

CURSO DE ESPECIALIZAÇÃO EM CONTROLE DE QUALIDADE DE PRODUTOS  
E SERVIÇOS VINCULADOS À VIGILÂNCIA SANITÁRIA  
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Fabio Silvestre Bazilio

**VALIDAÇÃO INTRALABORATORIAL DE MÉTODO ANALÍTICO PARA A  
DETERMINAÇÃO DA MIGRAÇÃO DO ADIPATO DE DI-(2-ETIL-HEXILA) DA  
EMBALAGEM PARA ALIMENTOS GORDUROSOS**

Rio de Janeiro

2012

Fabio Silvestre Bazilio

VALIDAÇÃO INTRALABORATORIAL DE MÉTODO ANALÍTICO PARA A  
DETERMINAÇÃO DA MIGRAÇÃO DO ADIPATO DE DI-(2-ETIL-HEXILA) DA  
EMBALAGEM PARA ALIMENTOS GORDUROSOS

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de Especialização em Controle da Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços Vinculados à Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito final para obtenção do grau de Especialista em Controle da Qualidade em Produtos, Ambientes e Serviços Vinculados à Vigilância Sanitária.

Orientadora: Shirley de Mello Pereira  
Abrantes

Rio de Janeiro

2012

Catálogo na fonte  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde  
Biblioteca.

Bazilio, Fabio Silvestre

Validação intralaboratorial de método analítico para a determinação da migração do adipato de di-(2-etil-hexila) da embalagem para alimentos gordurosos. /Fabio Silvestre Bazilio. – Rio de Janeiro : INCQS/FIOCRUZ, 2012.

71 f. : il., tab.

Trabalho de conclusão de curso (Especialização em Controle da Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços Vinculados à Vigilância Sanitária) - Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. 2012.

Orientadora: Shirley de Mello Pereira Abrantes

1. Validação. 2. Migração. 3. Alimentos gordurosos. 4. Adipato de di-(2-etil-hexila). 5. Cromatografia a gás.

Fabio Silvestre Bazilio

**VALIDAÇÃO INTRALABORATORIAL DE MÉTODO ANALÍTICO PARA A  
DETERMINAÇÃO DA MIGRAÇÃO DO ADIPATO DE DI-(2-ETIL-HEXILA) DA  
EMBALAGEM PARA ALIMENTOS GORDUROSOS**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de Especialização em Controle da Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços Vinculados à Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito final para obtenção do grau de Especialista em Controle da Qualidade em Produtos, Ambientes e Serviços Vinculados à Vigilância Sanitária.

Aprovado em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Isabella Fernandes Delgado (Doutor)  
Instituto Nacional de Controle de qualidade em Saúde

---

Marcus Vinícius Justo Bomfim (Mestre)  
Instituto Nacional de Controle de qualidade em Saúde

---

Sérgio Alves da Silva (Mestre)  
Instituto Nacional de Controle de qualidade em Saúde

---

Shirley de Mello Pereira Abrantes (Doutor) - Orientador  
Instituto Nacional de Controle de qualidade em Saúde

Dedico este trabalho a minha amada esposa que me dá forças para seguir em frente.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus pelo dom da vida.

À minha orientadora, Profa. Dra. Shirley de Mello Pereira Abrantes, pelo incentivo, orientação, apoio, compreensão, confiança e conhecimentos transmitidos. Obrigado pela contribuição na minha vida acadêmica e por tanta influência na minha vida profissional.

Aos meus pais, Jorge e Marilda, por todo amor, carinho, dedicação e ensinamentos que me conduzem. Obrigado pelo apoio em todos estes anos, ensinando-me, principalmente, a importância da construção de meus próprios valores.

À minha amada esposa, Adherlene, por todo o amor, carinho, apoio e dedicação. Obrigado pela compreensão e suporte nos momentos mais difíceis.

À minha irmã, Daiana, pelo carinho, amizade e momentos de diversão. Ao meu cunhado, Igor, pela amizade e companheirismo.

Aos meus tios, Dalila e Celso, pelo amor, carinho e dedicação.

A toda minha família pelo amor, carinho e dedicação.

Aos meus amigos do laboratório, Marcus e Rodrigo, pelo apoio, colaboração e amizade. Obrigado pelo suporte de fundamental importância e pelos momentos de descontração.

Aos professores e coordenadores do Curso de Especialização em Controle de Qualidade de Produtos e Serviços Vinculados à Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde pelos ensinamentos e dedicação aos alunos do curso.

Aos amigos da turma de especialização com quem compartilhei bons momentos de alegria e aprendizado.

A todos do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde que de alguma forma contribuíram para o sucesso dessa jornada.

É melhor lançar-se à luta em busca do triunfo mesmo expondo-se ao insucesso, que formar fila com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito; E vivem nessa penumbra cinzenta sem conhecer nem vitória nem derrota.

Franklin Roosevelt

## RESUMO

O PVC tem sido amplamente utilizado na indústria de embalagens, na forma de filme flexível de PVC, para o acondicionamento de alimentos. Porém, para que seja possível esta utilização é necessária a adição de plastificantes. Dentre os plastificantes mais utilizados em filmes flexíveis de PVC está o adipato de di-(2-etilhexila) – DEHA. A possibilidade de que ocorra a contaminação do alimento por constituintes da própria embalagem não pode ser negligenciada. A Resolução nº 17 da ANVISA de 17 de março de 2008 estabelece limite de migração específica para DEHA em  $18 \text{ mg kg}^{-1}$  do alimento ou solvente simulante. Diante deste cenário é necessário um monitoramento dos filmes flexíveis de PVC vendidos no comércio para acondicionamento de alimentos. Para tal deve-se ter disponível método para determinação da migração do DEHA. A Resolução nº 51 da ANVISA de 26 de novembro de 2010 estabelece condições para o ensaio de migração, porém é necessária a validação intralaboratorial do método. Com o objetivo de preencher esta lacuna, o presente trabalho apresenta a validação de um método para avaliação da migração do DEHA da embalagem para alimentos gordurosos. O teste de migração do DEHA foi realizado através do contato de  $1 \text{ dm}^2$  do filme de PVC com 100 mL de solvente simulante isooctano por 48 h à  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ . A concentração de migração do DEHA foi determinada por cromatografia a gás com detecção por ionização em chama e coluna de sílica fundida recoberta internamente com fase estacionária constituída de 5% fenilmetilsilicone. O método foi validado intralaboratorialmente e considerado adequado ao propósito. A faixa de trabalho foi definida de 6 a  $36 \text{ mg kg}^{-1}$  e considerada linear, não sendo observada falta de ajuste ao modelo. Não foi observado efeito matriz. O método apresentou repetitividade e precisão intermediária adequadas e resultados robustos para temperatura e tempo de migração de  $(20 \pm 3) \text{ }^\circ\text{C}$  e  $48 \text{ h} \pm 30$  minutos, respectivamente. Vinte e cinco amostras de filme de PVC foram ensaiadas, apresentando resultados para a migração específica de DEHA entre 7,2 e  $149 \text{ mg kg}^{-1}$  de solvente simulante. Dentre as amostras ensaiadas, 48 % apresentaram resultado acima do limite estabelecido na legislação. Dez amostras apresentaram resultado abaixo do limite de detecção do método ( $0,52 \text{ mg kg}^{-1}$ ).

Palavras-chave: Validação. Migração. Alimentos gordurosos. adipato de di-(2-etilhexila). Cromatografia a gás.



## ABSTRACT

PVC has been widely used in the packaging industry, in the shape of flexible PVC film, for packaging foods. However, for this use is required the addition of plasticizers. Among the plasticizers commonly used in flexible PVC films are di-(2-ethylhexyl) adipate - DEHA. The possibility of the occurrence of the contamination of food by constituents of the packaging itself cannot be neglected. Resolution N° 17 of ANVISA of 17 March 2008 establishing specific migration limit for DEHA in  $18 \text{ mg kg}^{-1}$  of food or simulant solvent. This scenario requires a monitoring of flexible PVC films sold commercially for packing food. To do this must be available a method to determine migration of DEHA. Resolution N° 51 of ANVISA of 26 November 2010 establishing conditions for the migration test, but is required the in-house validation of the method. Aiming to fill this gap, this paper presents the validation of a method for the determination of the migration of DEHA from packaging for fatty foods. The test migration of DEHA was carried through contact of  $1 \text{ dm}^2$  of PVC film with 100 mL of simulant solvent isooctane for 48 h at  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ . The migration concentration of DEHA was determined by gas chromatography with flame ionization detector and a fused silica column coated internally with a stationary phase consisting of 5% phenylmethylsilicone. The method was in-house validated and considered suitable for purpose. The working range defined was  $6\text{-}36 \text{ mg kg}^{-1}$  and considered linear, with no observed lack-of-fit. There was no matrix effect. The method has adequate repeatability and intermediate precision and robust results for temperature and time migration of  $(20 \pm 3) \text{ }^\circ\text{C}$  and  $48 \text{ h} \pm 30 \text{ min}$  respectively. Twenty five PVC film samples were tested, presenting results for specific migration of DEHA between  $7.2$  and  $149 \text{ mg kg}^{-1}$  of simulant solvent. Among the samples tested, 48% had results above the limit established by legislation. Ten samples had results below the limit of detection ( $0.52 \text{ mg kg}^{-1}$ ).

Keywords: Validation. Migration. Fatty foods. di-(2-ethylhexyl) adipate. Gas Chromatography.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b> Síntese da resina de PVC e adição de aditivos.....	15
<b>Figura 2.</b> Estrutura do adipato de di-(2-etil-hexila).....	17
<b>Figura 3.</b> Fluxograma do ensaio de migração. ....	20
<b>Figura 4.</b> Fluxo de preparo das soluções de trabalho.....	30
<b>Figura 5.</b> Sequência de Injeção no Cromatógrafo a Gás.....	32
<b>Figura 6.</b> Sequência de análises para os ensaios de repetitividade e homogeneidade .....	41
<b>Figura 7.</b> Grupos de replicatas .....	41
<b>Figura 8.</b> Incertezas de maior importância.....	47
<b>Figura 9.</b> Diagrama de causa e efeito para o ensaio de migração. ....	47
<b>Figura 10.</b> Curva analítica final de DEHA em solvente.....	52
<b>Figura 11.</b> Gráfico de Durbin-Watson ( $e_i$ x $e_{i-1}$ ), curva em solvente.....	54
<b>Figura 12.</b> Intervalo de Confiança da Reta .....	55
<b>Figura 13.</b> Curva analítica final preparada na presença da matriz .....	56
<b>Figura 14.</b> Gráfico de Durbin-Watson ( $e_i$ x $e_{i-1}$ ), curva na presença da matriz.....	57

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Preparo das Soluções Estoque.....	30
<b>Tabela 2.</b> Preparo das Soluções de Trabalho.....	31
<b>Tabela 3.</b> Análise de variância para significância da regressão e do desvio da linearidade.....	37
<b>Tabela 4.</b> Análise de variância (ANOVA) para avaliação da homogeneidade da amostra. ....	41
<b>Tabela 5.</b> Variações Avaliadas.....	44
<b>Tabela 6.</b> $R_{eq}$ e $R_{crit}$ calculados .....	53
<b>Tabela 7.</b> Resultados Obtidos.....	53
<b>Tabela 8.</b> Limites $d_L$ e $d_U$ .....	54
<b>Tabela 9.</b> Análise de variância para significância da regressão e do desvio da linearidade.....	54
<b>Tabela 10.</b> Limites de detecção e quantificação .....	55
<b>Tabela 11.</b> $R_{eq}$ e $R_{crit}$ calculados .....	56
<b>Tabela 12.</b> Resultados Obtidos.....	57
<b>Tabela 13.</b> Limites $d_L$ e $d_U$ .....	57
<b>Tabela 14.</b> Análise de variância para significância da regressão e do desvio da linearidade.....	58
<b>Tabela 15.</b> Avaliação da homoscedasticidade entre as curvas.....	58
<b>Tabela 16.</b> Comparação das inclinações e interseções das curvas.....	59
<b>Tabela 17.</b> Grupos de replicatas .....	59
<b>Tabela 18.</b> Análise de variância (ANOVA) para avaliação da homogeneidade da amostra. ....	60
<b>Tabela 19.</b> Avaliação da Repetitividade.....	60
<b>Tabela 20.</b> Avaliação da Precisão Intermediária.....	60
<b>Tabela 21.</b> Teste F e Teste T para comparação de médias .....	61
<b>Tabela 22.</b> Migração específica do DEHA, determinada para as amostras ensaiadas .....	62

## LISTA DE SIGLAS

ANOVA – Análise de variância

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CG-DIC – Cromatógrafo a gás com detector por ionização em chama

CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência

DEHA – Adipato de di-(2-etil-hexila)

DEHP – Ftalato de di-(2-etil-hexila)

EDC – Dicloroetano

EPA - Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos da América

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

IARC – International Agency for Research on Cancer

INCQS – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

LOD – Limite de detecção

LOQ – Limite de quantificação

MMQO – Método de mínimos quadrados ordinários

MS – Ministério da Saúde

MVC – Monômero cloreto de vinila

POP – Procedimento operacional padrão

PVC – Poli (cloreto de vinila)

VIM – Vocabulário Internacional de Metrologia

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	15
1.1	POLI (CLORETO DE VINILA)	15
1.2	ADITIVOS PLASTIFICANTES	16
1.3	EMBALAGENS PARA ALIMENTOS	18
1.4	MIGRAÇÃO	19
1.5	MÉTODO ANALÍTICO	19
1.6	VALIDAÇÃO DO MÉTODO	21
1.6.1	Faixa de trabalho	22
1.6.2	Curva analítica e linearidade	22
1.6.3	Efeito de matriz	23
1.6.4	Repetitividade	23
1.6.5	Precisão intermediária	24
1.6.6	Robustez	24
1.6.7	Limites de detecção e quantificação	25
1.7	ESTIMATIVA DA INCERTEZA DE MEDIÇÃO	25
1.8	JUSTIFICATIVA	26
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	27
2.1	OBJETIVO GERAL	27
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	28
3.1	MATERIAIS	28
3.2	PADRÕES E REAGENTES	28
3.3	EQUIPAMENTOS	28
3.4	AMOSTRAS	29
3.5	ENSAIO DE MIGRAÇÃO	29
3.6	VALIDAÇÃO DO MÉTODO	30
3.6.1	Desenho experimental da curva analítica	30
3.6.2	Avaliação da linearidade da curva analítica	32
3.6.2.1	<i>Estimativa dos parâmetros de regressão</i>	32
3.6.2.2	<i>Tratamento de valores extremos</i>	33
3.6.2.3	<i>Teste de normalidade</i>	34
3.6.2.4	<i>Teste de homoscedasticidade</i>	35

3.6.2.5	<i>Teste de independência (autocorrelação dos resíduos)</i> .....	36
3.6.2.6	<i>Teste de significância da regressão e do desvio da linearidade</i> .....	37
3.6.2.7	Limites de detecção e quantificação .....	38
3.6.3	Efeito matriz.....	38
3.6.3.1	Avaliação dos resultados.....	39
3.6.4	Repetitividade .....	40
3.6.4.1	<i>Avaliação da homogeneidade da amostra</i> .....	41
3.6.4.2	<i>Avaliação da repetitividade do método</i> .....	42
3.6.5	Precisão Intermediária .....	43
3.6.6	Robustez .....	44
3.7	INCERTEZA DE MEDIÇÃO .....	46
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>52</b>
4.1	VALIDAÇÃO DO MÉTODO.....	52
4.1.1	Avaliação da linearidade da curva analítica preparada em solvente .....	52
4.1.1.1	<i>Tratamento de valores extremos</i> .....	52
4.1.1.2	<i>Teste de normalidade</i> .....	52
4.1.1.3	<i>Teste de homoscedasticidade</i> .....	53
4.1.1.4	<i>Teste de independência (autocorrelação dos resíduos)</i> .....	53
4.1.1.5	<i>Teste de significância da regressão e desvio da linearidade</i> .....	54
4.1.2	Limites de detecção e quantificação – LOD e LOQ .....	55
4.1.3	Efeito matriz.....	55
4.1.3.1	<i>Avaliação da linearidade da curva preparada na presença da matriz</i> .....	55
4.1.3.1.1	<i>Tratamento de valores extremos (outliers)</i> .....	55
4.1.3.1.2	<i>Teste de normalidade</i> .....	56
4.1.3.1.3	<i>Teste de homoscedasticidade</i> .....	56
4.1.3.1.4	<i>Teste de independência (autocorrelação dos resíduos)</i> .....	57
4.1.3.2	<i>Avaliação do efeito matriz</i> .....	58
4.1.4	Repetitividade .....	59
4.1.5	Precisão intermediária .....	60
4.1.6	Robustez .....	61
4.2	PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO - POP .....	61
4.3	AMOSTRAS ENSAIADAS.....	62
4.3.1	Avaliação da concentração de migração de amostras de filme flexível de PVC.....	62

