

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Fabio Silvestre Bazilio

**DETERMINAÇÃO DA MIGRAÇÃO ESPECÍFICA DOS PLASTIFICANTES
FTALATO DE DI-(2-ETIL-HEXILA) E ADIPATO DE DI-(2-ETIL-HEXILA) DE
FILMES FLEXÍVEIS DE PVC PARA ALIMENTOS GORDUROSOS: VALIDAÇÃO
DE MÉTODO E CONTROLE SANITÁRIO DO FILME FLEXÍVEL DE PVC**

Rio de Janeiro

2014

Fabio Silvestre Bazilio

**DETERMINAÇÃO DA MIGRAÇÃO ESPECÍFICA DOS PLASTIFICANTES
FTALATO DE DI-(2-ETIL-HEXILA) E ADIPATO DE DI-(2-ETIL-HEXILA) DE
FILMES FLEXÍVEIS DE PVC PARA ALIMENTOS GORDUROSOS: VALIDAÇÃO
DE MÉTODO E CONTROLE SANITÁRIO DO FILME FLEXÍVEL DE PVC**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Vigilância Sanitária.

Orientadora: Shirley de Mello Pereira Abrantes

Rio de Janeiro

2014

Catálogo na fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Biblioteca

Bazilio, Fabio Silvestre

Determinação da migração específica dos plastificantes ftalato de di-(2-etil-hexila) e adipato de di-(2-etil-hexila) de filmes flexíveis de PVC para alimentos gordurosos: validação de método e controle sanitário do filme flexível de PVC / Fabio Silvestre Bazilio. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2014.

141 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) – Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 2014.

Orientadora: Shirley de Mello Pereira Abrantes

1. Contaminação de Alimentos. 2. Métodos de Controle. 3. Cromatografia Gasosa. 4. Controle de Qualidade. I Título

Determination of specific migration of the plasticizers di-(2-ethylhexyl) phthalate and di-(2-ethylhexyl) adipate from flexible PVC films to fatty foods: Method validation and sanitary control of flexible PVC film

Fabio Silvestre Bazilio

**DETERMINAÇÃO DA MIGRAÇÃO ESPECÍFICA DOS PLASTIFICANTES
FTALATO DE DI-(2-ETIL-HEXILA) E ADIPATO DE DI-(2-ETIL-HEXILA) DE
FILMES FLEXÍVEIS DE PVC PARA ALIMENTOS GORDUROSOS: VALIDAÇÃO
DE MÉTODO E CONTROLE SANITÁRIO DO FILME FLEXÍVEL DE PVC**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Vigilância Sanitária.

Orientadora: Shirley de Mello Pereira Abrantes

Aprovado em 06/ 06/ 2014

BANCA EXAMINADORA

Helena Pereira da Silva Zamith (Doutora)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – INCQS

Marco Antonio Mota da Silva (Doutor)
Centro Universitário Estadual da Zona Oeste – UEZO

Thomas Manfred Krauss (Doutor)
Escola Nacional de Saúde Pública – ENSP

Shirley de Mello Pereira Abrantes (Doutora) - Orientadora
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – INCQS

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, George e Laralice, pelo apoio, colaboração e amizade. Obrigado pelo suporte de fundamental importância e pelos momentos de descontração.

À Lúcia Helena e Maria Helena do laboratório de resíduos de agrotóxicos por permitir que os ensaios em CG-EM pudessem ser realizados. E ao Thomas por toda a ajuda e orientação no uso do equipamento.

Ao professor e amigo Sérgio pelos ensinamentos de estatística, fundamentais nesse trabalho.

Aos professores e coordenadores do Curso de Mestrado Profissional do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde pelos ensinamentos e dedicação aos alunos do curso.

Aos amigos da turma de mestrado 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.

O único lugar onde o sucesso vem antes do trabalho é no dicionário.

Albert Einstein

RESUMO

O poli (cloreto de vinila) - 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 estão o ftalato de di-(2-etil-hexila) – DEHP e o adipato de di-(2-etil-hexila) - DEHA. O DEHP é classificado pela Agência Internacional para Pesquisa em Câncer - IARC no grupo 2B (possível agente carcinogênico ao homem), e pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos da América - U.S.EPA no grupo toxicológico B2 (provável carcinógeno humano), sendo relacionado a diversos efeitos tóxicos para a saúde humana, tais como danos causados nos sistemas reprodutivos masculino e feminino e efeitos na indução de hepatocarcinomas. O DEHA é classificado pela IARC no grupo 3 (não classificável quanto à sua carcinogenicidade para os seres humanos). Contudo, a U.S.EPA classifica o DEHA dentro do grupo toxicológico C, como um possível carcinógeno humano. Os dois plastificantes estão relacionados à indução da proliferação de peroxissomas hepáticos e danos à gestação. A Resolução nº 17 da ANVISA de 17 de março de 2008 estabelece limite de migração específica para DEHP em $1,5 \text{ mg kg}^{-1}$ do solvente simulante e para o DEHA em 18 mg kg^{-1} . 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 o desenvolvimento e a validação intralaboratorial de um método para avaliação da migração dos plastificantes DEHP e DEHA da embalagem para alimentos gordurosos. O teste de migração foi realizado por meio do contato de 1 dm^2 do filme de PVC com 100 mL de solvente simulante etanol 95 % por 48 h à $20 \text{ }^\circ\text{C}$. As concentrações de migração dos plastificantes DEHP e DEHA foram determinadas 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. As faixas de trabalho foram definidas de 0,6 a $10,0 \text{ mg kg}^{-1}$ para o DEHP e 2,5 a $40,0 \text{ mg kg}^{-1}$ para o DEHA. As curvas se apresentaram estatisticamente lineares, não sendo observada falta de ajuste ao modelo. Não foi observado efeito de matriz e a seletividade foi considerada satisfatória. O método apresentou repetibilidade e precisão intermediária adequadas

e resultados robustos para temperatura e tempo de migração de $(20 \pm 2) ^\circ\text{C}$ e $(48 \pm 0,5)$ h, respectivamente. Trinta e sete amostras de filme de PVC foram ensaiadas, apresentando resultados para a migração específica de DEHA entre não detectável ($<0,35 \text{ mg kg}^{-1}$) e 231 mg kg^{-1} de solvente simulante e entre não detectável ($<2,23 \text{ mg kg}^{-1}$) e 304 mg kg^{-1} de solvente simulante para o DEHP. Dentre as amostras ensaiadas, 95 % apresentaram resultado insatisfatório para pelo menos um dos plastificantes.

Palavras-chave: Validação. Migração. Alimentos gordurosos. Adipato de di-(2-etil-hexila). Ftalato de di-(2-etil-hexila). 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) phthalate – DEHP and di-(2-ethylhexyl) adipate – DEHA. DEHP is classified by the International Agency for Research on Cancer - IARC in Group 2B (possibly carcinogenic agent to humans) and by US Environmental Protection Agency – U.S.EPA in group B2 (probable carcinogenic agent to humans), being related to many toxic effects to human health, such as damage to the male and female reproductive system and effects on hepatocellular carcinoma development. DEHA is classified by IARC in Group 3 (not classifiable as to its carcinogenicity to humans). However, the US Environmental Protection Agency – U.S.EPA classifies DEHA within the toxicology group C as a possible human carcinogen. Both plasticizers are related to the induction of hepatic peroxisome proliferation, and damage to pregnancy. Resolution N° 17 of ANVISA of 17 March 2008 establishing specific migration limit for DEHP in 1,5 mg kg⁻¹ of simulant solvent and 18 mg kg⁻¹ for 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 development and in-house validation of a method for the determination of the migration of DEHP and DEHA from packaging for fatty foods. The migration test was carried through contact of 1 dm² of PVC film with 100 mL of simulant solvent ethanol 95 % for 48 h at 20 °C. The migration concentrations of DEHP and DEHA were 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 ranges were defined from 0.6 to 10.0 mg kg⁻¹ for DEHP and from 2.5 to 40.0 mg kg⁻¹ for DEHA. The curves were statistically linear, with no observed lack-of-fit. There was no matrix effect and the selectivity of the method was satisfactory. The method has adequate repeatability and intermediate precision and robust results for temperature and time migration of (20 ± 2) °C and (48 ± 0,5) h, respectively. Thirty seven PVC film samples were tested, presenting results for specific migration of DEHA between not detectable (<0.35 mg kg⁻¹) and 231 mg kg⁻¹ of simulant solvent and between not detectable (<2.23

mg kg⁻¹) e 304 mg kg⁻¹ simulant solvent for DEHP. Among the samples tested, 95% had results above the limit established by legislation.

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

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Participação de cada segmento na indústria de embalagens em 2012.....	22
Figura 2. Síntese da resina de PVC e adição de aditivos.....	24
Figura 3. Estruturas bidimensional (a) e tridimensional (b) do ftalato de di-(2-etil-hexila).....	26
Figura 4. Estruturas bidimensional (a) e tridimensional (b) do adipato de di-(2-etil-hexila).....	26
Figura 5. Modelos de transferência de massa.....	34
Figura 6. Sequência do ensaio de migração.	48
Figura 7. Fluxograma de preparo das soluções estoque.....	50
Figura 8. Fluxograma de preparo das soluções intermediárias.....	51
Figura 9. Fluxo de preparo das soluções de trabalho.....	52
Figura 10. Sequência de análises para os ensaios de repetibilidade e homogeneidade	65
Figura 11. Grupos de replicatas	65
Figura 12. Incertezas de maior importância.....	71
Figura 13. Diagrama de causa e efeito para o ensaio de migração.	72
Figura 14. Cromatograma referente à mistura padrão	76
Figura 15. Cromatograma referente à amostra A-31	77
Figura 16. Curva analítica final de DEHP em solvente.....	78
Figura 17. Curva analítica final de DEHA em solvente.....	79
Figura 18. Gráfico de Durbin-Watson ($e_i \times e_{i-1}$), curva de DEHP em solvente.....	81
Figura 19. Gráfico de Durbin-Watson ($e_i \times e_{i-1}$), curva de DEHA em solvente.....	81
Figura 20. Intervalo de Confiança da Reta (DEHP).....	83
Figura 21. Intervalo de Confiança da Reta (DEHA).....	83
Figura 22. Curva analítica final de DEHP em matriz	84
Figura 23. Curva analítica final de DEHA em matriz	85
Figura 24. Gráfico de Durbin-Watson ($e_i \times e_{i-1}$), curva de DEHP em matriz	87
Figura 25. Gráfico de Durbin-Watson ($e_i \times e_{i-1}$), curva de DEHA em matriz	87
Figura 26. Comparação entre as curvas analíticas preparadas na presença do solvente (azul) e da matriz (vermelho) para o DEHP	90
Figura 27. Comparação entre as curvas analíticas preparadas na presença do solvente (azul) e da matriz (vermelho) para o DEHA	90

Figura 28. Análise cromatográfica da solução proveniente do ensaio de migração da amostra branca, em etanol 95 %.....	91
Figura 29. Análise cromatográfica da mistura padrão adicionada à solução proveniente do ensaio de migração da amostra branca, em etanol 95 %.....	91
Figura 30. Cromatograma de íons totais referente à mistura padrão	92
Figura 31. Cromatograma de íons totais referente à amostra AM-07.....	93
Figura 32. Espectros de massas dos plastificantes DEHA e DEHP, disponíveis na biblioteca de espectros de massas Wiley.....	94
Figura 33. Espectros de massas dos plastificantes DEHA e DEHP referentes à mistura padrão	94
Figura 34. Distribuição gráfica das migrações específicas de DEHP, determinadas para as amostras ensaiadas	101
Figura 35. Distribuição gráfica das migrações específicas de DEHA, determinadas para as amostras ensaiadas	102

