlos de 0.49 g/L e 1.19 g/L de etanol, respetivamente (ver ponto 3.1.5.2.3). Os controlos foram preparados em três replicados.

Como referido anteriormente, a precisão intermédia pode ser estimada a partir dos resultados das análises das amostras atrás descritas, obtidos no mesmo laboratório mas em

dias diferentes e com analistas diferentes. Para este caso específico a determinação foi feita em cinco dias diferentes e com analistas diferentes.

Este parâmetro pode ser avaliado através do coeficiente de variação (%CV) ou desvio padrão relativo (DPR). (Tabela XVII)

Tabela XVII- Valores de coeficiente de variação obtidas no estudo de precisão intermédia

Cromatógrafo	Coluna	%CV	
		Gama Baixa (0.49 g/L)	Gama média/alta (1.19 g/L)
GCFI001	FID1 A	1.66	1.63
	FID2 B	2.00	1.65
GCFI002	<i>Middle</i>	2.08	1.37
	<i>Front</i>	1.60	1.22

A capacidade do método em fornecer resultados concordantes em dias diferentes e com analistas diferentes foi avaliada a partir dos valores obtidos para o %CV. Um valor do coeficiente de variação não superior a 10% é considerado aceite na avaliação da precisão intermédia.

O método em estudo fornece resultados concordantes, mesmo sendo avaliado em dias diferentes e com analistas diferentes, pois os valores de coeficiente de variação são inferiores a 10% nos dois equipamentos. (TABELA XVII) Os dados foram tratados no Microsoft Excel usando a ferramenta ANOVA de fator único, com recurso às expressões abaixo referidas.

$$MS_{run} = \frac{n \sum_{i=1}^p (\bar{x}_i - \bar{\bar{x}})^2}{p-1} \quad \text{Equação 1- Variabilidade dentro de grupos para } p-1 \text{ graus de liberdade}$$

$$MS_r = \frac{1}{p(n-1)} \sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n (x_{ij} - \bar{x}_i)^2 \quad \text{Equação 2- Variabilidade entre grupos para } p \text{ (n-1) graus de liberdade}$$

Em que  $p$  é o número de sequências para cada nível de concentração (uma sequência para cada dia);  $n$  é o número de replicados em cada sequência;  $x_{ij}$  representa a réplica individual (réplica  $j$ ) obtida na sequência  $i$ ;  $\bar{x}_i$  representa a média de  $n$  replicados obtidos na sequência  $i$  e finalmente  $\bar{\bar{x}}$  é a média das médias de  $p$  sequências.

$$S_r = \sqrt{MS_r} \quad \text{Equação 3-Cálculo da repetibilidade}$$

$$S_{run} = \sqrt{\frac{MS_{run} - MS_r}{n}} \quad \text{Equação 4-Cálculo da precisão entre sequências}$$

$$S_1 = \sqrt{(S_r^2) + (S_{run}^2)} \quad \text{Equação 5- Cálculo da precisão intermédia}$$

Quando os valores de %CV forem aproximadamente constantes ao longo de uma gama de trabalho, aplica-se a fórmula abaixo para calcular um %CV ponderado.

$$\%CV_{pool} = \sqrt{\frac{(n-1) \times CV_1^2 + (n_2-1) \times CV_2^2 + \dots}{(n_1-1) + (n_2-1) + \dots}} \quad \text{Equação 6- Calculo de \%CV ponderado.}$$

Os resultados detalhados no estudo deste parâmetro encontram-se apresentados no anexo-IV.

### 3.2.2.6 Exatidão

Para avaliar a exatidão, foram analisadas soluções com concentrações conhecidas, tendo o coeficiente de variação constituído o indicador utilizado para avaliar os resultados do estudo efetuado.

Os resultados obtidos são indicativos de uma boa exatidão, uma vez que em cada nível de concentração a recuperação média foi superior a 94%. Os resultados para ambas as colunas dos dois cromatógrafos revela que não há uma diferença significativa entre a recuperação obtida e a concentração conhecida a um nível de confiança de 95%, tendo em conta que os valores de %CV foram inferiores a 10%. (TABELA XVIII)

Tabela XVIII- Resumo dos resultados de %CV e de recuperação média no teste de exatidão

Cromatógrafo	Coluna	%CV		Recuperação média	
		Gama Baixa (0.49 g/L)	Gama média/alta (1.19 g/L)	Gama Baixa (0.49 g/L)	Gama média/alta (1.19 g/L)
GCFI001	FID1 A	1.7	1.6	95.2	94.2
	FID2 B	2.0	1.6	95.7	94.8
GCFI002	Middle	2.0	1.4	97.7	94.5
	Front	1.6	6.6	97.8	97.4

O resultado detalhado do teste de exatidão encontra-se no anexo-V. Este foi obtido com o apoio da ferramenta Microsoft Excel.

### 3.2.2.7 Avaliação do fenómeno de arrastamento (*Carryover*)

A influência de uma análise anterior num determinado resultado foi avaliada em simultâneo com o teste aos limiares analíticos de quantificação. Para tal, foram preparadas amostras brancas que foram analisadas de forma intercaladas com os calibradores de maior concentração. No total foram injetadas quatro amostras brancas.

Após as injeções, procedeu-se à análise visual dos respetivos cromatogramas, não tendo estes revelado a presença de picos com tempo de retenção de etanol. Podemos por isso concluir que, mesmo nos casos em que a concentração de etanol na amostra é elevada não interfere nos resultados subsequentes.

### 3.2.2.8 Teste aos limiares analíticos

Com base na gama de trabalho definida para a quantificação de etanol, procedeu-se ao teste dos limites de quantificação inferior e superior da curva de calibração a uma concentração de 0.1 g/L (gama baixa) e 5.01 g/L (gama média/alta), respetivamente, e para os dois equipamentos. Para o efeito, fortificaram-se cinco replicados de amostras de humor vítreo com as concentrações atrás referidas. Aplicando o procedimento descrito no ponto 3.1.5.2.1, analisaram-se as amostras preparadas e os respetivos resultados, determinando-se a percentagem do coeficiente de variação (CV%), a média e o erro em relação aos valores teóricos.

Tabela XIX- Resultados obtidos no estudo dos limiares analíticos de quantificação (gama baixa 0.1 g/L)

	Equipamentos de CG/FID			
	GCFI001		GCFI002	
	FID1 A	FID2 B	<i>Middle</i>	<i>Front</i>
<b>%CV</b>	7.34	8.76	4.6	4.6
<b>Média</b>	0.10	0.07	0.1	0.1
<b>%Erro</b>	0.21	26.6	2.0	2.0

Tabela XX- Resultados obtidos no estudo dos limiares analíticos de quantificação (gama média/alta 5.01 g/L)

Equipamentos de CG/FID				
	GCFI001		GCFI002	
	FID1 A	FID2 B	<i>Middle</i>	<i>Front</i>
<b>%CV</b>	0.86	0.95	9.93	9.92
<b>Média</b>	4.81	4.43	4.32	4.35
<b>%Erro</b>	3.93	11.65	13.77	13.17

De acordo com os resultados obtidos, (TABELA XIX e XX) verificou-se que foram cumpridas os requisitos exigidos no teste de limiar analítico de quantificação. Tanto para a gama baixa como para a gama média/alta, os valores de coeficiente de variação (%CV) foram inferiores a 20%, embora a coluna FID2 B do equipamento GCFI001 tenha revelado um erro de 26.6%, mas o valor de coeficiente de variação foi de 8.8%.

Os valores estão apresentados de forma detalhada na tabela que se encontra no anexo VI.

### 3.2.2.9 Estabilidade

No estudo da estabilidade foram comparados resultados das mesmas amostras, gerados pelo mesmo equipamento e injeções em dias diferentes. De amostras existentes no SQTF foram retiradas as alíquotas necessárias para preparar as AE. Estas amostras primárias foram congeladas por um período de cinco meses e voltou-se a descongelá-las para novamente preparar as AE, a fim de avaliar se a ação de congelamento/descongelamento provoca alterações significativas na amostra e, conseqüentemente nos resultados.

A avaliação foi efetuada considerando que, quando não existirem diferenças entre os dois conjuntos de resultados obtidos de forma independente, a relação entre ambos será uma linha reta com declive igual a 1, interceção na origem igual a zero e um coeficiente de correlação igual a 1. De facto, foi possível constatar um comportamento bastante aproximado a este ( $r > 0.99$ ) para os resultados obtidos antes e depois das ações de congelamento/descongelamento das amostras utilizadas no estudo.

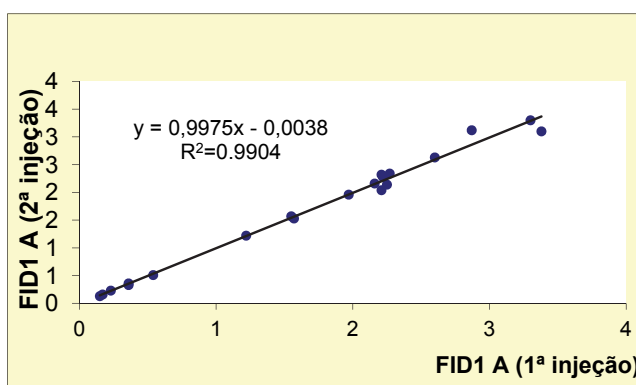
Sempre que possível, a preparação das AE deve ser efetuada em duplicado, estimando-se a respetiva media dos valores. A utilização da média diminui o erro que pode ocorrer, por exemplo, na pipetagem das amostras, uma vez que estamos a falar de volumes pequenos.

Infelizmente não foi possível implementar esta prática no estudo uma vez que as amostras já tinham sido utilizadas para outros testes e não se dispunha de quantidade suficiente.

Foi feita a comparação entre os valores obtidos com a utilização da coluna FID1 A do equipamento CG da marca *Agilent* 6890N com injetor de *headspace* de volume fixo (*loop*) obtidos inicialmente e após o período de descongelamento. Obtiveram-se os seguintes valores a partir da análise de correlação:  $y = 0.9975x - 0.0038$ ,  $R^2 = 0.9904$ . (TABELA XXI e Gráfico 1)

**Tabela XXI- Dados estatísticos (FID1 A/FID1 A), estudo da estabilidade**

Dados estatísticos	
Nº de amostras	20
r	0.995
Declive	0.998
Interceção	-0.004
Erro padrão	0.107

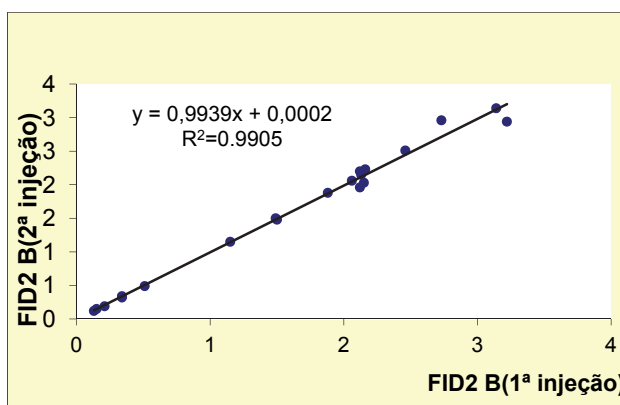


**Gráficos 1- Comparação das colunas FID1 A/ FID1 A, estudo de estabilidade.**

Esta comparação foi também efetuada para os valores da coluna FID2 B do equipamento GC da marca *Agilent* 6890N com injetor de *headspace* de volume fixo (*loop*). Obtiveram-se os seguintes valores a partir da análise de correlação  $y = 0.9939x + 0.0002$ ,  $R^2 = 0.9905$ . (TABELA XXII e Gráfico 2)

**Tabela XXII- Dados estatísticos (FID2 B/FID2 B), estudo da estabilidade**

Dados estatísticos	
Nº de amostras	20
r	0.995
Declive	0.994
Interceção	0.000
Erro padrão	0.101

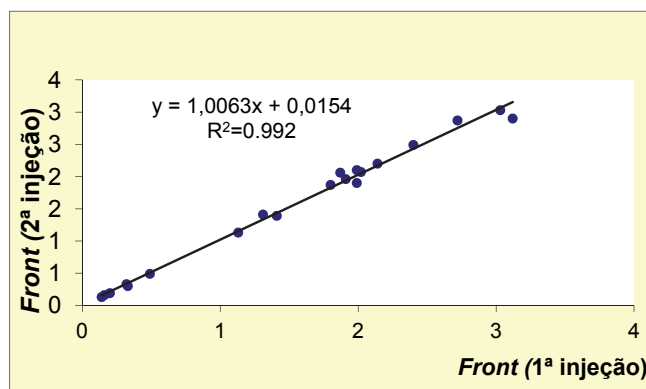


**Gráficos 2 Comparação das colunas FID2 B/ FID2 B, estudo da estabilidade**

Foi feita a comparação entre os valores da coluna *front* do equipamento CG da marca *Varian* 450 com injetor de volume variável (seringa) (*CombiPAL*). Obtiveram-se os seguintes valores a partir da análise de correlação:  $y = 1.0063x + 0.0154$ .  $R^2 = 0.992$ . (TABELA XXIII e Gráfico 3)

Tabela XXIII Dados estatísticos (*Front/ Front*), estudo da estabilidade

Dados estatísticos	
Nº de amostras	20
r	0.996
Declive	1.006
Interceção	0.015
Erro padrão	0.090

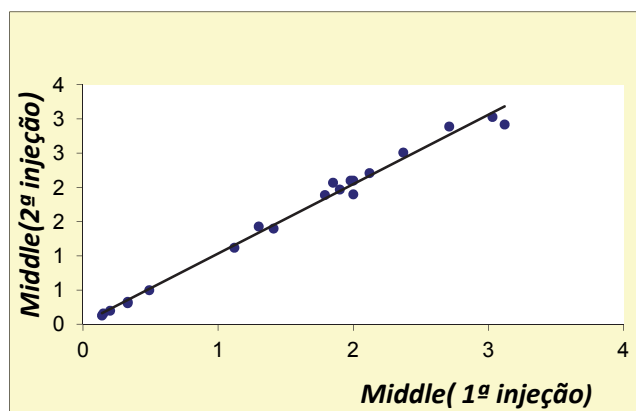


Gráficos 3- Comparação das colunas *Front/ Front*, estudo da estabilidade

Esta comparação foi também efetuada para os valores da coluna *middle* do equipamento CG da marca *Varian* 450 com injetor de volume variável (seringa) (*CombiPAL*). A partir da análise de correlação, obteve-se:  $y = 1.0132x + 0.0215$ ,  $R^2 = 0.9904$ . (TABELA XXIV e Gráfico 4)

Tabela XXIV Dados estatísticos (*Middle/ Middle*), estudo da estabilidade

Dados estatísticos	
Nº de amostras	20
r	0.995
Declive	1.013
Interceção	0.021
Erro padrão	0.099



Gráficos 4 Comparação das colunas *Middle/ Middle*, estudo da estabilidade

Mesmo não sendo possível fazer a média dos valores, foi possível cumprir os critérios de aceitação. A partir dos resultados obtidos pode se concluir que as ações congelação/descongelação das amostras não provocaram alterações significativas nos resultados da quantificação. Assim, podemos concluir que o etanol é estável nas condições normais de conservação/utilização das amostras. Os resultados estão apresentados de forma detalhada no anexo VII.



### **3.3 Aplicação do método analítico a amostras de humor vítreo em casos reais.**

Após o processo de validação do método, este foi aplicado a casos reais. Para tal, foram selecionadas 20 amostras de HV colhidas no âmbito de casos em que tinha sido solicitada a análise de etanol. Estes processos foram escolhidos com o objetivo de abranger toda a gama de trabalho estudada. As amostras foram analisadas segundo o procedimento analítico em vigor no SQTf nos equipamentos GCFI001 e GCFI002. Foi feita a avaliação dos cromatogramas obtidos para as amostras selecionadas e os resultados foram considerados positivos de acordo com os critérios definidos para a positividade da substância etanol segundo o procedimento operacional sobre a avaliação, cálculo e expressão de resultados em vigor. (TABELA XXV)

Assim, a positividade dos resultados foi avaliada de acordo com os critérios de aceitação de  $t_r$ . Considerando uma tolerância de  $\pm 7\%$ , todos os resultados foram conformes tanto para o equipamento de GCFI001 como para o de GCFI002. Os resultados estão apresentados no anexo VIII.

Tabela XXV- Concentração do etanol em amostras reais de HV

Amostras	Concentração do etanol (g/L) nos dois equipamentos			
	GC-FID001		GC-FID002	
	Coluna FID1 A	Coluna FID2 B	Coluna <i>Front</i>	Coluna <i>Middle</i>
1	0.15	0.13	0.14	0.14
2	0.36	0.34	0.32	0.33
3	1.57	1.50	1.31	1.30
4	3.38	3.22	3.12	3.12
5	1.97	1.88	1.80	1.79
6	2.16	2.06	1.91	1.90
7	2.21	2.12	1.99	2.00
8	2.60	2.46	2.4	2.37
9	1.55	1.49	1.41	1.41
10	2.21	2.12	2.02	2.00
11	2.22	2.13	2.14	2.12
12	0.36	0.34	0.33	0.33
13	0.17	0.15	0.16	0.15
14	0.54	0.51	0.49	0.49
15	2.87	2.73	2.72	2.71
16	3.30	3.14	3.03	3.03
17	2.25	2.15	1.87	1.85
18	1.22	1.15	1.13	1.12
19	2.27	2.16	1.99	1.98
20	0.23	0.21	0.2	0.2

### 3.4 Comparação dos resultados da aplicação do método a amostras de HV (GCFI001 e GCFI002)

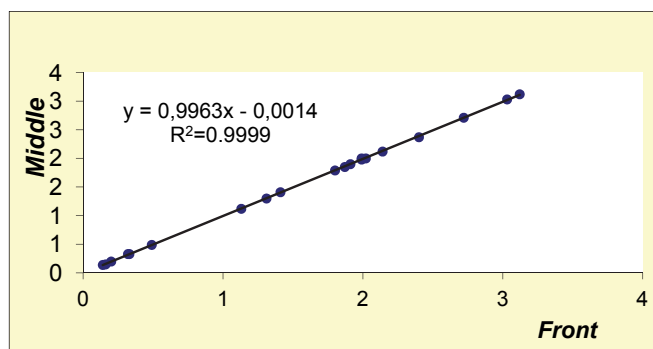
A relevância que a determinação da taxa do etanol apresenta em termos médico-legais e jurídicos exige que os resultados sejam tratados com rigor, exigindo-se, por isso, que a avaliação dos resultados seja efetuada de acordo com critérios objetivos e documentados.

De forma a avaliar os resultados gerados por cada uma das duas colunas e respetivos detetores foi selecionado um número significativo de amostras (um mínimo de 20 amostras) cujos resultados fossem representativos da gama de trabalho em vigor. Teoricamente, a relação entre os dois resultados seria uma linha reta, pois o declive seria igual a 1, a interceção na origem seria igual a 0 e o coeficiente de correlação igual a 1. Face aos erros associados, os valores supracitados não se obtêm na prática.

Foi feita a comparação entre os valores obtidos para as colunas *middle* e *front* do equipamento de CG de marca *Varian 450* com injetor de volume variável (seringa) (*CombiPAL*). Obteve-se:  $y = 0,9963x - 0,0014$ ,  $r^2 = 0,9999$ . (TABELA XXVI e Gráfico 5). Os resultados estão apresentados de forma detalhada no anexo IX.

Tabela XXVI- Dados estatísticos (*Varian 450*)

Dados estatísticos	
Nº de amostras	20
r	1.000
Declive	0.996
Interceção	-0.001
Erro padrão	0.010

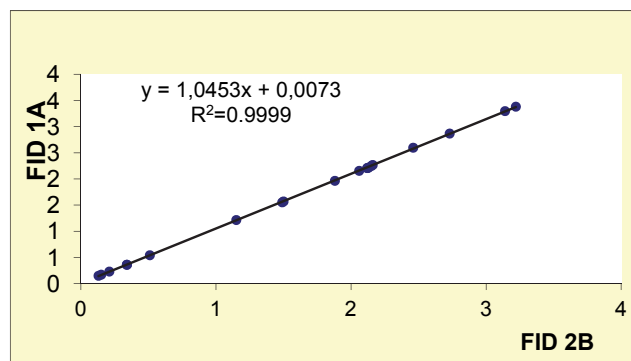


Gráficos 5- Comparação das colunas *Middle/ front*

Relativamente a comparação dos resultados da coluna FID1 A e FID2 B do equipamento de CG de marca *Agilent 6890N* com injetor de *headspace* de volume fixo (*loop*). Os resultados são:  $y = 1,0453x + 0,0073$  e  $r^2 = 0,9999$ . (TABELA XXVII e Gráfico 6) Os resultados estão apresentados de forma detalhada no anexo IX.

Tabela XXVII- Dados estatísticos (*Agilent 6890N*)

Dados estatísticos	
Nº de amostras	20
r	1.000
Declive	1.045
Interceção	0.007
Erro padrão	0.010



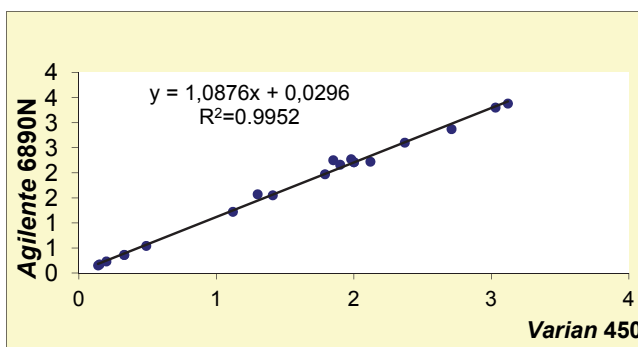
Gráficos 6- Comparação das colunas FID1 A/FID2 B

Decidiu-se ainda proceder à comparação entre a coluna FID1 A e *middle* dos dois equipamentos, porque apesar de ambos serem equivalentes diferem no sistema de injeção.

Para isso analisaram-se os resultados obtidos no estudo anterior. Obteve-se:  $y = 1,0876x + 0,0296$ ,  $r^2 = 0,9952$ . (TABELA XXVIII e Gráfico 7) Os resultados estão apresentados de forma detalhada no anexo IX.

Tabela XXVIII-Dados estatísticos (Agilent6890N/ Varian 450)

Dados estatísticos	
Nº de amostras	20
r	0.998
Declive	1.088
Interceção	0.03
Erro padrão	0.076



Gráficos 7- Comparação da coluna FID1 A/ Middle

#### **Capítulo IV- Conclusão**

De acordo com os resultados obtidos, pode concluir-se que as condições analíticas estabelecidas para os dois equipamentos de GC mostraram ser adequadas para a detecção e quantificação do etanol em amostras de humor vítreo. Os resultados obtidos a partir do estudo dos parâmetros de validação selecionados asseguram a qualidade do método analítico e, conseqüentemente, a obtenção de resultados laboratoriais confiáveis.

Da avaliação aos resultados obtidos quer com colunas analíticas de um mesmo equipamento quer de equipamentos diferentes, é possível concluir que os mesmos se revelaram equivalentes.