<b>5 CONCLUSÃO.....</b>	<b>64</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>65</b>

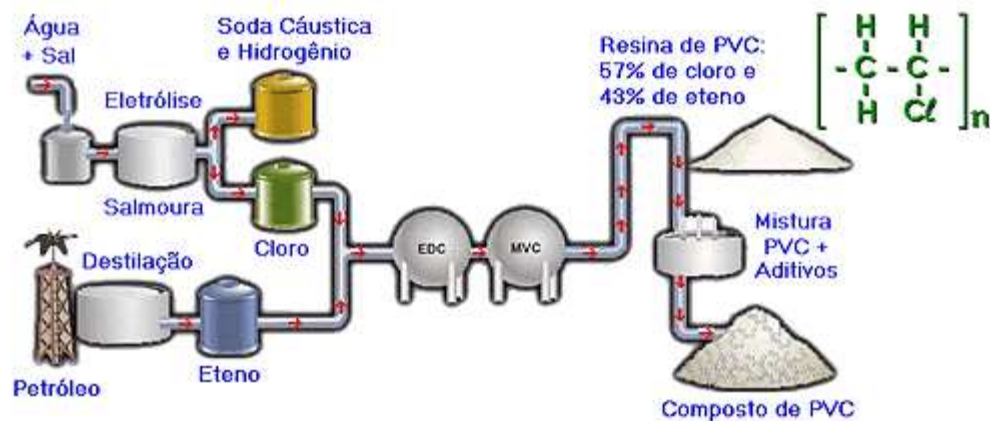
# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 POLI (CLORETO DE VINILA)

O Poli (cloreto de vinila) - PVC é um termoplástico vinílico, obtido a partir da polimerização do monômero cloreto de vinila (MVC). O primeiro registro da reação de polimerização ocorreu em 1872, quando Eugen Baumann detalhou a mudança de estado do cloreto de vinila, induzida pela luz solar, para um produto sólido branco, que imaginou ser um isômero do monômero (BRASKEM, 2006). Porém somente em 1930, na Alemanha, teve início a produção comercial do PVC através da utilização da polimerização em emulsão. Em 1932 ocorreu o primeiro avanço para seu uso com a descoberta da utilização de plastificantes, o que possibilitou ultrapassar problemas relacionados à estabilidade e ao processamento térmico do PVC (ENDO, 2002).

Atualmente o PVC é fabricado através do sal marinho, principal matéria prima do processo, e do petróleo. A partir do sal marinho é obtido o cloro, responsável por 57% da resina de PVC. Enquanto a partir do petróleo é obtido o eteno, responsável pelos 43% restantes. Em fase gasosa, o eteno e o cloro reagem para formar o dicloroetano, responsável pela obtenção do MVC. As moléculas de MVC são submetidas ao processo de polimerização para formação do PVC (INSTITUTO DO PVC, [2012]). A figura 1 apresenta o processo de síntese da resina de PVC e adição de aditivos.

**Figura 1.** Síntese da resina de PVC e adição de aditivos



Fonte: (INSTITUTO DO PVC, [2012])



Nos últimos anos tem ocorrido um rápido crescimento no desenvolvimento e aplicação de compostos poliméricos com matrizes termoplásticas. Este movimento se deve a facilidade de conformação e fabricação do polímero, a possibilidade de obtenção de produtos leves em relação aos materiais tradicionais, e ainda a boa relação custo/desempenho mecânico (GRIZZO; HAGE JÚNIOR; LAURINI, 2011).

O PVC é o segundo termoplástico mais consumido em todo o mundo, com capacidade mundial de produção de resinas de PVC estimada em cerca de 36 milhões de toneladas ao ano (BRASKEM, 2006). No ano de 2009 a produção industrial brasileira de resina de PVC foi de 689.484 toneladas, somadas ainda à importação de 285.768 toneladas no mesmo ano. Do total de resina utilizada no Brasil no ano de 2009, 5,1% foi utilizada na fabricação de embalagens (INSTITUTO DO PVC, [2010]).

O PVC é considerado um dos polímeros mais versáteis devido sua possibilidade em interagir com diferentes aditivos, o que pode alterar suas características dentro de um amplo espectro de propriedades, apresentando-se desde rígido a extremamente flexível e, conseqüentemente, sendo utilizado em aplicações que vão desde tubos e perfis rígidos, para uso na construção civil, até brinquedos e filmes flexíveis utilizados no acondicionamento de alimentos, sangue, soro e plasma (MADALENO et al., 2009).

O PVC tem sido amplamente utilizado na indústria de embalagens, na forma de filme flexível de PVC, para o acondicionamento de alimentos. Porém, para que seja possível esta utilização é necessária a adição de plastificantes (BARROS et al., 2011).

## 1.2 ADITIVOS PLASTIFICANTES

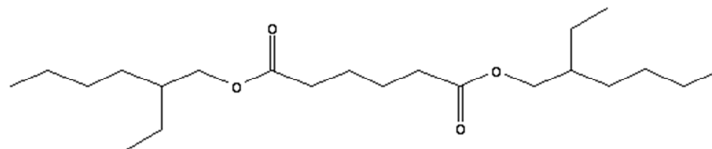
Plastificantes são substâncias orgânicas sintéticas de baixo peso molecular, adicionadas à resina de polímero para aumentar sua flexibilidade e a resistência do produto final, facilitando a produção e a processabilidade do polímero (SOUZA et al., 2012). Tais aditivos normalmente possuem uma elevada mobilidade devido ao peso molecular relativamente baixo e facilmente se difundem para os meios vizinhos, particularmente aqueles com elevado teor de gordura (ZYGOURA et al., 2005).

Os plastificantes comerciais são, de maneira geral, líquidos inodoros, incolores, insolúveis em água e de baixa volatilidade, sendo em sua grande maioria ésteres ou poliésteres (BRASKEM, 2006).

O PVC é um dos polímeros mais frequentemente plastificados (RAHMAN; BRAZEL, 2004). O PVC tem uma cadeia polihalogenada com átomos de cloro covalentemente ligados a átomos de carbono, proporcionando, assim, muitos pontos de interação dipolar ao longo da sua cadeia, que dão origem a interações fortes entre cadeias e consequente rigidez do material polimérico. Os aditivos plastificantes quebram a interação dipolo intercadeias proporcionando um material com mobilidade e flexibilidade características de um polímero com menor número de interações. Assim, o uso de plastificantes faz com que o PVC adquira diversas aplicações, entre elas dispositivos médicos, material para embalagem e ainda produtos infantis. (VINHAS et al., 2003).

Dentre os plastificantes mais utilizados em filmes flexíveis de PVC está o adipato de di-(2-etil-hexila) – DEHA (ALVES, 2009). A figura 2 apresenta a estrutura do plastificante.

**Figura 2.** Estrutura do adipato de di-(2-etil-hexila)



Fonte: (NIST, 2011)

A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos da América - EPA classifica o DEHA dentro do grupo toxicológico C, como um possível carcinógeno humano. A classificação é baseada na ausência de dados em humanos e ainda no aumento da incidência de tumores hepáticos em ratos fêmeas expostas ao plastificante. Com exceção de um ensaio de dominância letal positivo, não há evidências de genotoxicidade, porém o DEHA exibe relações estruturais com outros compostos não genotóxicos classificados como prováveis e possíveis carcinogêneos ao homem (U.S.EPA, 2012). Em estudo realizado com administração oral do DEHA em camundongos, foi observada a produção de adenomas e carcinomas no fígado

de machos e fêmeas. A exposição in útero, e durante a lactação, ao DEHA induz mortalidade peri e pós-natal da prole (PLASTINO, 2007).

### 1.3 EMBALAGENS PARA ALIMENTOS

O uso crescente de materiais poliméricos para embalagens de alimentos, principalmente plásticos, têm se destacado nas últimas décadas devido a fatores mercadológicos como transparência, leveza, resistência a quebras, versatilidade de formatos e tamanhos, além dos sistemas de fechamento. Além disso, os custos são altamente competitivos, tornando os plásticos extremamente atraentes para os produtores e usuários de embalagens (ALVES, 2009).

A Resolução RDC nº 91, de 11 de maio de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), do Ministério da Saúde (MS) define a embalagem para alimentos como “...um artigo que está em contato direto com os alimentos, destinado a contê-los desde a sua fabricação até a sua entrega ao consumidor, com a finalidade de protegê-los de agentes externos, de alterações e de contaminações, assim como adulterações” (BRASIL, 2001).

Segundo Evangelista (1998), embalagem é todo material acondicionante que exerça funções de proteção do alimento in natura, da matéria-prima alimentar ou do produto alimentício, temporária ou permanentemente, no decorrer de suas fases de elaboração e armazenamento.

As embalagens de alimentos, dentre suas funções, visam proteger o produto da contaminação externa, porém, a possibilidade de que ocorra contaminação do produto por constituintes da própria embalagem não pode ser negligenciada, principalmente por estar diretamente relacionada com a saúde humana considerando a segurança alimentar e a qualidade dos alimentos (MELO, 2007).

Dentre as embalagens poliméricas mais utilizadas estão as fabricadas em PVC. Neste contexto, os filmes plásticos flexíveis de PVC ganham destaque por sua ampla utilização como embalagem de alimentos (BARROS et al., 2011), o que pode causar a contaminação dos mesmos através da migração dos plastificantes utilizados.

## 1.4 MIGRAÇÃO

A exposição humana e ambiental aos plastificantes pode ocorrer de diferentes maneiras. As causas mais relevantes destas exposições incluem a contaminação durante o processo de fabricação do plastificante ou do polímero, lixiviação, migração e ainda evaporação dos plastificantes (RAHMAN, BRAZEL, 2004). A alimentação tem sido reportada como a principal fonte de exposição humana ao adipato de di-(2-etil-hexila). Isso se deve a migração do plastificante, em particular para alimentos gordurosos, tais como queijo e carne, a partir de filmes de PVC utilizados como embalagens (IARC, 2000).

A Resolução RDC nº 91, de 11 de maio de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), do Ministério da Saúde (MS) define migração como sendo a transferência de componentes do material em contato com alimentos para estes produtos, devido a fenômenos físico-químicos. Migração específica é a quantidade de um componente não polimérico particular de interesse toxicológico transferida dos materiais em contato com alimentos para os alimentos ou seus simulantes, nas condições equivalentes de ensaio (BRASIL, 2001).

Dentre os fatores que podem afetar a cinética de difusão, ou migração dos plastificantes estão a natureza e a espessura do polímero, a natureza e a concentração inicial do plastificante no polímero, o processo de plastificação, o meio circundante, além das condições de contato entre o alimento e o polímero (ZYGOURA et al., 2005).

A Resolução nº 17 da ANVISA de 17 de março de 2008 estabelece limite de migração específica para DEHA em  $18 \text{ mg.kg}^{-1}$  do alimento ou solvente simulante, sendo este um produto que imita o comportamento de um grupo de alimentos que tem características semelhantes (BRASIL, 2008).

## 1.5 MÉTODO ANALÍTICO

A Resolução nº 51 da ANVISA de 26 de novembro de 2010, dispõe sobre migração em materiais, embalagens e equipamentos plásticos destinados a entrar em contato com alimentos. A resolução estabelece condições para o desenvolvimento do ensaio de migração em solvente simulante. Para contato entre o plástico e alimentos gordurosos, que contenham gordura ou óleos entre seus

componentes, a norma estabelece a utilização de solventes simulantes D (simulantes de alimentos gordurosos) ou ainda simulantes D' (simulante equivalente ao simulante D). Dentre os simulantes estabelecidos na categoria D, está o isooctano (BRASIL, 2010).

Em ensaios de migração a amostra de material plástico é colocada em contato com o solvente simulante nas condições de tempo e temperatura correspondentes para que sejam reproduzidas as condições normais ou previsíveis de elaboração, fracionamento, armazenamento, comercialização e consumo do alimento (UE, 2007). Para tempos de contato superiores a 24 h em temperaturas maiores que 20°C e menores que 40°C, quando utilizado isooctano como solvente simulante, o ensaio de migração deve ser realizado à temperatura de 20°C por 48 horas (BRASIL, 2010).

A determinação da concentração de migração específica é realizada no solvente simulante ao término do ensaio de migração, através de técnica aplicável à detecção e quantificação da substância de interesse. Na literatura são relatadas diferentes métodos para determinação da concentração de migração do DEHA em solvente. Petersen e Breindahl (1998) relatam a determinação da concentração de DEHA em solvente isooctano por cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas. Esteves e colaboradores (2007) descrevem método com determinação por cromatografia a gás com detector por ionização em chama. A figura 3 apresenta o fluxograma do ensaio de migração.

**Figura 3.** Fluxograma do ensaio de migração.



## 1.6 VALIDAÇÃO DO MÉTODO

Milhões de medições analíticas são realizadas todos os dias em milhares de laboratórios ao redor do mundo (EURACHEM, 1998). É papel do laboratório de ensaio demonstrar que os resultados obtidos em condições particulares de aplicação são de confiança e adequados para o propósito (SOBOLEVA; AMBRUS, 2004).

O bom desempenho de qualquer técnica analítica depende crucialmente de dois parâmetros: a qualidade das medidas instrumentais e a confiabilidade estatística dos cálculos envolvidos no seu processamento. Uma forma de assegurar a aplicabilidade e o alcance de um método durante as operações de rotina de um laboratório é estabelecendo os limites destes parâmetros por meio da estimativa das figuras de mérito, numa etapa conhecida como validação (RIBEIRO et al., 2008).

A validação de métodos analíticos é assim um importante requisito para dar suporte às atividades de metrologia em análise química e de garantia da qualidade dos produtos nas indústrias (ESTEVES et al., 2007), sendo um componente essencial das medições que um laboratório deve implementar para garantir que o mesmo produza dados analíticos confiáveis (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002).

A norma ABNT NBR ISO/IEC 17025: 2005 estabelece requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração, sendo esta a base para a acreditação de tais laboratórios. Segundo a norma, na utilização de métodos desenvolvidos pelo laboratório, o mesmo deve assegurar que as características de desempenho do método atendem aos requisitos para as operações analíticas pretendidas (ABNT, 2005).

O Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia – INMETRO estabelece que para um método de análise de elementos traços, todos os parâmetros de validação devem ser verificados. São considerados traços os elementos em concentração abaixo de 0,01 % ( $100 \text{ mg kg}^{-1}$ ). Os parâmetros a serem verificados são: linearidade e faixa de trabalho, precisão (repetitividade e precisão intermediária), efeito matriz, robustez e limites de quantificação e detecção (INMETRO, 2010).

O desenho detalhado e a execução do procedimento de validação devem, sempre que possível, proporcionar uma avaliação realista do número e da extensão dos efeitos operacionais que podem ocorrer durante o uso normal do método avaliado, bem como abranger a faixa de concentrações de trabalho e tipos de

amostra que estejam dentro do escopo do método (BRATINOVA; RAFFAEL; SIMONEAU, 2009).

#### 1.6.1 Faixa de trabalho

De acordo com o trabalho a ser desenvolvido, uma faixa de concentração do analito ou valores da propriedade no qual o método pode ser aplicado deve ser definida, sendo denominada faixa de trabalho (GOUVÊA, 2011). A faixa de trabalho de um método analítico é o intervalo compreendido entre os níveis de concentração superior e inferior, incluindo estes níveis, que demonstram precisão, exatidão e linearidade adequada (HUBER, 1998). A faixa de trabalho é uma parte importante da validação do método analítico (BRATINOVA; RAFFAEL; SIMONEAU, 2009).

Para definição da faixa de trabalho a ser utilizada é necessária a observação do limite de restrição do analito, presente na legislação. Esta concentração deve encontrar-se no meio da faixa de trabalho, onde a curva analítica apresenta a menor incerteza para a determinação da concentração. Os níveis de concentração da curva analítica devem ser igualmente espaçados e preparados com três repetições genuínas, ou seja, cada repetição é preparada independentemente, a partir de soluções estoque diferentes (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002).

#### 1.6.2 Curva analítica e linearidade

A construção de curvas analíticas é uma prática comum em laboratório, sendo este passo de extrema importância para a obtenção de resultados precisos e com boa exatidão (BAZILIO et al., 2012). Levando-se em consideração que a maioria dos métodos analíticos utilizam relações lineares para quantificação analítica, o exame de uma função de calibração para a linearidade é uma figura de desempenho importante na validação de um método analítico (SOUZA; JUNQUEIRA, 2005).