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Seleção de simulantes para cada tipo de alimento.....	36
Tabela 2. Preparo das soluções estoque em etanol 95 %.....	50
Tabela 3. Preparo das soluções intermediárias.....	51
Tabela 4. Preparo das soluções de trabalho.....	53
Tabela 5. Análise de variância para significância da regressão e do desvio da linearidade.....	59
Tabela 6. Tolerância permitida entre as razões dos íons determinadas na amostra e padrão, de acordo com a intensidade relativa.....	62
Tabela 7. Análise de variância (ANOVA) para avaliação da homogeneidade da amostra.....	66
Tabela 8. Variações avaliadas na verificação da robustez.....	68
Tabela 9. Presença de plastificantes nas soluções de migração.....	77
Tabela 10. Normalidade dos resíduos da regressão (teste de Ryan-Joiner) - R_{eq} e R_{crit} calculados.....	79
Tabela 11. Homoscedasticidade dos resíduos da regressão (teste de Levene) - Resultados Obtidos.....	80
Tabela 12. Independência dos resíduos da regressão (teste de Durbin-Watson) - Limites d_L e d_U calculados.....	81
Tabela 13. Análise de variância para significância da regressão e do desvio da linearidade (DEHP).....	82
Tabela 14. Análise de variância para significância da regressão e do desvio da linearidade (DEHA).....	82
Tabela 15. Limites de detecção e quantificação.....	82
Tabela 16. Normalidade dos resíduos da regressão (teste de Ryan-Joiner) - R_{eq} e R_{crit} calculados.....	85
Tabela 17. Homoscedasticidade dos resíduos da regressão (teste de Levene) - Resultados Obtidos.....	86
Tabela 18. Independência dos resíduos da regressão (teste de Durbin-Watson) - Limites d_L e d_U calculados.....	87
Tabela 19. Análise de variância para significância da regressão e do desvio da linearidade (DEHP).....	88

Tabela 20. Análise de variância para significância da regressão e do desvio da linearidade (DEHA)	88
Tabela 21. Avaliação da homoscedasticidade entre as variâncias dos resíduos das duas curvas	89
Tabela 22. Comparação das inclinações e interseções das curvas.....	89
Tabela 23. Tempos de retenção dos plastificantes observados nas amostras analisadas por CG-MS	93
Tabela 24. Razões entre as áreas dos íons de confirmação e quantificação monitorados nas amostras e na mistura padrão.	95
Tabela 25. Grupos de replicatas para o DEHP	96
Tabela 26. Grupos de replicatas para o DEHA	96
Tabela 27. Análise de variância (ANOVA) para avaliação da homogeneidade da amostra (DEHP).	97
Tabela 28. Análise de variância (ANOVA) para avaliação da homogeneidade da amostra (DEHA).	97
Tabela 29. Avaliação da Repetibilidade.....	97
Tabela 30. Avaliação da Precisão Intermediária (DEHP)	98
Tabela 31. Avaliação da Precisão Intermediária (DEHA)	98
Tabela 32. Teste F e teste t para comparação de médias (DEHP).....	99
Tabela 33. Teste F e Teste T para comparação de médias (DEHA)	99
Tabela 34. Migrações específicas de DEHP e DEHA, determinadas para as amostras ensaiadas.....	101

LISTA DE SIGLAS

ABRE – Associação Brasileira de Embalagem

ANOVA – Análise de variância

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATSDR - *Agency for Toxic Substances and Disease Registry*

BBP – Ftalato de butil-benzila

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

CG-EM – Cromatógrafo a gás acoplado a um detector de massas

CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência

CSTEE – *Scientific Committee on Toxicity, Ecotoxicity and the Environment*

DBP – Ftalato de di-butila

DEHA – Adipato de di-(2-etil-hexila)

DEHP – Ftalato de di-(2-etil-hexila)

DEHT – Tereftalato de di-(2-etil-hexila)

DIBP – Ftalato de di-(iso-butila)

DIDP – Ftalato de di-(iso-dodecila)

DIHP – Ftalato de di-(iso-hexila)

DINP – Ftalato de di-(iso-nonila)

DL₅₀ – Dose letal média

DNOP – Ftalato de di-*n*-octila

DPHP – Ftalato di-(2-propil-heptila)

EC – *European Commission*

ECPI – *European Council for Plasticizers and Intermediates*

EDC – Dicloroetano

EU – União Européia (*European Union*)

FAO/WHO – *Food and Agriculture Organization of the United Nations – World Health Organization*

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

HHS – *U.S. Department of Health and Human Services*

IARC – *International Agency for Research on Cancer*

ICH – *International Conference on Harmonization*

IHCP – *Institute of Health and Consumer Protection*

INCQS – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

IPAC – Instituto Português de Acreditação

ISO – Organização Internacional de Normalização

IUPAC - *International Union of Pure and Applied Chemistry*

LME – Limite de migração específica

LOAEL – Menor dose onde se observa efeito adverso

LOD – Limite de detecção

LOQ – Limite de quantificação

MEHA – Adipato de mono-(2-etil-hexila)

MEHP – Ftalato de mono-(2-etil-hexila)

MMQO – Método de mínimos quadrados ordinários

MS – Ministério da Saúde

MVC – Monômero cloreto de vinila

m/z – Razão massa/carga

NIST – *National Institute of Standards and Technology*

NOAEL – Nível de não observação de efeito adverso

POP – Procedimento operacional padrão

PROMAC – Programa de Monitoramento de Aditivos e Contaminantes

PVC – Poli (cloreto de vinila)

RfD – Dose de referência

RSC – *Royal Society of Chemistry*

UE – União Europeia

U.S.EPA – Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos da América

UV – Ultravioleta

VIM – Vocabulário Internacional de Metrologia

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
1.1	EMBALAGENS PARA ALIMENTOS	21
1.2	POLI (CLORETO DE VINILA)	23
1.3	ADITIVOS PLASTIFICANTES	25
1.4	EFEITOS TOXICOLÓGICOS DE ADITIVOS PLASTIFICANTES	27
1.5	MIGRAÇÃO	33
1.6	ENSAIO DE MIGRAÇÃO	35
1.7	VALIDAÇÃO DO MÉTODO	37
1.7.1	Faixa de trabalho	38
1.7.2	Curva analítica e linearidade	39
1.7.3	Seletividade	40
1.7.4	Efeito de matriz	40
1.7.5	Repetibilidade	41
1.7.6	Precisão intermediária	41
1.7.7	Robustez	41
1.7.8	Limites de detecção e quantificação	42
1.8	ESTIMATIVA DA INCERTEZA DE MEDIÇÃO	42
1.9	JUSTIFICATIVA	43
2	OBJETIVOS	45
2.1	OBJETIVO GERAL	45
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	45
3	MATERIAL E MÉTODOS	46
3.1	MATERIAL	46
3.1.1	Vidrarias	46
3.1.2	Gases, padrões e reagentes	46
3.1.3	Equipamentos	46
3.1.4	Amostras	47
3.2	MÉTODOS	48
3.2.1	Ensaio de migração	48
3.2.2	Ensaio preliminar das amostras de filme flexível de PVC	49
3.2.3	Validação do método	49
3.2.3.1	<i>Desenho experimental da curva analítica</i>	50

3.2.3.2	<i>Avaliação da linearidade da curva analítica</i>	53
3.2.3.2.1	<i>Estimativa dos parâmetros de regressão</i>	54
3.2.3.2.2	<i>Tratamento de valores extremos</i>	54
3.2.3.2.3	<i>Teste de normalidade</i>	55
3.2.3.2.4	<i>Teste de homoscedasticidade</i>	57
3.2.3.2.5	<i>Teste de independência (autocorrelação dos resíduos)</i>	58
3.2.3.2.6	<i>Teste de significância da regressão e do desvio da linearidade</i>	59
3.2.3.2.7	<i>Limites de detecção e quantificação</i>	60
3.2.3.3	<i>Seletividade</i>	60
3.2.3.3.1	<i>Identificação dos plastificantes</i>	61
3.2.3.4	<i>Efeito de matriz</i>	62
3.2.3.4.1	<i>Avaliação dos resultados</i>	63
3.2.3.5	<i>Repetibilidade</i>	65
3.2.3.5.1	<i>Avaliação da homogeneidade da amostra</i>	65
3.2.3.5.2	<i>Avaliação da repetibilidade do método</i>	66
3.2.3.6	<i>Precisão Intermediária</i>	67
3.2.3.7	<i>Robustez</i>	68
3.2.4	<i>Incerteza de medição</i>	70
3.2.4.1	<i>Incerteza associada ao preparo dos padrões de calibração $u_{(dil)}$</i>	72
3.2.4.2	<i>Incerteza associada à curva analítica $u_{(C_0)}$</i>	73
3.2.4.3	<i>Incerteza associada à repetibilidade $u_{(rep)}$</i>	74
3.2.4.4	<i>Estimativa da incerteza combinada final $u_{(Comb)}$</i>	74
3.2.4.5	<i>Estimativa da incerteza expandida U</i>	75
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	76
4.1	ENSAIO DE MIGRAÇÃO PRELIMINAR	76
4.2	VALIDAÇÃO DO MÉTODO	78
4.2.1	<i>Avaliação da linearidade da curva analítica preparada em solvente</i>	78
4.2.1.1	<i>Tratamento de valores extremos</i>	78
4.2.1.2	<i>Teste de normalidade</i>	79
4.2.1.3	<i>Teste de homoscedasticidade</i>	80
4.2.1.4	<i>Teste de independência (autocorrelação dos resíduos)</i>	80
4.2.1.5	<i>Teste de significância da regressão e desvio da linearidade</i>	81
4.2.2	<i>Limites de detecção e quantificação – LOD e LOQ</i>	82

4.2.3	Efeito de matriz e seletividade.....	84
4.2.3.1	<i>Avaliação da linearidade da curva preparada na presença da matriz</i>	84
4.2.3.2	<i>Tratamento de valores extremos.....</i>	84
4.2.3.3	<i>Teste de normalidade.....</i>	85
4.2.3.4	<i>Teste de homoscedasticidade.....</i>	86
4.2.3.5	<i>Teste de independência (autocorrelação dos resíduos).....</i>	86
4.2.3.6	<i>Teste de significância da regressão e desvio da linearidade</i>	87
4.2.3.7	<i>Avaliação do efeito de matriz</i>	88
4.2.3.8	<i>Avaliação da seletividade.....</i>	90
4.2.4	Repetibilidade.....	96
	Fonte de Variação	97
	Fonte de Variação	97
4.2.5	Precisão intermediária	97
4.2.6	Robustez	98
4.4	AMOSTRAS ENSAIADAS.....	100
4.4.1	Avaliação da concentração de migração de amostras de filme flexível de PVC	100
5	CONCLUSÃO.....	105
	REFERÊNCIAS.....	107
	ANEXO A - Cromatogramas de íons totais referentes às amostras.	117
	ANEXO B - Espectros de massas obtidos para os plastificantes DEHA e DEHP obtidos nas amostras.....	120
	ANEXO C - Cromatogramas dos íons fragmento dos plastificantes DEHA e DEHP referentes à mistura padrão e às amostras.....	122
	ANEXO D – Procedimento operacional padrão para a determinação da migração específica dos plastificantes deha e dehp da embalagem para alimentos gordurosos	131