A confirmação da taxa de etanol em amostras de humor vítreo constitui uma alternativa nas situações em que não se dispõe de sangue para pesquisa de etanol, o que pode acontecer nas situações de traumatismos graves ou de putrefação avançada. Contudo, e embora a determinação de etanol em HV possa auxiliar a discernir entre uma ingestão de etanol e uma síntese endógena do mesmo, é necessária precaução, devido às variáveis envolvidas, quando o que se pretende é inferir a partir do HV qual seria a concentração sanguínea.



## Referências bibliográficas

BELL, S. *Drugs, poisons, and chemistry*, Facts on File, New York, 2009.

BRESSOLLE. F., BROMET-PETITB, M., AUDRANCc M. *Validation of liquid chromatographic and gas chromatographic methods. Applications to pharmacokinetics*, J. Chromatogh. B. 3-10, 686, 1996.

BURROWS, J.L. J. Pharm. Biomed. Anal. 11, 523, 1993. In HARTMANN, C., SMEYERS-VERBEKE J, MASSART D.L., McDOWALLI R.D. *Validation of bioanalytical chromatographic methods*, J. Pharm. Biomed. Anal. 17, 193–218, 1998.

CAUSON R. *Validation of chromatographic methods in biomedical analysis Viewpoint and discussion*, J. Chromatogh. B, 689, 175-180, 1997.

COE, J.I. *Postmortem chemistry update: emphasis on forensic application*, *Am. J. Forensic Med. Pathol.* 14, 91–117, 1993. In KARCH S.B., *Postmortem toxicology of abused drugs*, CRC Press, Boca Raton, FL, 2008.

DADGAR, D. *Issues in evaluation of bioanalytical method selectivity and drug stability*, J. Pharm. Biomed. Anal. 14, 23-31, 1995.

DAWLING, S. et al. - Gas chromatography. In JICKELLS, S. et al. *Clarke's Analytical Forensic Toxicology*, 3<sup>th</sup> edition, Pharmaceutical Press, 2008.

DAWLING, S. - Gas Cromatography. In MOFFAT, Anthony C. et al. *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material*, 4<sup>th</sup> edition, Pharmaceutical Press, 2011.

ERMER, J., MILLER, J. H. M. *Method Validation in Pharmaceutical Analysis - A Guide to Best Practice*, Wiley-VCH, Weinheim, 2005.

HARTMANN, C. SMEYERS-VERBEKE J., MASSART D.L., McDOWALLI R.D. *Validation of bioanalytical chromatographic methods*, J. Pharm. Biomed. Anal. 17, 193–218, 1998.

HEARN, W. Lee et al. - Common Methods in Postmortem Toxicology. *In: KARCH S.B. Postmortem toxicology of abused drugs*, CRC Press, Boca Raton, FL, 2008.

International Conference on Harmonization (ICH). *Analytical Methods: A Statistical Perspective on the ICH Q2A and Q2B Guidelines for Validation of Analytical Methods*, Q2 A e Q2 B, BioPharm International, 2006.

International Conference on Harmonization (ICH). *Validation of Analytical Methods: Definitions and Terminology*, ICH Q2 A, 1994.

International Conference on Harmonization (ICH). *Validation of Analytical Procedures: Methodology*, ICH Q2B, 1995.

International Organization for Standardization / International Electrotechnical Commission (ISO/IEC), ISO/IEC 17025. *General Requirements for the Competence of Testing and Calibration*, 2005.

JONES, A.W., FRASSON, M. *Blood Analysis by Headspace Gas Chromatography: Does a deficient sample volume distort ethanol concentration?*, Med. Sci. Law. 2003 43, 241-7, 2003.

JONES A. W., HOLMGREN, P. *Uncertainty in estimating blood ethanol concentrations by analysis of vitreous humour*, J. Clin. Pathol., 54, 699–702, 2001.

KARNES, H.T., SHIU, G., SHAH, V.P. *Validation of bioanalytical methods*, Pharm. Res., 8, 421-426, 1991.

LIEBER, C. S. *Ethanol metabolism, cirrhosis and alcoholism*, Clin. Chim. Acta, 257, 59-84, 1997.

LOGAN et al. *Alcohol, Drugs and Driving*. *In* NEGRUSZ, Adam et al. *Clarke's Analytical Forensic Toxicology*, Pharmaceutical Press, 2<sup>th</sup> edition, 2013.

MILLER, J. N. *Basic statistical methods for analytical chemistry. Part 2, calibration and regression methods*, Analyst, 116, 3-14, 1991.

RIBANI, M. *Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos*, Quim. Nova, 27, 771-780, 2004.



RIBEIRO, F.A.L., ERREIRA, M.M.C., MORANO, S. C., SILVA, L.R., SCHNEIDER, R.P. *Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados*, Quim. Nova, 31, 164-171, 2008.

ROZET, E., MARINI, R.D., ZIEMONS, E., BOULANGER, B., HUBERT, P. *Advances in validation, risk and uncertainty assessment of bioanalytical methods*, J. Pharm. Biomed. Anal, 55, 848–858, 2011.

SWARTZ, M.E. et al. *Validação de métodos cromatográficos*, Pharm. Technol., São Paulo, v.2, n. 3, p.12-20, 1998. In RIBANI, M. *Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos*; Quim. Nova, 27, 771-780, 2004.

JONES, G.R.- Postmortem toxicology. In JICKELLS, S. et al. *Clarke's Analytical Forensic Toxicology*, 3<sup>th</sup> edition, Pharmaceutical Press, 2008.

MUMENTHALER, M.S, Taylor J.L., O'hara R, Yesavage J.A. *Gender differences in moderate drinking effects*, Alcohol Res. Health 23, 55-64, 1999. In RAMCHANDANI, V.A., BOSRON, W.F., LI, T.K., *Research advances in ethanol metabolism*, Pathol Biol, 49, 676-82, 2001.

HOLFORD, N.H.G. *Clinical pharmacokinetics of ethanol*. Clin Pharmacokinet., 13, 273-92. 1987. In RAMCHANDANI V.A., BOSRON, W.F., LI, T.K. *Research advances in ethanol metabolism*, Pathol. Biol., 49, 676-82, 2001.

MELONI, J.N., LARANJEIRA, R. *Custo social e de saúde do consumo do álcool*, Rev. Bras. Psiquiatr. 26(Supl I), 7-10, 2004.

HOFFMANN M.H., CARBONELL, E., MONTORO, L. *Alcool e Segurança Epidemiologia e efeitos*, Psicol. Cienc. Prof., 16, 28-37, 1996.

JONES, A.W. *Blood- alcohol analysis by gas chromatography: fifty years of progress*. In TIAFT our first 50 years ,Academia Press, 1<sup>th</sup> edition, 2013.

TISCIONE, N.B., ALFORD, I., YEATMAN, D.T., SHAN., X. *Ethanol Analysis by headspace gas chromatography with simultaneous flame- ionization and mass spectrometry detection*, J. Anal. Toxicol., 35, 501-11, 2011.

PO-STF-CT-009, *Avaliação, cálculo e expressão de resultados*, Revisão001, documento interno aprovado para o Serviço de Química e Toxicologia Forense, 2012.

## **Anexos**

Nos anexos encontram-se todos os valores detalhados obtidos no tratamento dos resultados durante o processo de validação deste método analítico. Este encontra-se dividido de acordo com os testes dos parâmetros analíticos.

No anexo- I, encontram-se os resultados do tratamento dos dados obtidos durante o processo de validação do parâmetro linearidade. A linearidade do método foi avaliada com base no estudo da regressão linear.

No anexo- II, estão os resultados da análise dos limites de detecção e quantificação. Estes foram avaliados com base na análise da regressão linear. Os cálculos dos limites foram com base nas equações 1 e 2.

No anexo- III, estão apresentados os dados referentes a tratamento de dados referente à repetibilidade do equipamento.

Anexo- IV, estão os dados do parâmetro precisão intermédia. Este foi avaliado em cinco dias diferentes e com analistas diferentes.

Anexo-V, os resultados apresentados neste anexo contêm os dados obtidos na avaliação da exatidão do método.

Anexo-VI, refere-se a teste ao limiar analítico de quantificação dentro da gama de trabalho definido.

Anexo-VII, estão apresentados os resultados da estabilidade.

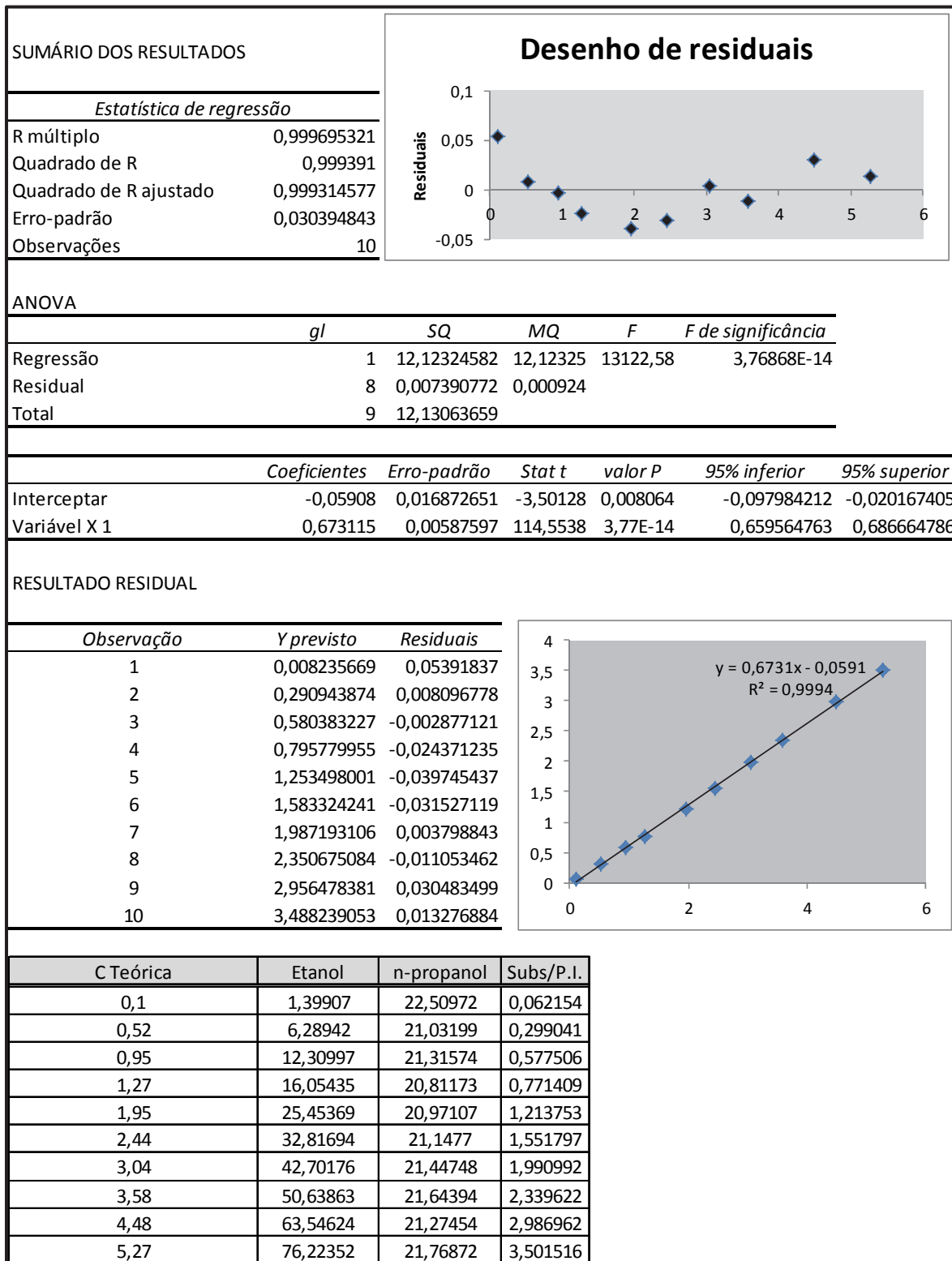
Anexo- VIII, estão os resultados da positividade dos resultados da aplicação do método a amostras de humor vítreo.

Anexo- IX, neste anexo estão apresentados os resultados da comparação dos valores obtidos pelo método na análise de casos reais que foram selecionados dos casos positivos solicitados para análises no SQTF.