A linearidade do método expressa a capacidade do mesmo em apresentar resultados diretamente proporcionais em relação às concentrações do analito de interesse, ao longo da faixa de trabalho (HUBER; 1998).

A linearidade pode ser testada informalmente através do exame de um gráfico de resíduos produzidos por regressão linear das respostas nas concentrações em um conjunto de calibração apropriado. Qualquer padrão de curva sugere falta de ajuste (*lack-of-fit*) devido a uma função de calibração não linear. Um teste de

significância pode ser realizado por meio da comparação da variância da falta de ajuste com aquela devido ao erro puro (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002).

Souza e Junqueira propõe um procedimento detalhado para o teste de linearidade de curvas de calibração na validação do ensaio analítico pelo método de mínimos quadrados ordinários - MMQO, incluindo delineamento experimental, a estimativa dos parâmetros, e tratamento de valores extremos (SOUZA; JUNQUEIRA, 2005).

Valores extremos são valores ou dados que estatisticamente não fazem parte do conjunto de dados estudado, podendo levar a erros na estimativa dos parâmetros da regressão (BELSLEY; KUH; WELSCH, 1980). Sendo assim é importante a avaliação da presença destes e uma possível exclusão.

### 1.6.3 Efeito de matriz

A matriz da amostra pode conter componentes que interferem no desempenho da medição, podendo haver acréscimo ou redução do sinal. A magnitude do efeito também pode depender da concentração. Se o efeito matriz for significativo, a linearidade, a tendência e a precisão estarão seriamente comprometidas (INMETRO, 2010).

O processo de preparação dos padrões de calibração pode ser simplificado se os mesmos podem ser preparados como soluções simples do analito. Porém é necessário que seja avaliada uma possível incompatibilidade da matriz analisada antes da utilização desta estratégia simplificada de preparo dos padrões (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002).

### 1.6.4 Repetitividade

A repetitividade é o grau de concordância entre resultados de testes independentes realizados em condições de repetitividade, ou seja, obtidos com o mesmo método, com material de ensaio idêntico, no mesmo laboratório, pelo mesmo operador, utilizando o mesmo equipamento e em curto intervalo de tempo (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002; BRATINOVA, RAFFAEL; SIMONEAU, 2009).



A repetitividade é normalmente determinada para circunstâncias específicas que na prática pode ser muito variada (EURACHEM, 1998). Pode ser expressa quantitativamente em termos da característica da dispersão dos resultados, podendo ser determinada por meio da análise de padrões, materiais de referência ou adição do analito a um branco da amostra (INMETRO, 2010).

Para uma avaliação correta da repetitividade do método, é necessária a verificação da homogeneidade da amostra utilizada. Amostras heterogêneas podem causar resultados falsos de repetitividade, uma vez que é possível confundir problemas relacionados à homogeneidade da amostra com a falta de repetitividade do método.

#### 1.6.5 Precisão intermediária

A precisão intermediária refere-se à precisão avaliada sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório, mas definindo uma ou mais condições a variar. Dentre estas condições estão diferentes analistas, diferentes equipamentos e diferentes tempos (INMETRO, 2010).

#### 1.6.6 Robustez

Em qualquer método existem certas etapas críticas que, se não realizadas com cuidado suficiente, podem ocasionar desvios no resultado final. O desempenho do método pode ser afetado e o resultado final pode não ser satisfatório (EURACHEM, 1998). A robustez de um método analítico é a resistência à alteração nos resultados produzidos por um processo analítico quando pequenos desvios são realizados a partir das condições experimentais descritas no processo (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002). Sendo assim, testes de robustez examinam o efeito destes desvios, realizados nas etapas críticas do procedimento analítico, no resultado final obtido. Se a influência do desvio em um parâmetro do método está dentro de uma tolerância especificada anteriormente, o parâmetro é considerado dentro do alcance da robustez do método (HUBER, 1998). Se as medições são

sensíveis a variações nas condições analíticas, estas condições devem ser adequadamente controladas ou uma indicação de precaução deve ser incluída no procedimento analítico (ICH, 2005).

#### 1.6.7 Limites de detecção e quantificação

Sempre que as medições analíticas são realizadas em baixos níveis do analito ou de uma propriedade, como por exemplo, em níveis de traço, torna-se importante conhecer o nível mais baixo do analito ou de uma propriedade, que pode ser detectado e quantificado com segurança pelo método (EURACHEM, 1998).

Em termos gerais, o limite de detecção (LOD) é a menor quantidade ou concentração do analito na amostra, que pode ser seguramente distinguida de zero (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002). O limite de quantificação (LOQ) representa o menor nível de concentração do analito que o método é capaz de determinar com um nível de incerteza adequado (BRATINOVA; RAFFAEL; SIMONEAU, 2009).

### 1.7 ESTIMATIVA DA INCERTEZA DE MEDIÇÃO

Com o objetivo de adequar o ensaio às normas de qualidade de forma a garantir a confiabilidade dos resultados analíticos e obter o reconhecimento da competência do laboratório, um importante passo a ser dado é a acreditação do ensaio, segundo os requisitos da norma ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005. Um dos requisitos técnicos abordados trata de métodos de ensaio e calibração, sendo estabelecido que laboratórios de ensaio devem aplicar procedimentos para a estimativa das incertezas de medição (ABTN, 2005).

Diante deste cenário, a estimativa da incerteza de medição em ensaios químicos torna-se de grande importância para a competência dos laboratórios de ensaios e ainda requisito para a confiabilidade do resultado analítico. De uma forma geral, o resultado de uma medição é somente uma aproximação ou estimativa de uma quantidade específica para um mensurando, assim, o resultado somente é completo quando acompanhado por uma declaração quantitativa de sua incerteza (NIST, 1994; DE LA CRUZ et al., 2010). O Vocabulário Internacional de Metrologia – VIM define incerteza como um parâmetro não negativo que caracteriza a dispersão

dos valores atribuídos a um mensurando, com base nas informações utilizadas (INMETRO, 2012).

A tradicional abordagem para estimativa da incerteza de medição é baseada na identificação, quantificação, e combinação de todas as contribuições individuais para a incerteza final. Nesta abordagem, chamada de “bottom-up”, a incerteza combinada final é derivada das incertezas dos componentes individuais, sendo adotada pela Organização Internacional de Normalização (ISO) (TOMICÍ; NASIPAK; BABIĆ, 2012).

A estimativa da incerteza do resultado de um ensaio perpassa pelo conhecimento dos pontos críticos do procedimento analítico, sendo necessário conhecer os fatores que podem vir a influenciar o seu resultado final. Alguns destes principais fatores envolvem o preparo dos padrões analíticos, diluição das amostras, medições feitas em um equipamento e procedimento de quantificação por calibração (EURACHEM, 2012). Com as fontes de incerteza relevantes identificadas, através de ferramentas estatísticas, são estimadas as incertezas padrão atribuídas a cada fonte e a incerteza padrão combinada final.

## 1.8 JUSTIFICATIVA

A utilização de embalagens de filme flexível de PVC no acondicionamento de alimentos pode trazer problemas relacionados à contaminação destes por substâncias presentes no material polimérico. O DEHA é um dos principais plastificantes utilizados como aditivo no processo de fabricação do filme, sendo capaz de migrar do material polimérico para o alimento gorduroso em contato. A legislação brasileira estabelece limite para a migração específica do DEHA. Sendo assim, é importante o monitoramento dos filmes flexíveis de PVC utilizados para acondicionamento de alimentos. Para tal é necessário que estejam disponíveis métodos validados capazes de determinar a concentração de migração do plastificante.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

- Validar método para determinação da migração do adipato de di-(2-etil-hexila) de embalagens de filme flexível de PVC para alimentos gordurosos utilizando-se solvente simulante, com determinação da concentração por cromatografia a gás com detector por ionização em chama.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estabelecer método analítico para o ensaio de migração do adipato de di-(2-etil-hexila) da embalagem para alimentos gordurosos;
- Verificar a aplicabilidade do método segundo os parâmetros: Linearidade; Efeito Matriz; Repetitividade; Precisão Intermediária e Robustez;
- Elaborar procedimento operacional padrão para aplicação do método no laboratório de análise de contaminantes orgânicos;
- Avaliar a migração específica do DEHA para alimentos gordurosos através de um programa de monitoramento em parceria com a Secretaria Estadual de Vigilância Sanitária.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 MATERIAIS

Foram utilizados para o ensaio de migração e validação do método os seguintes materiais de laboratório: Bureta de vidro de 5 mL, calibrada; erlenmeyers de vidro de 250 mL com tampa esmerilhada de vidro; balões volumétricos de vidro de 50 mL calibrados; pipetas volumétricas de vidro de 20 mL calibradas; molde de 1 dm<sup>2</sup> calibrado.

#### 3.2 PADRÕES E REAGENTES

Para o preparo das soluções estoque, foi utilizado um padrão de adipato de di-(2-etil-hexila) do fabricante ChemService com pureza igual a (98,1 ± 0,5) %. Foi utilizado como solvente simulante o isooctano grau Absolv® do fabricante TEDIA com pureza mínima igual a 99,8 %. O solvente foi utilizado também para preparo das soluções estoque e de trabalho, e diluição das amostras.

#### 3.3 EQUIPAMENTOS

Foram utilizados para o ensaio de migração e validação do método os seguintes equipamentos: Balança analítica do fabricante Sartorius, calibrada, com precisão de 5 casas decimais, modelo R200D; estufa do fabricante FANEM modelo 347-CD/2 e faixa de trabalho de -10 a 60°C; termômetro digital do fabricante VWR com capacidade de leitura de -35 a 65°C, calibrado; cromatógrafo a gás do fabricante Shimadzu, modelo GC-14A, com injetor automático modelo AOC-20i e detector por ionização em chama; coluna de sílica fundida recoberta internamente com fase estacionária constituída de 5% fenilmetilsilicone (HP-5 da J&W Scientific) com dimensões de 15 m de comprimento x 0,53 mm de diâmetro interno x 1,5 µm de espessura de filme interno.

### 3.4 AMOSTRAS

Através de um programa, em parceria com as vigilâncias sanitárias municipais e estaduais do estado do Rio de Janeiro, foram recolhidas amostras de filme flexível de PVC para determinação da migração do adipato de di-(2-etil-hexila). Foram recolhidas e analisadas 25 amostras de diferentes marcas disponíveis no mercado e provenientes de diversos supermercados do estado. As amostras foram recebidas no INCQS/FIOCRUZ através do grupo técnico de alimentos e ensaiadas no laboratório de alimentos e contaminantes.

### 3.5 ENSAIO DE MIGRAÇÃO

Para o ensaio de migração foram cortadas, com o auxílio de um molde calibrado, três seções com 1 dm<sup>2</sup> de área do filme de PVC. Cada seção foi colocada em contato com 100 mL de solvente simulante (isooctano) em um erlenmeyer de vidro de 250 mL com tampa, e acondicionado em estufa a 20 °C durante 48 horas.

Após a etapa de migração, foram injetadas alíquotas de 2 µL de cada solução obtida pelo ensaio de migração, em um cromatógrafo a gás acoplado a um detector por ionização em chama - CG-DIC. As temperaturas do injetor e do detector foram 270 °C. A rampa de temperatura da coluna foi de 170 °C até 220 °C (18 min), com acréscimo de 3 °C min<sup>-1</sup> e a vazão do gás de arraste nitrogênio foi 5,7 mL min<sup>-1</sup>. Quando necessário, as amostras foram diluídas para que suas concentrações estivessem dentro da faixa de trabalho.

O resultado final da migração do DEHA é reportado através da média das áreas dos picos cromatográficos das três soluções de migração da amostra ensaiada, quantificado por meio de uma curva analítica do analito.

Segundo a diretiva 2002/72/CE (2002), a densidade de todos os simulantes deve ser convencionalmente tomada como 1, assim a quantidade, em miligramas, de substância(s) liberada por litro de simulante (mg L<sup>-1</sup>) corresponde numericamente a quantidade, em miligramas, de substância(s) liberada por quilograma de simulante ou alimento. Sendo assim, a concentração de migração final é reportada em miligramas de DEHA por kg de solvente simulante ou alimento.

### 3.6 VALIDAÇÃO DO MÉTODO

#### 3.6.1 Desenho experimental da curva analítica

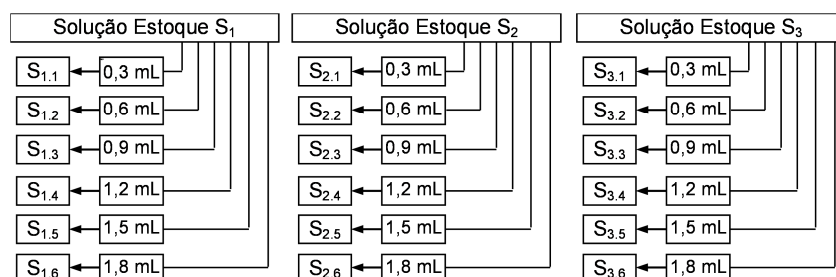
A faixa de trabalho definida foi de 6 a 36 mg L<sup>-1</sup>, observado o limite de restrição do adipato de di-(2-etil-hexila) de 18 mg L<sup>-1</sup> de solvente simulante. As soluções da curva analítica foram preparadas com concentrações nominais de 6, 12, 18, 24, 30 e 36 mg L<sup>-1</sup>. Para o preparo da curva analítica foram preparadas 3 soluções estoque medindo-se em balança analítica calibrada, 3 frações do padrão de adipato de di-(2-etil-hexila) com aproximadamente 100 mg. Cada fração foi transferida quantitativamente, uma por vez, para um balão volumétrico de 100 mL calibrado, e este foi avolumado à marca com isooctano. O mesmo balão foi utilizado para o preparo das três soluções, sendo lavado e secado entre cada procedimento. Na tabela 1 estão descritos os dados do preparo das soluções estoque. As concentrações das soluções estoque foram determinadas através das massas medidas na balança analítica e dos volumes dos balões volumétricos reais, presentes em seus respectivos certificados de calibração.

**Tabela 1.** Preparo das Soluções Estoque

Solução Estoque	Massa de Padrão (mg)	Volume do Balão (mL)	Concentração Final (mg L <sup>-1</sup> )
S <sub>1</sub>	100,13		1061,15
S <sub>2</sub>	108,09	99,963	1060,76
S <sub>3</sub>	108,52		1064,98

Dezoito soluções de trabalho foram preparadas medindo-se volumes apropriados das soluções estoque preparadas. A figura 4 apresenta o fluxo de preparo das soluções de trabalho.

**Figura 4.** Fluxo de preparo das soluções de trabalho.



Os volumes das alíquotas foram medidos com o auxílio de uma bureta de vidro calibrada com capacidade de 5 mL e os volumes finais das soluções foram ajustados em balões volumétricos de 50 mL calibrados. Foram determinadas as concentrações finais das soluções de trabalho através das concentrações das soluções estoque e dos volumes reais, presentes em seus respectivos certificados de calibração, da bureta e dos balões volumétricos. A tabela 2 apresenta os dados do preparo das soluções de trabalho.

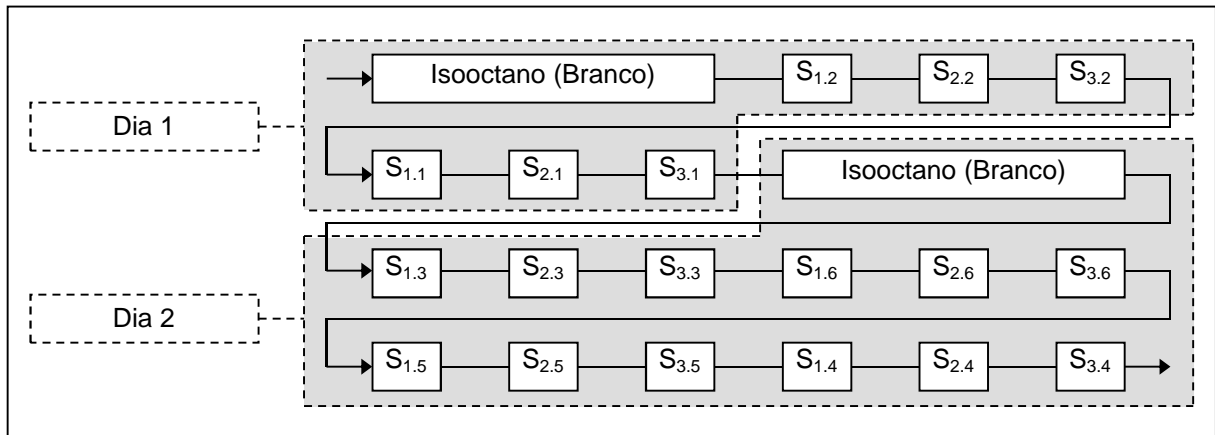
**Tabela 2.** Preparo das Soluções de Trabalho.