1 INTRODUÇÃO

1.1 EMBALAGENS PARA ALIMENTOS

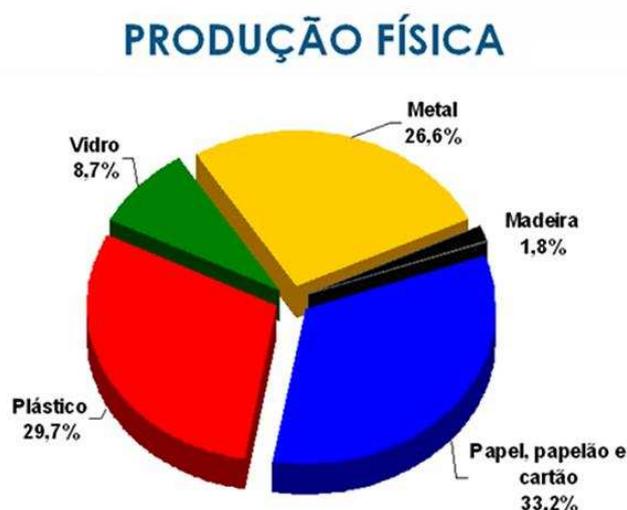
Nos primórdios da civilização humana, as embalagens não eram necessárias, e o homem consumia seus alimentos no local de sua origem. A necessidade do uso de embalagens começou a surgir à medida que a vida humana tornou-se mais complexa, surgindo a necessidade de armazenamento e transporte dos alimentos. (GERMANO; GERMANO, 2001).

Os alimentos, de um modo geral, em qualquer fase da destinação ao consumo, devem ser acondicionados. Diversos produtos, como os industrializados, devem ser embalados como parte obrigatória de um processo de conservação (GERMANO; GERMANO, 2001).

O desenvolvimento da tecnologia ampliou a variabilidade de materiais com características adequadas para suprir a grande diversidade de demanda específica, que necessita de uma embalagem para cada determinado tipo de alimento. As características físicas, químicas e sensoriais dos alimentos são bastante variadas, assim como as técnicas para acondicioná-los. Os materiais de embalagem tradicionalmente usados no mercado são o vidro, o papel, o metal e o plástico. Todavia, nas últimas décadas houve um expressivo crescimento na indústria de plásticos, favorecendo a produção de embalagens poliméricas (BARROS, 2010).

Esse crescimento se deve a fatores mercadológicos como transparência, leveza, resistência a quebras, versatilidade de formatos e tamanhos, assim como sistemas de fechamento. Além disso, os custos são altamente competitivos, tornando os plásticos extremamente atraentes para os produtores e usuários de embalagens (ALVES, 2009). Segundo dados da Associação Brasileira de Embalagens - ABRE, em 2012, a utilização de materiais plásticos na produção de embalagens representou 29,7% do total da produção física do setor no ano. A Figura 1 representa a distribuição da produção física de embalagens por segmento de matéria prima (ABRE, 2013).

Figura 1. Participação de cada segmento na indústria de embalagens em 2012



Fonte: (ABRE, 2013)

A Resolução RDC n° 91 de 11 de maio de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA, 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.

Do ponto de vista da Saúde Pública, o aspecto mais relevante da embalagem é o de conservação dos alimentos, protegendo-os contra agentes externos e da manipulação inadequada. (BARROS, 2010). Outra função de destaque das embalagens é a de informar o consumidor sobre características do produto (GERMANO; GERMANO, 2001).

Contudo, alimentos embalados incorretamente podem deteriorar-se e se contaminar, bem como incorporar aos produtos elementos nocivos à saúde

(BARROS, 2010). Através da adequação da embalagem ao produto é possível minimizar as alterações indesejáveis, aumentando a estabilidade do alimento. Porém, em função do tempo de contato entre o produto e a embalagem, ainda assim, podem ocorrer interações entre o alimento e sua embalagem (CORSO, 2007).

As embalagens plásticas são as que mais interagem com os alimentos, tanto diretamente, através da migração de monômeros e aditivos para o alimento, quanto indiretamente, através de interações entre o alimento e o ambiente, permitidas pela permeabilidade da embalagem (CORSO, 2007). Os plásticos utilizados em embalagens são polímeros de elevado peso molecular, sendo relativamente reduzidas as quantidades de resíduos dos polímeros encontradas em alimentos. Porém, plásticos são polímeros aos quais podem ter sido adicionados aditivos ou outras substâncias (UE, 2011), tais como substâncias de baixo peso molecular que podem representar um risco em potencial à saúde do homem (COULTATE, 2004).

Assim, a possibilidade de que ocorra contaminação do produto por constituintes da própria embalagem não pode ser negligenciada (MELO, 2007).

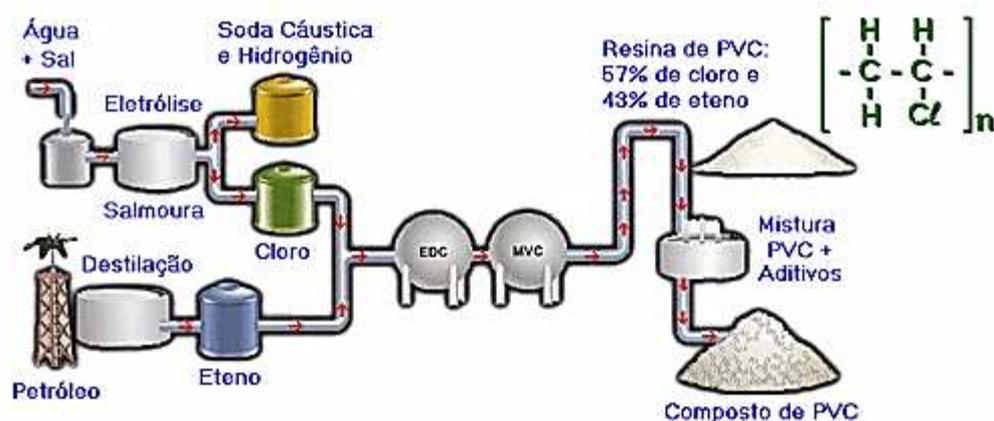
1.2 POLI (CLORETO DE VINILA)

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 físico 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 a solução de 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 - EDC, responsável pela obtenção do MVC. As moléculas de MVC são submetidas ao processo de polimerização para formação do PVC (INSTITUTO DO

PVC, [2013]). A Figura 2 apresenta o processo de síntese da resina de PVC e adição de aditivos.

Figura 2. Síntese da resina de PVC e adição de aditivos



Fonte: (INSTITUTO DO PVC, [2013])

Nos últimos anos tem ocorrido um rápido crescimento no desenvolvimento e aplicação de compostos polímeros como matrizes termoplásticas. Este movimento se deve à facilidade de conformação e fabricação do polímero, à possibilidade de obtenção de produtos leves em relação aos materiais tradicionais, e ainda à 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% foram utilizadas na fabricação de embalagens (INSTITUTO DO PVC, [2010]). Em 2013, a demanda brasileira por PVC foi de 1,3 milhão de toneladas, sendo 12% superior à demanda do ano anterior (BRASKEM, 2013).

O PVC é considerado um dos polímeros mais versáteis devido sua possibilidade de 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 no segmento de embalagem, na forma de filme flexível de PVC, para o acondicionamento de alimentos *in natura*, tais como carnes, frango e frutas. Tais filmes são utilizados em supermercados e vendidos para uso doméstico (SARANTÓPOULOS et al., 2002). Porém, para que seja possível esta utilização é necessária a adição de plastificantes (BARROS et al., 2011).

1.3 ADITIVOS PLASTIFICANTES

Plastificantes são substâncias orgânicas sintéticas de baixo peso molecular, adicionadas à resina do polímero para aumentar sua flexibilidade e a resistência do produto final, facilitando a produção e a processabilidade do polímero (SOUZA et al., 2012).

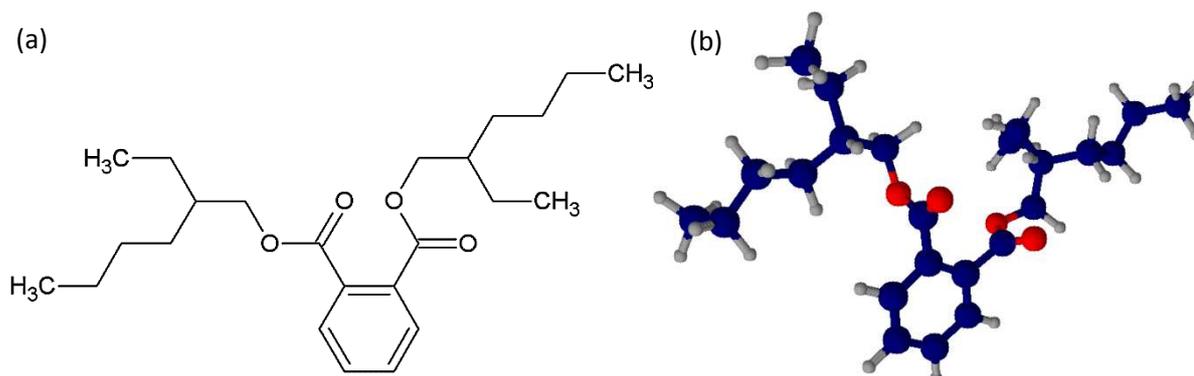
O PVC é um dos polímeros mais frequentemente plastificados (RAHMAN; BRAZEL, 2004). O PVC tem uma cadeia polihalogenada com átomos de cloro covalentemente ligados a átomos de carbono, proporcionando, assim, muitos pontos de interação dipolar ao longo da sua cadeia, que dão origem a interações fortes entre cadeias e conseqüente 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 possibilita a utilização do PVC em diversas aplicações, entre elas dispositivos médicos, material para embalagem e ainda produtos infantis (VINHAS et al., 2003).

Existem diversas substâncias químicas que podem ser utilizadas como plastificantes de PVC. De maneira geral, os plastificantes com maior importância comercial, são líquidos inodoros, incolores, insolúveis em água e de baixa volatilidade, sendo em sua grande maioria ésteres ou poliésteres (COLTRO; PITTA; MADALENO, 2013; BRASKEM, 2006).

Os ftalatos têm, mundialmente, um papel importante na indústria do plástico e da borracha, representando mais de 80% de todos os plastificantes utilizados no PVC. O ftalato de di-(2-etil-hexila) – DEHP representa pelo menos 60% desse montante (COLTRO; PITTA; MADALENO, 2013). O sucesso dos ftalatos pode ser associado à melhor relação entre custo e benefício, oferecida por sua utilização, e a uma gama de propriedades satisfatórias na área de embalagens de alimentos, principalmente na conservação e praticidade (BARROS, 2010).