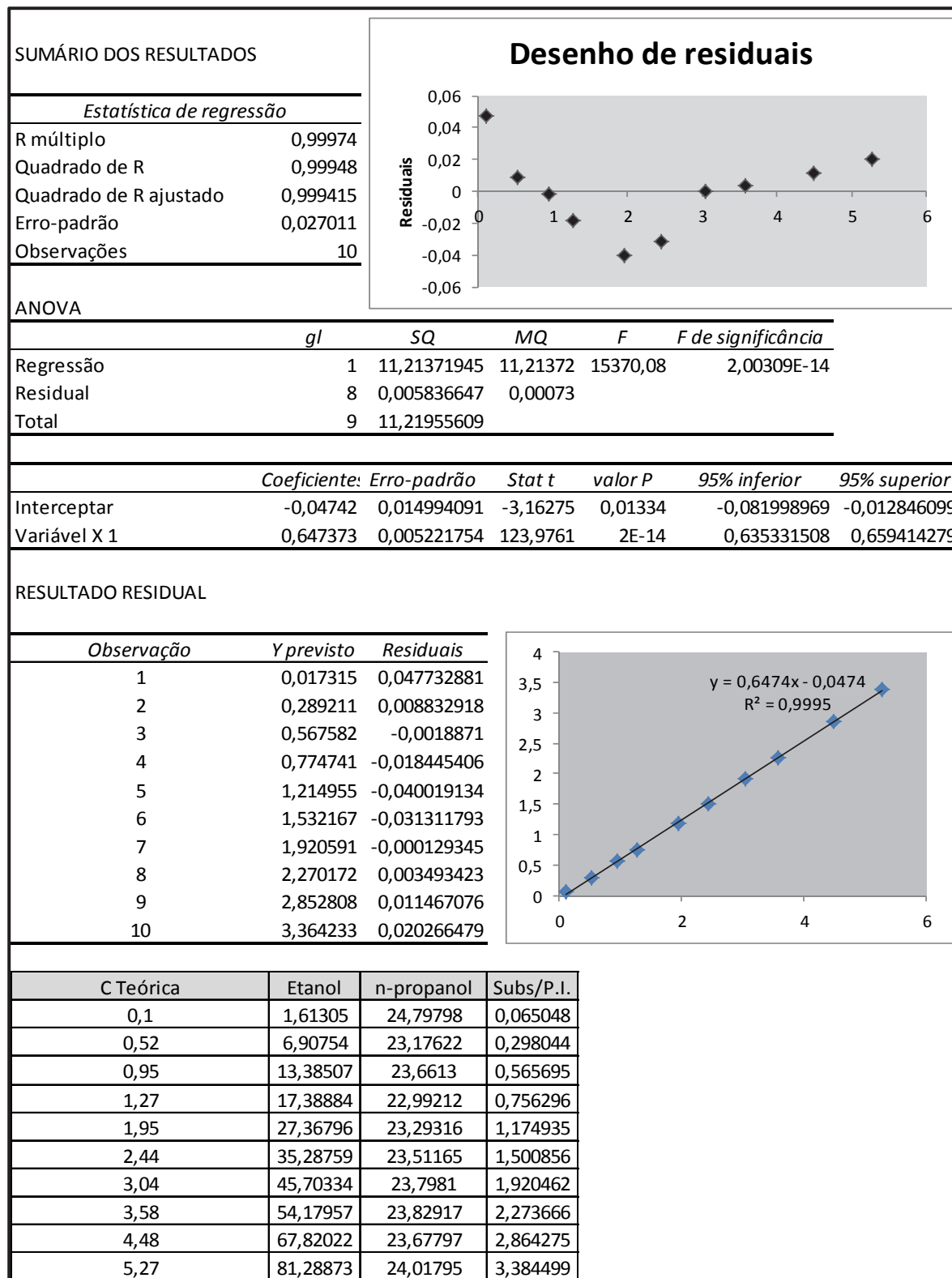


**Anexo -I**

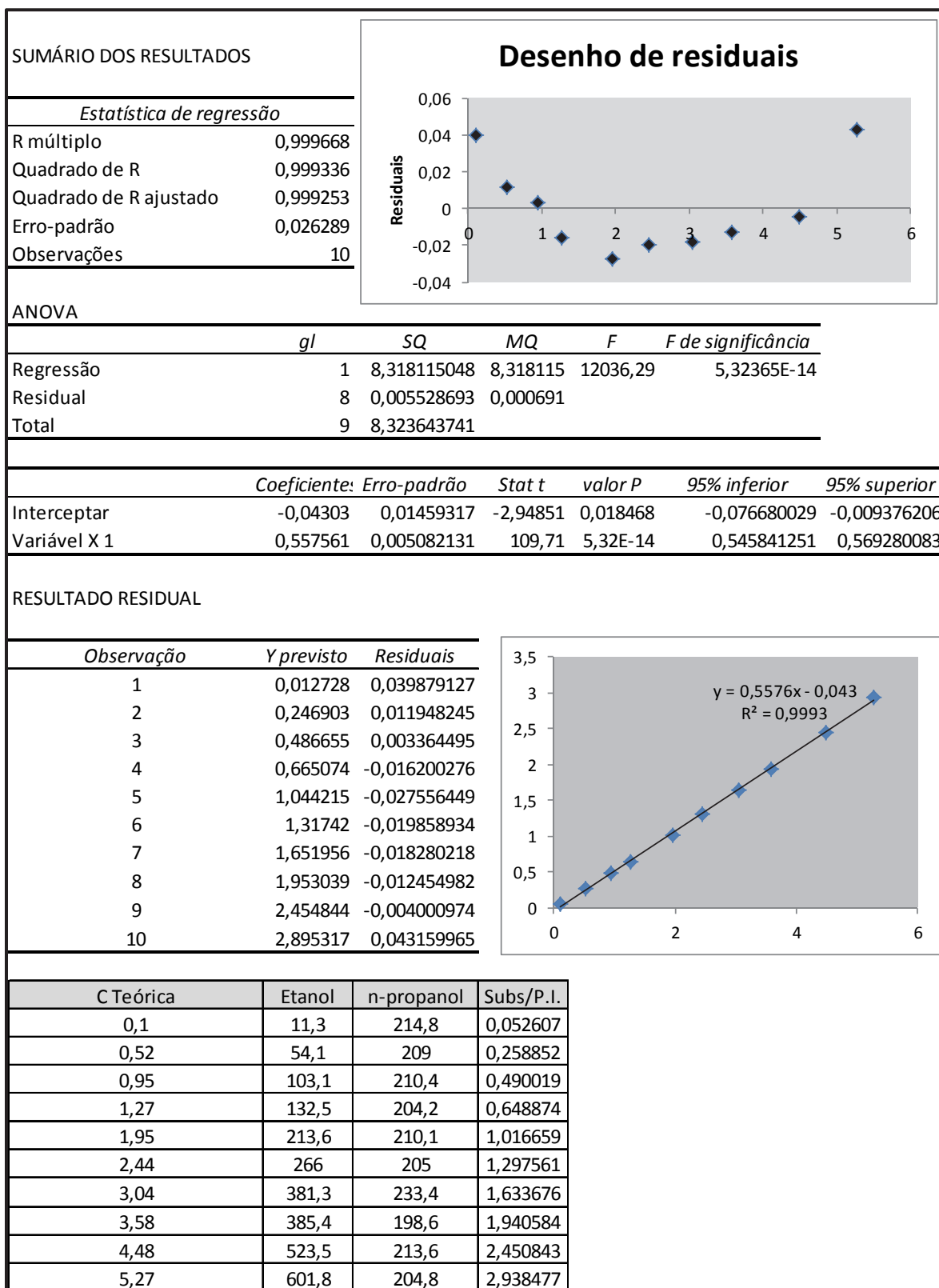
**Equipamento GCFI001 - Coluna FID1 A**



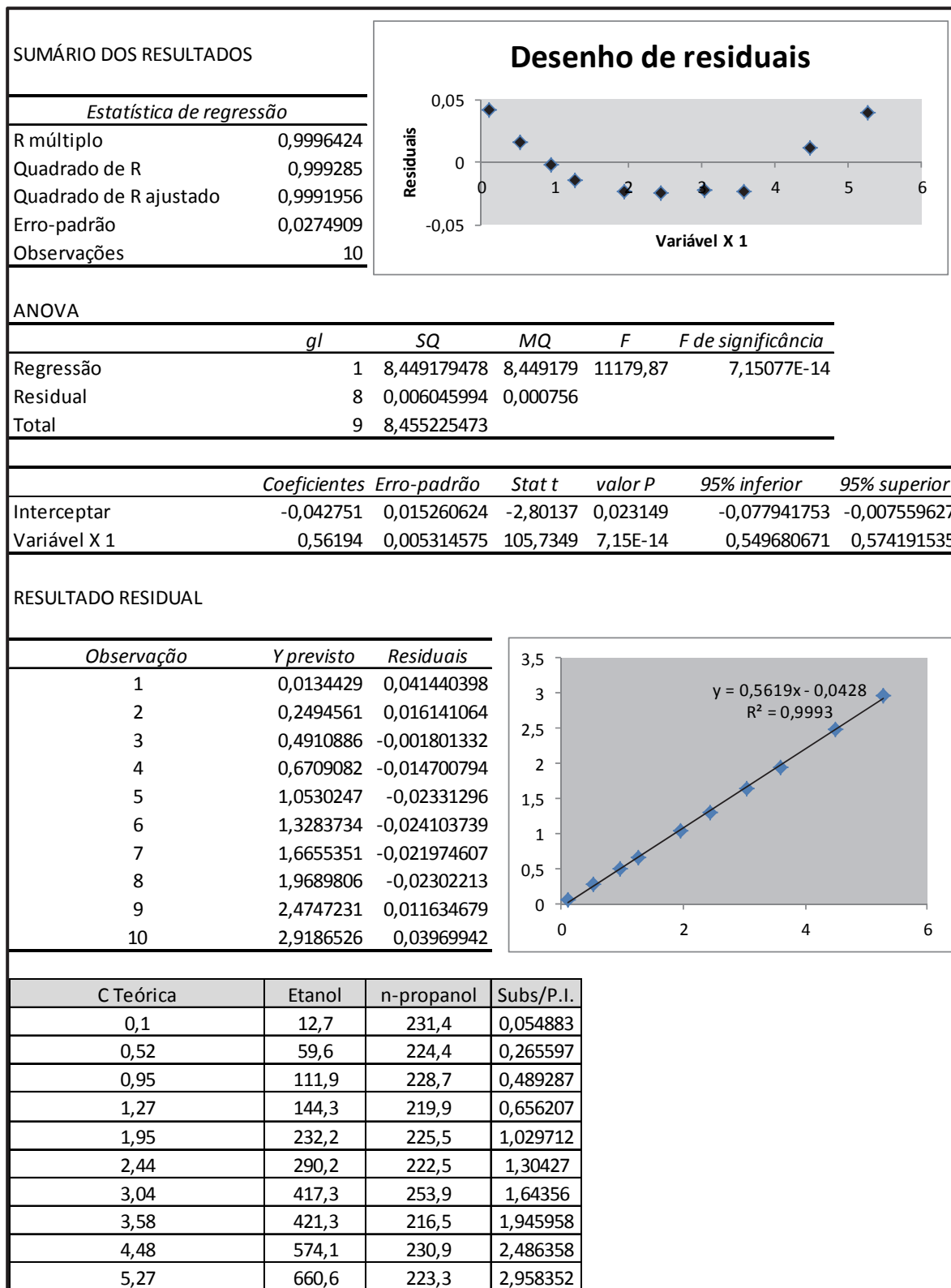
## Coluna FID2 B



**Equipamento GC-FID002 - Coluna Middle**



## Coluna Front



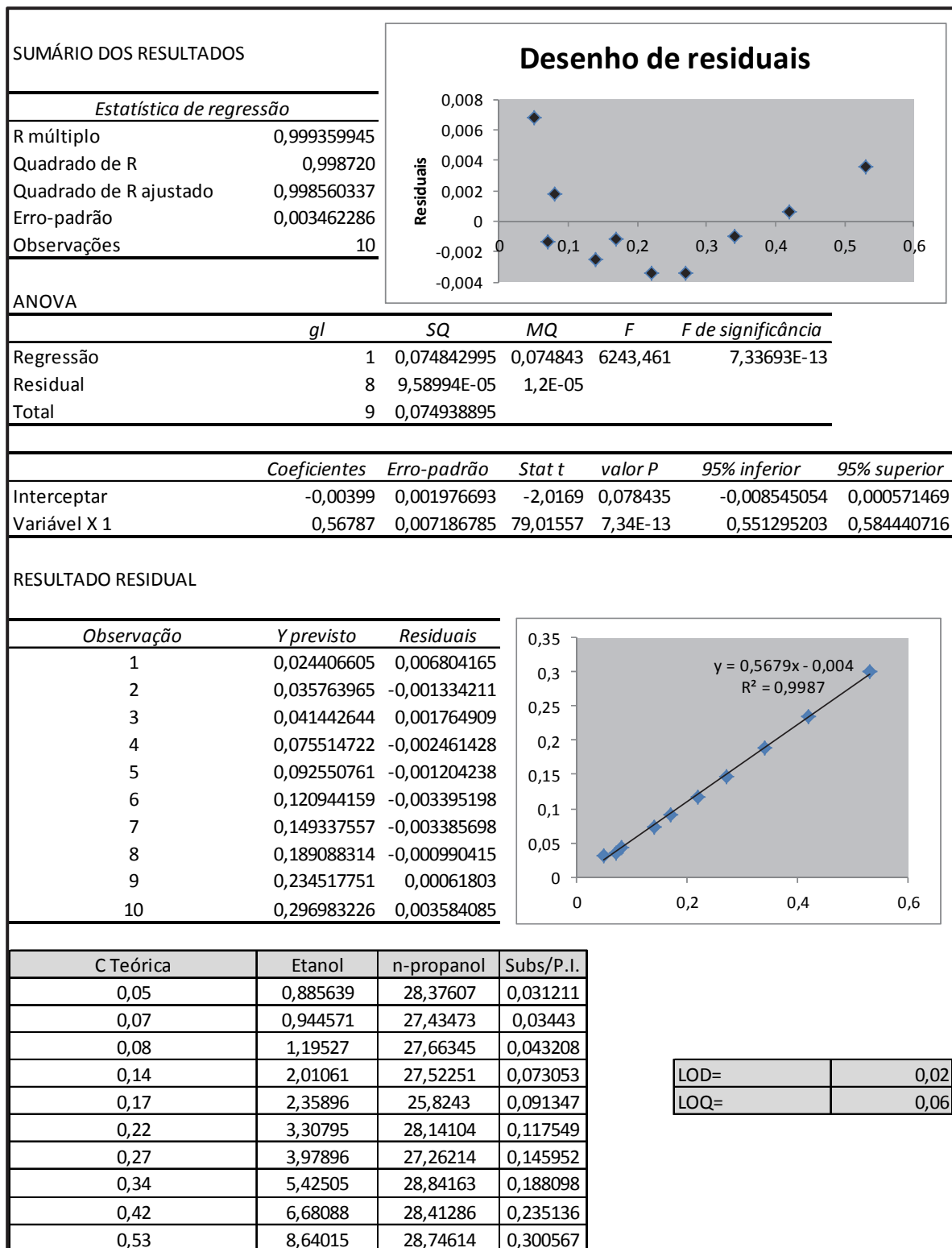


**Anexo-II**

**Equipamento GCFI001- Coluna FID1 A**

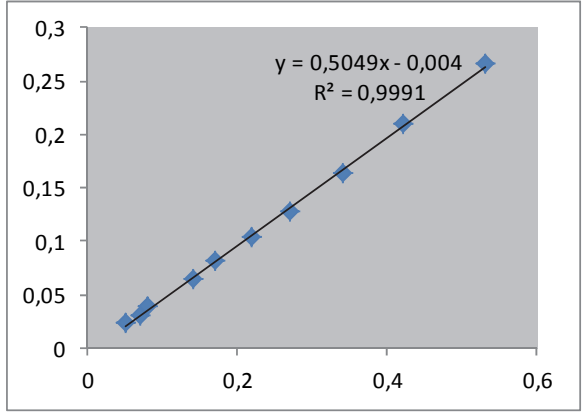
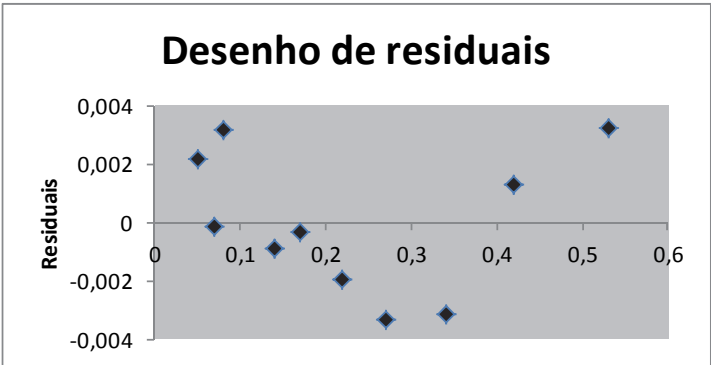
SUMÁRIO DOS RESULTADOS		ANOVA					RESULTADO RESIDUAL	
<i>Estadística de regressão</i>		<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significância</i>		
R múltiplo	0,998921957	1	0,077397049	0,077397	3704,427	5,90148E-12		
Quadrado de R	0,997845	8	0,000167145	2,09E-05				
Quadrado de R ajustado	0,99757571	9	0,077564194					
Erro-padrão	0,004570899							
Observações	10							
		<i>Coeficientes</i>	<i>Erro-padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor P</i>	<i>95% inferior</i>	<i>95% superior</i>	
		Interceptar	-0,00779	0,002609624	-2,98406	0,017492	-0,013805081 -0,001769474	
		Variável X 1	0,57748	0,009487973	60,86401	5,9E-12	0,555596757 0,599355367	
ANOVA								
RESULTADO RESIDUAL								
<i>Observação</i>	<i>Y previsto</i>	<i>Residuais</i>						
1	0,021086526	0,007423477						
2	0,032636047	0,000608543						
3	0,038410808	0,00261711						
4	0,073059371	-0,002421246						
5	0,090383653	-0,001984268						
6	0,119257456	-0,006122257						
7	0,148131259	-0,004625254						
8	0,188554584	-0,00259928						
9	0,234752669	0,002109575						
10	0,298275035	0,0049936						
<i>C Teórica</i>	<i>Etanol</i>	<i>n-propanol</i>	<i>Subs/P.I.</i>					
0,05	0,731277	25,64984	0,02851					
0,07	0,823279	24,7643	0,033245					
0,08	1,02744	25,04246	0,041028					
0,14	1,7557	24,85485	0,070638					
0,17	2,05997	23,30299	0,088399					
0,22	2,88322	25,48473	0,113135					
0,27	3,54086	24,67395	0,143506					
0,34	4,8552	26,1095	0,185955					
0,42	6,08199	25,67733	0,236862					
0,53	7,8931	26,02676	0,303269					
LOD=		0,03						
LOQ=		0,08						

## Coluna FID2 B



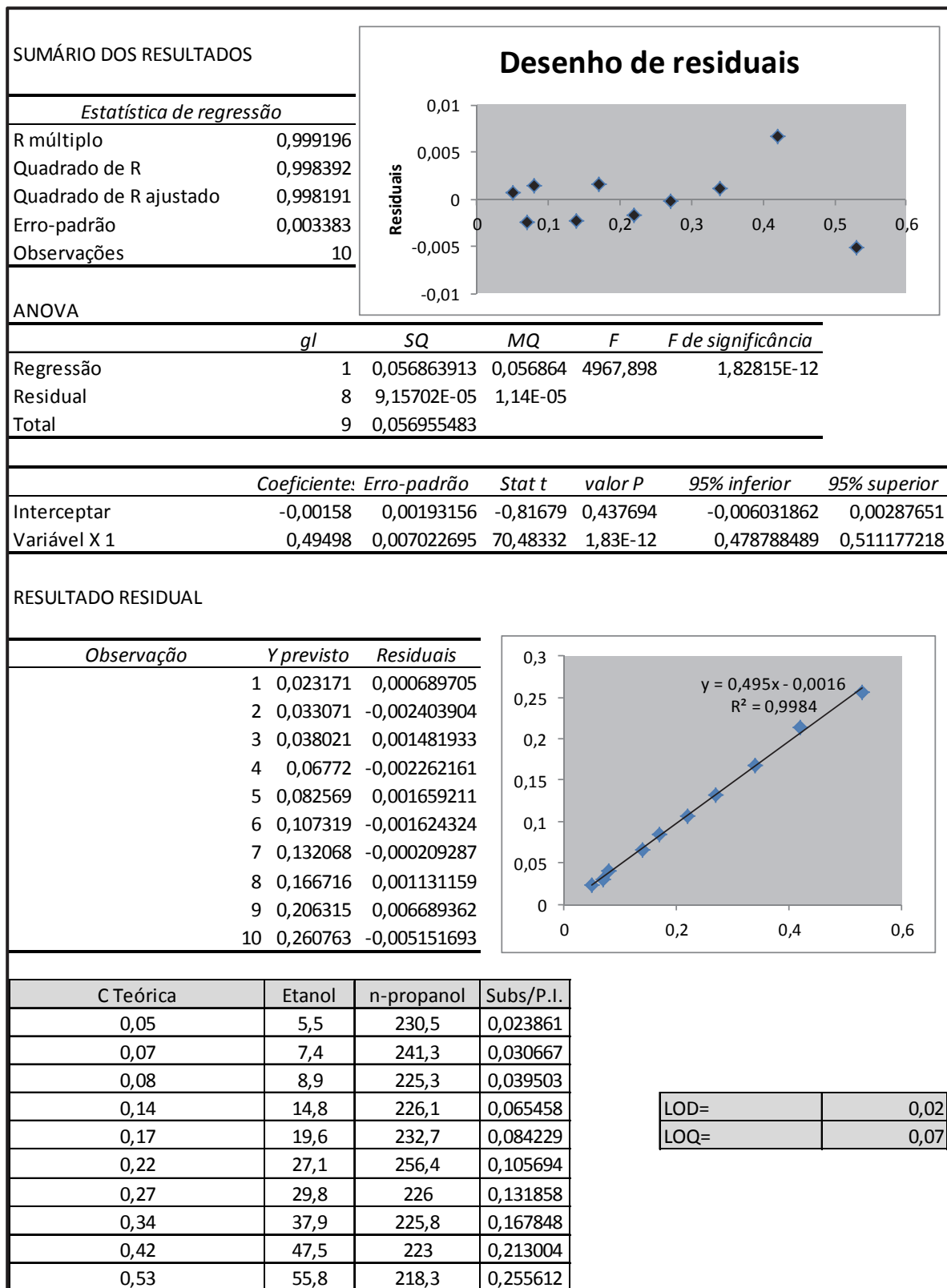
**Equipamento GCFI002-Coluna Middle**

SUMÁRIO DOS RESULTADOS					
<i>Estatística de regressão</i>					
R múltiplo	0,999556				
Quadrado de R	0,999111				
Quadrado de R ajustado	0,999				
Erro-padrão	0,002565				
Observações	10				
ANOVA					
	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significância</i>
Regressão	1	0,059169	0,059169	8993,983	1,70616E-13
Residual	8	5,26E-05	6,58E-06		
Total	9	0,059222			
	<i>Coefficiente erro-padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor P</i>	<i>95% inferior</i>	<i>95% superior</i>
Interceptar	-0,00400	0,001464	-2,73461	0,025662	-0,0073813 -0,000627641
Variável X 1	0,50492	0,005324	94,83661	1,71E-13	0,492640396 0,517195098
RESULTADO RESIDUAL					
<i>Observação</i>	<i>Y previsto</i>	<i>Residuais</i>			
1	0,021241	0,002189			
2	0,03134	-0,00013			
3	0,036389	0,003167			
4	0,066684	-0,00091			
5	0,081832	-0,00035			
6	0,107077	-0,00197			
7	0,132323	-0,00334			
8	0,167668	-0,00315			
9	0,208061	0,001275			
10	0,263602	0,00321			
<i>C Teórica</i>	<i>Etanol</i>	<i>n-propano</i>	<i>Subs/P.I.</i>		
0,05	5	213,4	0,02343		
0,07	7	224,3	0,031208		
0,08	8,2	207,3	0,039556		
0,14	13,8	209,8	0,065777		
0,17	17,6	216	0,081481		
0,22	25,1	238,8	0,105109		
0,27	27,1	210,1	0,128986		
0,34	34,5	209,7	0,164521		
0,42	43,5	207,8	0,209336		
0,53	61,1	229	0,266812		



LOD=	0,02
LOQ=	0,05

## Coluna Front



Anexo-III

Etanol - FD2 B						
	Repetib_TRR			Repetib_Áreas		
	TR (min)	TR pt (min)	TRR	Área	Área pt	A/Apt
0,49 g/L	2,428	3,94	0,616	7	23	0,289
	2,428	3,94	0,616	7	23	0,284
	2,427	3,939	0,616	8	26	0,302
	2,428	3,94	0,616	7	23	0,288
	2,428	3,941	0,616	7	23	0,288
	Média	0,616		Média	0,290	
	Desv. pad. (s)	0,000	Desv. pad. (s)	0,007		
	CV (%)	0,01	CV (%)	2,3		
1,19 g/L	2,425	3,941	0,615	16	23	0,722
	2,425	3,94	0,615	16	23	0,716
	2,425	3,940	0,615	17	23	0,712
	2,425	3,94	0,615	17	23	0,719
	2,425	3,939	0,616	18	25	0,735
	Média	0,615		Média	0,721	
	Desv. pad. (s)	0,000	Desv. pad. (s)	0,009		
	CV (%)	0,02	CV (%)	1,2		

Etanol - FD1 A						
	Repetib_TRR			Repetib_Áreas		
	TR (min)	TR pt (min)	TRR	Área	Área pt	A/Apt
0,49 g/L	2,612	4,625	0,565	6	21	0,290
	2,612	4,625	0,565	6	21	0,286
	2,613	4,625	0,565	7	23	0,304
	2,612	4,625	0,565	6	21	0,286
	2,612	4,626	0,565	6	21	0,291
	Média	0,565		Média	0,291	
	Desv. pad. (s)	0,000	Desv. pad. (s)	0,007		
	CV (%)	0,02	CV (%)	2,5		
1,19 g/L	2,608	4,625	0,564	15	21	0,732
	2,609	4,625	0,564	15	20	0,735
	2,609	4,626	0,564	15	21	0,737
	2,609	4,625	0,564	16	21	0,742
	2,609	4,625	0,564	17	23	0,756
	Média	0,564		Média	0,740	
	Desv. pad. (s)	0,000	Desv. pad. (s)	0,009		
	CV (%)	0,02	CV (%)	1,2		

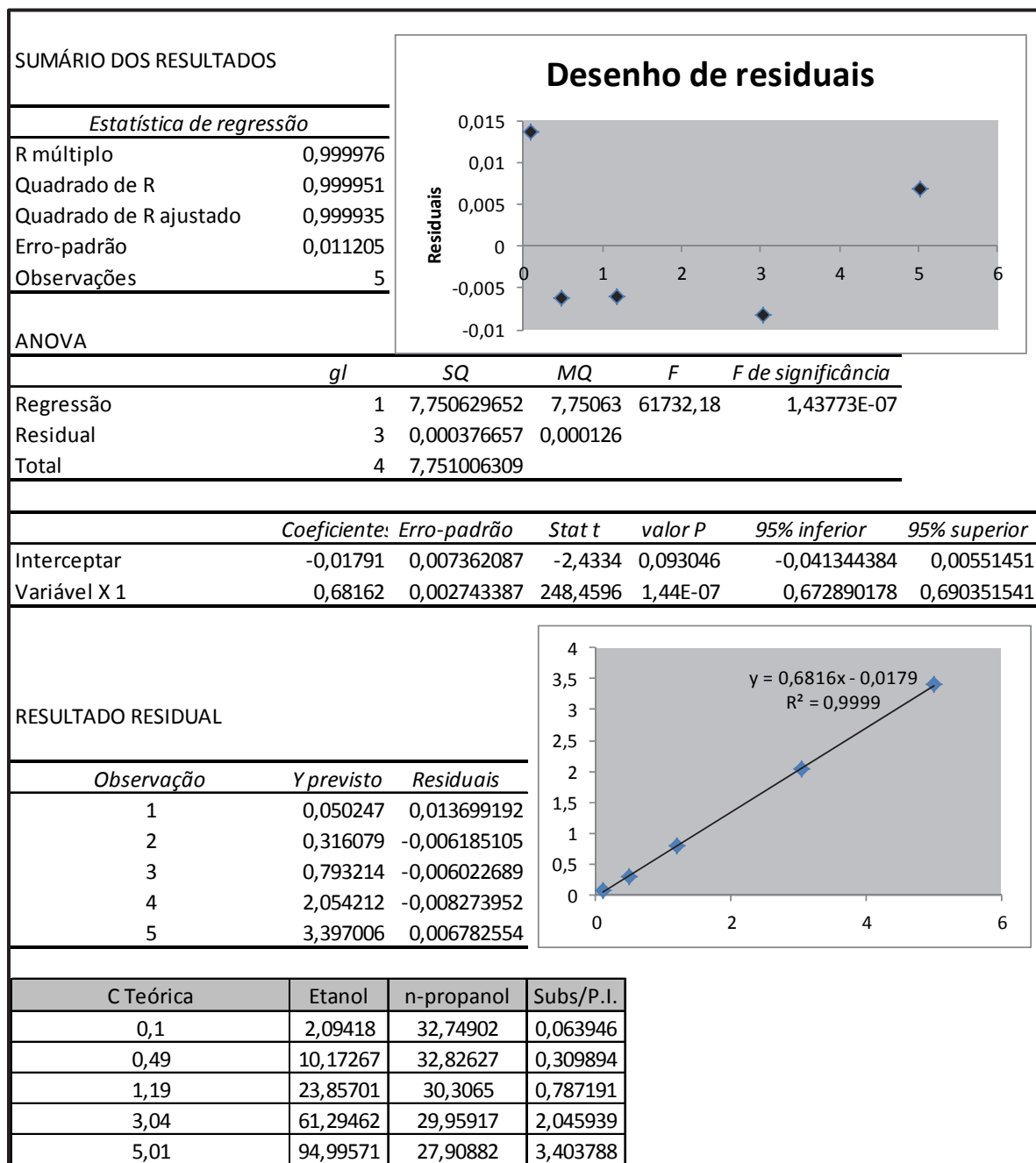
Etanol - Middle						
	Repetib_TRR			Repetib_Áreas		
	TR (min)	TR pt (min)	TRR	Área	Área pt	A/Apt
0,49g/L	2,43	4,9083	0,495	54	205	0,260
	2,43	4,9083	0,495	56	218	0,258
	2,4283	4,9083	0,495	53	204	0,259
	2,4283	4,9083	0,495	54	206	0,259
	2,4283	4,9083	0,495	55	211	0,259
	Média	0,495		Média	0,259	
	Desv. pad. (s)	0,000	Desv. pad. (s)	0,001		
	CV (%)	0,0	CV (%)	0,4		
1,19g/L	2,4267	4,9083	0,494	132	206	0,641
	2,4267	4,9067	0,495	137	212	0,645
	2,4283	4,908	0,495	139	219	0,636
	2,4283	4,9083	0,495	134	210	0,639
	2,4283	4,9083	0,495	131	206	0,637
	Média	0,495		Média	0,640	
	Desv. pad. (s)	0,000	Desv. pad. (s)	0,004		
	CV (%)	0,0	CV (%)	0,6		

Etanol - Front						
	Repetib_TRR			Repetib_Áreas		
	TR (min)	TR pt (min)	TRR	Área	Área pt	A/Apt
0,49g/L	1,3783	1,9817	0,696	59	223	0,264
	1,3767	1,9817	0,695	62	233	0,264
	1,3767	1,9817	0,695	58	219	0,264
	1,3767	1,9817	0,695	58	220	0,265
	1,3767	1,9817	0,695	60	228	0,262
	Média	0,695		Média	0,264	
	Desv. pad. (s)	0,000	Desv. pad. (s)	0,001		
	CV (%)	0,1	CV (%)	0,4		
1,19g/L	1,375	1,9817	0,694	144	222	0,651
	1,3733	1,98	0,694	148	229	0,648
	1,375	1,982	0,694	152	235	0,647
	1,375	1,9817	0,694	146	227	0,643
	1,375	1,9817	0,694	143	222	0,643
	Média	0,694		Média	0,646	
	Desv. pad. (s)	0,000	Desv. pad. (s)	0,003		
	CV (%)	0,0	CV (%)	0,5		