Solução	Solução Estoque	Volume da Alíquota (mL)	Volume Final da Solução (mL)	<i>i</i>	Concentração da Solução de Trabalho (mg L <sup>-1</sup> ), <i>x<sub>i</sub></i>
S <sub>1.1</sub>	S <sub>1</sub>	0,2960	49,99	1	6,2833
S <sub>1.2</sub>		0,5940	50,04	2	12,5964
S <sub>1.3</sub>		0,8930	49,95	3	18,9711
S <sub>1.4</sub>		1,1920	50,05	4	25,2725
S <sub>1.5</sub>		1,4900	50,07	5	31,5752
S <sub>1.6</sub>		1,7890	50,03	6	37,9487
S <sub>2.1</sub>	S <sub>2</sub>	0,2960	49,99	7	6,2809
S <sub>2.2</sub>		0,5940	50,04	8	12,5917
S <sub>2.3</sub>		0,8930	49,95	9	18,9641
S <sub>2.4</sub>		1,1920	50,05	10	25,2631
S <sub>2.5</sub>		1,4900	50,07	11	31,5635
S <sub>2.6</sub>		1,7890	50,03	12	37,9347
S <sub>3.1</sub>	S <sub>3</sub>	0,2960	49,99	13	6,3059
S <sub>3.2</sub>		0,5940	50,04	14	12,6418
S <sub>3.3</sub>		0,8930	49,95	15	19,0395
S <sub>3.4</sub>		1,1920	50,05	16	25,3636
S <sub>3.5</sub>		1,4900	50,07	17	31,6891
S <sub>3.6</sub>		1,7890	50,03	18	38,0856

Após o preparo das 18 soluções de trabalho, foi injetada uma alíquota de 2 µL de cada solução no CG-DIC, nas condições cromatográficas descritas nos itens 3.3 e 3.5. A figura 5 apresenta a sequência de injeção.



**Figura 5.** Sequência de Injeção no Cromatógrafo a Gás



### 3.6.2 Avaliação da linearidade da curva analítica

Com os dados obtidos na confecção da curva analítica, os parâmetros de regressão foram estimados com o auxílio da planilha “Planilha para Avaliação de Premissas” elaborada por Bazilio e colaboradores (2012). Foi avaliada a presença de valores extremos (outliers), a normalidade, homoscedasticidade e a independência dos resíduos da regressão, e o ajuste ao modelo linear. Foram determinados ainda os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ).

#### 3.6.2.1 Estimativa dos parâmetros de regressão

Os parâmetros de regressão foram estimados através das equações 1 e 2.

$$b = \frac{S_{xy}}{S_{xx}}, \quad \text{Equação 1}$$

$$a = \bar{y} - b\bar{x}. \quad \text{Equação 2}$$

sendo,

$$S_{xy} = \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y}),$$

$$S_{xx} = \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2,$$

onde,  $n$  é o número total de pontos da curva analítica.

O resíduo  $e_i$  referente a cada valor  $x_i$ , foi calculado através da equação 3.

$$e_i = y_i - \hat{y}_i, \quad \text{Equação 3}$$

sendo,

$\hat{y}_i$  = variável dependente estimada pela equação de regressão.

O coeficiente de determinação do ajuste  $R^2$  foi calculado, sendo definido pela equação 4.

$$R^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - \bar{y})^2}{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2} \quad \text{Equação 4}$$

### 3.6.2.2 Tratamento de valores extremos

Os valores extremos foram avaliados pelo método dos resíduos padronizados Jackknife, cuja estatística é o resíduo padronizado Jackknife  $J_{ei}$ , calculado para cada ponto da curva de calibração, conforme descrito pela equação 5.

$$J_{ei} = r_i \sqrt{\frac{n-p-1}{n-p-r_i^2}}, \quad \text{Equação 5}$$

onde,

$n$  = número total de dados,

$p$  = número de parâmetros do modelo,

$r_i = \frac{|e_i|}{s_{e_i}}$  (resíduo padronizado),

$s_{e_i} = s_{res} \sqrt{1-h_i}$  (erro padrão do resíduo),

$h_i = \frac{1}{n} + \frac{(x_i - \bar{x})^2}{S_{xx}}$  (ponto de alavanca),

$s_{res} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}}$  (desvio padrão residual).

Valores maiores que o valor  $t_{(1-\alpha/2;n-p-1)}$  crítico são considerados valores extremos, podendo ser removidos (BELSLEY; KUH; WELSCH, 1980). Primeiramente a replicata com maior valor absoluto de  $J_{ei}$  é excluída e em seguida são excluídas as demais repetições uma a uma, até o máximo de 22,2% do número original de dados (HORWITZ, 1995). Não se deve também excluir todo um nível de concentração, devendo permanecer ao menos uma repetição em cada nível. A cada dado excluído os parâmetros de regressão são novamente estimados.

### 3.6.2.3 Teste de normalidade

O método dos mínimos quadrados ordinários - MMQO pressupõe que os resíduos da regressão seguem a distribuição normal, não havendo desvios de normalidade. A normalidade dos resíduos da regressão é verificada pelo teste Ryan-Joiner (RYAN; JOINER, 1976). Os resíduos foram primeiramente ordenados em ordem crescente. Em seguida, foi construído um gráfico dos valores dos resíduos ordenados  $e_i$  versus os valores dos percentis estimados para uma distribuição normal reduzida  $q_i$  (quantis normais). Os quantis normais são obtidos pela equação 6.

$$q_i = \varphi^{-1} \left\{ \frac{(i-3/8)}{(n+1/4)} \right\}, i = 1, \dots, n, \quad \text{Equação 6}$$

onde,

$q_i$  = valor normal esperado,

$\varphi^{-1}$  = inverso de uma função de distribuição normal padrão.

O coeficiente de correlação  $R_{eq}$  entre  $e_i$  e  $q_i$  é calculado pela equação 7

$$R_{eq} = \frac{S_{eq}}{\sqrt{S_{ee} \times S_{qq}}}, \quad \text{Equação 7}$$

onde,

$$S_{eq} = \sum_{i=1}^n (e_i - \bar{e})(q_i - \bar{q}_i) = \sum_{i=1}^n e_i q_i - \frac{\sum_{i=1}^n e_i \sum_{i=1}^n q_i}{n},$$

$$S_{ee} = \sum_{i=1}^n (e_i - \bar{e})^2 = \sum_{i=1}^n e_i^2 - \frac{\left(\sum_{i=1}^n e_i\right)^2}{n},$$

$$S_{qq} = \sum_{i=1}^n (q_i - \bar{q})^2 = \sum_{i=1}^n q_i^2 - \frac{\left(\sum_{i=1}^n q_i\right)^2}{n},$$

$$\bar{e} = \frac{\sum_{i=1}^n e_i}{n},$$

$$\bar{q} = \frac{\sum_{i=1}^n q_i}{n}.$$

O coeficiente de correlação  $R_{eq}$  é então comparado com o  $R_{crit}(n)$  para um  $\alpha$  de 0,05, como descrito na equação 8.

$$R_{crit}(n) \approx 1,0063 - \frac{0,1288}{\sqrt{n}} - \frac{0,6118}{n} + \frac{1,3505}{n^2} \quad \text{Equação 8}$$

O coeficiente de correlação  $R_{eq}$  deve ser maior que o valor de  $R_{crit}(n)$ . Valores abaixo indicam, a não normalidade dos resíduos da regressão.

#### 3.6.2.4 Teste de homoscedasticidade

A homoscedasticidade dos resíduos da regressão foi verificada através do teste de Levene (LEVENE, 1960), modificado por Brown & Forsythe (BROWN; FORSYTHE, 1974). Os resíduos foram divididos igualmente em dois grupos, porém sem haver separação de repetições de um mesmo nível em grupos diferentes. Um deve conter os níveis de menor concentração e outro os níveis restantes. São calculadas as medianas dos resíduos de cada grupo ( $\tilde{e}_1$  e  $\tilde{e}_2$ ), o valor absoluto das diferenças entre os resíduos e as medianas dos respectivos grupos ( $d_{1j} = |\tilde{e}_1 - e_{1j}|$  e  $d_{2j} = |\tilde{e}_2 - e_{2j}|$ ), a média das diferenças  $\bar{d}_k$  e a soma dos quadrados dos desvios  $SQD_k$  dos valores  $d_{kj}$  de cada  $k$  grupo. A estatística  $t_L$  foi obtida pela equação 9.

$$t_L = \frac{|\bar{d}_1 - \bar{d}_2|}{\sqrt{\left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}\right) s_p^2}},$$

Equação 9

onde,

$$\bar{d}_k = \frac{\sum_{j=1}^{n_k} d_{kj}}{n_k} \text{ (desvio médio de cada } k \text{ grupo),}$$

$$d_{kj} = |\tilde{e}_k - e_{kj}| \text{ (módulo do desvio da mediana de cada } k \text{ grupo),}$$

$n_k$  = número de dados em cada  $k$  grupo,

$\tilde{e}_k$  = mediana de cada  $k$  grupo,

$$s_p^2 = \frac{\sum_{k=1}^2 \sum_{j=1}^{n_k} (d_{kj} - \bar{d}_k)^2}{(n_1 + n_2 - 2)} \text{ (variância combinada).}$$

Há indicação de homoscedasticidade caso a estatística  $t_L$  não exceda o valor crítico  $t_{(1-\alpha/2; n_1+n_2-2)}$  (LEVENE, 1960; BROWN; FORSYTHE, 1974).

### 3.6.2.5 Teste de independência (autocorrelação dos resíduos)

A autocorrelação ou independência dos resíduos foi verificada através do teste de Durbin-Watson (DURBIN; WATSON, 1951). A estatística deste teste é a estatística  $d$ , definida pela equação 10.

$$d = \frac{\sum_{i=1}^n (e_i - e_{i-1})^2}{\sum_{i=1}^n e_i^2}.$$

Equação 10

São calculados dois limites críticos  $d_L$  (limite inferior) e  $d_U$  (limite superior). Se o valor de  $d$  estiver entre os dois limites, o teste é inconclusivo. Valores de  $d$  menores que  $d_L$ , indicam autocorrelação, enquanto valores de  $d$  maiores que  $d_U$

indicam independência dos resíduos. Os limites  $d_L$  e  $d_U$  para um  $\alpha=0,05$  são dados pelas equações 11 e 12.

$$d_L \approx 1,9693 - \frac{2,8607}{\sqrt{n}} - \frac{3,4148}{n} + \frac{16,6400}{n^2}, \quad \text{Equação 11}$$

$$d_U \approx 1,9832 - \frac{3,0547}{\sqrt{n}} + \frac{1,3862}{n} + \frac{16,3662}{n^2}. \quad \text{Equação 12}$$

### 3.6.2.6 Teste de significância da regressão e do desvio da linearidade

O teste de significância da regressão e do desvio da linearidade foi realizado através da análise de variância apresentada na tabela 3, avaliada através da estimativa dos parâmetros pelo método dos mínimos quadrados ordinários - MMQO.

**Tabela 3.** Análise de variância para significância da regressão e do desvio da linearidade.

<i>FV</i>	<i>GL</i>	<i>SQ</i>	<i>QM</i>	<i>F</i>	<i>p</i>
Regressão	1	$\left[ \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y}) \right]^2$ $\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2$	$\frac{SQ_{Re\ gr}}{GL_{Re\ gr}}$	$\frac{QM_{Re\ gr}}{s_{res}^2}$	Distribuição de probabilidade F $DISTF(F_{Re\ gr}; GL_{Re\ gr}; GL_{Resíduo})$
Resíduos	$n-2$	$\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2$	$\frac{SQ_{Res}}{GL_{Res}} = s_{res}^2$		
Desvio da Linearidade	$u-2$	$\sum_{i=1}^n n_k (\hat{y}_k - \bar{y}_k)^2$	$\frac{SQ_{Desvio}}{GL_{Desvio}}$	$\frac{QM_{Desvio}}{QM_{ErroPuro}}$	Distribuição de probabilidade F $DISTF(F_{Desvio}; GL_{Desvio}; GL_{ErroPuro})$
Entre Níveis	$u-1$	$\sum_{i=1}^n n_k (\bar{y}_k - \bar{y})^2$			
Erro Puro	$n-u$	$\sum_{k=1}^u \sum_{j=1}^{n_k} (y_{kj} - \bar{y}_k)^2$	$\frac{SQ_{ErroPuro}}{GL_{ErroPuro}}$		
Total	$n-1$	$\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2$	$\frac{SQ_{Total}}{GL_{Total}}$		

*FV*, fonte de variação; *GL*, graus de liberdade; *SQ*, soma dos quadrados; *QM*, média dos quadrados; *F*, estatística da análise de variância; *p*, significância; *n*, número de pontos da curva analítica; *u*, número de níveis de concentração;  $n_k$ , número de pontos em cada nível de concentração;  $y_i$ , resposta medida;  $x_i$ , concentração do analito;  $\hat{y}_i$ , variável dependente estimada pela equação de regressão;  $\bar{y}$ , média das respostas medidas;  $\bar{x}$ , média das concentrações;  $y_{kj}$ , j-ésima resposta medida do k-ésimo nível de concentração;  $\bar{y}_k$ , média das respostas medidas do k-ésimo nível de concentração,  $\hat{y}_{kj}$ , variável dependente estimada pela equação de regressão para o k-ésimo nível de concentração.

O valor da significância  $p$  observado para a regressão deve ser menor que 0,001 enquanto o valor da significância  $p$  observado para o desvio da linearidade deverá ser maior que 0,05 (DRAPER; SMITH, 1998).

### 3.6.2.7 Limites de detecção e quantificação

Através da curva analítica final, após sua avaliação e exclusão de possíveis valores extremos, foram determinados os limites de detecção LOD (Equação 13) e de quantificação LOQ (Equação 14). O método utilizado baseia-se na curva preparada e no seu intervalo de confiança (MILLER; MILLER, 1993; HUBER, 2003).

$$LOD = \frac{(Y_{\text{sup}} - a)}{b}, \quad \text{Equação 13}$$

onde,

$$Y_{\text{sup}} = a + t_{(0,05;n-2)} \times S_{xy} \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{(\bar{x})^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}.$$

$$LOQ = \frac{(2 \times LOD \times b + a) + t_{(0,05;n-2)} \times S_{xy} \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{(2 \times LOD - \bar{x})^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}} - a}{b}. \quad \text{Equação 14}$$

### 3.6.3 Efeito matriz

Souza (2007) descreve um procedimento analítico para avaliação do efeito matriz, onde uma curva analítica preparada em solvente é comparada com uma curva preparada na presença da matriz da amostra. O efeito matriz é considerado não significativo quando as curvas analíticas preparadas não diferem estatisticamente entre si.

Para o preparo da curva na presença da matriz, foram analisadas vinte repetições de uma amostra de filme flexível de PVC sem a presença de DEHA. Todas as etapas previstas no método de migração foram seguidas. Ao final da etapa

de migração, as soluções foram reunidas e homogeneizadas formando uma única solução de migração.

As soluções da curva analítica foram preparadas seguindo-se o procedimento descrito para o preparo da curva analítica em solvente, porém utilizando-se a solução de matriz preparada no lugar do solvente isooctano. Organizou-se uma batelada de amostras com o solvente, e em seguida as soluções de trabalho em ordem aleatória de níveis, com todas as repetições de um mesmo nível no solvente e na matriz agrupadas. As amostras da batelada foram analisadas por CG-DIC nas condições analíticas determinadas nos itens 3.3 e 3.5.

### 3.6.3.1 Avaliação dos resultados

Primeiramente foi avaliada a linearidade da curva analítica preparada na presença da matriz. Uma vez observada a normalidade dos resíduos da regressão e o ajuste ao modelo linear, a curva é comparada com a curva em solvente, preparada anteriormente. É verificada a homogeneidade entre as variâncias dos resíduos das duas curvas através do teste de F (SNEDECOR; COCHRAN, 1989). A estatística F do teste é calculada através da equação 15, com o maior valor de  $s_{res}^2$  no numerador, e é comparada com o valor crítico  $F_{(1-\alpha/2; n_1-2; n_2-2)}$ . Valores de F menores que o valor crítico demonstram que as variâncias não diferem entre si, indicando a homoscedasticidade.

$$F = \frac{s_{res1}^2}{s_{res2}^2} \quad \text{Equação 15}$$

Havendo homoscedasticidade, as inclinações (equação 16) e interseções (equação 17) das duas curvas são comparadas através do teste t com variâncias combinadas. A hipótese de efeito matriz é rejeitada quando  $t_a$  e  $t_b$  são menores que o valor t crítico  $t_{(1-\alpha/2; n_1+n_2-4)}$ . Os índices 1 e 2 diferenciam as curvas preparadas no solvente e na matriz respectivamente.

$$t_b = \frac{|b_1 - b_2|}{\sqrt{\frac{s_p^2}{S_{xx1}} + \frac{s_p^2}{S_{xx2}}}}, \quad \text{Equação 16}$$



$$t_a = \frac{|a_1 - a_2|}{\sqrt{\frac{s_p^2 \sum x_1^2}{n_1 S_{xx_1}} + \frac{s_p^2 \sum x_2^2}{n_2 S_{xx_2}}}}, \quad \text{Equação 17}$$

onde,  $s_p^2 = \frac{(n_1 - 2)s_{res1}^2 + (n_2 - 2)s_{res2}^2}{n_1 + n_2 - 4}$  (variância combinada).