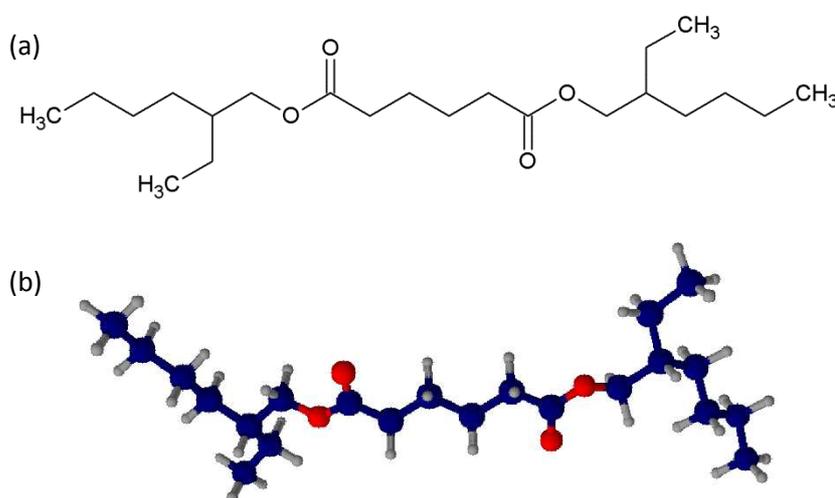
Dentre os plastificantes utilizados no PVC estão o DEHP e o adipato de di-(2-etil-hexila) – DEHA (BRASIL, 2008). O DEHP e o DEHA estão entre os plastificantes mais utilizados em filmes flexíveis de PVC (ALVES, 2009; COULTATE, 2004). As Figuras 3 e 4 mostram as estruturas dos plastificantes DEHP e DEHA, respectivamente.

Figura 3. Estruturas bidimensional (a) e tridimensional (b) do ftalato de di-(2-etil-hexila)



Fonte: (RSC, 2014a; NIST, 2011a)

Figura 4. Estruturas bidimensional (a) e tridimensional (b) do adipato de di-(2-etil-hexila)



Fonte: (RSC, 2014b; NIST, 2011b)

Como os plastificantes não são quimicamente ligados ao plástico, eles representam uma fonte de riscos à saúde do consumidor e de contaminação pela simples difusão para os meios ou fluidos em contato (CHANG; LIN; CHANG, 2012).

Tais aditivos normalmente possuem uma elevada mobilidade devido ao peso molecular relativamente baixo e facilmente se difundem para os meios em contato. Alguns estudos vêm tratando da contaminação de alimentos em contato com filmes flexíveis de PVC por plastificantes, com destaque para a presença de DEHP e DEHA (BARROS, 2010; BARROS et al., 2011; BAZILIO, 2012).

1.4 EFEITOS TOXICOLÓGICOS DE ADITIVOS PLASTIFICANTES

Os ftalatos de baixo peso molecular, tais como o ftalato de butil-benzila - BBP, o ftalato de di-(iso-butila) - DIBP, o ftalato de di-(iso-hexila) - DIHP e o DEHP, são tratados levando-se em consideração o conceito da precaução, sendo sua utilização limitada em alguns produtos. Por outro lado, ftalatos de peso molecular elevado, tais como ftalato de di-(iso-nonila) - DINP e ftalato de di-(iso-dodecila) - DIDP não têm quaisquer restrições para utilização (MARCILLA; GARCÍA, GÁRCIA-QUESADA, 2004).

São observados diversos efeitos tóxicos para a saúde humana devido à exposição a doses elevadas de DEHP, tais como a possibilidade de desempenhar um papel de desregulador do sistema endócrino, alterando os níveis de testosterona e estradiol (CHANG; LIN; CHANG, 2012). O DEHP tem sido associado a danos ao sistema reprodutivo (KAVLOCK et al., 2002), e efeitos na indução de hepatocarcinomas em ratos F-344 e camundongos B6C3F1 de ambos os sexos (HHS, 1982). Aproximadamente 95 % do DEHP produzido é utilizado como plastificante na resina de PVC para fabricação de produtos flexíveis. Tais produtos possuem geralmente 1 a 40 % de DEHP, porém é reportada a utilização do plastificante em níveis acima de 80 % em alguns produtos médicos (HHS, 2011).

Dentre as principais causas de contaminação por DEHP estão a ingestão de água ou de alimentos contaminados e por via inalatória. Assim, a maior parte da absorção do DEHP ocorre a partir do intestino e pulmões (ASTDR, 2002). O DEHP é rapidamente absorvido e distribuído pelo corpo, porém não existem evidências de acúmulo no organismo. O metabolismo do DEHP envolve diversas vias e produz uma grande variedade de metabolitos. A principal etapa de metabolização do DEHP é a hidrólise por lipases inespecíficas para ftalato de mono-(2-etil-hexila) - MEHP, e 2-etil-hexanol (CHOI et al., 2013; IHCP, 2008). Uma vez absorvidos, os compostos são transportados para o fígado, rins, testículos e outros tecidos, e pequenas quantidades

podem ficar armazenadas no tecido adiposo e ainda podem ser excretadas no leite materno. O MEHP é metabolizado através de numerosas reações de oxidação, resultando na formação de 30 ou mais metabólitos, alguns dos quais podem ser conjugados com ácido glucurônico para excreção. O restante do MEHP é excretado diretamente na urina. O 2-etil-hexanol é oxidado, via 2-etil-hexanal, produzindo principalmente o ácido 2-etil-hexanóico, além de diversos ácidos cetônicos derivados, que são excretados na urina. A maior parte do DEHP, MEHP, e 2-etil-hexanol é eliminada dentro de 24 horas através da urina e fezes (ASTDR, 2002).

Os possíveis efeitos genotóxicos do DEHP foram exaustivamente investigados em vários estudos de curto prazo. Os principais metabólitos do DEHP, MEHP e 2-etil-hexanol, também foram examinados. Os resultados foram negativos na maioria dos testes *in vitro* e *in vivo* com o DEHP, MEHP e 2-etil-hexanol para detecção de mutações gênicas, danos ao DNA, e efeitos cromossômicos (EC, 2008). Contudo, diversos estudos recentes em humanos e células primárias de mamífero apresentaram em testes de exposição *in vitro* ao DEHP ou seu principal metabólito, MEHP, quebra de fita de DNA, detectável nos ensaios Cometa, ou indução de transformação celular (IARC, 2012). Considerados em conjunto, todos os resultados negativos e positivos, o DEHP e os seus metabólitos são considerados substâncias não mutagênicas (EC, 2008; US.EPA, 2012a).

Estudos de toxicidade indicam uma baixa toxicidade aguda do DEHP, sendo a dose letal média (DL₅₀) oral maior que 20000 mg kg⁻¹ de peso corpóreo em ratos F-344 de ambos os sexos e maior que 9860 mg kg⁻¹ de peso corpóreo em camundongos ICR/SIM machos (EC, 2008). Contudo, na década de 80, com a realização de testes de carcinogenicidade a longo prazo, observou-se que sua administração oral poderia causar tumores no fígado de ratos e camundongos de ambos os sexos. Atualmente, as avaliações de risco de câncer têm sido conduzidas por um número crescente de diferentes instituições reguladoras (GERMANO; GERMANO, 2001).

Em um estudo de toxicidade subcrônica por via oral (faixa testada: 0, 5, 50, 500 e 5000 ppm de DEHP na dieta), o nível de não observação de efeito adverso – NOAEL para o DEHP foi de 50 ppm, correspondente a 3,7 mg kg⁻¹ por dia para ratos Sprague-Dawley machos e 4,2 mg kg⁻¹ por dia para ratos Sprague-Dawley fêmeas. A menor dose onde se observa efeito adverso foi na mais alta dose testada de 5000 ppm, o que corresponde a 375,2 mg kg⁻¹ por dia para ratos Sprague-Dawley machos e 419,3 mg kg⁻¹ por dia para ratos Sprague-Dawley fêmeas, sendo observado aumento do

fígado relacionado à dose em ambos os sexos (POON et al. 1997). O NOAEL refere-se à maior dose de uma substância que não provoca alteração adversa detectável na morfologia, capacidade funcional, crescimento, desenvolvimento, ou vida útil do organismo alvo sob condições definidas (IUPAC, 2014).

A dose de referência – RfD por via oral para o DEHP é de $0,02 \text{ mg kg}^{-1}$ por dia e a LOAEL é de 19 mg kg^{-1} por dia. Os valores foram definidos com base no aumento do peso do fígado em um bioensaio oral subcrônico a crônico em cobaias (U.S.EPA, 2000). A RfD é uma estimativa de exposição diária à população humana em que é provável não haver risco apreciável de efeitos nocivos à saúde durante toda a vida. A LOAEL refere-se à menor dose de uma substância que provoca uma alteração adversa de morfologia, capacidade funcional, crescimento, desenvolvimento, ou no tempo de vida de um organismo alvo distinguíveis de organismos normais (controle) da mesma espécie sob condições definidas de exposição (IUPAC, 2014).

Com base nos resultados apresentados por um estudo de exposição oral crônica, com ratos Fischer-344 de ambos os sexos, foi definido um nível de risco mínimo – MRL de $0,06 \text{ mg kg}^{-1}$ por dia, baseado na NOAEL, em relação à patologia testicular em ratos (DAVID et al., 2000; ASTDR, 2002). O MRL é uma estimativa da exposição humana diária a uma substância perigosa, que é provavelmente destituída de risco significativo de efeitos adversos não-carcinogênicos à saúde, durante um período específico de exposição (ATSDR, 2013).

Thiess e Fleig (1978) apresentam um estudo de mortalidade com 221 trabalhadores de uma fábrica de produção de DEHP na Alemanha, expostos a concentrações desconhecidas de DEHP durante 3 meses a 24 anos, entre os anos de 1940 e 1976. Foram relatadas oito mortes durante o período de acompanhamento, sendo um caso de carcinoma pancreático e um de papiloma de uretra e bexiga, ocorridos em trabalhadores com tempo de exposição superior a 20 anos (THIESS; FLEIG, 1978).

López-Carrillo e colaboradores (2010) relatam um estudo de caso conduzido no México para avaliação da relação entre os níveis de metabólitos de ftalato encontrados na urina e o câncer de mama. Entre 2007 e 2008, foram entrevistadas 233 mulheres com câncer de mama e 221 mulheres com idades compatíveis para controle do estudo. Foram coletadas urinas das mulheres, sendo observadas concentrações significativamente maiores dos metabólitos de ftalato nas amostras coletadas das mulheres com câncer de mama. A partir dos resultados deste estudo

de caso, associados a resultados de estudos anteriores, como o apresentado por Thiess e Fleig (1978), e a exposição de trabalhadores das indústrias de plástico a níveis consideravelmente altos de ftalatos a Agência Internacional para Pesquisa em Câncer - IARC elevou o grau de risco à exposição ao DEHP (IARC, 2012) em relação à sua publicação anterior do ano de 2000 (BARROS, 2010). Antes classificado no grupo 3 (não classificável quanto à sua carcinogenicidade para os seres humanos) (BARROS, 2010), o DEHP passou a pertencer ao grupo 2B, sendo considerado um possível agente carcinogênico ao homem (IARC, 2014). A monografia anterior, publicada pela IARC, contemplava o estudo apresentado por Thiess e Fleig (1978), contudo o Grupo de Trabalho da Monografia observou que a maioria dos indivíduos do estudo foram empregados após os níveis de exposição terem sido consideravelmente reduzidos, e que os métodos utilizados para o estudo foram mal descritos.