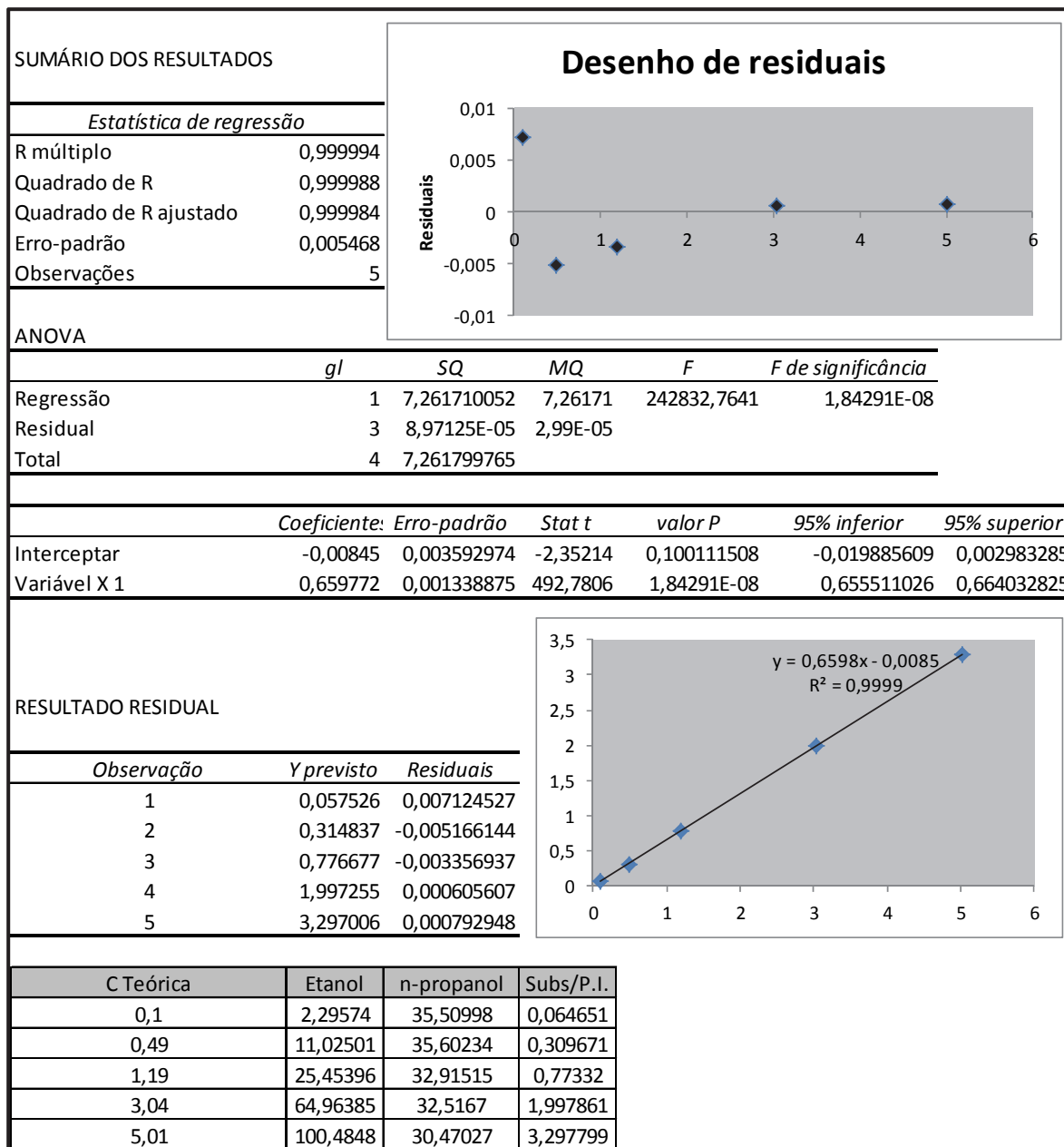


## Anexo-IV

### Equipamento GCFI001 / Primeiro dia (10/12/12) - Coluna FID1 A

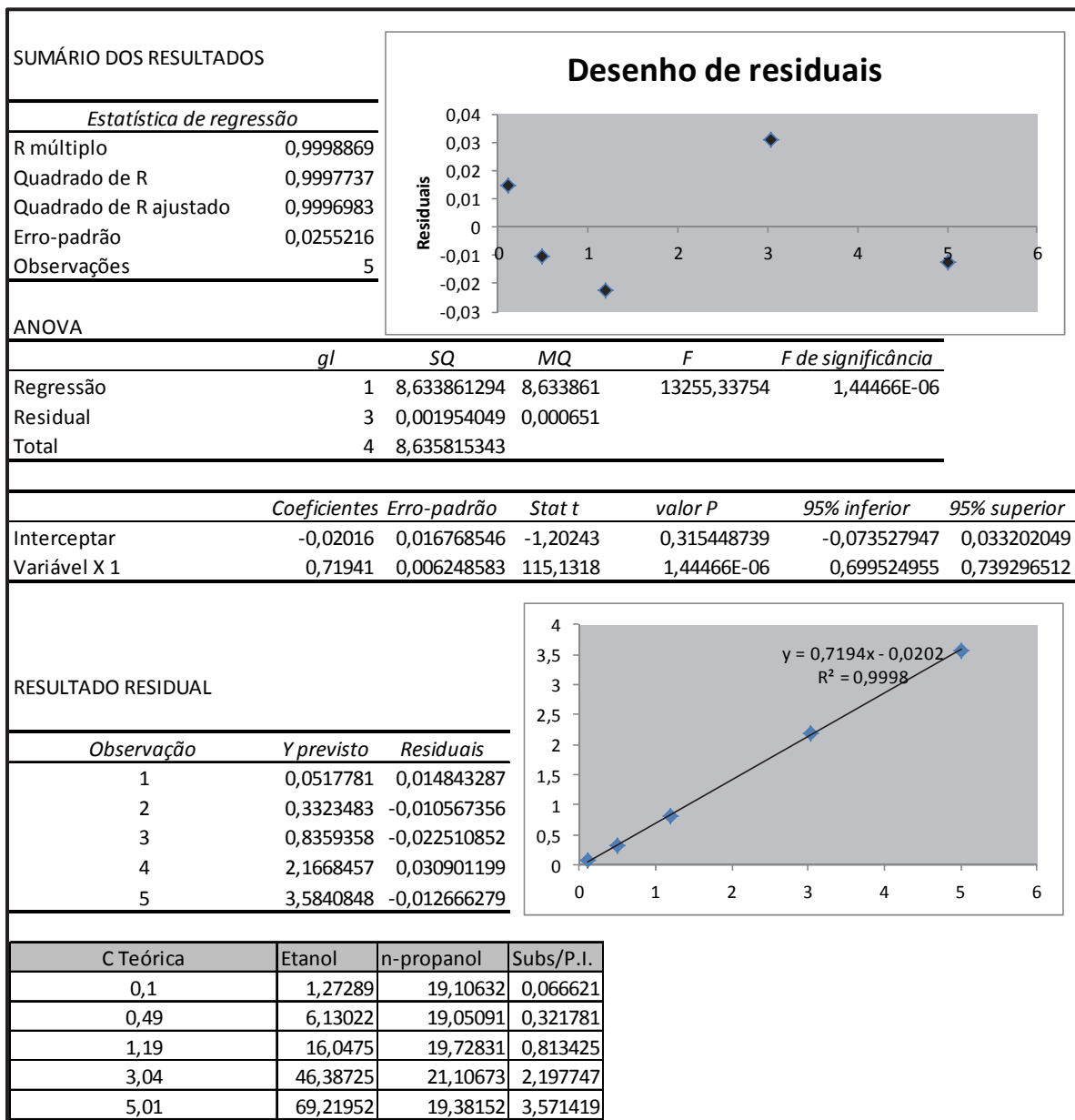


## Coluna FID2 B

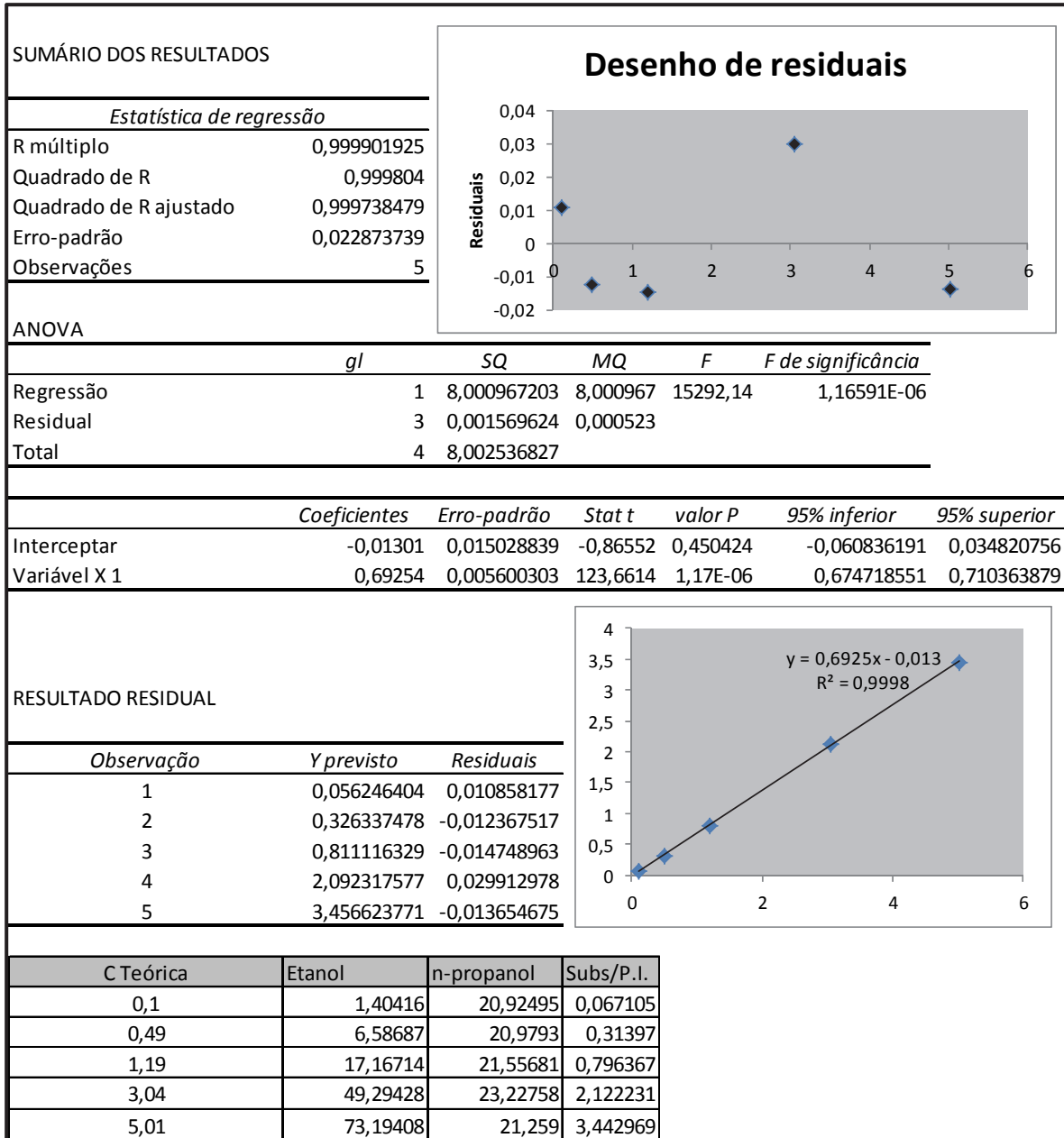




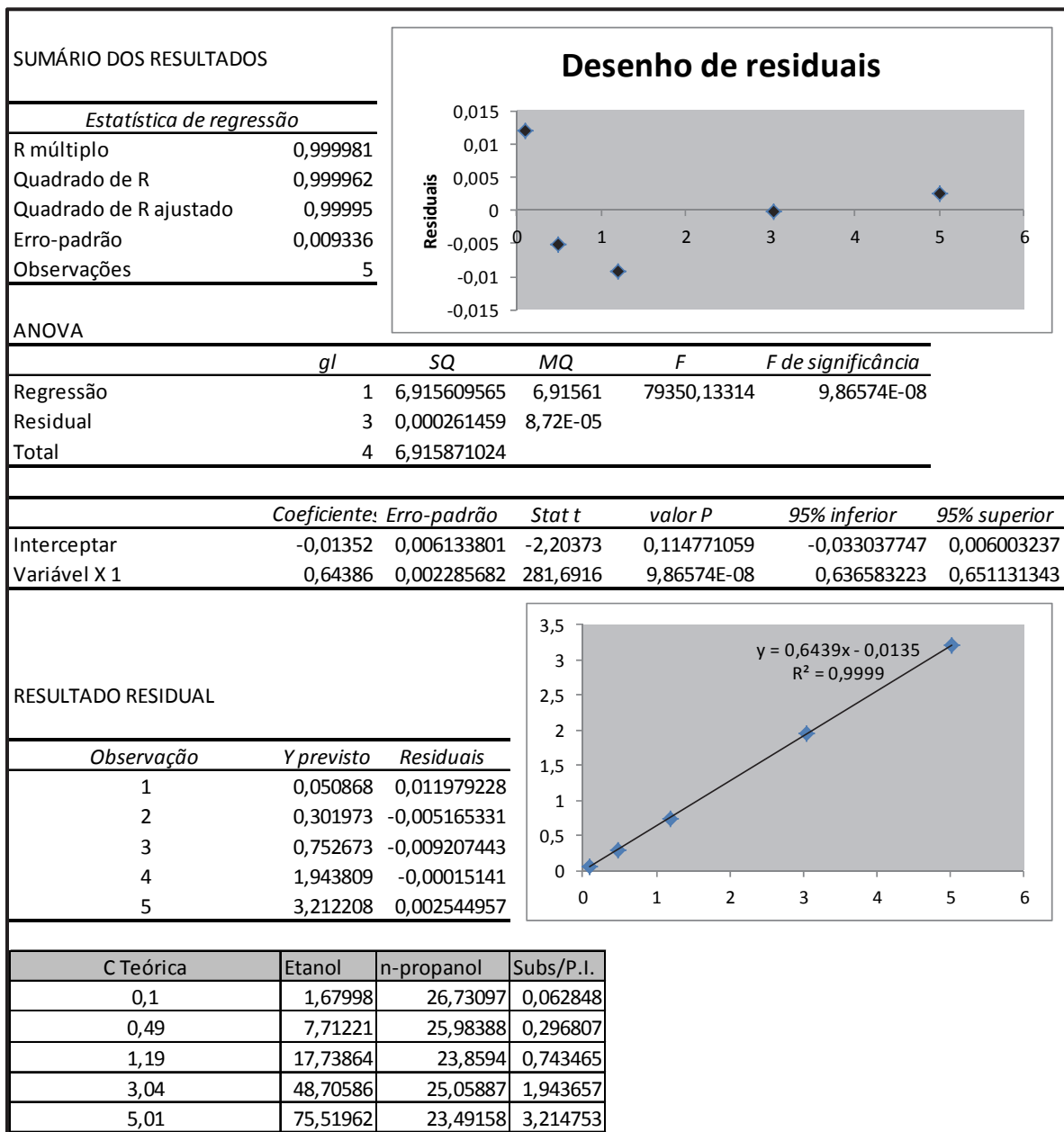
Segundo dia (11/12/12) - Coluna FID1 A



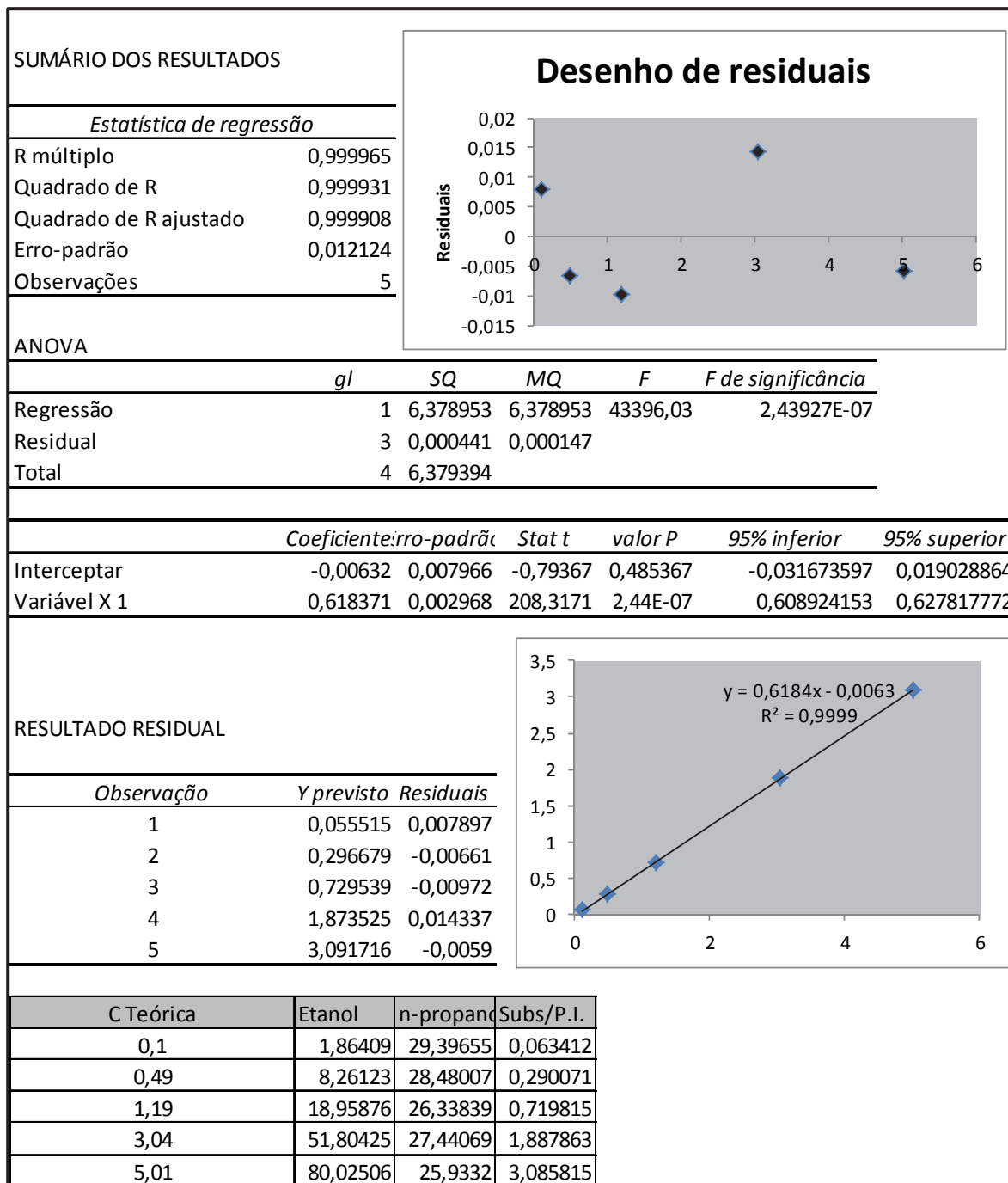
## Coluna FID2 B



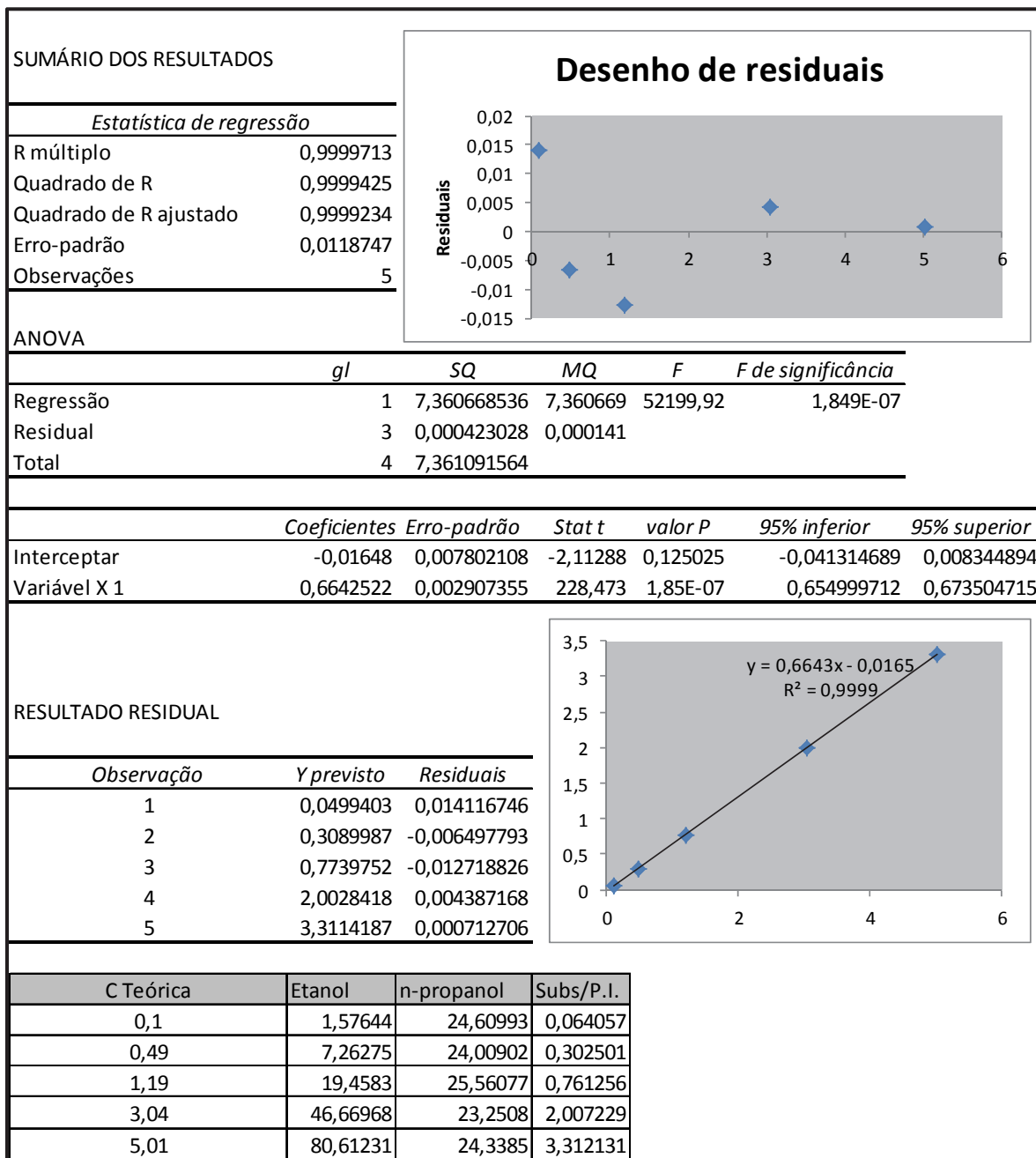
Terceiro dia (12/12/12) - Coluna FID1 A



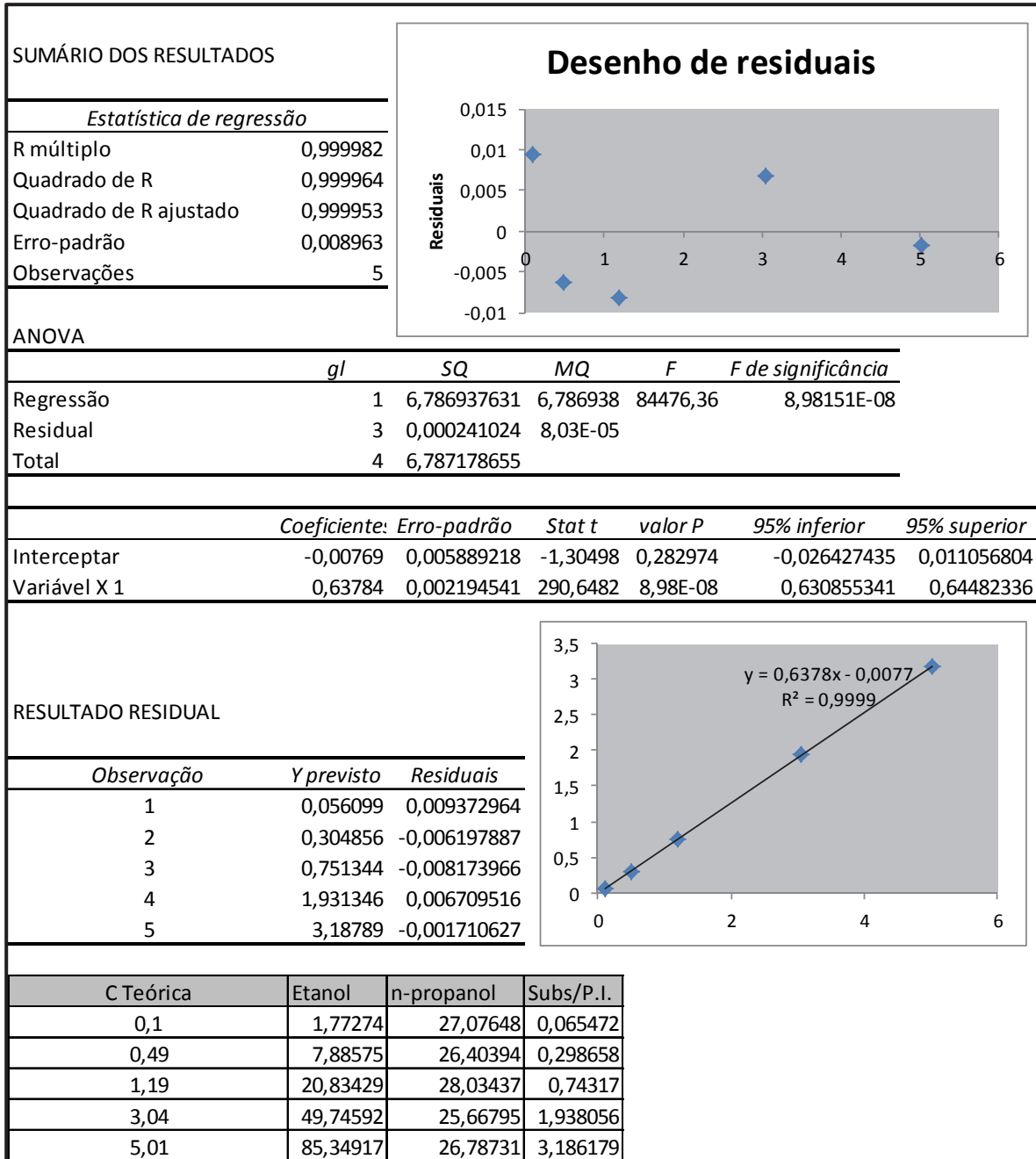
## Coluna FID2 B



Quarto dia (13/12/12) - Coluna FID1 A

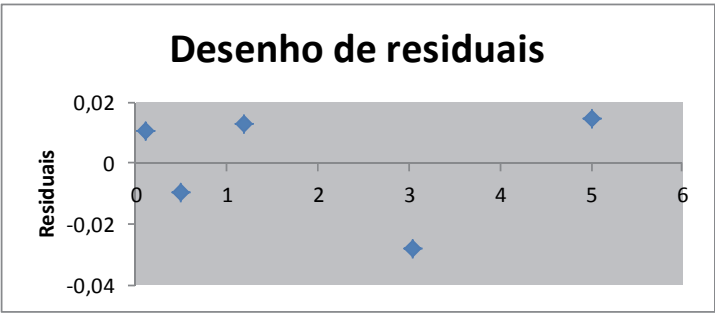


## Coluna FID2 B



Quinto dia (17/12/12) - Coluna FID1 A

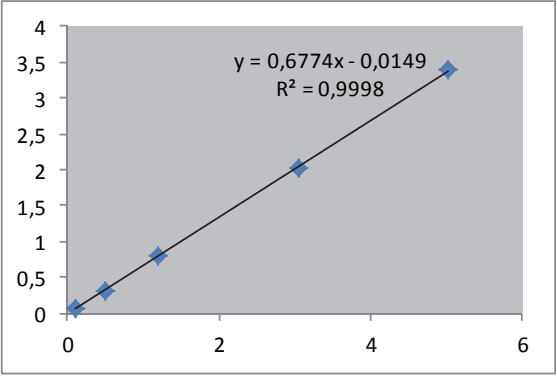
SUMÁRIO DOS RESULTADOS	
<i>Estatística de regressão</i>	
R múltiplo	0,999912
Quadrado de R	0,99982
Quadrado de R ajustado	0,999764
Erro-padrão	0,021238
Observações	5



ANOVA					
	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significância</i>
Regressão	1	7,654997022	7,654997	16971,49	9,97238E-07
Residual	3	0,001353151	0,000451		
Total	4	7,656350174			

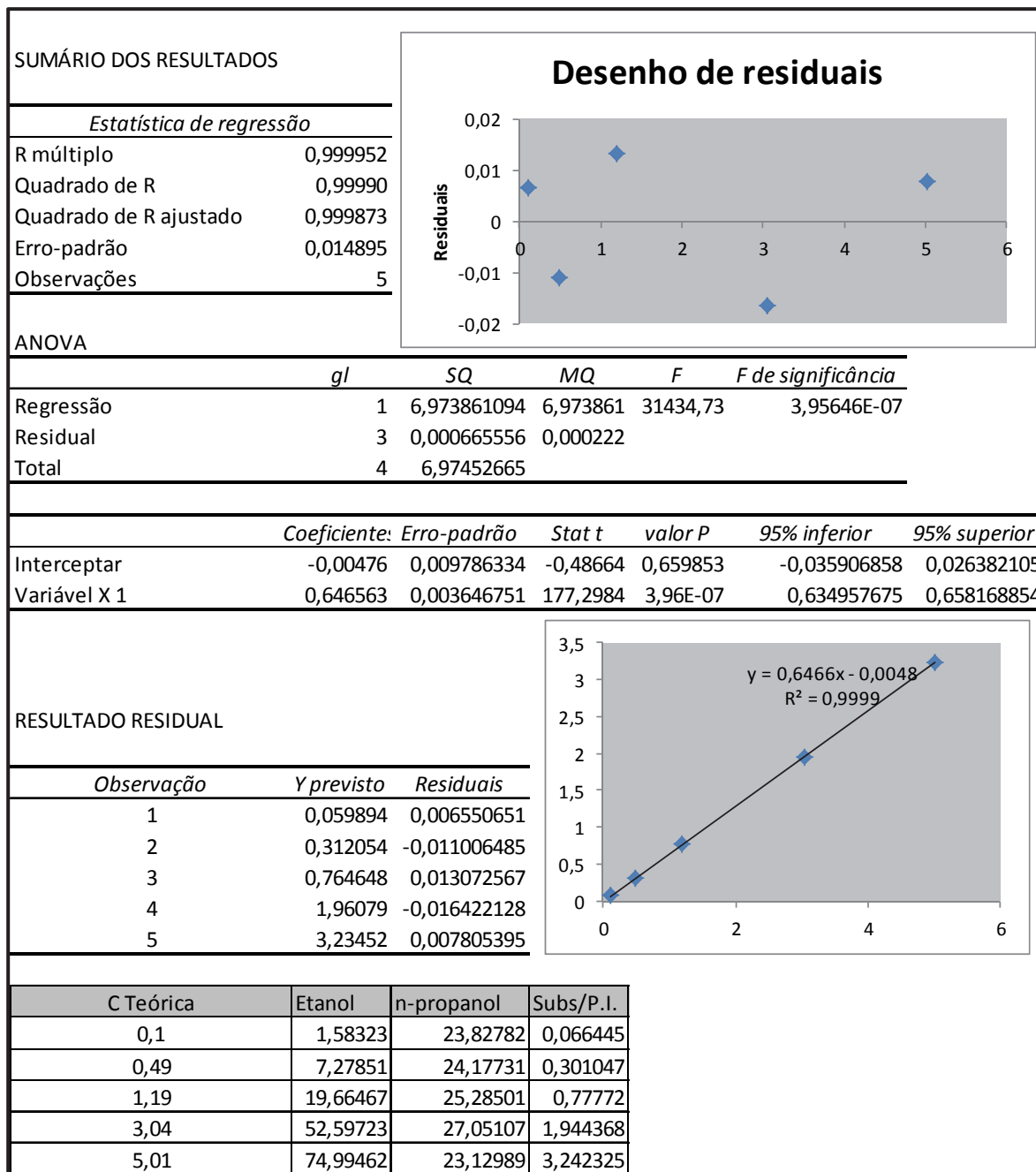
	<i>Coefficiente: Erro-padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor P</i>	<i>95% inferior</i>	<i>95% superior</i>
Interceptar	-0,01495	0,013954068	-1,07122	0,362588	-0,059355969 0,029460178
Variável X 1	0,67740	0,005199804	130,2747	9,97E-07	0,660854556 0,693950748

RESULTADO RESIDUAL		
<i>Observação</i>	<i>Y previsto</i>	<i>Residuais</i>
1	0,052792	0,010289473
2	0,316979	-0,009822558
3	0,791161	0,012750259
4	2,044356	-0,027832154
5	3,378839	0,014614979



C Teórica	Etanol	n-propanol	Subs/P.I.
0,1	1,34756	21,36209	0,063082
0,49	6,65455	21,66499	0,307157
1,19	18,24273	22,69246	0,803912
3,04	49,1146	24,35607	2,016524
5,01	70,18098	20,68128	3,393454

## Coluna FID2 B





Validação do etanol, precisão intermédia tratamento final de dados dos equipamento GCFI001.

**Coluna FID1 A**

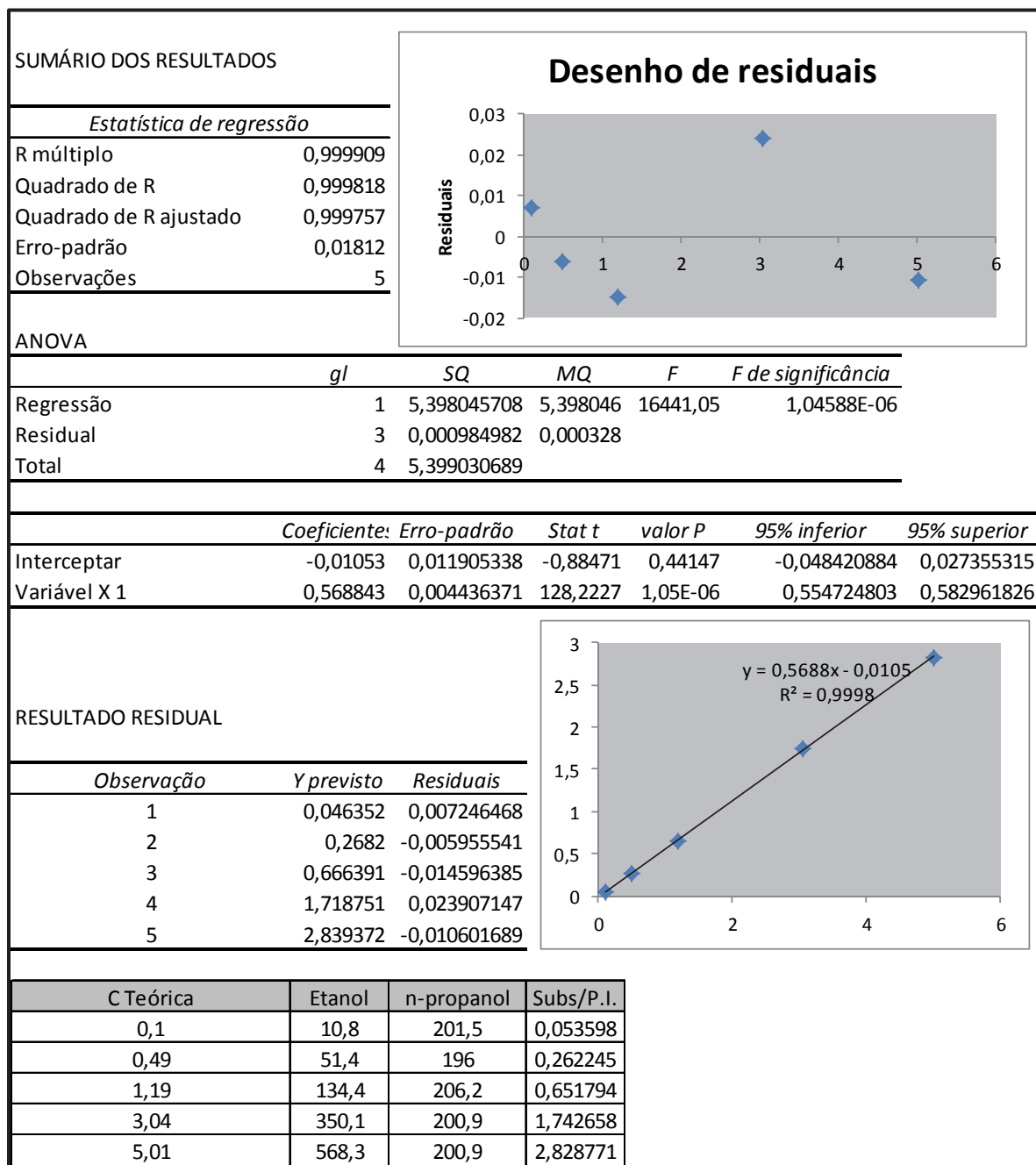
Data	1º DIA (10/12/12)	2º DIA (11/12/12)	3º DIA (12/12/12)	4º DIA (13/12/12)	5º DIA (17/12/12)
<b>R<sup>2</sup></b>	0.99995	0.99977	0.99996	0.99994	0.99982
<b>Declive</b>	0.68162	0.71941	0.64386	0.66425	0.6774
<b>Y0</b>	-0.01791	-0.02016	-0.01352	-0.01648	-0.01495
<b>Gama Baixa 0.49 g/L</b>					