Havendo heterocedasticidade, as inclinações (equação 18) e interseções (equação 19) das duas curvas são comparadas através do teste t com variâncias amostrais. A hipótese de efeito matriz é rejeitada quando  $t'_a$  e  $t'_b$  são menores que o valor crítico  $t_{(1-\alpha/2;v)}$ , sendo  $v$  definido pela equação 20.

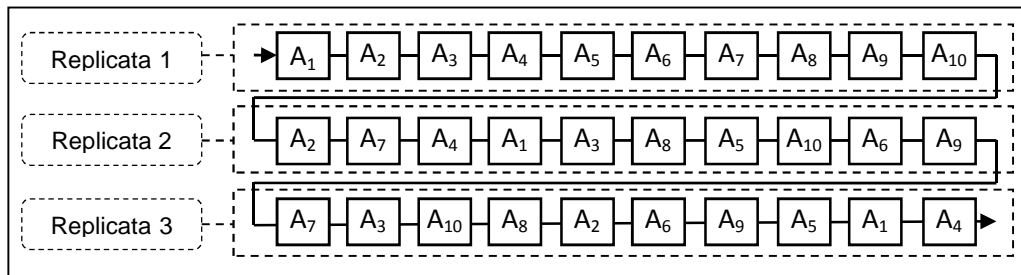
$$t'_b = \frac{|b_1 - b_2|}{\sqrt{\frac{s_{res1}^2}{S_{xx_1}} + \frac{s_{res2}^2}{S_{xx_2}}}}, \quad \text{Equação 18}$$

$$t'_a = \frac{|a_1 - a_2|}{\sqrt{\frac{s_{res1}^2 \sum x_1^2}{n_1 S_{xx_1}} + \frac{s_{res2}^2 \sum x_2^2}{n_2 S_{xx_2}}}}, \quad \text{Equação 19}$$

$$v = \frac{\left(\frac{s_{res1}^2}{n_1} + \frac{s_{res2}^2}{n_2}\right)^2}{\frac{(s_{res1}^2/n_1)^2}{n_1 - 2} + \frac{(s_{res2}^2/n_2)^2}{n_2 - 2}}. \quad \text{Equação 20}$$

### 3.6.4 Repetitividade

Para a avaliação da homogeneidade da amostra e repetitividade do método, foi realizado o ensaio de migração de dez repetições genuínas de uma amostra contendo o analito. As análises foram conduzidas nas mesmas condições analíticas, no menor espaço de tempo possível e pelo mesmo analista. Após o ensaio de migração, alíquotas das dez soluções de migração foram injetadas em sequência no CG-DIC (replicata 1). Em seguida as soluções de migração foram analisadas novamente alterando-se aleatoriamente a sequência (replicata 2). O procedimento foi repetido mais uma vez com uma nova sequência aleatória (replicata 3). A figura 6 apresenta a sequência de injeção no CG-DIC.

**Figura 6.** Sequência de análises para os ensaios de repetitividade e homogeneidade

### 3.6.4.1 Avaliação da homogeneidade da amostra

As concentrações do analito, nas repetições genuínas, foram estimadas por meio da curva analítica previamente preparada. As replicatas das repetições são organizadas como apresentado na figura 7, e a variância das concentrações de cada grupo é calculada. Através do teste de Grubbs é verificada a presença de valores extremos entre as variâncias, excluindo algum grupo se necessário. A homogeneidade da amostra é testada através da análise de variância (Tabela 4) das concentrações dos grupos ( $A_1, A_2, A_3, \dots, A_{10}$ ) de replicatas das repetições (ABNT, 2012).

**Figura 7.** Grupos de replicatas

Replicata	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5	Grupo 6	Grupo 7	Grupo 8	Grupo 9	Grupo 10
1	$A_1$	$A_2$	$A_3$	$A_4$	$A_5$	$A_6$	$A_7$	$A_8$	$A_9$	$A_{10}$
2	$A_1$	$A_2$	$A_3$	$A_4$	$A_5$	$A_6$	$A_7$	$A_8$	$A_9$	$A_{10}$
3	$A_1$	$A_2$	$A_3$	$A_4$	$A_5$	$A_6$	$A_7$	$A_8$	$A_9$	$A_{10}$

**Tabela 4.** Análise de variância (ANOVA) para avaliação da homogeneidade da amostra.

$FV$	$SQ$	$GL$	$QM$	$F$	$p$
Entre os grupos (EG)	$\sum_{i=1}^g n_i (\bar{x}_i - \bar{x})^2$	$g - 1$	$\frac{SQ_{EG}}{GL_{EG}}$	$\frac{QM_{EG}}{QM_{DG}}$	$DISTF(F_{EG}; GL_{EG}; GL_{DG})$
Dentro dos grupos (DG)	$\sum_{i=1}^g \sum_{j=1}^{n_i} (x_{ij} - \bar{x}_i)^2$	$\sum_{i=1}^g (n_i - 1)$	$\frac{SQ_{DG}}{GL_{DG}}$		
Total	$\sum_{i=1}^g \sum_{j=1}^{n_i} (x_{ij} - \bar{x})^2$	$\left( \sum_{i=1}^g (n_i) \right) - 1$	$\frac{SQ_{Total}}{GL_{Total}}$		

$FV$ , fonte de variação;  $SQ$ , soma dos quadrados;  $GL$ , graus de liberdade;  $QM$ , média dos quadrados;  $F$ , estatística da análise de variância;  $p$ , significância;  $g$ , número de grupos;  $n$ , número de replicatas da repetição;  $x$ , concentração medida para a replicata;  $DISTF$ , distribuição de probabilidade  $F$ .

A amostra é considerada homogênea se o valor da significância  $p$  observado for maior que 0,05. Se a amostra for considerada heterogênea deve-se repetir o teste com uma nova amostra.

#### 3.6.4.2 Avaliação da repetitividade do método

Para a avaliação da repetitividade do método são utilizadas as primeiras replicatas de cada repetição genuína (replicata 1). Segundo Souza (2007), na condução de experimentos sob condições de repetitividade a precisão é expressa em termos de desvio padrão relativo das concentrações das repetições genuínas ensaiadas. O teste é avaliado por meio da razão de Horwitz (*HorRat*), originalmente calculada para condições de reprodutibilidade. Porém é possível utilizá-la na avaliação da repetibilidade utilizando-se o desvio padrão relativo  $DPR_r$  (Equação 21) e o desvio padrão relativo previsto  $DPRP_r$ , ambos em condições de repetibilidade.

$$DPR_r = \frac{s}{\bar{x}} \times 100, \quad \text{Equação 21}$$

onde,

$\bar{x}$  = média das concentrações medidas para as repetições,

$s$  = desvio padrão das concentrações medidas para as repetições genuínas.

Os valores de  $DPRP_r$  são tipicamente de um meio a dois terços do valor de  $DPRP_R$  (HORWITZ; ALBERT, 2006), sendo este calculado através da equação de Horwitz (Equação 22). A equação representa empiricamente as alterações no  $DPRP_R$  ocasionadas por variações na concentração da amostra. Para o cálculo do  $DPRP_r$ , neste trabalho é utilizada a razão máxima de dois terços (Equação 23).

$$DPRP_R = 2C^{-0,15} \quad \text{Equação 22}$$

onde,  $C$  = concentração do analito em fração de massa.

$$DPRP_r = \frac{2}{3} DPRP_R \quad \text{Equação 23}$$

O método é considerado repetitivo com um valor de  $HorRat_r$  (Equação 24) menor ou igual a 2.

$$HorRat_r = \frac{DPR_r}{DPRP_r}. \quad \text{Equação 24}$$

### 3.6.5 Precisão Intermediária

Em cinco dias diferentes, foram preparadas e analisadas, quatro repetições de uma mesma amostra. Após o ensaio de migração, as amostras foram diluídas para que suas concentrações estivessem dentro da faixa de trabalho. Através da curva analítica validada, a concentração de cada repetição de cada dia foi determinada. O teste foi avaliado através da determinação do desvio padrão de precisão intermediária relativo ao tempo  $si_{tempo}$  (Equação 25) e do desvio padrão relativo de precisão intermediária  $DPR_{precint}$  (Equação 26).

$$si_{tempo} = \sqrt{\frac{1}{t(n-1)} \sum_{j=1}^t \sum_{k=1}^n (x_{jk} - \bar{x}_j)^2}, \quad \text{Equação 25}$$

$$DPR_{precint} = \frac{si_{tempo}}{\bar{x}} \times 100. \quad \text{Equação 26}$$

onde,

$t$  = dias de análise,

$n$  = repetições genuínas por dia,

$x$  = concentração medida para a repetição,

$\bar{x}$  = média das concentrações medidas para as repetições.

A razão  $HorRat_R$  (Equação 27) foi calculada pela divisão entre o desvio padrão relativo de precisão intermediária  $DPR_{precint}$  e o  $DPRP_R$ . Valores de  $HorRat_R$  menores ou iguais a 2 indicam precisão intermediária adequada.

$$HorRat_R = \frac{DPR_{prec\ int}}{DPRP_R}.$$

Equação 27

### 3.6.6 Robustez

A avaliação da robustez foi realizada segundo o método de comparação de médias (teste t). Foram escolhidas cinco pequenas variações críticas para o método na verificação da sua robustez. Foram avaliadas duas variações na temperatura, duas no tempo de migração, e uma no formato do corte do filme de PVC. A tabela 5 apresenta as variações realizadas.

**Tabela 5.** Variações Avaliadas

Variação	Condição Normal	Condição Variada
Tamanho do Corte	1 x (1 dm <sup>2</sup> )	4 x (0,25 dm <sup>2</sup> )
Tempo de Migração	48 h	47 h 30 min 48 h 30 min
Temperatura de Migração	20 °C	17 °C 23 °C

Uma amostra foi analisada seguindo as condições normais do método. A mesma amostra foi analisada mais 5 vezes, realizando em cada uma delas a variação correspondente no método. Ao final de cada procedimento, foram analisadas 3 alíquotas de cada solução. As soluções provenientes do ensaio de migração foram diluídas para que suas concentrações estivessem dentro da faixa de trabalho.

Para cada variação, verificou-se através de teste F (SNEDECOR; COCHRAN, 1989) a homogeneidade entre as variâncias da amostra ensaiada para a variação e da amostra ensaiada nas condições normais do método. A estatística F do teste é calculada através da equação 28 e é comparada com o valor crítico  $F_{(\alpha/2; n_1-2; n_2-2)}$ . Valores de F menores que o valor crítico demonstram que as variâncias não diferem entre si, indicando a homoscedasticidade.

$$F_{\text{calculado}} = \frac{s_1^2}{s_2^2} \quad \text{Equação 28}$$

onde,  $s_1^2$  e  $s_2^2$  são as variâncias de cada amostra, com a maior variância no numerador.

Havendo homoscedasticidade, as médias das concentrações das duas amostras são comparadas através do teste t (Equação 29). Onde o método é considerado robusto para a variação quando  $t_{\text{calculado}}$  é menor que o valor  $t$  crítico  $t_{(1-\alpha/2;n_1-1)}$ .

$$t_{\text{calculado}} = \frac{|\bar{d}|}{\sqrt{s^2/n}} \quad \text{Equação 29}$$

onde,

$$\bar{d} = \frac{\sum_{i=1}^n (x_{i_1} - x_{i_2})}{n},$$

$x_{i_1}$  = concentração da i-ésima replicata da amostra ensaiada nas condições normais do método,

$x_{i_2}$  = concentração da i-ésima replicata da amostra ensaiada para a variação,

$s^2$  = variância das diferenças,

$n$  = número de pares de replicatas comparadas.

Havendo heterocedasticidade, as médias das concentrações das amostras são comparadas através do teste t com variâncias amostrais. Onde o método é considerado robusto para a variação quando  $t'_{\text{calculado}}$  (Equação 30) é menor que o valor crítico  $t_{(1-\alpha/2;\nu)}$ , sendo  $\nu$  definido pela equação 31.

$$t'_{\text{calculado}} = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}}, \quad \text{Equação 30}$$

$$v = \frac{\left( \frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2} \right)^2}{\frac{(s_1^2/n_1)^2}{n_1 - 1} + \frac{(s_2^2/n_2)^2}{n_2 - 1}} . \quad \text{Equação 31}$$

### 3.7 INCERTEZA DE MEDIÇÃO

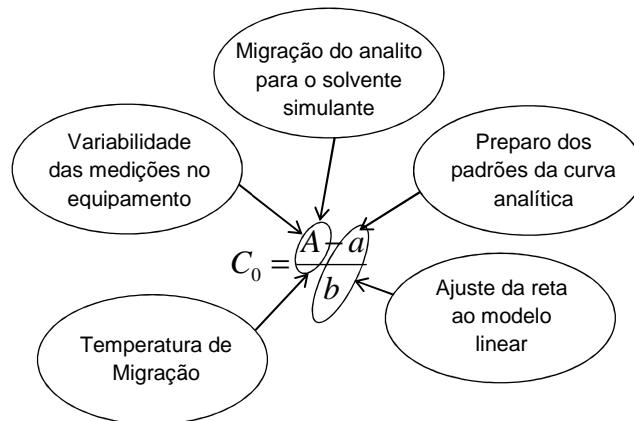
O processo de estimativa da incerteza foi iniciado pela determinação do mensurando e identificação das fontes de incerteza para o método analítico. Para cada fonte de incerteza as variáveis de entrada são determinadas e as incertezas associadas a cada fonte são quantificadas. Possíveis correlações entre as variáveis são identificadas e as incertezas combinada e expandida são calculadas.

No ensaio de migração estudado o mensurando é representado pela concentração de migração do analito para o solvente simulante. A determinação da concentração de migração foi realizada através da equação 32 proveniente da equação da curva analítica.

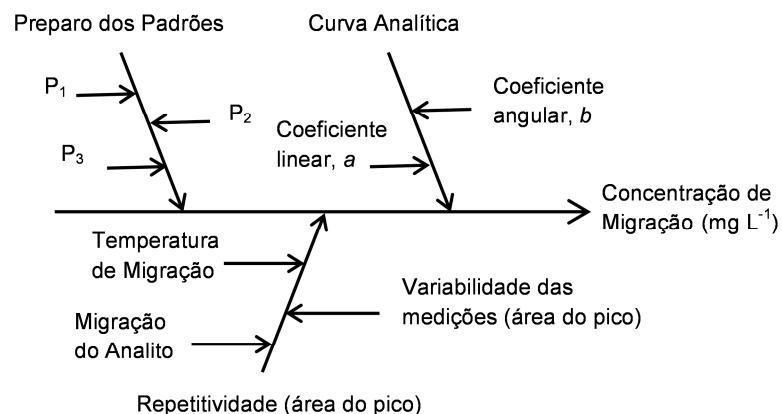
$$C_0 = \frac{A - a}{b} \quad \text{Equação 32}$$

Onde,  $A$  é a média das áreas dos picos referentes às amostras obtidas pelo ensaio de migração,  $C_0$  a concentração média do analito encontrada na amostra,  $b$  a inclinação da reta, e  $a$  a interseção.

É necessário que a estimativa da incerteza de medição seja desenvolvida de maneira completa e confiável, observando-se a contribuição quantitativa de cada fonte (DE LA CRUZ et al., 2010). Devem ser considerados os erros que possam ocorrer durante o processo analítico desde o preparo dos padrões até a obtenção do resultado final (SHEGUNOVA; BERCARU; SEJERØE-OLSEN, 2008). Através de uma análise detalhada da expressão do mensurando e do conhecimento dos pontos críticos do ensaio, são identificadas as fontes de incerteza que possam vir a impactar no resultado final. A figura 8 apresenta as fontes de incerteza mais importantes (LEITO; LEITO, 2004).