A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos da América – U.S.EPA classifica o DEHP dentro do grupo toxicológico B2, como um provável carcinógeno humano. A classificação é baseada na observação do aumento da incidência de tumores de fígado relacionado à dose em ratos e camundongos de ambos os sexos, quando expostos oralmente ao DEHP (U.S.EPA, 2012a).

O DEHP está relacionado a danos aos sistemas reprodutores masculino e feminino de ratos Sprague–Dawley. Os efeitos adversos no sistema reprodutor incluem mudanças nos testículos, levando à redução da fertilidade e alterações na produção de espermatozoides em machos (PARK; HABEEBU; KLAASSEN, 2002), e disfunção do ovário em fêmeas (DAVIS; MARONPOT; HEINDEL, 1994).

Em um estudo com adolescentes de ambos os sexos, expostos a quantidades significativas de DEHP quando neonatos, não foram observados efeitos adversos significativos sobre o crescimento físico e maturação puberal. Funções dos rins, da tireoide, do fígado, e das gônadas masculinas e femininas testadas se apresentaram dentro da faixa normal para a idade e distribuição por sexo (RAIS-BAHRAMI et al., 2004).

Foi definido um NOAEL de 4,8 mg kg⁻¹ por dia para toxicidade testicular, com base em um estudo de toxicidade reprodutiva de três gerações por via oral, com ratos machos Sprague-Dawley, mostrando incidência de atrofia testicular mínima a 14 mg kg⁻¹ por dia e completa atrofia e aspermia em doses de 359 mg kg⁻¹ por dia. A toxicidade testicular observada em diferentes espécies de animais e em doses

relativamente baixas é considerada relevante para os seres humanos. Os efeitos sobre a fertilidade têm sido observados em níveis de exposição ligeiramente mais elevados, com um NOAEL de 20 mg kg⁻¹ por dia, observado em camundongos CD-1 de ambos os sexos (IHCP, 2008).

Diante deste cenário, diversas indústrias vêm buscando alternativas a certos ftalatos, seja voluntariamente ou compulsoriamente. De acordo com esta tendência, plastificantes advindos de fontes renováveis, tais como o óleo vegetal modificado, óleo vegetal modificado e epoxidado, mistura de acetatos de glicerina, monoésteres de glicerol, bem como o tereftalato de di-(2-etil-hexila) - DEHT são novas alternativas para aplicações em filmes de PVC (COLTRO; PITTA; MADALENO, 2013). Ftalatos de alto peso molecular, tais como ftalato de di-(iso-nonila) - DINP, ftalato de di-(iso-dodecila) – DIDP e ftalato de di-(2-propil-heptila) - DPHP, vêm sendo utilizados como alternativas no mercado europeu, representando hoje cerca de 85% dos ftalatos produzidos na Europa. A avaliação de risco tem mostrado resultados positivos em relação ao uso seguro deste grupo de ftalatos (ECPI, 2014).

Outro plastificante amplamente utilizado como alternativa aos ftalatos é o DEHA (BARROS et al., 2011; DALGAARD et al., 2003), porém alguns estudos vêm tratando a utilização do mesmo com cautela (SILVA, 2007; BARROS, 2010; BAZILIO, 2012; DALGAARD et al., 2003). A IARC classifica o DEHA dentro do grupo 3, não sendo classificável quanto à sua carcinogenicidade para os seres humanos (IARC, 2000). A U.S.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 aumento da incidência de tumores hepáticos em camundongos fêmeas (U.S.EPA, 2012b). Estudos de genotoxicidade *in vitro*, realizados com o DEHA, apresentaram resultados negativos para mutações, síntese de DNA não programada e efeitos no DNA em sistemas bacterianos e em células de mamífero. Estudos de genotoxicidade *in vivo* também têm apresentado resultados negativos (SILVA, 2007). Assim, com exceção de um ensaio dominante letal positivo, não existe nenhuma evidência de genotoxicidade para o DEHA, no entanto, existem relações estruturais com outros compostos não genotóxicos classificados como prováveis e possíveis carcinogênicos ao homem (U.S.EPA, 2012b).

O metabolismo do DEHA envolve inicialmente uma etapa de hidrólise, onde o plastificante é hidrolisado formando o adipato de mono-(2-etil-hexila) - MEHA e o 2-etil-hexanol. O MEHA é rapidamente metabolizado em ácido adípico e excretado na

urina. O 2-etil-hexanol é conjugado e excretado na urina, contudo alguma fração pode sofrer metabolismo adicional formando o ácido 2-etil-hexanóico, sendo este conjugado e excretado na urina. Quase toda a dose administrada é excretada como metabólitos urinários ou encontrados no ar expirado como dióxido de carbono, dentro de 48 horas após a administração, com uma fração mínima a ser excretado nas fezes (IARC, 2000).

Segundo a U.S.EPA a RfD por via oral para o DEHA é de $0,6 \text{ mg kg}^{-1}$ por dia, o NOAEL de 170 mg kg^{-1} por dia e a LOAEL é de 1080 mg kg^{-1} por dia. Os valores foram definidos com base em um estudo de reprodução com ratos Wistar de ambos os sexos e outro de teratogenicidade com ratos Wistar fêmeas grávidas e sua prole. Os principais efeitos críticos observados foram mudanças no peso corpóreo e do fígado de ratos pais machos e fêmeas, ossificação reduzida e ureteres ligeiramente dilatados nos fetos, redução do ganho de peso da ninhada, redução do peso total da prole e redução do tamanho da prole (U.S.EPA, 2012b).

Segundo Lake e colaboradores (1997), em um estudo comparativo realizado com ratos fêmeas F344 e camundongos fêmeas B6C3F1, foi observado em ambas as espécies aumento do peso do fígado e proliferação de peroxissomas hepáticos, relacionados às doses. As duas espécies foram alimentadas com dietas contendo 0-4,0 % e 0-2,5 % de DEHA, respectivamente, por períodos de 1, 4 e 13 semanas.

Em um estudo conduzido por Dalgaard e colaboradores (2003) com ratos Wistar, a administração por via oral do DEHA provocou o prolongamento do período de gestação na dose de 800 mg kg^{-1} por dia, e um aumento da incidência de morte pós-natal nas doses de 400 e 800 mg kg^{-1} por dia. Houve também uma redução permanente do peso corporal da prole (800 mg kg^{-1} por dia). Assim, foi estimado um valor de NOAEL de 200 mg kg^{-1} .

Em estudo de toxicidade reprodutiva realizado em camundongos machos Swiss Webster expostos *in utero* e durante a lactação, foi observada mortalidade peri- e pós-natal da prole, retardo do desenvolvimento e alterações em parâmetros específicos do sistema reprodutivo masculino de camundongos, em níveis de dose, em que não se observa toxicidade materna evidente (SILVA, 2007).

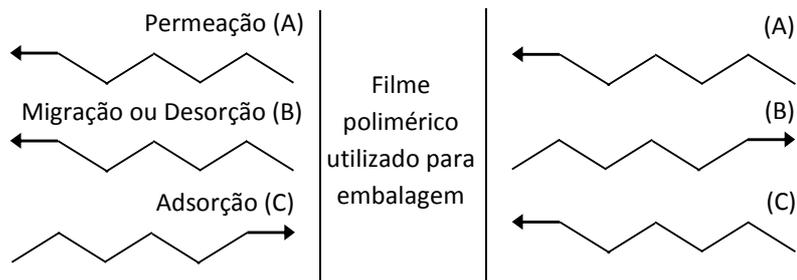
1.5 MIGRAÇÃO

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 aos plastificantes. Isso se deve à 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 n° 91 de 11 de maio de 2001, da ANVISA, define migração como sendo a transferência de componentes do material em contato com alimentos para estes produtos, devido a fenômenos físico-químicos. A migração é dividida entre global e específica, sendo a migração global a quantidade de componentes transferida dos materiais em contato com alimentos ou com seus simulantes, nas condições usuais de emprego, elaboração e armazenamento ou nas condições equivalentes de ensaio. A 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). As substâncias transferidas para o alimento são chamadas de migrantes (CROSBY, 1981).

O fenômeno de transferência de substâncias através do material polimérico pode ocorrer de acordo com três modelos de transferência de massa (Figura 5), sendo estes a permeação, migração ou desorção e adsorção (ABRANTES, 1998; GILBERT; MILTZ; GIANCINI, 1980). Este fenômeno é controlado pelo mecanismo de difusão, sendo esta definida como a transferência de massa resultante de movimentos moleculares naturais e espontâneos que ocorrem sem a ajuda de forças externas (FERNANDES; GARCIA; PADULA, 1987).

Figura 5. Modelos de transferência de massa



Fonte: (GILBERT; MILTZ; GIANCINI,1980)

Dentre os fatores que podem afetar a cinética de difusão, ou migração 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 (CORSO, 2007; ZYGOURA et al., 2005). A transferência de substâncias da embalagem para alimentos depende do coeficiente de difusão da substância no polímero e da razão entre a concentração da substância na embalagem e no alimento, quando em equilíbrio, determinada pelo coeficiente de partição de Nerst (VOM BRUCK et al., 1979). A difusão ocorre de acordo com a concentração das moléculas nos meios vizinhos, havendo a migração de áreas de alta concentração para áreas de baixa concentração (ABRANTES, 1998). Segundo Castle, Mercer e Gilbert (1988), outro fator que pode determinar a migração de aditivos do polímero para os alimentos é a espessura do filme polimérico. Filmes de PVC com espessuras menores contêm níveis inferiores de plastificantes, ocasionando uma redução na concentração de migração dos mesmos para alimentos em contato.

A contaminação de alimentos por migração de monômeros ou de aditivos é assunto que compete à Vigilância Sanitária (CORSO, 2007). A Resolução nº 17 de 17 de março de 2008, da ANVISA, estabelece limite de migração específica - LME para o DEHP em $1,5 \text{ mg kg}^{-1}$ do alimento ou solvente simulante, sendo este um produto que imita o comportamento de um grupo de alimentos que tem características semelhantes. O limite estabelecido para o DEHA é de 18 mg kg^{-1} (BRASIL, 2008). O LME é a quantidade máxima permitida de uma substância nos alimentos. Este limite deve assegurar que o material em contato com o alimento não representa um risco para a saúde. A conformidade dos materiais e artigos que ainda não estão em contato com os alimentos deve ser avaliada segundo as regras previamente estabelecidas na

legislação. O LME é estabelecido através da convenção de que uma pessoa com peso corporal de 60 kg consome diariamente 1 kg de alimentos, embalados em um recipiente de forma cúbica com 6 dm² de área superficial de liberação da substância (UE, 2011).

Um estudo recente conduzido por Bazilio (2012) aponta para a migração do DEHA, proveniente de embalagens de filme flexível de PVC recolhidas no comércio do estado do Rio de Janeiro, acima do limite máximo permitido. O estudo aponta ainda para a migração do DEHP, em diversas amostras avaliadas. As amostras foram provenientes de diversos estabelecimentos e de marcas e tamanhos variados. O estudo teve como objetivo principal avaliar a migração do adipato de di-(2-etil-hexila) - DEHA, porém foi observada durante os ensaios a presença do DEHP. Do total de 25 amostras ensaiadas, treze apresentaram resultados satisfatórios para a migração específica do DEHA, sendo dez resultados abaixo do limite de detecção do método (0,52 mg.kg⁻¹). Contudo, com a disponibilidade de um método analítico para determinação do DEHP, o quadro se agravaria. Uma vez que foram observados picos cromatográficos referentes ao DEHP em amostras satisfatórias quanto à quantidade de DEHA.