<b>Replicado 1</b>	0.468	0.469	0.482	0.461	0.451
<b>Replicado 2</b>	0.467	0.482	0.47	0.469	0.445
<b>Replicado 3</b>	0.468	0.473	0.464	0.46	0.471
<b>Média</b>	0.468	0.475	0.472	0.463	0.455
<b>Recuperação</b>	95.424	96.936	96.32	94.543	92.912
<b>Concenc. Média</b>	<b>0.47</b>				
<b>Recuperação Média</b>	<b>95.23</b>				
<b>Repetibilidade (S<sub>r</sub>)</b>	<b>0.01</b>				
<b>Between Run (S<sub>run</sub>)</b>	<b>0.01</b>				
<b>Precisão intermédia</b>	<b>0.01</b>				
<b>C.V (%)</b>	<b>1.66</b>				
<b>Gama média/alta 1.19 g/L</b>					
<b>Replicado 1</b>	1.12	1.13	1.15	1.12	1.1
<b>Replicado 2</b>	1.11	1.16	1.14	1.1	1.11
<b>Replicado 3</b>	1.12	1.14	1.11	1.1	1.11
<b>Média</b>	1.12	1.15	1.13	1.1	1.11
<b>Recuperação</b>	93.94	96.31	95.29	92.69	93.01
<b>Concenc. Média</b>	<b>1.12</b>				
<b>Recuperação Média</b>	<b>94.24</b>				
<b>Repetibilidade (S<sub>r</sub>)</b>	<b>0.01</b>				
<b>Between Run (S<sub>run</sub>)</b>	<b>0.02</b>				
<b>Precisão intermédia</b>	<b>0.02</b>				
<b>C.V (%)</b>	<b>1.63</b>				
<b>C.Vpool</b>	<b>2.72</b>				

## Coluna FID2 B

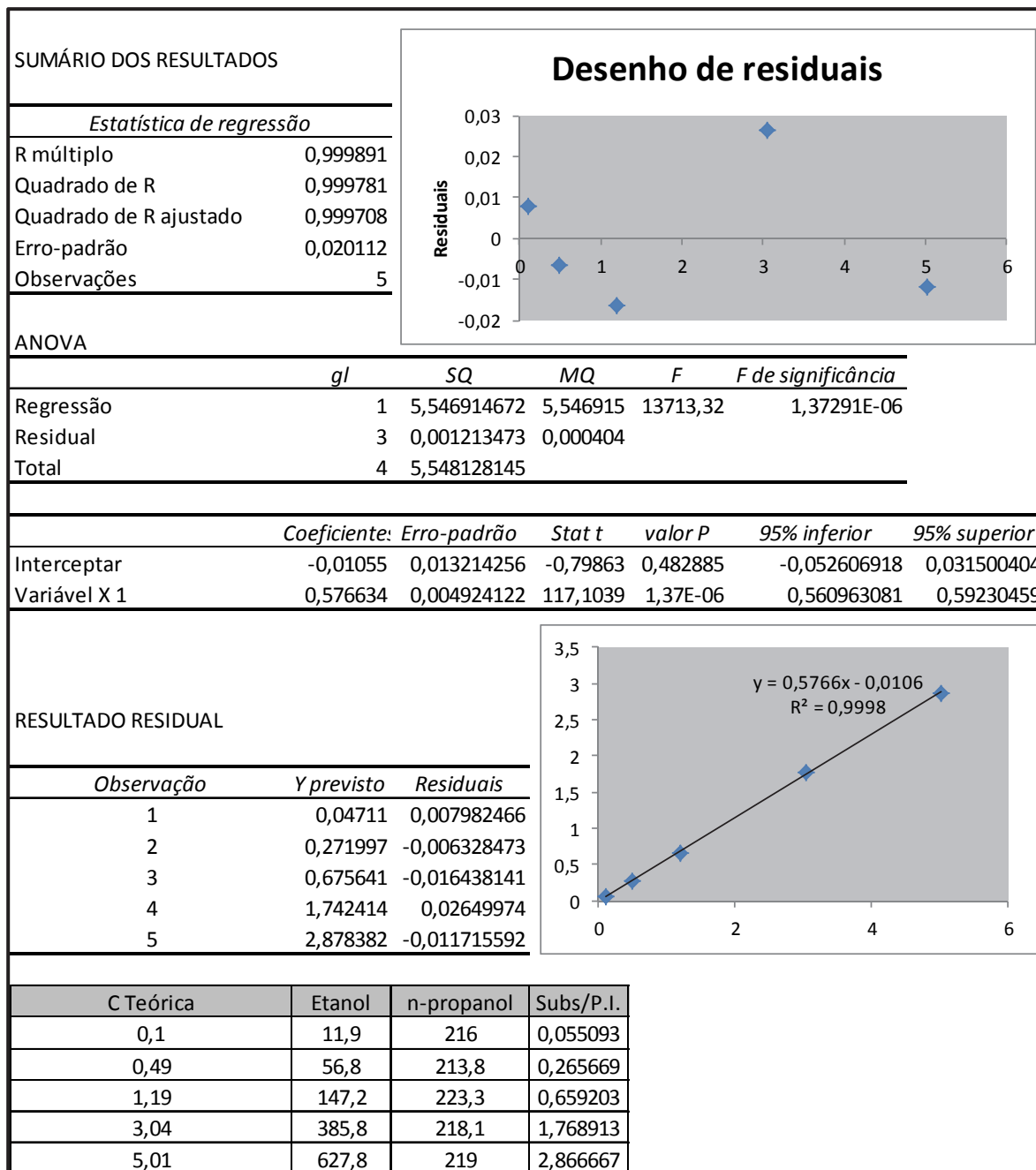
Data	1º DIA (10/12/12)	2º DIA (11/12/12)	3º DIA (12/12/12)	4º DIA (13/12/12)	5º DIA (17/12/12)
R <sup>2</sup>	0.99999	0.9998	0.99993	0.99996	0.9999
Declive	0.65977	0.69254	0.61837	0.63784	0.64656
Y0	-0.00845	-0.01301	-0.00632	-0.00769	-0.00476
<b>Gama Baixa 0.49 g/L</b>					
Replicado 1	0.46	0.47	0.49	0.46	0.46
Replicado 2	0.46	0.49	0.47	0.47	0.45
Replicado 3	0.47	0.48	0.47	0.46	0.47
Média	0.46	0.48	0.47	0.47	0.46
Recuperação	94.61	98.44	96.74	95.04	93.58
Concenc. Média	<b>0.47</b>				
Recuperação Média	<b>95.68</b>				
Repetibilidade (S <sub>r</sub> )	<b>0.01</b>				
Between Run (S <sub>run</sub> )	<b>0.01</b>				
Precisão intermédia	<b>0.01</b>				
C.V (%)	<b>2</b>				
<b>Gama média/alta 1.19 g/L</b>					
Replicado 1	1.13	1.14	1.16	1.13	1.12
Replicado 2	1.12	1.17	1.14	1.1	1.12
Replicado 3	1.11	1.15	1.12	1.11	1.11
Média	1.12	1.15	1.14	1.11	1.12
Recuperação	93.94	96.91	95.98	93.33	93.79
Concenc. Média	<b>1.13</b>				
Recuperação Média	<b>94.79</b>				
Repetibilidade (S <sub>r</sub> )	<b>0.01</b>				
Between Run (S <sub>run</sub> )	<b>0.02</b>				
Precisão intermédia	<b>0.02</b>				
C.V (%)	<b>1.65</b>				
<b>C.Vpool</b>	<b>2.96</b>				