**Figura 8.** Incertezas de maior importância

Para uma estimativa adequada da incerteza de medição, é importante que o processo analítico seja cuidadosamente observado. No entanto, deve ser evitada a duplicidade de contribuição das incertezas, o que poderia causar uma superestimativa da incerteza combinada. Com este fim, foi construído um diagrama de causa e efeito, também conhecido como diagrama de Ishikawa ou espinha de peixe (BUCHMANN; SARKIS, 2002). A figura 9 apresenta o diagrama de causa e efeito construído para o ensaio de migração. O diagrama evidencia as principais fontes de incerteza identificadas para o ensaio.

**Figura 9.** Diagrama de causa e efeito para o ensaio de migração.

As principais fontes de incerteza identificadas para o ensaio de migração foram: incerteza associada à curva analítica ( $u_{(C_0)}$ ), incerteza associada a repetitividade do método ( $u_{(rep)}$ ) e a incerteza associada ao preparo dos padrões da curva analítica ( $u_{(dil)}$ ).



***Incerteza associada ao preparo dos padrões de calibração  $u_{(dil)}$***

A incerteza de medição associada ao preparo dos padrões  $u_{(dil)}$  engloba as incertezas associadas ao preparo de cada padrão ( $u_{(p1)}$ ,  $u_{(p2)}$ ,  $u_{(p3)}$ ) sendo uma incerteza combinada destas (IPAC, 2007). As incertezas associadas ao preparo de cada padrão  $u_{(Pn)}$  foram calculadas através dos coeficientes de sensibilidade de cada variável e suas relações matemáticas como apresentado na equação 33.

$$u_{(P_n)} = \sqrt{\left(\frac{C_e \times u_{(v_e)}}{v_p}\right)^2 + \left(\frac{C_e \times v_e \times u_{(v_p)}}{v_p^2}\right)^2 + \left(\frac{v_e \times u_{(C_e)}}{v_p}\right)^2} \quad \text{Equação 33}$$

onde,  $C_e$  é a concentração da solução estoque,  $v_e$  o volume da alíquota da solução estoque,  $v_p$  o volume final da solução do padrão de calibração,  $u_{(P_n)}$  a incerteza associada à solução padrão,  $u_{(v_e)}$  a incerteza associada à alíquota da solução estoque,  $u_{(v_p)}$  a incerteza associada ao volume final da solução do padrão de calibração e  $u_{(C_e)}$  a incerteza associada à concentração da solução estoque.

Estimadas as incertezas de cada padrão preparado para a curva analítica, estas foram combinadas através da equação 34.

$$u_{(dil)} = \sqrt{\left(\frac{u_{(P_1)}}{C_{P_1}}\right)^2 + \left(\frac{u_{(P_2)}}{C_{P_2}}\right)^2 + \left(\frac{u_{(P_3)}}{C_{P_3}}\right)^2} \quad \text{Equação 34}$$

onde,  $C_{P_n}$  é a concentração de cada  $n$  solução de trabalho e  $u_{(P_n)}$  a incerteza associada ao preparo de cada  $n$  solução de trabalho.

***Incerteza associada à curva analítica  $u_{(C_0)}$***

A incerteza associada à interpolação na curva analítica  $u_{(C_0)}$  é baseada no cálculo do intervalo de confiança da curva construída através do método dos mínimos quadrados ordinários – MMQO, considerando-se o modelo de resposta

linear (EURACHEM, 2012). A incerteza associada à curva analítica foi estimada através da equação 35.

$$u_{(C_0)} = \frac{S_{residual}}{b} \times \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(C_0 - \bar{C})^2}{S_{xx}}}$$

Equação 35

onde,  $S_{residual} = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^n [A_j - A_{Esp}]^2}{n-2}}$ ,  $S_{xx} = \sum_{j=1}^n (C_j - \bar{C})^2$ ,  $C_0$  é a concentração da solução de migração encontrada para a amostra,  $p$  o número de repetições para determinar  $C_0$ ,  $n$  o número total de determinações para construção da curva analítica,  $\bar{C}$  a concentração média da curva analítica, e  $b$  a inclinação da reta.

#### ***Incerteza associada à repetitividade*** $u_{(rep)}$

A incerteza associada à repetitividade é oriunda de efeitos aleatórios e é em geral medida a partir de experimentos repetidos e quantificada em termos de desvio padrão de resposta (EURACHEM, 2012). A incerteza associada à repetitividade do método  $u_{(rep)}$  provém do desvio padrão das áreas dos picos calculadas para as três soluções e engloba as variações inerentes ao processo analítico. A incerteza associada à repetitividade foi estimada através da equação 36 (ÁVILA et al., 2009).

$$u_{(rep)} = \frac{s_{\acute{a}rea}}{\sqrt{p}} \times \frac{1}{b}$$

Equação 36

onde,  $s_{\acute{a}rea}$  é o desvio padrão das áreas dos picos correspondentes às alíquotas das soluções de migração das repetições,  $p$  o número de repetições para determinar a concentração de migração para a amostra e  $b$  o coeficiente angular da curva analítica preparada.

### **Estimativa da incerteza combinada final $u_{Comb}$**

A incerteza padrão combinada final  $u_{Comb}$  associada ao mensurando, sendo este o resultado da medição analítica, é obtida pela combinação apropriada das incertezas padrão estimadas para as grandezas de entrada (EURACHEM, 2012; ABNT, 2003). A incerteza combinada final, para o ensaio de migração estudado, foi estimada através da equação 37.

$$u_{Comb} = C_0 \times \sqrt{\left(u_{(dil)}\right)^2 + \left(\frac{u_{(rep)}}{C_0}\right)^2 + \left(\frac{u_{(C_0)}}{C_0}\right)^2} \quad \text{Equação 37}$$

### **Estimativa da incerteza expandida $U$**

Através da incerteza combinada final foi calculada a incerteza expandida associada ao resultado analítico. A incerteza expandida é uma medida da incerteza, dada para uma função de distribuição de probabilidade apropriada ao resultado, habitualmente distribuição normal, associada a um nível elevado de confiança. A incerteza expandida é dada pelo produto entre a incerteza padrão combinada estimada e um fator de abrangência  $k$  para um nível de confiança desejado (equação 38) (OLIVEIRA; AGUIAR, 2009; ABNT, 2003; IPAC, 2007).

$$U = k \times u_{(Comb)} \quad \text{Equação 38}$$

onde,  $k$  é o fator de abrangência.

Nos casos em que a incerteza  $u_{comb}(y)$  é aproximadamente normal ou os graus de liberdade efetivos  $v_{eff}$  de  $u_{comb}(y)$  são de tamanho significativo, utiliza-se  $k=2$  para um nível de confiança de aproximadamente 95%. Para quase todos os fins, devido à natureza aproximativa do processo de estimativa da incerteza de medição, pode-se adotar  $k=2$  (EURACHEM, 2012; ABNT, 2003). Contudo é possível também determinar o valor de  $k$ , quando o processo de estimativa de incerteza não possui graus de liberdade efetivos suficientemente grandes. Segundo o ISO GUM, os graus

de liberdade efetivos podem ser calculados através da fórmula Welch-Satterthwaite (equação 39) (ABNT, 2003).

$$v_{eff} = \frac{u_c^4(y)}{\sum_{i=1}^N \frac{u_i^4(y)}{v_i}} \quad \text{Equação 39}$$

onde,

$u_c$  é a incerteza combinada do método;  $u_i$  é a incerteza padrão da componente  $i$  e  $v_i$  é o número de graus de liberdade da componente  $i$ .

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

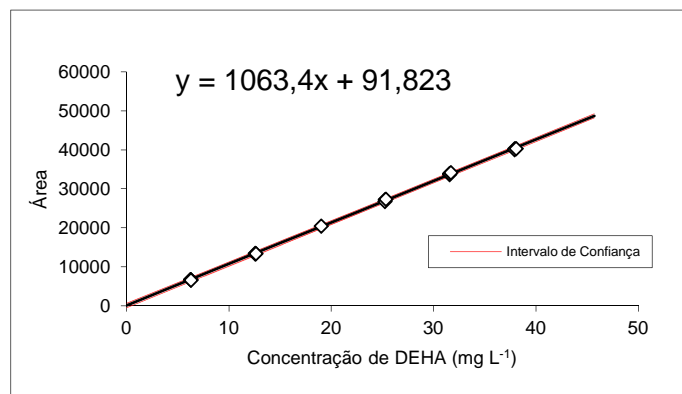
### 4.1 VALIDAÇÃO DO MÉTODO

#### 4.1.1 Avaliação da linearidade da curva analítica preparada em solvente

##### 4.1.1.1 Tratamento de valores extremos

Foi avaliada a presença de valores extremos pelo método dos resíduos padronizados Jackknife, sendo as repetições  $i = 7$  e  $8$  consideradas extremas e removidas do conjunto de dados. Após a remoção das 2 repetições o valor  $t_{(1-\alpha/2; n-p-1)}$  crítico encontrado foi 2,1604, sendo maior que o valor absoluto do resíduo padronizado Jackknife  $J_{ei}$ , calculado para cada ponto da curva de calibração. A figura 10 apresenta a curva analítica final após a remoção dos valores extremos.

**Figura 10.** Curva analítica final de DEHA em solvente



##### 4.1.1.2 Teste de normalidade

A normalidade dos resíduos da regressão foi verificada pelo teste Ryan-Joiner. O coeficiente de correlação  $R_{eq}$  entre  $e_i$  e  $q_i$  e o valor de  $R_{crit}$  foram calculados e a tabela 6 apresenta os resultados obtidos. O valor de  $R_{eq}$  encontrado, maior que o valor crítico  $R_{crit}$  ( $\alpha=0,05$ ) indica que os resíduos da regressão seguem a distribuição normal.

**Tabela 6.**  $R_{eq}$  e  $R_{crit}$  calculados

$R_{eq}$	$R_{crit} (\alpha=0,05)$
0,9852	0,9411

Req, coeficiente de correlação entre  $e_i$  e  $e_j$ ; Rcrit, R crítico.

#### 4.1.1.3 Teste de homoscedasticidade

A homoscedasticidade dos resíduos da regressão foi verificada através do teste de Levene (1960), modificado por Brown e Forsythe (1974). A tabela 7 apresenta os resultados obtidos. O valor encontrado para a estatística  $t_L$ , menor que o valor crítico  $t_{(1-\alpha/2; n_1+n_2-2)}$  indica a homoscedasticidade dos resíduos.

**Tabela 7.** Resultados Obtidos

Estatística	Grupo 1	Grupo 2
$n$	10	6
Mediana	30,6	-51,1
$dm$	$1,45 \times 10^2$	$2,17 \times 10^2$
SQD	$3,31 \times 10^5$	$3,94 \times 10^5$
Var	$5,18 \times 10^4$	
$t^*$	0,615	
$t_{critico}$	2,145	

$n$ , número de observações no grupo;  $dm$ , média das diferenças entre cada resíduo e a mediana do seu grupo;  $t$ , estatística t.

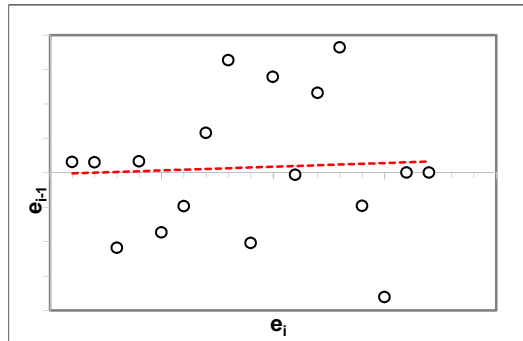
#### 4.1.1.4 Teste de independência (autocorrelação dos resíduos)

A autocorrelação dos resíduos foi verificada através do teste de Durbin-Watson. A tabela 8 apresenta os resultados obtidos para os limites  $d_L$  (inferior) e  $d_U$  (superior) com um nível de significância de 0,05. O valor calculado para a estatística  $d$  do teste, maior que o limite superior, indica a independência dos resíduos. A figura 11 apresenta graficamente a independência dos resíduos da regressão.

**Tabela 8.** Limites  $d_L$  e  $d_U$ 

$d$	$d_L$	$d_U$
1,700694	1,1057	1,370093

$d$ , estatística  $d$ ;  $d_L$ , limite inferior;  $d_U$ , limite superior

**Figura 11.** Gráfico de Durbin-Watson ( $e_i$  x  $e_{i-1}$ ), curva em solvente

#### 4.1.1.5 Teste de significância da regressão e desvio da linearidade

O teste de significância da regressão e desvio da linearidade foi realizado através da análise de variância - ANOVA. A tabela 9 apresenta os resultados obtidos.

**Tabela 9.** Análise de variância para significância da regressão e do desvio da linearidade

$FV$	$GL$	$SQ$	$QM$	$F$	$p$
Regressão	1	$2,36 \times 10^9$	$2,36 \times 10^9$	$4,59 \times 10^4$	$5,13 \times 10^{-26}$
Resíduos	14	$7,20 \times 10^5$	$5,14 \times 10^4$		
Desvio da Linearidade	4	$2,79 \times 10^5$	$6,98 \times 10^4$	1,59	$2,52 \times 10^{-1}$
Erro Puro	10	$4,40 \times 10^5$	$4,40 \times 10^4$		
Total	15	$2,36 \times 10^9$			

$FV$ , fonte de variação;  $SQ$ , soma dos quadrados;  $GL$ , graus de liberdade;  $QM$ , média dos quadrados;  $F$ , estatística da análise de variância;  $p$ , significância.

O valor da significância  $p$  observado para a regressão foi inferior a 0,001 indicando que a regressão é significativa. O valor da significância  $p$  observado para o desvio da linearidade foi superior a 0,05 indicando que a falta de ajuste não é significativa. A linearidade da curva preparada, confirma a utilização da faixa de trabalho adotada, sendo esta de 6 a  $36 \text{ mg L}^{-1}$ .

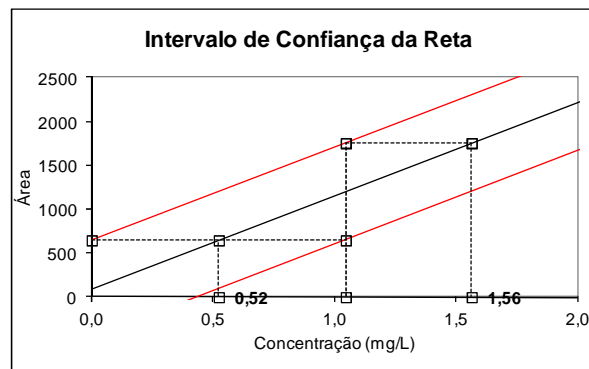
#### 4.1.2 Limites de detecção e quantificação – LOD e LOQ

Os limites de detecção e quantificação foram obtidos através da curva analítica final. A tabela 10 apresenta os limites obtidos e a Figura 12 apresenta o intervalo de confiança da reta.

**Tabela 10.** Limites de detecção e quantificação

Limite de Detecção	Limite de Quantificação
0,52 mg L <sup>-1</sup>	1,56 mg L <sup>-1</sup>

**Figura 12.** Intervalo de Confiança da Reta



#### 4.1.3 Efeito matriz

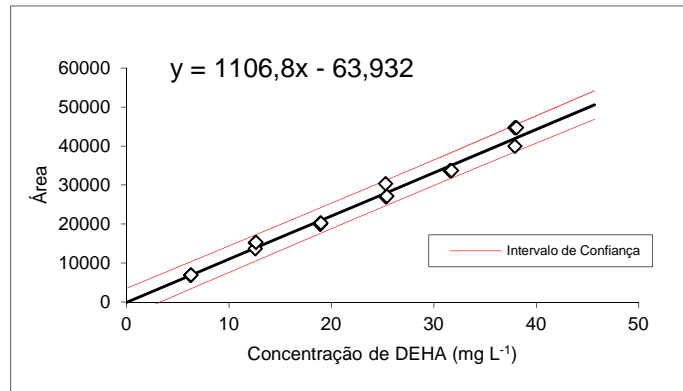
##### 4.1.3.1 Avaliação da linearidade da curva preparada na presença da matriz

###### 4.1.3.1.1 Tratamento de valores extremos (outliers)

Foi avaliada a presença de valores extremos (outliers) pelo método dos resíduos padronizados Jackknife. O valor  $t_{(1-\alpha/2; n-p-1)}$  crítico encontrado foi 2,1314 e nenhuma repetição foi considerada extrema através do teste. A figura 13 apresenta a curva analítica final preparada na presença da matriz.



**Figura 13.** Curva analítica final preparada na presença da matriz



#### 4.1.3.1.2 Teste de normalidade

A normalidade dos resíduos da regressão foi verificada pelo teste Ryan-Joiner. O coeficiente de correlação  $R_{eq}$  entre  $e_i$  e  $q_i$  e o valor de  $R_{crit}$  foram calculados e a tabela 11 apresenta os resultados obtidos. O valor de  $R_{eq}$  encontrado, maior que o valor crítico  $R_{crit}$  ( $\alpha=0,05$ ) indica que os resíduos da regressão seguem a distribuição normal.