Um estudo conduzido por Barros (2010) aponta para a exposição do consumidor ao DEHP em quantidades excessivamente elevadas, cerca de 1779 vezes maior que o limite estabelecido. O estudo foi conduzido através da análise de filmes de PVC utilizados no comércio para a embalagem de alimentos gordurosos.

1.6 ENSAIO DE MIGRAÇÃO

Os testes usualmente efetuados em embalagens para alimentos são denominados testes de migração, cuja finalidade é avaliar a quantidade de substâncias passíveis de migrar da embalagem para o alimento. O teste de migração simula, na medida do possível, as condições a que a embalagem e o alimento serão submetidos, em função do tipo de alimento, tempo de contato e da temperatura. Devido às dificuldades técnicas, e à complexidade química da maioria dos alimentos, os testes são realizados utilizando-se solventes simulantes, ou simulantes alimentares, que tentam reproduzir o pH, o teor de gordura dos alimentos e sua eventual graduação alcoólica (GERMANO; GERMANO, 2001).

A Resolução nº 51 de 26 de novembro de 2010, da ANVISA, 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, sendo este escolhido com base nas características do alimento relevante ao estudo, e deve estar de acordo com o disposto na Tabela 1.

Tabela 1. Seleção de simulantes para cada tipo de alimento.

Tipo de Alimento	Simulante
Somente alimentos aquosos não ácidos	A
Somente alimentos aquosos ácidos	B
Somente alimentos alcoólicos	C
Somente alimentos gordurosos	D ou D'
Alimentos aquosos não ácidos e alcoólicos	C
Alimentos aquosos ácidos e alcoólicos	B e C
Alimentos aquosos não ácidos contendo gorduras e óleos	A e D ou D'
Alimentos aquosos ácidos contendo gorduras e óleos	B e D ou D'
Alimentos aquosos não ácidos alcoólicos e gordurosos	C e D ou D'
Alimentos aquosos ácidos alcoólicos e gordurosos	B, C e D ou D'
Alimentos secos não gordurosos	Não é necessário realizar o ensaio de migração
Alimentos secos gordurosos	D ou D'

Simulante A (simulante de alimentos aquosos não ácidos, pH > 4,5): água destilada ou desionizada;

Simulante B (simulante de alimentos aquosos ácidos, pH < 4,5): solução de ácido acético a 3% (m/v) em água destilada ou desionizada;

Simulante C (simulante de alimentos alcoólicos): solução de etanol a 10% (v/v) em água destilada ou desionizada, concentração que se ajustará ao conteúdo real de etanol do produto no caso deste superar os 10% (v/v);

Simulante D (simulante de alimentos gordurosos): solução de etanol a 95% (v/v) em água destilada ou desionizada, ou isooctano, ou MPPO (óxido de polifenileno modificado), conforme o caso;

Simulante D' (simulante equivalente ao simulante D): azeites/óleos comestíveis (azeite de oliva, óleo de girassol, óleo de milho) ou misturas sintéticas de triglicerídeos.

Fonte: (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, 2011). Para tempos de contato superiores a 24 h em temperaturas maiores que 20°C e menores que 40°C, quando utilizado etanol 95% como solvente simulante, o ensaio

de migração deve ser realizado à temperatura de 20°C por 48 horas (BRASIL, 2010). O contato entre a embalagem e o solvente simulante deve obedecer a razão de 0,5 a 2,0 cm² mL⁻¹ (BRASIL, 1999).

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 relatados 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. Bazilio (2012) descreve a determinação do DEHA em solvente simulante isooctano por cromatografia a gás com detector por ionização em chama.

Para determinação da concentração do DEHP, Aignasse e colaboradores (1995) e Baram e colaboradores (2000) descrevem método de separação, detecção e quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE com detecção por ultravioleta - UV. Chang, Lin e Chang (2012) descrevem método por CLAE acoplada a um espectrômetro de massas. Fierens e colaboradores (2012) descrevem um método por cromatografia a gás acoplada a um espectrômetro de massas.

Esteves e colaboradores (2007) e Barros (2010) descrevem um método com determinação dos plastificantes DEHA e DEHP por cromatografia a gás com detector por ionização em chama.

1.7 VALIDAÇÃO DO MÉTODO

Um importante aspecto a ser levado em consideração no suporte às ações de vigilância sanitária é a confiabilidade das medições analíticas realizadas pelo laboratório de saúde pública.

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 através do estabelecimento dos 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 análises químicas 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, este 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 mg kg^{-1}). Os parâmetros a serem verificados são: linearidade e faixa de trabalho, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), efeito de matriz, robustez e limites de quantificação e detecção (INMETRO, 2011).

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).

1.7.1 Faixa de trabalho

De acordo com o trabalho a ser desenvolvido, uma faixa de concentração do analito, no qual o método pode ser aplicado, deve ser definida, sendo denominada faixa de trabalho (CARDOSO, 2008). 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).

1.7.2 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., 2012b). 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 através do exame de um gráfico de resíduos produzidos por regressão linear das respostas nas concentrações em uma curva de calibração. 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 propõem 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.

1.7.3 Seletividade

Segundo Vessman e colaboradores (2001) e Bratinova, Raffael e Simoneau (2009), a seletividade de um método analítico é a sua capacidade de quantificar o analito de interesse na presença de outros analitos, matrizes e outros potenciais interferentes. Em um estudo de validação de um método cromatográfico, a seletividade é avaliada através da análise de amostras brancas, seguindo-se todo o procedimento analítico definido. A determinação do analito deve ser garantida na solução final do ensaio, mesmo na presença de possíveis interferentes na matriz da amostra. Para Thompsom, Ellison e Wood (2002), a seletividade do método pode ser observada através da relação entre as inclinações das duas curvas analíticas, preparadas no solvente e na presença de matriz. Assim, a avaliação da seletividade do método é completada com os resultados observados em um ensaio denominado de efeito de matriz, onde é possível observar a interferência de outros analitos, presentes na matriz da amostra, sobre a quantificação do analito de interesse. A espectrometria de massas em conjunto com a separação cromatográfica é também uma importante ferramenta para a identificação de analitos presentes na amostra. A identificação pode ser assegurada pela avaliação simultânea do tempo de retenção do analito, razões massa/carga dos íons (m/z) e informações sobre a abundância dos íons de fragmentação (SANCO, 2014).

1.7.4 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 de matriz for significativo, a linearidade, a tendência e a precisão estarão seriamente comprometidas (INMETRO, 2011).

O processo de preparação dos padrões de calibração pode ser simplificado se eles puderem 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).

1.7.5 Repetibilidade

A repetibilidade é o grau de concordância entre resultados de testes independentes realizados em condições de repetibilidade, 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 repetibilidade é normalmente determinada para circunstâncias específicas que na prática podem ser muito variadas (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, 2011).

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

1.7.6 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, 2011).

1.7.7 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).

1.7.8 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).

1.8 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 (BAZILIO et al., 2012^a; DE LA CRUZ et al., 2010; NIST, 1994). 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 (TOMIĆ; 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.

1.9 JUSTIFICATIVA

A utilização de filmes flexíveis de PVC no acondicionamento de alimentos pode ocasionar problemas relacionados à contaminação destes por substâncias presentes no material polimérico. O DEHP e o DEHA estão entre os principais plastificantes utilizados como aditivos no processo de fabricação do filme, sendo capazes de migrar do material polimérico para o alimento gorduroso em contato. O DEHP tem sido relacionado a danos causados no sistema reprodutivo e efeitos no desenvolvimento de câncer em roedores, sendo classificado pela IARC como um possível agente carcinogênico ao homem - Grupo 2B e provável carcinógeno humano – Grupo B2 pela U.S.EPA. A IARC classifica o DEHA no Grupo 3, não sendo classificável quanto à sua

carcinogenicidade para os seres humanos. Contudo, o DEHA tem sido tratado com cautela por diversos autores, sendo classificado pela U.S.EPA como um possível agente carcinogênico ao homem - Grupo C. A legislação brasileira estabelece limite para a migração específica destes plastificantes, sendo necessário que esteja disponível método analítico validado para o monitoramento da migração específica dos plastificantes. Sendo assim, o método a ser desenvolvido e validado será uma importante ferramenta de suporte para a fiscalização junto à vigilância sanitária, sendo possível, através da determinação da migração específica dos plastificantes proveniente de filmes de PVC, direcionar ações regulatórias e promover uma maior segurança sanitária relacionada dos produtos disponíveis à população.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar a migração específica dos plastificantes ftalato de di-(2-etil-hexila) – DEHP e adipato de di-(2-etil-hexila) – DEHA, presentes em filmes flexíveis de PVC utilizados para o acondicionamento de alimentos gordurosos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Otimizar e validar intralaboratorialmente um método analítico para o ensaio de migração específica dos plastificantes DEHP e DEHA, do filme flexível de PVC para alimentos gordurosos;
- Elaborar um procedimento operacional padrão – POP para o método analítico;
- Estabelecer um método para estimativa da incerteza de medição do método analítico;
- Avaliar a migração específica dos plastificantes DEHP e DEHA, através da análise de amostras de filme flexível de PVC.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 Vidrarias

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 e 100 mL calibrados; pipetas volumétricas de vidro de 20 e 25 mL calibradas; moldes de 0,5 e 1 dm² calibrados.

3.1.2 Gases, padrões e reagentes

Para o preparo das soluções estoque, foram utilizados os padrões de DEHP do fabricante ChemService (West Chester, Estados Unidos) com pureza igual a (99,5 ± 0,5) %, de DEHA do fabricante ChemService (West Chester, Estados Unidos) com pureza igual a (98,1 ± 0,5) %, de ftalato de di-butila – DBP do fabricante Sigma Aldrich (St. Louis, Estados Unidos) com pureza igual a 99 % e de ftalato de di-*n*-octila – DNOP do fabricante Sigma Aldrich (St. Louis, Estados Unidos) com pureza igual a 99,2 %. Foi utilizado como solvente simulante o etanol 95 %, preparado a partir do etanol LiChrosolv do fabricante Merck (Darmstadt, Alemanha) com pureza mínima igual a 99,9 %. O solvente foi utilizado também para preparo das soluções estoque, intermediária e de trabalho, e diluição das amostras. Foram utilizados para a cromatografia a gás os gases especiais (puros) hélio grau 5.0 (analítico) com pureza mínima de 99,999 %, Ar sintético grau 4.7 com pureza mínima de 99,997 % e Hidrogênio grau 5.0 (analítico) com pureza mínima de 99,999 %, todos do fabricante Praxair - White Martins (Danbury, Estados Unidos).