## Equipamento GCFI002

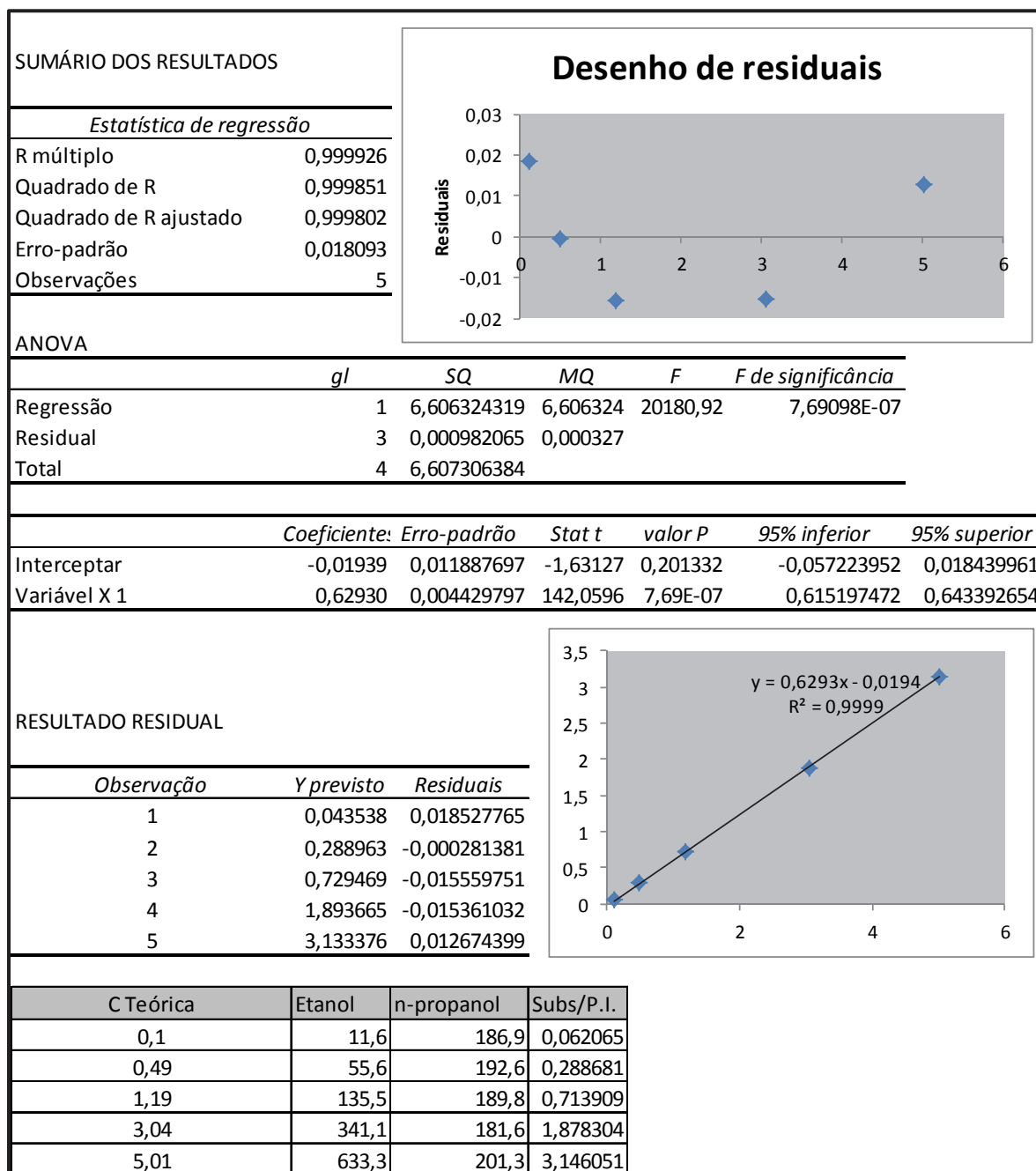
Primeiro dia (07/12/12) - Coluna *Middle*



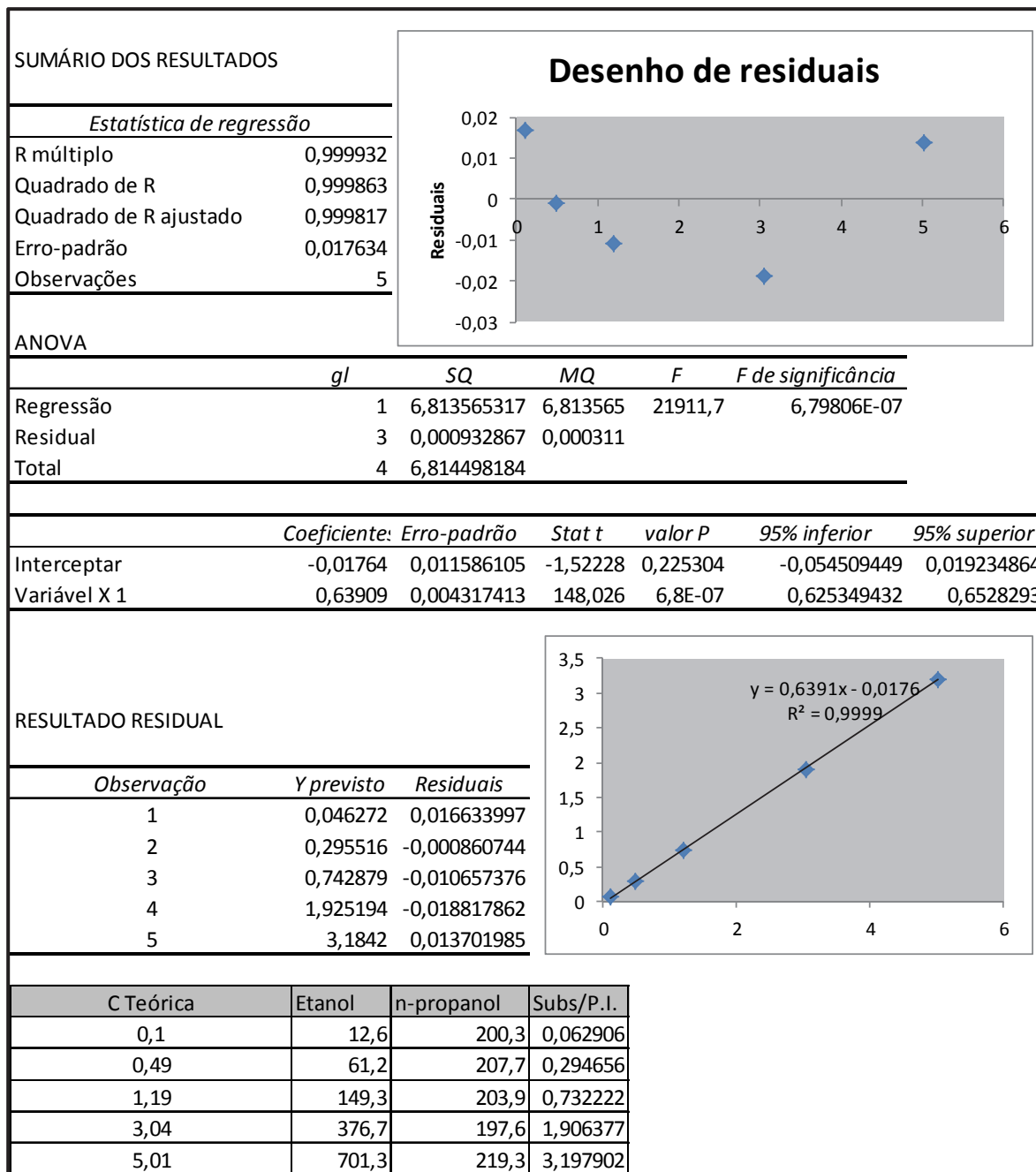
## Coluna Front



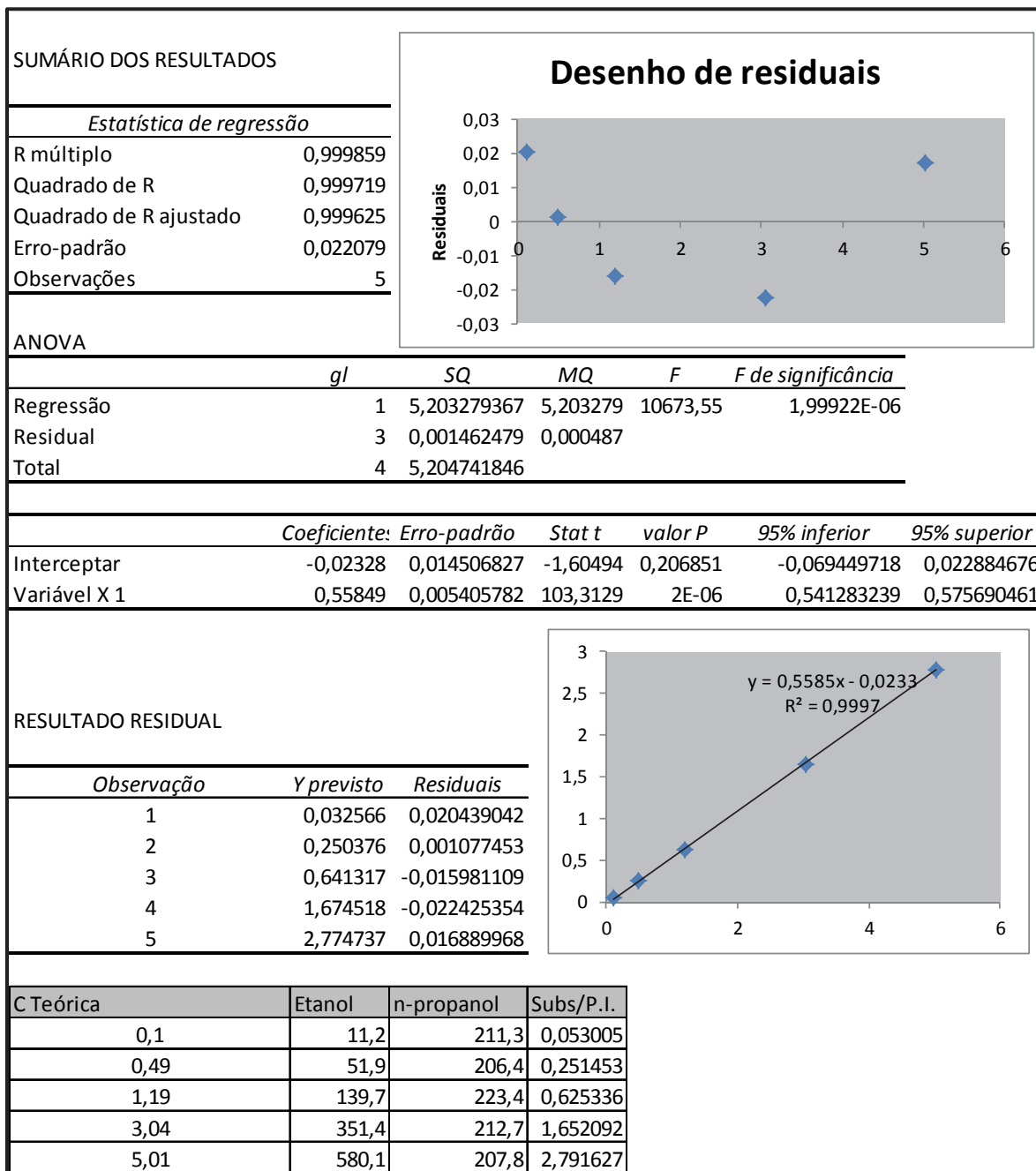
Segundo dia (11/12/12) Coluna *Middle*



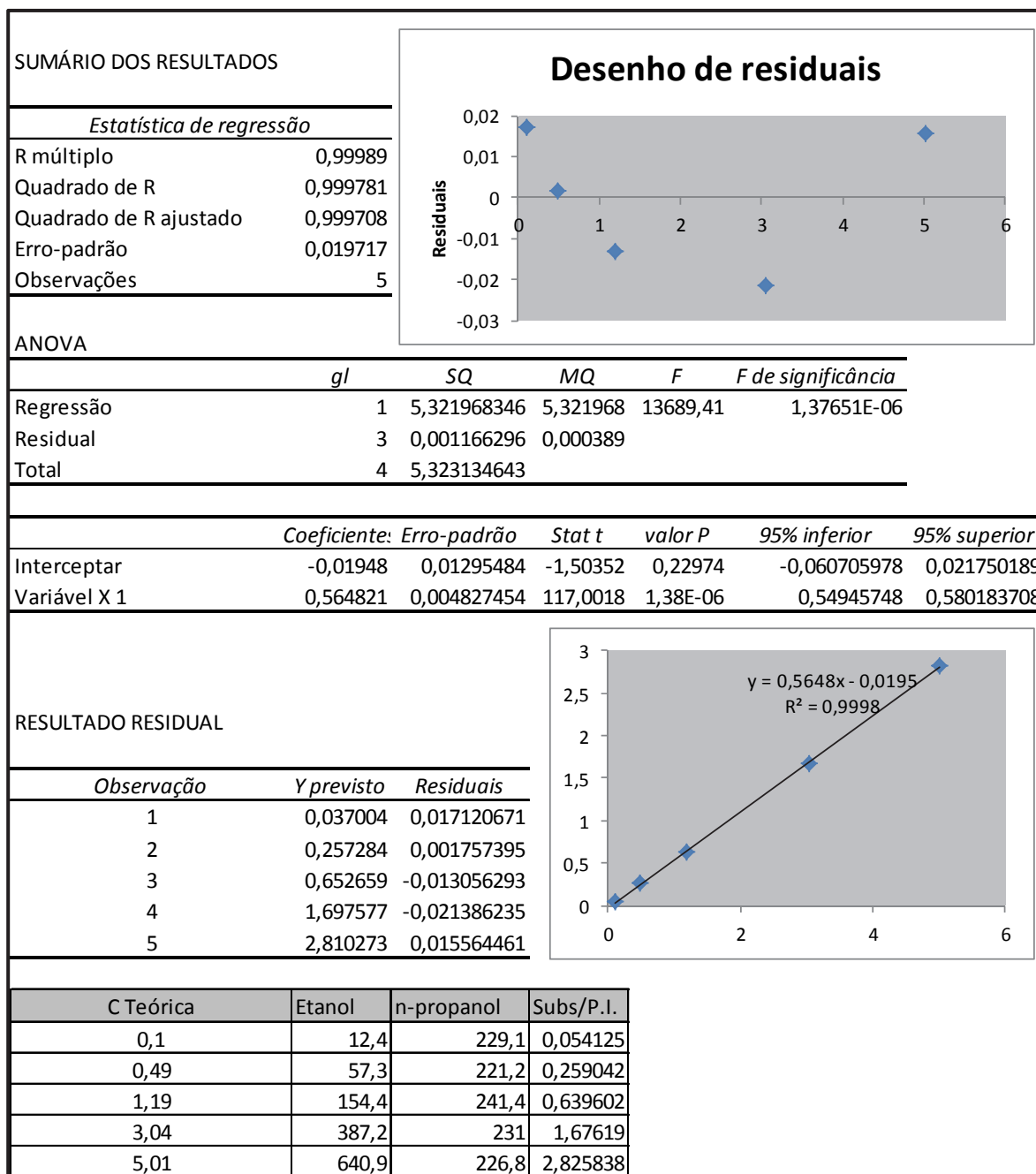
## Coluna front



Terceiro dia (12/12/12) Coluna Middle



## Coluna Front





Quarto dia (13/12/12) Coluna Middle

SUMÁRIO DOS RESULTADOS	
<i>Estatística de regressão</i>	
R múltiplo	0,999952
Quadrado de R	0,999904
Quadrado de R ajustado	0,999871
Erro-padrão	0,012927
Observações	5

**Desenho de residuais**

ANOVA					
	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significância</i>
Regressão	1	5,19830606	5,198306	31109,01	4,01875E-07
Residual	3	0,000501299	0,000167		
Total	4	5,198807359			

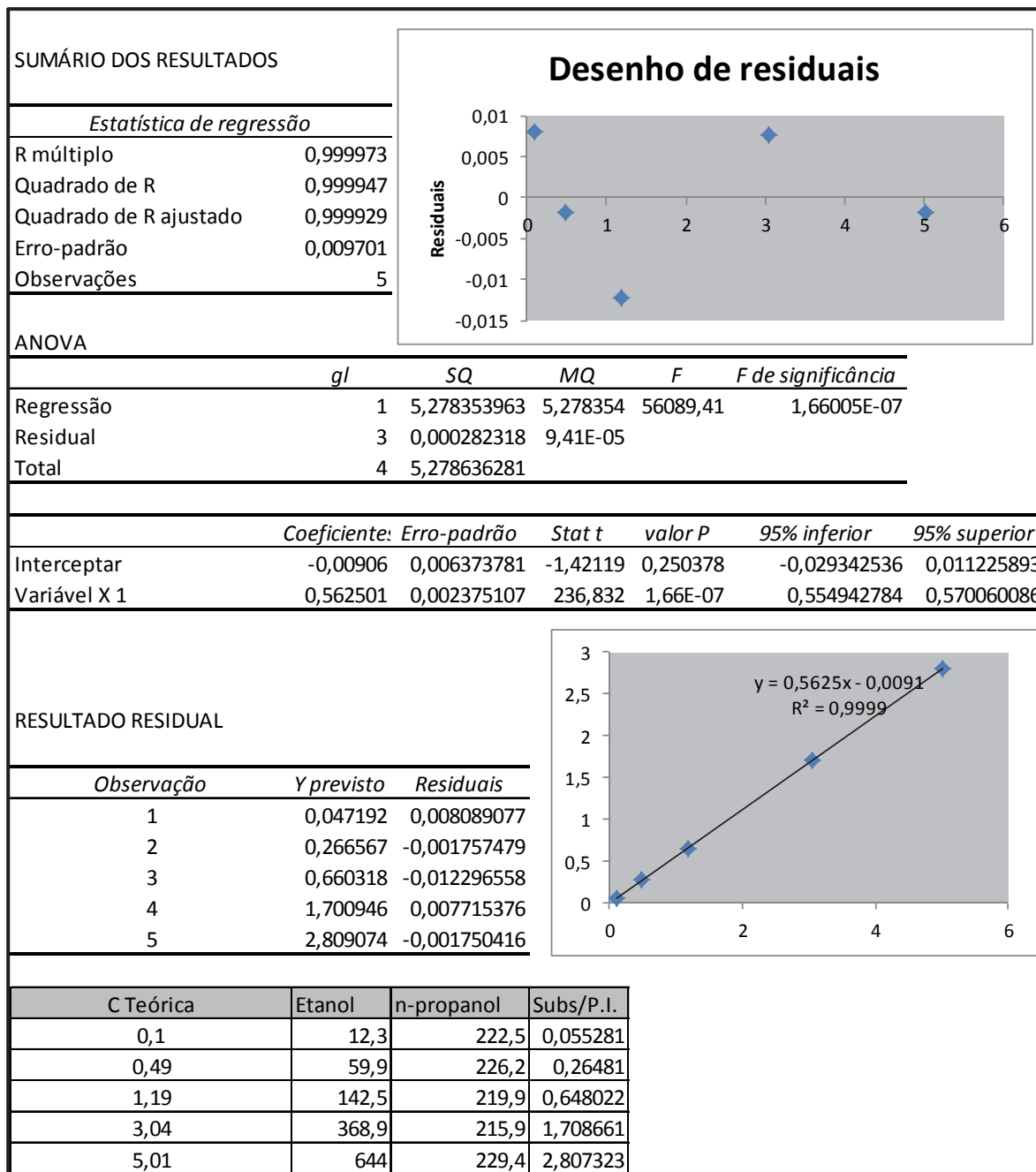
	<i>Coefficiente: Erro-padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor P</i>	<i>95% inferior</i>	<i>95% superior</i>
Interceptar	-0,01571	0,008493293	-1,84929	0,161539	-0,042736005 0,011322892
Variável X 1	0,55822	0,003164916	176,3775	4,02E-07	0,548147709 0,56829206

RESULTADO RESIDUAL

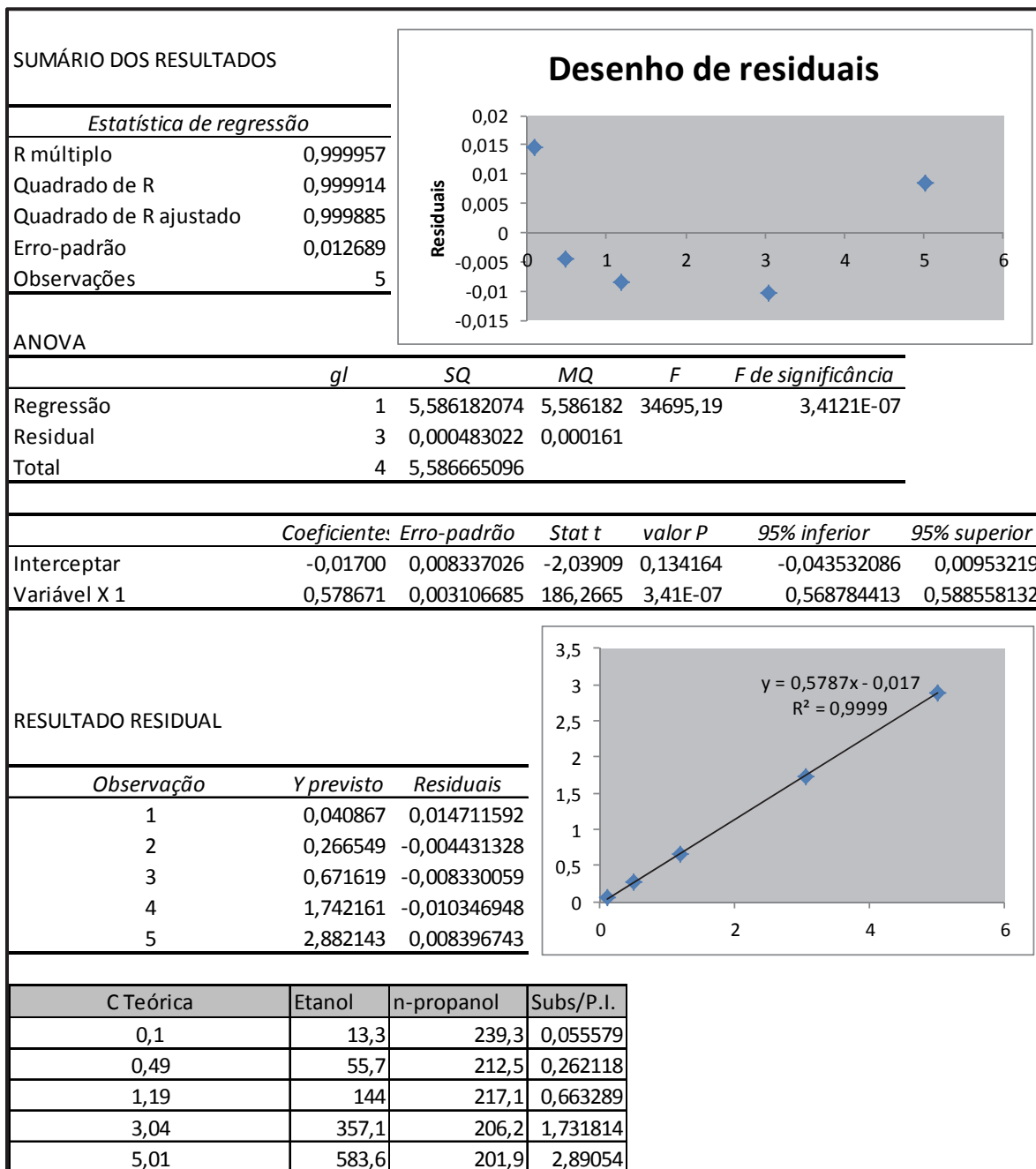
<i>Observação</i>	<i>Y previsto</i>	<i>Residuais</i>
1	0,040115	0,014004509
2	0,257821	-0,000528026
3	0,648575	-0,013010866
4	1,681282	-0,008463937
5	2,780975	0,00799832

C Teórica	Etanol	n-propanol	Subs/P.I.
0,1	11,1	205,1	0,05412
0,49	53,8	209,1	0,257293
1,19	130,1	204,7	0,635564
3,04	335,4	200,5	1,672818
5,01	586,8	210,4	2,788973