**Tabela 11.**  $R_{eq}$  e  $R_{crit}$  calculados

$R_{eq}$	$R_{crit} (\alpha=0,05)$
0,9491	0,9461

Req, coeficiente de correlação entre  $e_i$  e  $q_i$ ; Rcrit, R crítico.

#### 4.1.3.1.3 Teste de homoscedasticidade

A homoscedasticidade dos resíduos da regressão foi verificada através do teste de Levene (1960), modificado por Brown e Forsythe (1974). A tabela 12 apresenta os resultados obtidos. O valor encontrado para a estatística  $t_L$ , menor que o valor crítico  $t_{(1-\alpha/2; n_1+n_2-2)}$  indica a homoscedasticidade dos resíduos.

**Tabela 12.** Resultados Obtidos

Estatística	Grupo 1	Grupo 2
$n$	9	9
Mediana	-7,42E+00	-1,02E+03
$dm$	5,72E+02	1,40E+03
SQD	5,25E+06	3,97E+07
Var	2,81E+06	
$t_L$	1,054	
$t_{crítico}$	2,120	

$n$ , número de observações no grupo;  $dm$ , média das diferenças entre cada resíduo e a mediana do seu grupo;  $t$ , estatística t.

#### 4.1.3.1.4 Teste de independência (autocorrelação dos resíduos)

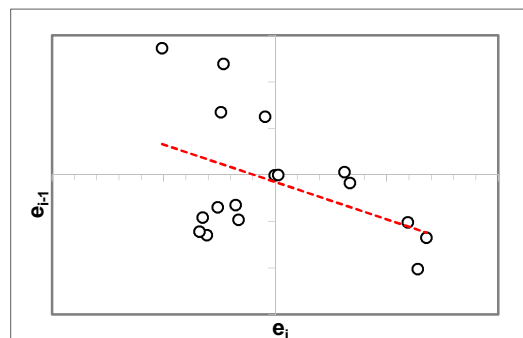
A autocorrelação dos resíduos foi verificada através do teste de Durbin-Watson. A tabela 13 apresenta os resultados obtidos para os limites  $d_L$  (inferior) e  $d_U$  (superior) com um nível de significância de 0,05.

**Tabela 13.** Limites  $d_L$  e  $d_U$ 

$d$	$d_L$	$d_U$
2,6231	1,1567	1,3907

$d$ , estatística  $d$ ;  $d_L$ , limite inferior;  $d_U$ , limite superior

O valor calculado para a estatística  $d$  do teste, maior que o limite superior, indica a independência dos resíduos. A figura 14 apresenta graficamente a independência dos resíduos da regressão.

**Figura 14.** Gráfico de Durbin-Watson ( $e_i$  x  $e_{i-1}$ ), curva na presença da matriz

#### 4.1.3.1.5 Teste de significância da regressão e desvio da linearidade

O teste de significância da regressão e desvio da linearidade foi realizado através da análise de variância - ANOVA. A tabela 14 apresenta os resultados obtidos. O valor da significância  $p$  observado para a regressão foi inferior a 0,001 indicando que a regressão é significativa. O valor da significância  $p$  observado para o desvio da linearidade foi superior a 0,05 indicando que a falta de ajuste não é significativa.

**Tabela 14.** Análise de variância para significância da regressão e do desvio da linearidade

<i>FV</i>	<i>GL</i>	<i>SQ</i>	<i>QM</i>	<i>F</i>	<i>p</i>
Regressão	1	$2,59 \times 10^9$	$2,59 \times 10^9$	$1,15 \times 10^3$	$2,42 \times 10^{-16}$
Resíduos	16	$3,59 \times 10^7$	$2,24 \times 10^6$		
Desvio da Linearidade	4	$1,19 \times 10^7$	$2,99 \times 10^6$	1,50	$2,65 \times 10^{-1}$
Erro Puro	12	$2,40 \times 10^7$	$2,00 \times 10^6$		
Total	17	$2,63 \times 10^9$			

*FV*, fonte de variação; *SQ*, soma dos quadrados; *GL*, graus de liberdade; *QM*, média dos quadrados; *F*, estatística da análise de variância; *p*, significância.

#### 4.1.3.2 Avaliação do efeito matriz

A homoscedasticidade entre as variâncias dos resíduos das duas curvas foi verificada através do teste F (SNEDECOR; COCHRAN, 1989). A tabela 15 apresenta as variâncias de cada curva (solvente e matriz) e a estatística F.

**Tabela 15.** Avaliação da homoscedasticidade entre as curvas

Teste F	
$S^2_{\text{res Solvente}}$	51384
$S^2_{\text{res Matriz}}$	2244006
$GL_{\text{res Solvente}}$	14
$GL_{\text{res Matriz}}$	16
$F_{(1-\alpha/2; n1-2; n2-2)}$	2,92
$F_{\text{calculado}}$	43,67

$S^2_{\text{res Solvente}}$ , variância dos resíduos da curva preparada em solvente;  $S^2_{\text{res Matriz}}$ , variância dos resíduos da curva prepara na presença da matriz;  $GL$ , grau de liberdade;  $F_{(1-\alpha/2; n1-2; n2-2)}$ , F tabelado.

Sendo as variâncias das curvas analíticas consideradas heterocedásticas, as suas inclinações e interseções foram comparadas através do teste t com variâncias amostrais. A tabela 16 apresenta os resultados das estatísticas  $t_b$  e  $t_a$ .

**Tabela 16.** Comparação das inclinações e interseções das curvas

Teste T	
$t_b$	1,316
$t_a$	0,191
$GL$	16,82
$t_{(1-\alpha/2;GL)}$	2,12

$t_b$ ; valor de t calculado para a inclinação;  $t_a$ ; valor de t calculado para a interseção;  $GL$ , graus de liberdade;  $t_{(1-\alpha/2;GL)}$ , valor de t tabelado.

Os resultados dos testes permitem afirmar que o método não apresenta efeito matriz, pois, estatisticamente ( $\alpha=0,05$ ) as curvas analíticas preparadas no solvente e na presença da matriz se equivalem. Adicionalmente conclui-se que o método não apresenta interferentes.

#### 4.1.4 Repetitividade

Os resultados obtidos foram organizados em grupos de replicatas de cada amostra, calculando-se a variância de cada amostra. A tabela 17 apresenta as concentrações obtidas em  $\text{mg L}^{-1}$ , e a variância de cada amostra.

**Tabela 17.** Grupos de replicatas

Replicata	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4	Amostra 5	Amostra 7	Amostra 8	Amostra 9	Amostra 10
1	20,85	20,67	21,17	20,92	20,81	20,77	20,88	20,94
2	21,07	21,06	20,99	20,74	20,83	21,06	21,09	20,90
3	20,72	20,79	20,91	21,00	21,14	20,89	20,98	20,78
Variância	0,0311	0,0388	0,0177	0,0182	0,0336	0,0222	0,0117	0,0071

Foi avaliada a presença de valores extremos (outliers) entre as amostras, sendo as variâncias testadas através do teste de Grubbs. As variâncias das amostras 1 e 6 foram consideradas discrepantes sendo estas amostras excluídas. A homogeneidade das amostras restantes foi avaliada através da análise de variância - ANOVA. A tabela 18 apresenta os resultados obtidos.

**Tabela 18.** Análise de variância (ANOVA) para avaliação da homogeneidade da amostra.

Fonte de Variação	$SQ$	$GL$	$QM$	$F$	$p$
Entre os grupos (EG)	0,0812767	7	0,011611	0,514808	0,810457
Dentro dos grupos (DG)	0,3608633	16	0,022554		
Total	0,4421401	23			

Sendo a amostra considerada homogênea ( $p > 0,05$ ), a repetitividade foi avaliada através da primeira replicata das amostras (Replicata 1). Foi verificada através do teste de Grubbs, a presença de valores extremos (outliers) dentre as concentrações, sendo nenhum valor extremo encontrado. A tabela 19 apresenta os valores calculados para o desvio padrão relativo  $DPR_r$ , o  $DPRP_r$  e o  $HorRat_r$ . Os resultados obtidos indicam que o método apresenta repetitividade adequada.

**Tabela 19.** Avaliação da Repetitividade

$DPR_r$	$DPRP_r$	$HorRat_r$
0,710	6,714	0,106

#### 4.1.5 Precisão intermediária

As respostas encontradas foram avaliadas através da curva analítica preparada no solvente e suas concentrações foram determinadas. A tabela 20 apresenta as concentrações das amostras e os resultados obtidos para o  $DPR_{precint}$ . Os resultados obtidos indicam precisão intermediária adequada.

**Tabela 20.** Avaliação da Precisão Intermediária

Amostras	Concentração em mg L <sup>-1</sup>				
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5
1	52,30	48,52	49,27	50,12	50,45
2	52,10	49,22	50,11	50,59	51,97
3	51,71	49,16	49,91	50,86	51,95
4	50,84	49,54	49,85	49,75	51,68
Média	51,74	49,11	49,78	50,33	51,51
$S_{i(tempo)}$	0,55				
$DPR_{precint}$	1,082				
$DPRP_R(\%)$	8,821				
$HorRat_R$	0,123				

#### 4.1.6 Robustez

Para cada variação, verificou-se através de teste F (SNEDECOR; COCHRAN, 1989) a homogeneidade entre as variâncias da amostra ensaiada para a variação e da amostra ensaiada nas condições normais do método. Os valores de F calculados apresentaram-se menores que o valor crítico, para  $\alpha$  igual a 0,05, indicando homogeneidade entre as variâncias para todas as variações. As médias das replicatas de cada variação foram comparadas com a média das replicatas da amostra ensaiada nas condições normais através de teste t, onde o método é considerado robusto para a variação quando  $t_{calculado}$  é menor que o valor  $t_{crítico}$  para  $\alpha$  igual a 0,05. A tabela 21 apresenta os resultados dos testes.

**Tabela 21.** Teste F e Teste T para comparação de médias

Varição	Média	Variância	Teste F	Teste T
Condições Normais	48,76	0,106	-	-
Tamanho do Corte: 4 x 0,25 dm <sup>2</sup>	48,37	0,240	2,271	0,805
Tempo de Migração: 47 h e 30 minutos	48,19	0,099	1,070	2,251
Tempo de Migração: 48 h e 30 minutos	48,36	0,100	1,058	1,313
Temperatura de Migração: 17 °C	48,36	0,069	1,539	1,583
Temperatura de Migração: 23 °C	47,80	0,520	4,930	1,917
Valores Críticos			39,00	4,303

Com os resultados obtidos o método apresenta-se robusto para todas as variações estudadas. Através das alterações realizadas, foi possível estabelecer faixas de variabilidade para os parâmetros avaliados. Assim a temperatura e o tempo de migração foram definidos como  $(20 \pm 3) ^\circ\text{C}$  e  $48 \text{ h} \pm 30$  minutos, respectivamente.

#### 4.2 PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO - POP

Como resultado do processo de validação do método, foi elaborado o procedimento operacional padrão – POP INCQS 65.3120.155 para a determinação da migração do adipato de di-(2-etil-hexila) da embalagem para alimentos gordurosos. O procedimento descreve as condições de realização do ensaio a

serem seguidas no laboratório de contaminantes orgânicos do INCQS e leva em consideração os parâmetros avaliados no processo de validação.

### 4.3 AMOSTRAS ENSAIADAS

Foram analisadas vinte e cinco amostras de filme flexível de PVC recolhidas no comércio do estado do Rio de Janeiro. As amostras foram provenientes de diversos estabelecimentos e de marcas e tamanhos variados.

#### 4.3.1 Avaliação da concentração de migração de amostras de filme flexível de PVC

As amostras foram ensaiadas conforme procedimento validado anteriormente para determinação da migração específica do adipato de di-(2-etil-hexila) em filmes flexíveis de PVC em contato com alimentos gordurosos. Para cada amostra ensaiada, foi estimada a incerteza de medição inerente à concentração de migração específica determinada. A estimativa foi realizada através do método “bottom-up” descrito no item 3.7. As amostras foram identificadas de 1 a 25 para identificação unívoca das embalagens. A tabela 22 apresenta os resultados obtidos.

**Tabela 22.** Migração específica do DEHA, determinada para as amostras ensaiadas

Amostra	Resultado	Amostra	Resultado
1	< 0,52 mg kg <sup>-1</sup> (LOD)	14	(94,4 ± 3,7) mg kg <sup>-1</sup>
2	(95 ± 13) mg kg <sup>-1</sup>	15	< 0,52 mg kg <sup>-1</sup> (LOD)
3	(77,8 ± 3,1) mg kg <sup>-1</sup>	16	(36,74 ± 0,92) mg kg <sup>-1</sup>
4	< 0,52 mg kg <sup>-1</sup> (LOD)	17	(75,4 ± 4,8) mg kg <sup>-1</sup>
5	< 0,52 mg kg <sup>-1</sup> (LOD)	18	(33,4 ± 2,1) mg kg <sup>-1</sup>
6	< 0,52 mg kg <sup>-1</sup> (LOD)	19	(149 ± 27) mg kg <sup>-1</sup>
7	(86,4 ± 4,2) mg kg <sup>-1</sup>	20	< 0,52 mg kg <sup>-1</sup> (LOD)
8	< 0,52 mg kg <sup>-1</sup> (LOD)	21	(39,9 ± 1,5) mg kg <sup>-1</sup>
9	< 0,52 mg kg <sup>-1</sup> (LOD)	22	(21,60 ± 0,50) mg kg <sup>-1</sup>
10	< 0,52 mg kg <sup>-1</sup> (LOD)	23	(74,8 ± 2,4) mg kg <sup>-1</sup>
11	< 0,52 mg kg <sup>-1</sup> (LOD)	24	(7,20 ± 0,40) mg kg <sup>-1</sup>
12	(120,7 ± 5,9) mg kg <sup>-1</sup>	25	(14,29 ± 0,97) mg kg <sup>-1</sup>
13	(17,12 ± 0,55) mg kg <sup>-1</sup>		

Do total de amostras ensaiadas, treze apresentaram resultados satisfatórios para a migração específica do DEHA, sendo dez resultados abaixo do limite de detecção do método ( $0,52 \text{ mg kg}^{-1}$ ). Doze amostras apresentaram resultados insatisfatórios, sendo dez resultados acima de 200% do limite máximo estabelecido pela legislação ( $18 \text{ mg kg}^{-1}$ ).

Durante a análise da migração do DEHA foi possível observar a presença de outras substâncias, dentre as quais se destaca o ftalato de di-(2-etil-hexila) - DEHP, possível carcinogênico ao homem. Porém não foi possível a quantificação destas substâncias pelo método proposto, sendo necessária a aplicação da cromatografia líquida de alta eficiência - CLAE.



## 5 CONCLUSÃO

O método desenvolvido para detecção e quantificação da migração do adipato de di-(2-etil-hexila) a partir de filmes flexíveis de PVC em simulante isooctano foi considerado adequado ao propósito. Todos os parâmetros avaliados como linearidade, efeito matriz, repetitividade, precisão intermediária e robustez apresentaram resultados satisfatórios para a faixa de concentração definida na validação do método.

O procedimento operacional elaborado irá padronizar o ensaio de migração realizado no laboratório de contaminantes orgânicos do INCQS, sendo importante para o aumento do escopo de acreditação do laboratório, pelo INMETRO, na realização do ensaio. Porém é necessário que se estabeleça um processo de melhoria contínua, avaliando na rotina do laboratório a aplicação do procedimento.

As amostras de filme de PVC ensaiadas apresentaram resultados para a migração específica de DEHA entre 7,2 e 149 mg kg<sup>-1</sup> de solvente simulante, dentre as quais 48 % apresentaram resultado acima do limite estabelecido na legislação. Dez amostras apresentaram resultado abaixo do limite de detecção do método (0,52 mg kg<sup>-1</sup>).

É um problema de saúde pública a exposição da população às quantidades de DEHA acima do limite permitido pela legislação, como evidenciado neste estudo. Considerando-se outras possíveis fontes de exposição ao plastificante, o quadro ainda se agrava. Devido ao crescente uso dos materiais poliméricos plastificados pela população, a migração torna-se a principal fonte de contaminação, sendo capaz de atingir um maior número de indivíduos.

O método desenvolvido e validado é uma importante ferramenta de suporte para a fiscalização junto à vigilância sanitária. Através da determinação da migração específica do DEHA em filmes flexíveis de PVC comercializados, é possível direcionar ações regulatórias e promover uma maior confiabilidade nos produtos disponíveis à população. É preocupante a presença de outras substâncias nas amostras ensaiadas, sendo necessário um futuro estudo para identificação e determinação da concentração das mesmas.

## REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). **Guia para a Expressão da Incerteza de Medição**. 3ª ed., Rio de Janeiro, 2003.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). **Materiais de referência – Princípios gerais e estatísticos para certificação: ABNT ISO GUIA 35/2012**. Rio de Janeiro, 2012.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). **Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração: NBR ISO/IEC 17025/2005**. 2ª ed., Rio de Janeiro, 2005.

ALVES, S. T. **A contaminação de alimentos gordurosos através de migração de plastificantes do tipo DEHA e DEHP do filme de PVC**. 2009. 43 f. Trabalho de conclusão de curso (Especialização em Qualidade em Alimentos)- Universidade de Brasília, Brasília, 2009. Disponível em: <[http://bdm.bce.unb.br/bitstream/10483/1029/1/2009\\_SumaraTeixeiraAlves\\_.pdf](http://bdm.bce.unb.br/bitstream/10483/1029/1/2009_SumaraTeixeiraAlves_.pdf)>.

ÁVILA, A. K. et al. Comparação da estimativa de incerteza de medição na determinação de cobre por espectrometria de absorção atômica com chama por diluição gravimétrica e volumétrica. **Analytica**, v. 11, p. 48-51, 2004. Disponível em: <[http://www.revistaanalytica.com.br/ed\\_anteriores/11/comparacao.pdf](http://www.revistaanalytica.com.br/ed_anteriores/11/comparacao.pdf)>

BARROS, H. D. et al. Identification of fatty foods with contamination possibilities by plasticizers when stored in PVC film packaging. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, p. 547-552, 2011. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0101-20612011000200041&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612011000200041&nrm=iso)>.

BAZILIO, F. S. et al. Uso de planilha eletrônica na verificação da adequação de curva analítica ao modelo linear. **Analytica**, v. 59, p. 60-67, 2012. Disponível em: <[http://www.revistaanalytica.com.br/ed\\_anteriores/59/analytica.pdf](http://www.revistaanalytica.com.br/ed_anteriores/59/analytica.pdf)>.

BELSLEY, D. A.; KUH, E.; WELSCH, R. E. **Regression diagnostics: identifying influential data and sources of collinearity**. New York: Wiley, 1980.

BRASIL. Resolução nº 91 de 11 de maio de 2001. Aprovar o Regulamento Técnico - Critérios Gerais e Classificação de Materiais para Embalagens e Equipamentos em Contato com Alimentos constante do Anexo desta Resolução. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, DF, 15 de maio de 2001. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/91\\_01rdc.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/91_01rdc.htm)>.

BRASIL. Resolução nº 17 de 17 de março de 2008. Dispõe sobre regulamento técnico sobre lista positiva de aditivos para materiais plásticos destinados à elaboração de embalagens e equipamentos em contato com alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, DF, 18 de março de 2008. Disponível em:

<[http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/64805f004b0775bb92fcbfa337abae9d/Resolucao\\_RDC\\_n\\_17\\_de\\_17\\_de\\_marco\\_de\\_2008.pdf?MOD=AJPERES](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/64805f004b0775bb92fcbfa337abae9d/Resolucao_RDC_n_17_de_17_de_marco_de_2008.pdf?MOD=AJPERES)>.

BRASIL. Resolução nº 51 de 26 de novembro de 2010. Dispõe sobre migração em materiais, embalagens e equipamentos plásticos destinados a entrar em contato com alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, DF, 22 de dezembro de 2010. Disponível em:

<[http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/33fc9d0049189085b8c9bc466b74119d/RESOLUCAO\\_RDC\\_N\\_51\\_DE\\_26\\_DE\\_NOVEMBRO\\_DE\\_2010.pdf?MOD=AJPERES](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/33fc9d0049189085b8c9bc466b74119d/RESOLUCAO_RDC_N_51_DE_26_DE_NOVEMBRO_DE_2010.pdf?MOD=AJPERES)>.

BRASKEM. **Tecnologia do PVC**. São Paulo, 2006. 450p. Disponível em:

<[http://www.braskem.com.br/Portal/Principal/Arquivos/Download/Upload/Tecnologia%20do%20PVC%202a%20edi%C3%A7%C3%A3o\\_22.pdf](http://www.braskem.com.br/Portal/Principal/Arquivos/Download/Upload/Tecnologia%20do%20PVC%202a%20edi%C3%A7%C3%A3o_22.pdf)>.

BRATINOVA, S.; RAFFAEL, B.; SIMONEAU, C. **Guidelines for performance criteria and validation procedures of analytical methods used in controls of food contact materials: EUR 24105 EN**. 1. ed. Luxembourg: Publications Office of the European Union, 2009. Disponível em:

<<http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/111111111/1326>>.

BROWN, M. B.; FORSYTHE, A. B. Robust Tests for the Equality of Variances.

**Journal of the American Statistical Association**, v. 69, n. 346, p. 364-367, 1974. Disponível em: <<http://www.jstor.org/stable/2285659>>.

BUCHMANN, J. H.; SARKIS, J. E. D. S. O conceito de incerteza aplicado aos processos de medição associados à preparação de uma solução de referência para calibração. **Química Nova**, v. 25, p. 111-116, 2002. Disponível em:

<[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-40422002000100019&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422002000100019&nrm=iso)>.

DE LA CRUZ, M. H. C. et al. Estimativa da incerteza de medição em análise cromatográfica: abordagem sobre a quantificação de carbamato de etila em cachaça. **Química Nova**, v. 33, p. 1578-1584, 2010. Disponível em:

<[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-40422010000700027&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422010000700027&nrm=iso)>.

DRAPER, N.R.; SMITH, H. **Applied regression analysis**. New York: Wiley. 706 p., 1998.

DURBIN, J.; WATSON, G. S. Testing for Serial Correlation in Least Squares Regression. II. **Biometrika**, v. 38, n. 1/2, p. 159-177, 1951. Disponível em: <<http://www.jstor.org/stable/2332325>>.

ENDO, K. Synthesis and structure of poly(vinyl chloride). **Progress in Polymer Science**, v. 27, n. 10, p. 2021-2054, 2002. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0079670002000667>>.

U. S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (U.S.EPA). **Integrated Risk Information System - Di(2-ethylhexyl)adipate**. 2012. Disponível em: <<http://www.epa.gov/iris/subst/0420.htm>>. Acesso em: 02 out. 2012.

ESTEVES, A. A. et al. Validação em laboratório de método analítico para determinação do teor de adipato e ftalato de di-(2-etil-hexila) utilizados como plastificantes em filmes flexíveis de PVC. **Química Nova**, v. 30, p. 219-223, 2007. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-40422007000100035&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422007000100035&nrm=iso)>.

EURACHEM/CITAC WORKING GROUP. **The fitness for purpose of analytical methods: A laboratory guide to method validation and related topics**. 1<sup>a</sup> ed., London, 1998. Disponível em: <<http://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/valid.pdf>>.

EURACHEM/CITAC WORKING GROUP. **Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement**. 3<sup>a</sup> ed., London, 2012. Disponível em: <[http://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/QUAM2012\\_P1.pdf](http://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/QUAM2012_P1.pdf)>.

EVANGELISTA, J. **Tecnologia de alimentos**. São Paulo: Editora Atheneu, 1998.

GOUVÊA, A.V. **Validação de metodologia de análise de resíduos de agrotóxicos em maçãs por cromatografia líquida com detecção por espectrometria de massas sequencial**. 2011. 74 f. Trabalho de conclusão de curso (Especialização em Vigilância Sanitária)-Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Rio de Janeiro, 2011. Disponível em: <[http://phl.incqs.fiocruz.br/controle/tc/ADHERLENE\\_TCC.pdf](http://phl.incqs.fiocruz.br/controle/tc/ADHERLENE_TCC.pdf)>.

GRIZZO, L. H.; HAGE JÚNIOR, E.; LAURINI, R. V. Desenvolvimento de PVC reforçado com fibras de vidro longas para fabricação de produtos moldados. **Polímeros**, v. 21, p. 369-375, 2011. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0104-14282011000500006&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-14282011000500006&nrm=iso)>.

HORWITZ, W. Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies. **Pure Applied Chemistry**. v. 67, p. 331-43, 1995. Disponível em: <<http://www.iupac.org/publications/pac/1995/pdf/6702x0331.pdf>>.

HORWITZ, W.; ALBERT, R. The Horwitz Ratio (HorRat): A Useful Index of Method Performance with Respect to Precision. **Journal of AOAC International**, v. 89, n. 4, p. 1095-1109, 2006.

HUBER, L. Validation of analytical methods: review and strategy. **LC/GC International**, Feb, p. 96-105, 1998.

HUBER, W. Basic calculations about the limit of detection and its optimal determination. **Accreditation and Quality Assurance**, v. 8, n. 5, p. 213-217, 2003. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00769-003-0626-8>>.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA (INMETRO). **Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos: DOQ-CGCRE-008**. Normatização e Qualidade Industrial. Revisão 4, julho de 2011. Disponível em: <[http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8\\_04.pdf](http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_04.pdf)>.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA (INMETRO). **Vocabulário Internacional de Metrologia: Conceitos Fundamentais e Gerais e Termos Associados (VIM 2012)**, 1ª ed., Rio de Janeiro, 2012. Disponível em: <[http://www.inmetro.gov.br/infotec/publicacoes/vim\\_2012.pdf](http://www.inmetro.gov.br/infotec/publicacoes/vim_2012.pdf)>.

INSTITUTO DO PVC. **Consumo aparente das resinas de PVC**. [2010]. Disponível em: <[http://www.institutodopvc.org/publico/?a=conteudo&canal\\_id=65&subcanal\\_id=66](http://www.institutodopvc.org/publico/?a=conteudo&canal_id=65&subcanal_id=66)>. Acesso em: 09 out. 2012.

INSTITUTO DO PVC. **A fabricação do PVC**. [2012]. Disponível em: <[http://www.institutodopvc.org/publico/?a=conteudo&canal\\_id=39&subcanal\\_id=40](http://www.institutodopvc.org/publico/?a=conteudo&canal_id=39&subcanal_id=40)>. Acesso em: 03 out. 2012.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). **Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans**: v. 77, 2000. Disponível em: <<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol77/mono77-7.pdf>>.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION (ICH). **Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1)**. Geneva, 2005. Disponível em: <<http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA417.pdf>>.

INSTITUTO PORTUGUÊS DE ACREDITAÇÃO (IPAC). **Guia para a Quantificação de Incerteza em Ensaios Químicos: OGC007**, Caparica, 2007.

LEITO, S.; LEITO, I. Introduction of measurement uncertainty estimation into analytical instrument software: mission impossible? **Accreditation and Quality Assurance**, v. 9, n. 11, p. 666-670, 2004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00769-004-0859-1>>.

LEVENE, H. Robust tests for equality of variances. In: OLKIN, I; GHURYE, S.G.; Hoeffding, W.; MADOW, W.G.; MANN, H.B. (Ed.). **Contributions to probability and statistics**. Stanford University Press, p. 278-292, 1960.

MADALENO, E. et al. Estudo do uso de plastificantes de fontes renovável em composições de PVC. **Polímeros**, v. 19, p. 263-270, 2009. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0104-14282009000400004&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-14282009000400004&nrm=iso)>.

MELO, N. R. **Migração de plastificantes e avaliação de propriedades mecânicas de filmes de poli(cloreto de vinila) para alimentos**. 2007. 138 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)- Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2007. Disponível em: <[http://www.tede.ufv.br/tedesimplificado/tde\\_arquivos/38/TDE-2007-08-15T134918Z-757/Publico/texto%20completo.pdf](http://www.tede.ufv.br/tedesimplificado/tde_arquivos/38/TDE-2007-08-15T134918Z-757/Publico/texto%20completo.pdf)>.

MILLER, J. C., MILLER, J. N.; **Statistics for analytical chemistry**. New York: Ellis Horwood Limited, 1993.

NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY (NIST). **Guidelines for evaluating and expressing the uncertainty of NIST measurement results: NIST Technical Note 1297**. 1994 Edition, Washington: U.S. Government Printing Office, 1994. Disponível em: <<http://physics.nist.gov/Pubs/guidelines/TN1297/tn1297s.pdf>>.

NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY (NIST). **Livro de química na web**. 2011. Disponível em: <<http://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?Name=Bis%282-ethylhexyl%29+adipate&Units=SI>>. Acesso em: 18 out. 2012.

OLIVEIRA, E. C. D.; AGUIAR, P. F. D. Comparação de diferentes abordagens para avaliação da incerteza na cromatografia gasosa do gás natural. **Química Nova**, v. 32, p. 1655-1660, 2009. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-40422009000600051&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422009000600051&nrm=iso)>.

PETERSEN, J. H. J.; BREINDAHL, T. Specific migration of di-(2-ethylhexyl)adipate (DEHA) from plasticized PVC film: Results from an enforcement campaign. **Food Additives and Contaminants**, v. 15, n. 5, p. 600-608, 1998. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/02652039809374687>>.

RAHMAN, M.; BRAZEL, C. S. The plasticizer market: an assessment of traditional plasticizers and research trends to meet new challenges. **Progress in Polymer Science**, v. 29, n. 12, p. 1223-1248, 2004. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0079670004000929>>.

RIBEIRO, F. A. D. L. et al. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Química Nova**, v. 31, p. 164-171, 2008. Disponível em:  
<[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-40422008000100029&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422008000100029&nrm=iso)>.

RYAN, T.A.; JOINER, B.L. **Normal probability plots and tests for normality**. The States College: Pennsylvania State University, 15 p., 1976.

SHEGUNOVA, P.; BERCARU, O.; SEJERØE-OLSEN, B. Estimation of measurement uncertainty in organic analysis: two practical approaches. **Accreditation and Quality Assurance**, v. 13, n. 1, p. 11-18, 2008. Disponível em:  
<<http://dx.doi.org/10.1007/s00769-007-0322-1>>.

SILVA, A. V. P. **Avaliação da toxicidade do plastificante adipato de di-(2-etil-hexila) - DEHA sobre o sistema reprodutivo de camundongos machos expostos in utero e durante a lactação**. 2007. 89 f. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária)- Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Rio de Janeiro, 2007. Disponível em:  
<<http://teses.icict.fiocruz.br/lildbi/docsonline/get.php?id=095>>.

SNEDECOR, G. W.; COCHRAN, W. G. **Statistical methods**. Ames: Iowa State University. 503 p., 1989.

SOBOLEVA, E.; AMBRUS, Á. Application of a system suitability test for quality assurance and performance optimisation of a gas chromatographic system for pesticide residue analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1027, n. 1–2, p. 55-65, 2004. Disponível em:  
<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967303020235>>.

SOUZA, S. V. C.; JUNQUEIRA, R. G. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. **Analytica Chimica Acta**, v. 552, n. 1–2, p. 25-35, 2005. Disponível em:  
<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267005012857>>.

SOUZA S. V. C. **Procedimento para validação intralaboratorial de métodos de ensaio: delineamento e aplicabilidade em análises de alimentos**. 2007. 296 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos)-Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/1843/URMR-76GNKZ>>.

SOUZA, R. R. et al. Determinação de plastificantes em água potável utilizando cromatografia gasosa e espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 35, p. 1453-1458, 2012. Disponível em:  
<[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-40422012000700028&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422012000700028&nrm=iso)>.

THOMPSON, M.; ELLISON, S.L.R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for a single-laboratory validation of methods of analysis. **Pure Applied Chemistry**, v.74, p. 835-855, 2002. Disponível em: <<http://pac.iupac.org/publications/pac/pdf/2002/pdf/7405x0835.pdf>>.

TOMIĆ, T.; NASIPAK, U. N.; BABIĆ, S. Estimating measurement uncertainty in high-performance liquid chromatography methods. **Accreditation and Quality Assurance**, v. 17, n. 3, p. 291-300, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00769-011-0872-0>>.

UNIÃO EUROPÉIA (UE). Directiva 2002/72/CE, 06 de agosto de 2002. Relativa aos materiais e objectos de matéria plástica destinados a entrar em contacto com os géneros alimentícios. **Official Journal of the European Union**, L. 220, 2002. Disponível em: <<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2002:220:0018:0018:EN:PDF>>.

VINHAS, G. M. et al. Degradation studies on plasticized PVC films submitted to gamma radiation. **Materials Research**, v. 6, p. 497-500, 2003. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1516-14392003000400012&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-14392003000400012&nrm=iso)>.

ZYGOURA, P. D. et al. Determination of diethylhexyladipate and acetyltributylcitrate in aqueous extracts after cloud point extraction coupled with microwave assisted back extraction and gas chromatographic separation. **Journal of Chromatography A**, v. 1093, n. 1–2, p. 29-35, 2005. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002196730501575X>>.