3.1.3 Equipamentos

Foram utilizados para o ensaio de migração e validação do método os seguintes equipamentos: balança analítica do fabricante Sartorius (Goettingen, Alemanha) calibrada, com precisão de 5 casas decimais, modelo R200D; estufa do

fabricante FANEM (Guarulhos, Brasil) modelo 347-CD/2 e faixa de trabalho de -10 a 60°C; termômetro digital do fabricante VWR (Radnor, Estados Unidos) com capacidade de leitura de -35 a 65°C, calibrado; cromatógrafo a gás (CG) do fabricante Shimadzu (Quioto, Japão), modelo GC-2010, com injetor automático modelo AOC-20i+s e detector por ionização em chama (DIC); coluna de sílica fundida recoberta internamente com fase estacionária constituída de 5% fenilmetilsilicone (DB-5) da J&W Scientific (Folsom, Estados Unidos) com dimensões de 30 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro interno x 0,25 µm de espessura de filme interno.

Para identificação das substâncias no ensaio de seletividade foi utilizado o cromatógrafo a gás do fabricante Agilent (Santa Clara, Estados Unidos), modelo 6890N, com injetor automático modelo 7683N e acoplado a um detector seletivo de massas modelo 5973N. Foi utilizada uma coluna de sílica fundida recoberta internamente com fase estacionária constituída de 5% fenilmetilsilicone para espectrometria de massas (DB5-MS) da Agilent (Santa Clara, Estados Unidos) com dimensões de 60 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro interno x 0,25 µm de espessura de filme interno. Foi utilizada a biblioteca de espectros de massas Wiley (Hoboken, Estados Unidos), revisão D.03.00 de Novembro de 2001.

3.1.4 Amostras

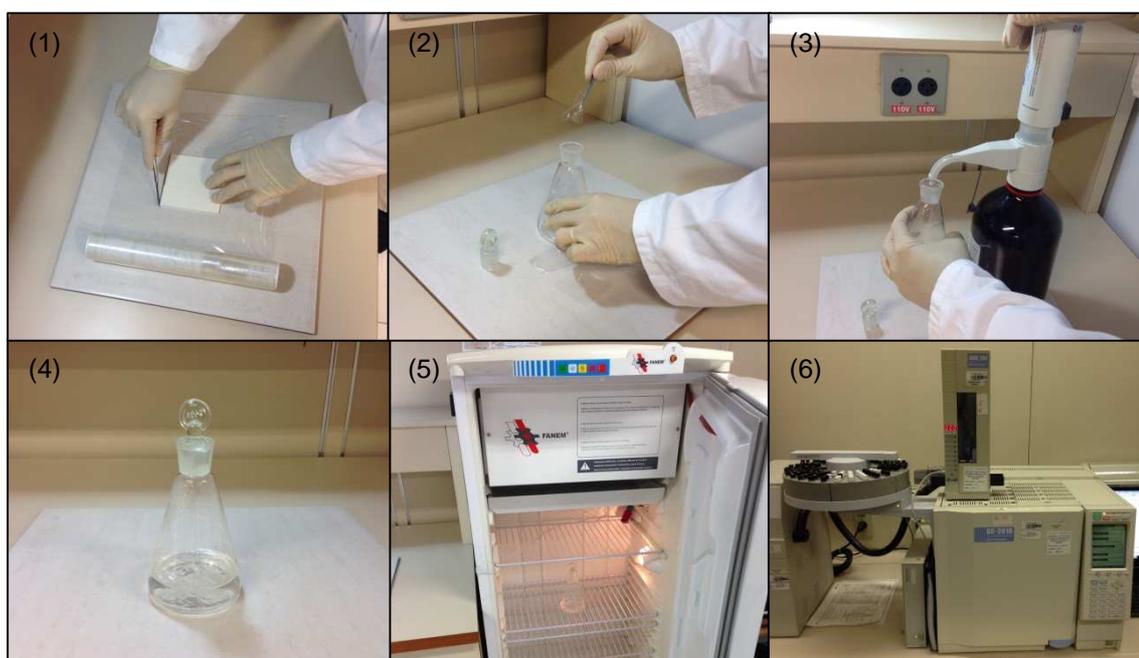
Através do Programa de Monitoramento de Aditivos e Contaminantes – PROMAC, realizado em parceria com a vigilância sanitária do estado do Rio de Janeiro, foram recolhidas amostras de filme flexível de PVC para determinação da migração específica dos plastificantes DEHA e DEHP. Foram recolhidas e analisadas trinta e sete amostras de vinte diferentes marcas disponíveis no mercado, provenientes de diversos supermercados do estado, entre abril de 2012 e setembro de 2013. As amostras foram recebidas no Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – INCQS, da Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, por meio do núcleo técnico de alimentos, e ensaiadas no setor de contaminantes orgânicos.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Ensaio de migração

Para o ensaio de migração foram cortadas, com o auxílio de um molde calibrado, três seções com 1 dm² de área do filme de PVC. Cada seção foi colocada em contato com 100 mL de solvente simulante (etanol 95 %) em um erlenmeyer de vidro de 250 mL com tampa, e acondicionado em estufa a 20 °C durante 48 horas. A Figura 6 apresenta a sequência do ensaio de migração.

Figura 6. Sequência do ensaio de migração



(1) Recorte de 1 dm² do filme flexível de PVC; (2) Transferência da seção recortada para um erlenmeyer de vidro de 250 mL; (3-4) Adição de 100 mL de etanol 95 % (solvente simulante); (5) Acondicionamento em estufa por 48 horas à temperatura de 20 °C; (6) Análise da solução de migração por cromatografia a gás com detecção por ionização em chama.

Após a etapa de migração, foram injetadas alíquotas de 2 µL de cada solução obtidas pelo ensaio de migração, em um cromatógrafo a gás acoplado a um detector por ionização em chama - CG-DIC. A injeção foi realizada em modo “splitless” (sem divisão de fluxo), com um tempo de amostragem de 1 minuto e vazão de purga de 4,0 mL min⁻¹. As temperaturas do injetor e do detector foram de 250 e 320 °C respectivamente. A rampa de temperatura da coluna foi de 150 °C, mantida por 10 minutos, até 300 °C (20 minutos), com acréscimo de 6 °C min⁻¹ e vazão do gás de

arraste hélio de $1,86 \text{ mL min}^{-1}$, com fluxo constante. Quando necessário, as amostras foram diluídas para que suas concentrações estivessem dentro da faixa de trabalho.

O resultado final da migração específica foi reportado através da média das áreas dos picos cromatográficos, referentes a cada plastificante, das três soluções de migração da amostra ensaiada, quantificado por meio de uma curva analítica do analito.

3.2.2 Ensaio preliminar das amostras de filme flexível de PVC

Foi realizado um ensaio de migração preliminar de trinta e sete amostras de filme flexível de PVC para avaliação das substâncias presentes na matriz. Ao fim do ensaio de migração, foram analisadas alíquotas das soluções de migração provenientes de cada amostra, por CG-DIC, como descrito no item 3.2.1. Foi analisada também uma alíquota de uma mistura padrão, contendo os plastificantes DBP, DNOP, DEHA e DEHP com concentrações nominais de 8, 10, 15 e $3,5 \text{ mgkg}^{-1}$, respectivamente. Os tempos de retenção referentes aos picos cromatográficos apresentados para cada solução de migração foram comparados aos tempos de retenção encontrados para os plastificantes presentes na mistura padrão.

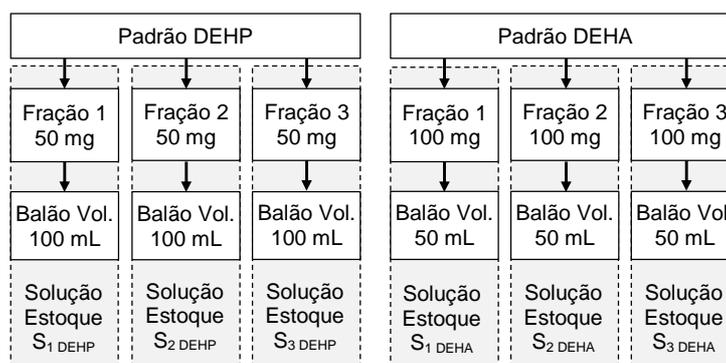
3.2.3 Validação do método

O método foi validado para os plastificantes DEHA e DEHP, principais plastificantes encontrados durante o ensaio preliminar das amostras de filme flexível de PVC. A validação do método foi realizada conforme descrito no procedimento operacional padrão - POP nº 65.3120.126 (INCQS/FIOCRUZ, 2012). O procedimento segue recomendações do documento DOQ-CGCRE-008 (INMETRO, 2011), e dos trabalhos publicados por Thompson, Ellison e Wood (2002), Horwitz e Albert (2006) e Souza (2007). Foram verificados os parâmetros linearidade e faixa de trabalho, seletividade, efeito de matriz, repetibilidade, precisão intermediária, robustez e limites de detecção e quantificação.

3.2.3.1 Desenho experimental da curva analítica

A faixa de trabalho foi definida sendo observado os limites de restrição de 1,5 mg kg⁻¹ de solvente simulante para o DEHP e 18 mg kg⁻¹ para o DEHA. Para o preparo da curva analítica foram preparadas 3 soluções estoque de cada plastificante medindo-se em balança analítica calibrada, 3 frações de cada padrão. Cada fração foi transferida quantitativamente, uma por vez, para um balão volumétrico calibrado, e este foi avolumado à marca com etanol 95 %. Um mesmo balão foi utilizado para o preparo das três soluções do mesmo padrão, sendo lavado e secado entre cada procedimento. A Figura 7 apresenta o fluxograma de preparo das soluções estoque.

Figura 7. Fluxograma de preparo das soluções estoque.



Na Tabela 2 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 2. Preparo das soluções estoque em etanol 95 %

Plastificante	Solução Estoque	Massa de Padrão (mg)	Volume do Balão (mL)	Concentração Final (mg L ⁻¹)
DEHP	S ₁ DEHP	51,4	100,31	509,8
	S ₂ DEHP	51,5	100,31	510,8
	S ₃ DEHP	51,2	100,31	507,9
DEHA	S ₁ DEHA	109,5	50,0252	2147,3
	S ₂ DEHA	109,9	50,0252	2155,2
	S ₃ DEHA	110,2	50,0252	2161,0

Foram preparadas três soluções intermediárias contendo os dois plastificantes, medindo-se com o auxílio de uma pipeta volumétrica calibrada, uma alíquota de volume nominal igual a 25 mL de cada plastificante, transferindo-as para um balão de 100 mL calibrado. Foi utilizada a mesma pipeta volumétrica para medição das três alíquotas do mesmo analito. O volume final da solução foi ajustado à marca com etanol 95 %. O mesmo balão foi utilizado para o preparo das três soluções intermediárias. A Figura 8 apresenta o fluxograma de preparo das soluções intermediárias.

Figura 8. Fluxograma de preparo das soluções intermediárias.