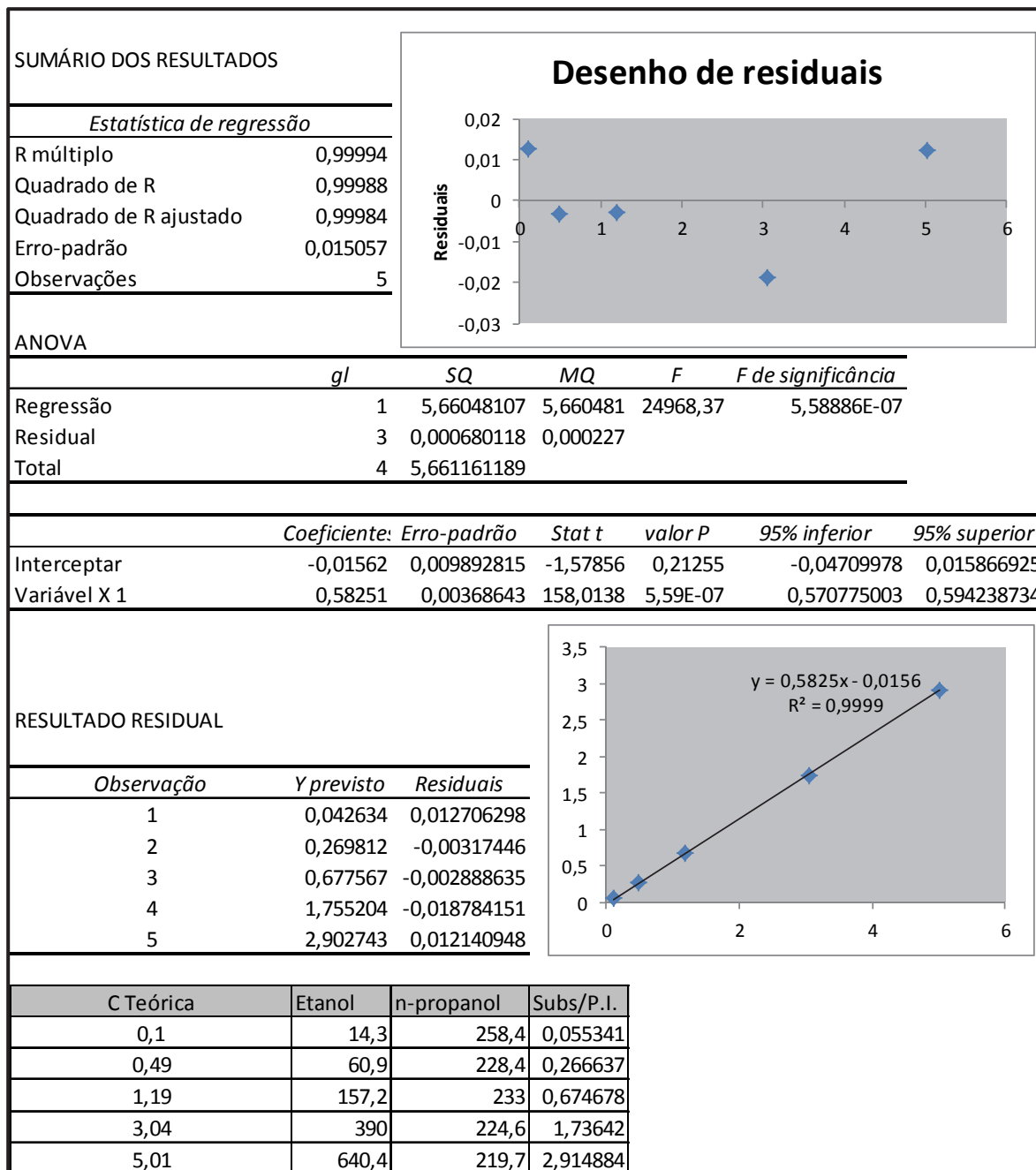
## Coluna Front



Quinto dia (14/12/12) **Coluna Middle**



## Coluna Front



Validação do etanol, precisão intermédia tratamento final de dados dos equipamento GCFI002.

### Coluna *Middle*

Data	1º DIA (07/12/12)	2º DIA (11/12/12)	3º DIA (12/12/12)	4º DIA (13/12/12)	5º DIA (14/12/12)
R <sup>2</sup>	0.99982	0.99985	0.99972	0.9999	0.99991
Declive	0.56884	0.6293	0.55849	0.55822	0.57867
Y0	-0.01053	-0.01939	-0.02328	-0.01571	-0.017
<b>Gama Baixa 0.49 g/L</b>					
Replicado 1	0.47	0.49	0.49	0.48	0.48
Replicado 2	0.46	0.48	0.49	0.48	0.47
Replicado 3	0.47	0.48	0.49	0.46	0.48
Média	0.47	0.48	0.49	0.47	0.48
Recuperação	94.9	98.88	100.23	96.78	97.36
Concenc. Média	<b>0.48</b>				
Recuperação Média	<b>97.63</b>				
Repetibilidade (S <sub>r</sub> )	<b>0</b>				
Between Run (S <sub>run</sub> )	<b>0.01</b>				
Precisão intermédia	<b>0.01</b>				
C.V (%)	<b>2.08</b>				
<b>Gama média/alta 1.19 g/L</b>					
Replicado 1	1.11	1.14	1.12	1.12	1.14
Replicado 2	1.1	1.15	1.13	1.11	1.14
Replicado 3	1.1	1.13	1.13	1.11	1.13
Média	1.1	1.14	1.13	1.11	1.14
Recuperação	92.67	95.75	94.75	93.67	95.55
Concenc. Média	<b>1.12</b>				
Recuperação Média	<b>94.48</b>				
Repetibilidade (S <sub>r</sub> )	<b>0.01</b>				
Between Run (S <sub>run</sub> )	<b>0.02</b>				
Precisão intermédia	<b>0.02</b>				
C.V (%)	<b>1.37</b>				
C.Vpool	<b>2.9</b>				

## Coluna *Front*

Data	1º DIA (07/12/12)	2º DIA (11/12/12)	3º DIA (12/12/12)	4º DIA (13/12/12)	5º DIA (14/12/12)
R <sup>2</sup>	0.99978	0.99986	0.99978	0.99995	0.99988
Declive	0.57663	0.63909	0.56482	0.5625	0.58251
Y0	-0.01055	-0.01764	-0.01948	-0.00906	-0.01562
<b>Gama Baixa 0.49 g/L</b>					
Replicado 1	0.47	0.49	0.49	0.47	0.48
Replicado 2	0.47	0.49	0.49	0.47	0.48
Replicado 3	0.47	0.48	0.48	0.47	0.48
Média	0.47	0.49	0.49	0.47	0.48
Recuperação	96.53	99	99.69	96.03	98
Concenc. Média	<b>0.48</b>				
Recuperação Média	<b>97.85</b>				
Repetibilidade (S <sub>r</sub> )	<b>0</b>				
Between Run (S <sub>run</sub> )	<b>0.01</b>				
Precisão intermédia	<b>0.01</b>				
C.V (%)	<b>1.6</b>				
<b>Gama média/alta 1.19 g/L</b>					
Replicado 1	1.11	1.12	1.14	1.12	1.14
Replicado 2	1.1	1.15	1.13	1.11	1.14
Replicado 3	1.1	1.13	1.13	1.11	1.14
Média	1.11	1.13	1.13	1.12	1.14
Recuperação	92.99	95.13	95.12	93.78	95.81
Concenc. Média	<b>1.13</b>				
Recuperação Média	<b>94.57</b>				
Repetibilidade (S <sub>r</sub> )	<b>0.01</b>				
Between Run (S <sub>run</sub> )	<b>0.01</b>				
Precisão intermédia	<b>0.03</b>				
C.V (%)	<b>1.22</b>				
<b>C.Vpool</b>	<b>2.5</b>				

**Anexo-V**

Equipamento- GC-FID001- Coluna FID1 A

Data	1º DIA	2º DIA	3º DIA	4º DIA	5º DIA
<b>Equação</b>	$y = 0.68162x - 0.01791$	$y = 0.71941x - 0.02016$	$y = 0.64386x - 0.01352$	$y = 0.66425x - 0.01648$	$y = 0.67740x - 0.01495$
<b>Gama Baixa 0.49 g/L</b>					
<b>Média</b>	0.47	0.47	0.47	0.46	0.46
<b>Recuperação</b>	95.4	96.9	96.3	94.5	92.9
<b>Média</b>	<b>95.2</b>				
<b>Desvio padrão</b>	<b>1.58</b>				
<b>C.V (%)</b>	<b>1.7</b>				
<b>N</b>	<b>5</b>				
<b>Texp</b>	<b>6.76</b>				
<b>Tcrit</b>	<b>2.78</b>				
<b>Incerteza de R%</b>	<b>0.7</b>				
<b>Incerteza padrão rel.</b>	<b>0.007</b>				
<b>Gama Média/Alta 1.19g/L</b>					
<b>Média</b>	1.12	1.15	1.13	1.10	1.11
<b>Recuperação</b>	93.9	96.3	95.3	92.7	93.0
<b>Concenc. Média</b>	<b>94.2</b>				
<b>Desvio padrão</b>	<b>1.53</b>				
<b>C.V (%)</b>	<b>1.6</b>				
<b>N</b>	<b>5</b>				
<b>Texp</b>	<b>8.40</b>				
<b>Tcrit</b>	<b>2.78</b>				
<b>Incerteza de R%</b>	<b>0.7</b>				
<b>Incerteza padrão rel.</b>	<b>0.007</b>				

Coluna-FID2 B

Data	1° DIA	2° DIA	3° DIA	4° DIA	5° DIA
<b>Equação</b>	$y = 0.65977x - 0.00845$	$y = 0.69254x - 0.01301$	$y = 0.61837x - 0.00632$	$y = 0.63784x - 0.00769$	$y = 0.64656x - 0.00476$
<b>Gama Baixa 0.49 g/L</b>					
<b>Média</b>	0.46	0.48	0.47	0.47	0.46
<b>Recuperação</b>	94.6	98.4	96.7	95.0	93.6
<b>Média</b>	95.7				
<b>Desvio padrão</b>	1.92				
<b>C.V (%)</b>	2.0				
<b>N</b>	5				
<b>Texp</b>	5.04				
<b>Tcrit</b>	2.78				
<b>Incerteza de R%</b>	0.9				
<b>Incerteza padrão rel.</b>	0.009				
<b>Gama Média/Alta 1.19 g/L</b>					
<b>Média</b>	1.12	1.15	1.14	1.11	1.12
<b>Recuperação</b>	93.9	96.9	96.0	93.3	93.8
<b>Concenc. Média</b>	94.8				
<b>Desvio padrão</b>	1.56				
<b>C.V (%)</b>	1.6				
<b>N</b>	5				
<b>Texp</b>	7.45				
<b>Tcrit</b>	2.78				
<b>Incerteza de R%</b>	0.7				
<b>Incerteza padrão rel.</b>	0.007				



Equipamento- GC-FID002- Coluna *Middle*

Data	1° DIA	2° DIA	3° DIA	4° DIA	5° DIA
<b>Equação</b>	$y = 0.56884x - 0.01053$	$y = 0.62930x - 0.01939$	$y = 0.55849x - 0.02328$	$y = 0.55822x - 0.01571$	$y = 0.57867x - 0.01700$
<b>Gama Baixa 0.49 g/L</b>					
<b>Média</b>	0.47	0.48	0.49	0.48	0.48
<b>Recuperação</b>	94.9	98.9	100.2	97.2	97.4
<b>Média</b>	<b>97.7</b>				
<b>Desvio padrão</b>	<b>2.00</b>				
<b>C.V (%)</b>	<b>2.0</b>				
<b>N</b>	<b>5</b>				
<b>Texp</b>	<b>2.54</b>				
<b>Tcrit</b>	<b>2.78</b>				
<b>Incerteza de R%</b>	<b>0.9</b>				
<b>Incerteza padrão rel.</b>	<b>0.009</b>				
<b>Gama Média/Alta 1.19 g/L</b>					
<b>Média</b>	1.10	1.14	1.13	1.11	1.14
<b>Recuperação</b>	92.7	95.7	94.7	93.7	95.5
<b>Concenc. Média</b>	<b>94.5</b>				
<b>Desvio padrão</b>	<b>1.30</b>				
<b>C.V (%)</b>	<b>1.4</b>				
<b>N</b>	<b>5</b>				
<b>Texp</b>	<b>9.52</b>				
<b>Tcrit</b>	<b>2.78</b>				
<b>Incerteza de R%</b>	<b>0.6</b>				
<b>Incerteza padrão rel.</b>	<b>0.006</b>				

## Coluna *Front*

Data	1° DIA	2° DIA	3° DIA	4° DIA	5° DIA
Equação	$y = 0.57663x - 0.01055$	$y = 0.63909x - 0.01764$	$y = 0.56482x - 0.01948$	$y = 0.56250x - 0.00906$	$y = 0.58251x - 0.01562$
<b>Gama Baixa 0.49 g/L</b>					
Média	0.47	0.49	0.49	0.47	0.48
Recuperação	96.5	99.0	99.7	96.0	98.0
Média	97.8				
Desvio padrão	1.57				
C.V (%)	1.6				
N	5				
Texp	3.07				
Tcrit	2.78				
Incerteza de R%	0.7				
Incerteza padrão rel.	0.007				
<b>Gama Média/Alta 1.19 g/L</b>					
Média	1.1	1.1	1.3	1.1	1.1
Recuperação	93.0	95.9	108.8	93.8	95.8
Concenc. Média	97.4				
Desvio padrão	6.46				
C.V (%)	6.6				
N	5				
Texp	0.88				
Tcrit	2.78				
Incerteza de R%	2.9				
Incerteza padrão rel.	0.029				

## Anexo VI

### Coluna *Middle*

Etanol	LQ teste
	0,1 g/L
	0,10
	0,10
	0,10
	0,10
	0,09
Média (g/mL)	0,10
Desvio padrão (s)	0,00
CV (%)	4,6
Erro (%)	2,00

Etanol	LQ teste
	5,01 g/L
	3,99
	4,13
	5,07
	4,20
	4,17
Média (g/mL)	4,31
Desvio padrão (s)	0,43
CV (%)	10,0
Erro (%)	13,93

### Coluna *Front*

Etanol	LQ teste
	0,1 g/L
	0,10
	0,10
	0,09
	0,10
	0,10
Média (g/mL)	0,10
Desvio padrão (s)	0,00
CV (%)	4,6
Erro (%)	2,00

Etanol	LQ teste
	5,01 g/L
	4,01
	4,15
	5,10
	4,29
	4,20
Média (g/mL)	4,35
Desvio padrão (s)	0,43
CV (%)	9,9
Erro (%)	13,17

### Coluna FID1 A

Etanol	LQ teste
	0,1 g/L
	0,11
	0,11
	0,10
	0,09
	0,09
Média (g/mL)	0,10
Desvio padrão (s)	0,01
CV (%)	7,3
Erro (%)	0,21

Etanol	LQ teste
	5,01 g/L
	4,82
	4,84
	4,76
	4,86
	4,79
Média (g/mL)	4,81
Desvio padrão (s)	0,04
CV (%)	0,9
Erro (%)	3,93

## Coluna FID2 B

	LQ teste
Etanol	0,1 g/L
	0,08
	0,08
	0,07
	0,07
	0,07
Média (g/mL)	0,07
Desvio padrão (s)	0,01
CV (%)	8,8
Erro (%)	26,60

	LQ teste
Etanol	5,01 g/L
	4,44
	4,46
	4,36
	4,46
	4,41
Média (g/mL)	4,43
Desvio padrão (s)	0,04
CV (%)	1,0
Erro (%)	11,65


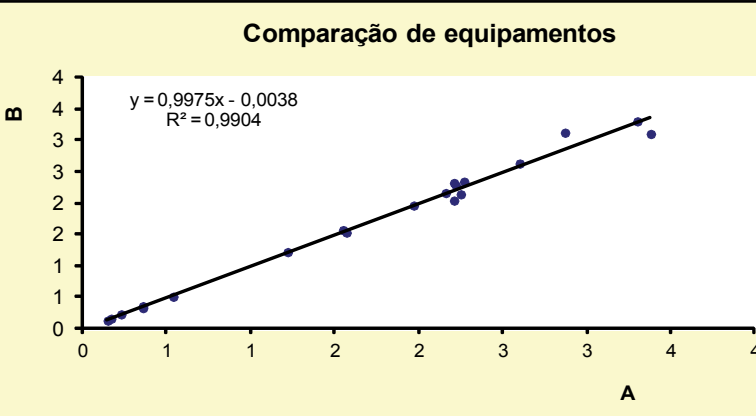
**Anexo VII**


Resultados das amostras que foram preparadas e injetadas no mesmo dia.

Amostras	Concentração do etanol (g/L)			
	Equipamentos			
	GC-FID001		GC-FID002	
	Coluna FID1 A	Coluna FID2B	Coluna <i>Front</i>	Coluna <i>Middle</i>
1	0.15	0.13	0.14	0.14
2	0.36	0.34	0.32	0.33
3	1.57	1.5	1.31	1.3
4	3.38	3.22	3.12	3.12
5	1.97	1.88	1.8	1.79
6	2.16	2.06	1.91	1.9
7	2.21	2.12	1.99	2
8	2.6	2.46	2.4	2.37
9	1.55	1.49	1.41	1.41
10	2.21	2.12	2.02	2
11	2.22	2.13	2.14	2.12
12	0.36	0.34	0.33	0.33
13	0.17	0.15	0.16	0.15
14	0.54	0.51	0.49	0.49
15	2.87	2.73	2.72	2.71
16	3.3	3.14	3.03	3.03
17	2.25	2.15	1.87	1.85
18	1.22	1.15	1.13	1.12
19	2.27	2.16	1.99	1.98
20	0.23	0.21	0.2	0.2

Resultados injetadas após um período de cinco meses de congelação.

Concentração do etanol (g/L) nos Equipamentos				
Nº de amostras	GC-FID001		GC-FID002	
	Coluna FID1 A	Coluna FID2B	Coluna <i>Front</i>	Coluna <i>Middle</i>
1	0.13	0.12	0.13	0.13
2	0.33	0.32	0.33	0.33
3	1.53	1.48	1.41	1.43
4	3.1	2.94	2.9	2.92
5	1.96	1.88	1.87	1.89
6	2.16	2.06	1.96	1.97
7	2.04	1.96	1.9	1.9
8	2.63	2.51	2.49	2.51
9	1.57	1.5	1.39	1.4
10	2.32	2.2	2.07	2.1
11	2.28	2.15	2.2	2.21
12	0.36	0.34	0.3	0.31
13	0.16	0.15	0.16	0.16
14	0.51	0.49	0.49	0.5
15	3.12	2.96	2.87	2.89
16	3.3	3.14	3.03	3.03
17	2.14	2.03	2.06	2.07
18	1.22	1.15	1.13	1.12
19	2.34	2.23	2.1	2.1
20	0.23	0.19	0.19	0.2

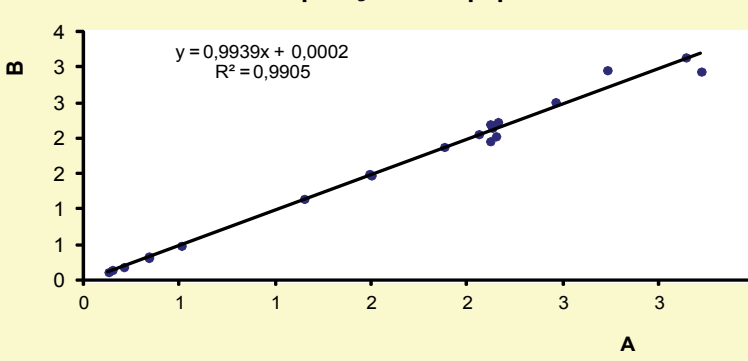
		REGISTO			MOD-STF-C-058 Rev00				
		COMPARAÇÃO DE MÉTODOS, EQUIPAMENTOS E COLABORADORES			Método	PE-STF-401			
					Pág. 1 de 1				
Metodologias		Gamas		Lim. Inf	Lim. Sup.	Aprovação			
A- FID 1A (1ª injeção)		Gama baixa		0	1	Elaborado por:			
B- FID 1A(2ª injeção)		Gama média		1,1	3	Aprovado por:			
Unidades g/L		Gama alta		3,1	5	Data:			
DADOS EXPERIMENTAIS									
	A	B	Média	Abs. Dif.		A	B	Média	Abs. Dif.
1	0,15	0,13	0,140	0,020	41				
2	0,36	0,33	0,345	0,030	42				
3	1,57	1,53	1,550	0,040	43				
4	3,38	3,10	3,240	0,280	44				
5	1,97	1,96	1,965	0,010	45				
6	2,16	2,16	2,160	0,000	46				
7	2,21	2,04	2,125	0,170	47				
8	2,60	2,63	2,615	0,030	48				
9	1,55	1,57	1,560	0,020	49				
10	2,21	2,32	2,265	0,110	50				
11	2,22	2,28	2,250	0,060	51				
12	0,36	0,36	0,360	0,000	52				
13	0,17	0,16	0,165	0,010	53				
14	0,54	0,51	0,525	0,030	54				
15	2,87	3,12	2,995	0,250	55				
16	3,30	3,30	3,300	0,000	56				
17	2,25	2,14	2,195	0,110	57				
18	1,22	1,22	1,220	0,000	58				
19	2,27	2,34	2,305	0,070	59				
20	0,23	0,23	0,230	0,000	60				
21					61				
22					62				
23					63				
24					64				
25					65				
26					66				
27					67				
28					68				
29					69				
30					70				
31					71				
32					72				
33					73				
34					74				
35					75				
36					76				
37					77				
38					78				
39					79				
40					80				
CALCULOS									
Gama baixa									
		0,00	1,00						
Nº amostras	6	5							
Média	0,29								
Repetibilidade	0,014	5%							
Limite de rep.	0,039	13%							
Gama média									
		1,10	3,00						
Nº amostras	12	11							
Média	2,10								
Repetibilidade	0,073	3%							
Limite de rep.	0,204	10%							
Gama alta									
		3,10	5,00						
Nº amostras	2	1							
Média	3,27								
Repetibilidade	0,140	4%							
Limite de rep.	0,392	12%							
Limite de repetibilidade total									
<b>11,0%</b>									
Dados estatísticos totais									
Nº amostras	20								
r	0,995								
Declive	0,998								
Intercepção	-0,004								
Erro padrão	0,107								
Observações / conclusões									
Comparação de equipamentos									
									

		REGISTO			MOD-STF-C-058 Rev00				
		COMPARAÇÃO DE MÉTODOS, EQUIPAMENTOS E COLABORADORES			Método	PE-STF-401			
					Pág. 1 de 1				
Metodologias		Gamas		Lim. Inf	Lim. Sup.	Aprovação			
A- FID 2B (1ª injeção)		Gama baixa		0	1	Elaborado por:			
B- FID 2B(2ª injeção)		Gama média		1,1	3	Aprovado por:			
Unidades g/L		Gama alta		3,1	5	Data:			
DADOS EXPERIMENTAIS									
	A	B	Média	Abs. Dif.		A	B	Média	Abs. Dif.
1	0,13	0,12	0,125	0,010		41			
2	0,34	0,32	0,330	0,020		42			
3	1,50	1,48	1,490	0,020		43			
4	3,22	2,94	3,080	0,280		44			
5	1,88	1,88	1,880	0,000		45			
6	2,06	2,06	2,060	0,000		46			
7	2,12	1,96	2,040	0,160		47			
8	2,46	2,51	2,485	0,050		48			
9	1,49	1,50	1,495	0,010		49			
10	2,12	2,20	2,160	0,080		50			
11	2,13	2,15	2,140	0,020		51			
12	0,34	0,34	0,340	0,000		52			
13	0,15	0,15	0,150	0,000		53			
14	0,51	0,49	0,500	0,020		54			
15	2,73	2,96	2,845	0,230		55			
16	3,14	3,14	3,140	0,000		56			
17	2,15	2,03	2,090	0,120		57			
18	1,15	1,15	1,150	0,000		58			
19	2,16	2,23	2,195	0,070		59			
20	0,21	0,19	0,200	0,020		60			
21						61			
22						62			
23						63			
24						64			
25						65			
26						66			
27						67			
28						68			
29						69			
30						70			
31						71			
32						72			
33						73			
34						74			
35						75			
36						76			
37						77			
38						78			
39						79			
40						80			


  

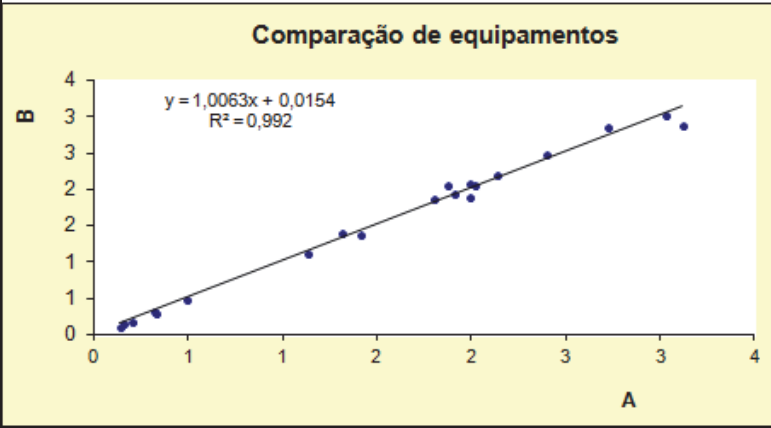
CALCULOS		
Gama baixa		
	0,00	1,00
Nº amostras	6	5
Média	0,27	
Repetibilidade	0,010	4%
Limite de rep.	0,029	11%
Gama média		
	1,10	3,00
Nº amostras	12	11
Média	2,00	
Repetibilidade	0,067	3%
Limite de rep.	0,187	9%
Gama alta		
	3,10	5,00
Nº amostras	1	0
Média	3,14	
Repetibilidade	0,000	0%
Limite de rep.	0,000	0%
Limite de repetibilidade total		
<b>9,8%</b>		
Dados estatísticos totais		
Nº amostras	20	
r	0,995	
Declive	0,994	
Intercepção	0,000	
Erro padrão	0,101	


  

Comparação de equipamentos	
	<p>Observações / conclusões</p>



		REGISTO				MOD-STF-C-058 Rev00			
		COMPARAÇÃO DE MÉTODOS, EQUIPAMENTOS E COLABORADORES				Método	PE-STF-401		
Metodologias		Gamas		Lim. Inf	Lim. Sup.	Aprovação			
Unidades	A- Front (1ª injeção)	Gama baixa		0	1	Elaborado por:			
	B- Front (2ª injeção)	Gama média		1,1	3	Aprovado por:			
	g/L	Gama alta		3	5	Data:			
DADOS EXPERIMENTAIS									
		A	B	Média	Abs. Dif.	A	B	Média	Abs. Dif.
1		0,14	0,13	0,135	0,010	41			
2		0,32	0,33	0,325	0,010	42			
3		1,31	1,41	1,360	0,100	43			
4		3,12	2,90	3,010	0,220	44			
5		1,80	1,87	1,835	0,070	45			
6		1,91	1,96	1,935	0,050	46			
7		1,99	1,90	1,945	0,090	47			
8		2,40	2,49	2,445	0,090	48			
9		1,41	1,39	1,400	0,020	49			
10		2,02	2,07	2,045	0,050	50			
11		2,14	2,20	2,170	0,060	51			
12		0,33	0,30	0,315	0,030	52			
13		0,16	0,16	0,160	0,000	53			
14		0,49	0,49	0,490	0,000	54			
15		2,72	2,87	2,795	0,150	55			
16		3,03	3,03	3,030	0,000	56			
17		1,87	2,06	1,965	0,190	57			
18		1,13	1,13	1,130	0,000	58			
19		1,99	2,10	2,045	0,110	59			
20		0,20	0,19	0,195	0,010	60			
21						61			
22						62			
23						63			
24						64			
25						65			
26						66			
27						67			
28						68			
29						69			
30						70			
31						71			
32						72			
33						73			
34						74			
35						75			
36						76			
37						77			
38						78			
39						79			
40						80			
		Gama baixa		Gama média		Gama alta			
		0,00	1,00	1,10	3,00	3,00	5,00		
Nº amostras		6	5	12	11	2	1		
Média		0,27		1,92		3,02			
Repetibilidade		0,010	4%	0,068	4%	0,110	4%		
Limite de rep.		0,028	10%	0,190	10%	0,308	10%		
<b>Limite de repetibilidade total</b>									
<b>10,1%</b>									
<b>Dados estatísticos totais</b>									
Nº amostras		20							
r		0,996							
Declive		1,006							
Intercepção		0,015							
Erro padrão		0,090							
Observações/conclusões									



		REGISTO				MOD-STF-C-058 Rev00			
		COMPARAÇÃO DE MÉTODOS, EQUIPAMENTOS E COLABORADORES				Método	PE-STF-401		
						Pág. 1 de 1			
Metodologias		Gamas		Lim. Inf	Lim. Sup.	Aprovação			
A- Middle (1ª injeção)		Gama baixa		0	1	Elaborado por:			
B- Middle (2ª injeção)		Gama média		1,1	1,5	Aprovado por:			
Unidades g/L		Gama alta		3	5	Data:			
DADOS EXPERIMENTAIS									
	A	B	Média	Abs. Dif.		A	B	Média	Abs. Dif.
1	0,14	0,13	0,135	0,010	41				
2	0,33	0,33	0,330	0,000	42				
3	1,30	1,43	1,365	0,130	43				
4	3,12	2,92	3,020	0,200	44				
5	1,79	1,89	1,840	0,100	45				
6	1,90	1,97	1,935	0,070	46				
7	2,00	1,90	1,950	0,100	47				
8	2,37	2,51	2,440	0,140	48				
9	1,41	1,40	1,405	0,010	49				
10	2,00	2,10	2,050	0,100	50				
11	2,12	2,21	2,165	0,090	51				
12	0,33	0,31	0,320	0,020	52				
13	0,15	0,16	0,155	0,010	53				
14	0,49	0,50	0,495	0,010	54				
15	2,71	2,89	2,800	0,180	55				
16	3,03	3,03	3,030	0,000	56				
17	1,85	2,07	1,960	0,220	57				
18	1,12	1,12	1,120	0,000	58				
19	1,98	2,10	2,040	0,120	59				
20	0,20	0,20	0,200	0,000	60				
21					61				
22					62				
23					63				
24					64				
25					65				
26					66				
27					67				
28					68				
29					69				
30					70				
31					71				
32					72				
33					73				
34					74				
35					75				
36					76				
37					77				
38					78				
39					79				
40					80				

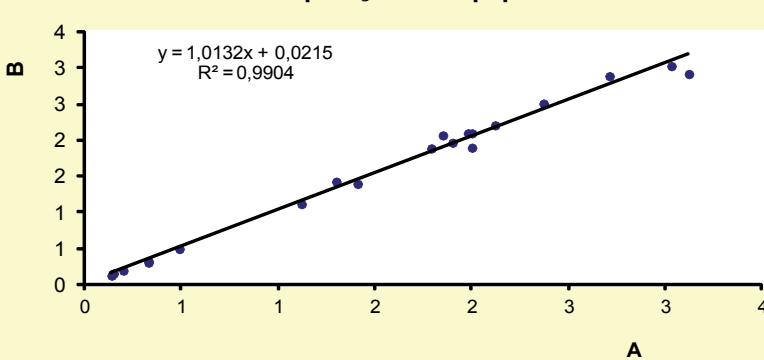
CALCULOS		
<b>Gama baixa</b>		
	0,00	1,00
Nº amostras	6	5
Média	0,27	
Repetibilidade	0,008	3%
Limite de rep.	0,021	8%
<b>Gama média</b>		
	1,10	1,50
Nº amostras	3	2
Média	1,30	
Repetibilidade	0,053	4%
Limite de rep.	0,149	11%
<b>Gama alta</b>		
	3,00	5,00
Nº amostras	2	1
Média	3,03	
Repetibilidade	0,100	3%
Limite de rep.	0,280	9%
<b>Limite de repetibilidade total</b>		
<b>9,1%</b>		
<b>Dados estatísticos totais</b>		
Nº amostras	20	
r	0,995	
Declive	1,013	
Intercepção	0,021	
Erro padrão	0,099	


Observações / conclusões	

**Comparação de equipamentos**



## Anexo VIII

		<b>REGISTO</b>				Pág. 1/1	
<b>INML, IP • CENTRO</b> <b>TOXICOLOGIA FORENSE</b>		<b>Aceitação de Tempos de Retenção</b>					
<b>Procedimento:</b>		PE-STF-C-402				[ ]% = 0,7%	
<b>Série:</b>							
<b>Observações:</b>		Amostras Forenses GCF1001					
#	ID	t.r. sub	t.r. PI	t.r.r.	-0,7%	0,7%	Conformidade
1	<b>Controlo 1</b>	2,612	4,626	0,565	<b>0,561</b>	<b>0,569</b>	conforme
2	<b>1</b>	2,619	4,626	0,566			conforme
3	<b>2</b>	2,614	4,626	0,565			conforme
4	<b>3</b>	2,608	4,626	0,564			conforme
5	<b>4</b>	2,606	4,625	0,563			conforme
6	<b>5</b>	2,608	4,627	0,564			conforme
7	<b>6</b>	2,608	4,626	0,564			conforme
8	<b>7</b>	2,608	4,626	0,564			conforme
9	<b>8</b>	2,606	4,626	0,563			conforme
10	<b>9</b>	2,609	4,626	0,564			conforme
11	<b>10</b>	2,607	4,626	0,564			conforme
12	<b>11</b>	2,607	4,626	0,564			conforme
13	<b>12</b>	2,614	4,625	0,565			conforme
14	<b>13</b>	2,617	4,625	0,566			conforme
15	<b>14</b>	2,612	4,625	0,565			conforme
16	<b>15</b>	2,606	4,625	0,563			conforme
17	<b>16</b>	2,606	4,626	0,563			conforme
18	<b>17</b>	2,607	4,626	0,564			conforme
19	<b>18</b>	2,608	4,625	0,564			conforme
20	<b>19</b>	2,607	4,625	0,564			conforme
21	<b>20</b>	2,615	4,625	0,565			conforme
22							

Procedimento: PE-STF-C-402


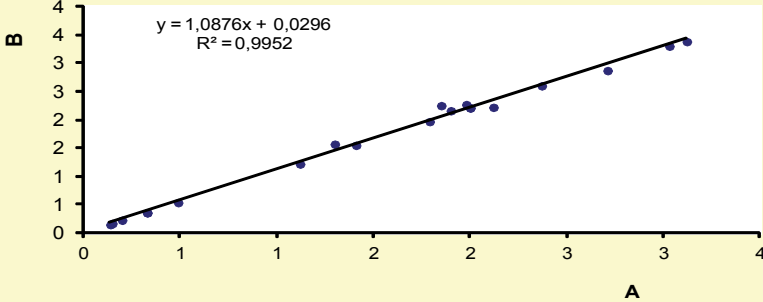
[ ]% = 0,7%


Série:

Observações: Amostras Forenses GCFI002

#	ID	t.r. sub	t.r. PI	t.r.r.	-0,7%	0,7%	Conformidade
1	Controlo 1	2,440	4,933	0,495	<b>0,491</b>	<b>0,498</b>	conforme
2	1	2,443	4,932	0,495			conforme
3	2	2,442	4,932	0,495			conforme
4	3	2,438	4,932	0,494			conforme
5	4	2,438	4,930	0,495			conforme
6	5	2,440	4,933	0,495			conforme
7	6	2,438	4,933	0,494			conforme
8	7	2,440	4,933	0,495			conforme
9	8	2,440	4,933	0,495			conforme
10	9	2,438	4,932	0,494			conforme
11	10	2,438	4,932	0,494			conforme
12	11	2,438	4,932	0,494			conforme
13	12	2,442	4,933	0,495			conforme
14	13	2,442	4,932	0,495			conforme
15	14	2,440	4,932	0,495			conforme
16	15	2,438	4,932	0,494			conforme
17	16	2,438	4,932	0,494			conforme
18	17	2,438	4,932	0,494			conforme
19	18	2,440	4,932	0,495			conforme
20	19	2,438	4,932	0,494			conforme
21	20	2,442	4,933	0,495			conforme
22							
23							

Anexo IX

		REGISTO			MOD-STF-C-058 Rev00		
		COMPARAÇÃO DE MÉTODOS, EQUIPAMENTOS E COLABORADORES			Método	PE-STF-401	
Metodologias		Gamas		Lim. Inf	Lim. Sup.	Aprovação	
Unidades	A- Middle	Gama baixa		0	1	Elaborado por: Aprovado por: Data: 10-01-2013	
	B- FID 1A	Gama média		1,1	3		
	g/L	Gama alta		3,1	5		
DADOS EXPERIMENTAIS							
A	B	Média	Abs. Dif.	A	B	Média	Abs. Dif.
1	0,14	0,15	0,145	0,010	41		
2	0,33	0,36	0,345	0,030	42		
3	1,30	1,57	1,435	0,270	43		
4	3,12	3,38	3,250	0,260	44		
5	1,79	1,97	1,880	0,180	45		
6	1,90	2,16	2,030	0,260	46		
7	2,00	2,21	2,105	0,210	47		
8	2,37	2,60	2,485	0,230	48		
9	1,41	1,55	1,480	0,140	49		
10	2,00	2,21	2,105	0,210	50		
11	2,12	2,22	2,170	0,100	51		
12	0,33	0,36	0,345	0,030	52		
13	0,15	0,17	0,160	0,020	53		
14	0,49	0,54	0,515	0,050	54		
15	2,71	2,87	2,790	0,160	55		
16	3,03	3,30	3,165	0,270	56		
17	1,85	2,25	2,050	0,400	57		
18	1,12	1,22	1,170	0,100	58		
19	1,98	2,27	2,125	0,290	59		
20	0,20	0,23	0,215	0,030	60		
21					61		
22					62		
23					63		
24					64		
25					65		
26					66		
27					67		
28					68		
29					69		
30					70		
31					71		
32					72		
33					73		
34					74		
35					75		
36					76		
37					77		
38					78		
39					79		
40					80		
CALCULOS							
Gama baixa							
Nº amostras	0,00	1,00					
Média	6	5					
Repetibilidade	0,29	8%					
Limite de rep.	0,022	8%					
	0,061	21%					
Gama média							
Nº amostras	1,10	3,00					
Média	12	11					
Repetibilidade	1,99	8%					
Limite de rep.	0,161	8%					
	0,451	23%					
Gama alta							
Nº amostras	3,10	5,00					
Média	2	1					
Repetibilidade	3,21	6%					
Limite de rep.	0,187	6%					
	0,525	16%					
Limite de repetibilidade total							
<b>22,0%</b>							
Dados estatísticos totais							
Nº amostras	20						
r	0,998						
Declive	1,088						
Intercepção	0,030						
Erro padrão	0,076						
Observações / conclusões							
Comparação de equipamentos							
							

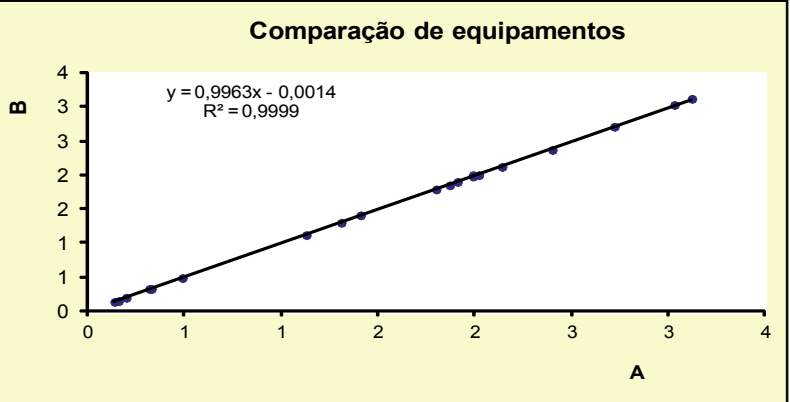
		REGISTO			MOD-STF-C-058 Rev00		
		COMPARAÇÃO DE MÉTODOS, EQUIPAMENTOS E COLABORADORES			Método	PE-STF-401	
					Pág. 1 de 1		
Metodologias		Gamas		Lim. Inf	Lim. Sup.	Aprovação	
Unidades	A- Front	Gama baixa		0	1	Elaborado por:	
	B- Middle	Gama média		1,1	3	Aprovado por:	
	g/L	Gama alta		3,1	5	Data: 10-01-2013	
DADOS EXPERIMENTAIS						Período em análise	
A	B	Média	Abs. Dif.	A	B	Média	Abs. Dif.
1	0,14	0,14	0,140	0,000	41		
2	0,32	0,33	0,325	0,010	42		
3	1,31	1,30	1,305	0,010	43		
4	3,12	3,12	3,120	0,000	44		
5	1,80	1,79	1,795	0,010	45		
6	1,91	1,90	1,905	0,010	46		
7	1,99	2,00	1,995	0,010	47		
8	2,40	2,37	2,385	0,030	48		
9	1,41	1,41	1,410	0,000	49		
10	2,02	2,00	2,010	0,020	50		
11	2,14	2,12	2,130	0,020	51		
12	0,33	0,33	0,330	0,000	52		
13	0,16	0,15	0,155	0,010	53		
14	0,49	0,49	0,490	0,000	54		
15	2,72	2,71	2,715	0,010	55		
16	3,03	3,03	3,030	0,000	56		
17	1,87	1,85	1,860	0,020	57		
18	1,13	1,12	1,125	0,010	58		
19	1,99	1,98	1,985	0,010	59		
20	0,20	0,20	0,200	0,000	60		
21					61		
22					62		
23					63		
24					64		
25					65		
26					66		
27					67		
28					68		
29					69		
30					70		
31					71		
32					72		
33					73		
34					74		
35					75		
36					76		
37					77		
38					78		
39					79		
40					80		

CALCULOS	
<b>Gama baixa</b>	
Nº amostras	6 5
Média	0,27
Repetibilidade	0,004 1%
Limite de rep.	0,011 4%
<b>Gama média</b>	
Nº amostras	12 11
Média	1,89
Repetibilidade	0,011 1%
Limite de rep.	0,030 2%
<b>Gama alta</b>	
Nº amostras	1 0
Média	3,12
Repetibilidade	0,000 0%
Limite de rep.	0,000 0%
<b>Limite de repetibilidade total</b>	
<b>2,7%</b>	
<b>Dados estatísticos totais</b>	
Nº amostras	20
r	1,000
Declive	0,996
Intercepção	-0,001
Erro padrão	0,010


  

**Comparação de equipamentos**



Observações / conclusões

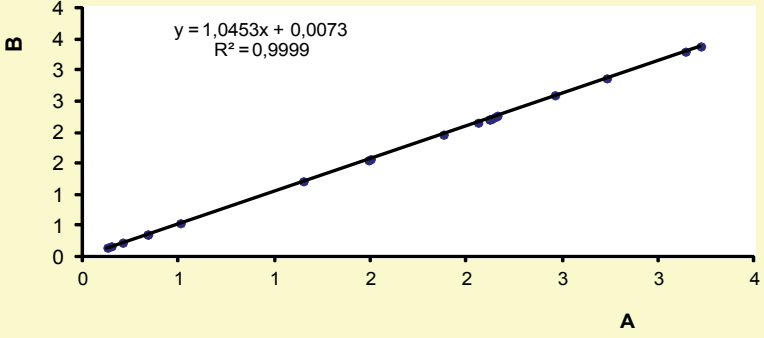
				<b>REGISTO</b> COMPARAÇÃO DE MÉTODOS, EQUIPAMENTOS E COLABORADORES				MOD-STF-C-058 Rev00	
				Método		PE-STF-401		Pág. 1 de 1	
Metodologias				Gamas		Lim. Inf.	Lim. Sup.	Aprovação	
Unidades				A- FID 2B B- FID 1A g/L		Gama baixa	0	1	Elaborado por:
						Gama média	1,1	3	Aprovado por:
						Gama alta	3,1	5	Data: 10-01-2013
DADOS EXPERIMENTAIS								Periodo em análise	
A	B	Média	Abs. Dif.	A	B	Média	Abs. Dif.	a	
1	0,13	0,15	0,140	0,021	41				
2	0,34	0,36	0,350	0,021	42				
3	1,50	1,57	1,535	0,071	43				
4	3,22	3,38	3,301	0,163	44				
5	1,88	1,97	1,923	0,085	45				
6	2,06	2,16	2,108	0,097	46				
7	2,12	2,21	2,165	0,091	47				
8	2,46	2,60	2,529	0,138	48				
9	1,49	1,55	1,522	0,064	49				
10	2,12	2,21	2,165	0,090	50				
11	2,13	2,22	2,174	0,088	51				
12	0,34	0,36	0,351	0,022	52				
13	0,15	0,17	0,161	0,022	53				
14	0,51	0,54	0,526	0,033	54				
15	2,73	2,87	2,799	0,139	55				
16	3,14	3,30	3,219	0,158	56				
17	2,15	2,25	2,200	0,100	57				
18	1,15	1,22	1,183	0,066	58				
19	2,16	2,27	2,214	0,108	59				
20	0,21	0,23	0,220	0,021	60				
21					61				
22					62				
23					63				
24					64				
25					65				
26					66				
27					67				
28					68				
29					69				
30					70				
31					71				
32					72				
33					73				
34					74				
35					75				
36					76				
37					77				
38					78				
39					79				
40					80				

CALCULOS		
<b>Gama baixa</b>		
Nº amostras	0,10	1,00
Média	0,29	
Repetibilidade	0,017	6%
Limite de rep.	0,046	16%
<b>Gama média</b>		
Nº amostras	1,10	3,00
Média	2,04	
Repetibilidade	0,069	3%
Limite de rep.	0,193	9%
<b>Gama alta</b>		
Nº amostras	3,10	5,00
Média	3,26	
Repetibilidade	0,113	3%
Limite de rep.	0,318	10%
<b>Limite de repetibilidade total</b>		
<b>11,8%</b>		
<b>Dados estatísticos totais</b>		
Nº amostras	20	
r	1,000	
Declive	1,045	
Intercepção	0,007	
Erro padrão	0,010	

**Comparação de equipamentos**



$y = 1,0453x + 0,0073$   
 $R^2 = 0,9999$

Observações / conclusões