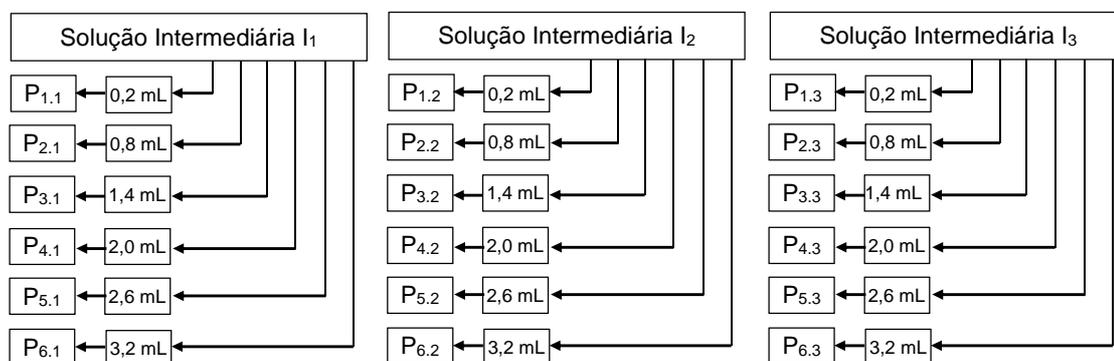
Foram determinadas as concentrações finais dos plastificantes na solução intermediária através das concentrações das soluções estoque e dos volumes reais, presentes em seus respectivos certificados de calibração, das pipetas volumétricas e dos balões volumétricos. A Tabela 3 apresenta os dados do preparo das soluções intermediárias.

Tabela 3. Preparo das soluções intermediárias

Solução Intermediária	Plastificante	Solução Estoque	Alíquota (mL)	Volume do Balão (mL)	Concentração Final (mg L ⁻¹)
I ₁	DEHP	S _{1 DEHP}	25,059	100,08	127,7
	DEHA	S _{1 DEHA}	25,024		536,9
I ₂	DEHP	S _{2 DEHP}	25,059	100,08	127,9
	DEHA	S _{2 DEHA}	25,024		538,9
I ₃	DEHP	S _{3 DEHP}	25,059	100,08	127,2
	DEHA	S _{3 DEHA}	25,024		540,3

Dezoito soluções de trabalho foram preparadas medindo-se volumes apropriados das soluções intermediárias preparadas. A Figura 9 apresenta o fluxo de preparo das soluções de trabalho.

Figura 9. 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, em mg kg^{-1} , através das concentrações das soluções intermediárias e dos volumes reais, presentes em seus respectivos certificados de calibração, da bureta e dos balões volumétricos. As concentrações das soluções padrão em mg kg^{-1} foram determinadas através da densidade do solvente simulante (etanol 95%) de $0,8101 \text{ g mL}^{-1}$ ($20 \text{ }^\circ\text{C}$). A Tabela 4 apresenta os dados do preparo das soluções de trabalho.

Tabela 4. Preparo das soluções de trabalho

Solução de Trabalho	Volume da Aliquota (mL)	Volume Final da Solução (mL)	i	Concentração da Solução de Trabalho (mg L ⁻¹)		Concentração da Solução de Trabalho (mg kg ⁻¹ do solvente), x_i	
				DEHP	DEHA	DEHP	DEHA
P _{1.1}	0,20	50,0034	1	0,511	2,148	0,631	2,652
P _{1.2}	0,20	50,0034	2	0,512	2,155	0,632	2,660
P _{1.3}	0,20	50,0034	3	0,509	2,161	0,628	2,668
P _{2.1}	0,79	49,98	4	2,018	8,487	2,491	10,476
P _{2.2}	0,79	49,98	5	2,022	8,518	2,496	10,515
P _{2.3}	0,79	49,98	6	2,010	8,541	2,481	10,543
P _{3.1}	1,39	50,01	7	3,548	14,923	4,380	18,421
P _{3.2}	1,39	50,01	8	3,555	14,978	4,388	18,489
P _{3.3}	1,39	50,01	9	3,534	15,019	4,362	18,540
P _{4.1}	1,99	49,95	10	5,086	21,391	6,278	26,405
P _{4.2}	1,99	49,95	11	5,096	21,469	6,291	26,502
P _{4.3}	1,99	49,95	12	5,066	21,527	6,254	26,573
P _{5.1}	2,59	50,0917	13	6,601	27,761	8,148	34,269
P _{5.2}	2,59	50,0917	14	6,614	27,863	8,164	34,395
P _{5.3}	2,59	50,0917	15	6,575	27,939	8,116	34,488
P _{6.1}	3,18	49,99	16	8,121	34,154	10,025	42,160
P _{6.2}	3,18	49,99	17	8,137	34,279	10,044	42,315
P _{6.3}	3,18	49,99	18	8,089	34,373	9,985	42,431

Após o preparo das 18 soluções de trabalho, foi analisada uma alíquota de 2 µL de cada solução no CG-DIC, nas condições cromatográficas definidas no item 3.2.1.

3.2.3.2 Avaliação da linearidade da curva analítica

Com os dados obtidos na confecção da curva analítica, para cada analito, os parâmetros de regressão foram estimados com o auxílio da planilha intitulada “Planilha para Avaliação de Premissas” elaborada por Bazilio e colaboradores (2012b). 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).

3.2.3.2.1 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.

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

3.2.3.2.2 Tratamento de valores extremos

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

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

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.

3.2.3.2.3 *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 foi verificada pelo teste Ryan-Joiner (RYAN; JOINER, 1976). A hipótese nula de que os resíduos da regressão seguem a distribuição normal foi testada contra a hipótese alternativa de que os resíduos não seguem a distribuição normal. A hipótese nula é rejeitada quando o coeficiente de correlação de Ryan-Joiner R calculado for menor que o coeficiente de correlação crítico estabelecido (SOUZA, 2007).

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 foram 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,

φ^{-1} = inverso de uma função de distribuição normal padrão.

O coeficiente de correlação R_{eq} entre e_i e q_i foi calculado pela Equação 7

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

onde,

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

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

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

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

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

O coeficiente de correlação R_{eq} foi então comparado com o $R_{crit}(n)$ para um nível de significância α de 0,05, como descrito na Equação 8.

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

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.

3.2.3.2.4 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). Foi testada a hipótese nula H_0 de que as variâncias dos resíduos não diferem entre si (homoscedásticas) contra a hipótese alternativa H_1 de que as variâncias dos resíduos são diferentes (heteroscedásticas). A hipótese nula é rejeitada quando a estatística calculada t_L for maior que o valor crítico $t_{(1-\alpha/2; n_1+n_2-2)}$.

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. Foram 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).

3.2.3.2.5 Teste de independência (autocorrelação dos resíduos)

A autocorrelação ou independência dos resíduos foi verificada através do teste de Durbin-Watson (DURBIN; WATSON, 1951). A hipótese nula H_0 de que não há autocorrelação dos resíduos, sendo os resíduos independentes, foi confrontada com a hipótese alternativa H_1 de que há autocorrelação dos resíduos. A estatística deste teste é a estatística d , definida pela Equação 10.

$$d = \frac{\sum_{i=1}^n (e_i - e_{i-1})^2}{\sum_{i=1}^n e_i^2} . \quad \text{Equação 10}$$

Foram calculados dois limites críticos d_L (limite inferior) e d_U (limite superior). Valores da estatística d entre os dois limites indicam resultado inconclusivo para o teste. Valores de d menores que d_L , indicam autocorrelação e rejeição da hipótese nula com um nível de significância de 2α . Valores de d maiores que d_U indicam independência dos resíduos e não rejeição da hipótese nula. Os limites d_L e d_U para um nível de significância α igual a 0,05 são dados pelas Equações 11 e 12.

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

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

3.2.3.2.6 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 5, avaliada através da estimativa dos parâmetros pelo método dos mínimos quadrados ordinários - MMQO.

Tabela 5. 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 – valor</i>
Regressão	1	$\left[\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \right]^2$	$\frac{SQ_{Re\ gr}}{GL_{Re\ gr}}$	$\frac{QM_{Re\ gr}}{s_{res}^2}$	Distribuição de probabilidade F $DISTF(F_{Re\ gr}; GL_{Re\ gr}; GL_{Residuo})$
Resíduos	<i>n-2</i>	$\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2$	$\frac{SQ_{Res}}{GL_{Res}} = s_{res}^2$		
Desvio da Linearidade	<i>u-2</i>	$\sum_{i=1}^n n_k (\hat{y}_k - \bar{y}_k)^2$	$\frac{SQ_{Desvio}}{GL_{Desvio}}$	$\frac{QM_{Desvio}}{QM_{ErroPuro}}$	Distribuição de probabilidade F $DISTF(F_{Desvio}; GL_{Desvio}; GL_{ErroPuro})$
Entre Níveis	<i>u-1</i>	$\sum_{i=1}^n n_k (\bar{y}_k - \bar{y})^2$			
Erro Puro	<i>n-u</i>	$\sum_{k=1}^u \sum_{j=1}^{n_k} (y_{kj} - \bar{y}_k)^2$	$\frac{SQ_{ErroPuro}}{GL_{ErroPuro}}$		
Total	<i>n-1</i>	$\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2$	$\frac{SQ_{Total}}{GL_{Total}}$		

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

Foi testada a hipótese nula H_0 de que a regressão linear não é significativa, contra a hipótese alternativa H_1 de que a regressão linear é significativa. A hipótese nula é rejeitada quando a probabilidade da estatística calculada (*p – valor*) observada para a regressão for menor que a significância α . Assim, a regressão é considerada significativa quando o *p – valor* estimado for menor que 0,001 para um nível de confiança de 99,9%. Para avaliação do desvio da linearidade, é testada a hipótese nula H_0 de que não há desvio da linearidade, contra a hipótese alternativa H_1 de que os dados não se ajustam ao modelo linear. A hipótese nula é rejeitada quando a

probabilidade da estatística calculada (*p*-valor) observada para a regressão for menor que a significância α . Com isso, o desvio da linearidade é considerado não significativo quando o *p*-valor estimado for maior que 0,05 para um nível de confiança de 95% (DRAPER; SMITH, 1998).

3.2.3.2.7 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,

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

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

3.2.3.3 Seletividade

Para a avaliação da seletividade do método, foram analisadas três repetições de uma amostra de filme flexível de PVC sem a presença dos plastificantes avaliados. Todas as etapas previstas no método de migração foram seguidas. Ao final do ensaio de migração, foram analisadas no CG-DIC uma alíquota de 2 μL de cada repetição. Os cromatogramas foram analisados visualmente quanto à presença de picos cromatográficos no tempo de retenção correspondente aos plastificantes avaliados.

A avaliação da seletividade é completada pelo teste de efeito de matriz. O método é considerado seletivo caso não sejam observados picos cromatográficos nos mesmos tempos de retenção dos plastificantes avaliados, além da capacidade do método de quantificar os analitos de interesse, mesmo na presença da matriz (efeito matriz não observado).

3.2.3.3.1 *Identificação dos plastificantes*

Adicionalmente foi realizada a identificação dos plastificantes DEHA e DEHP em um cromatógrafo a gás acoplado a um detector seletivo de massas – CG-EM, comparando-se os resultados com os obtidos anteriormente na análise no CG-DIC. Foram analisadas, no CG-EM, alíquotas com volume de 1 μL de seis amostras e uma mistura padrão contendo os plastificantes DEHA e DEHP, com concentrações nominais de 10 e 2,5 mg kg^{-1} , respectivamente. A injeção foi realizada no modo “splitless” (sem divisão de fluxo), com um tempo de amostragem de 1 minuto e vazão de purga de 500 mL min^{-1} . A temperatura do injetor foi de 250 $^{\circ}\text{C}$ e a rampa de temperatura da coluna foi de 150 $^{\circ}\text{C}$, mantida por 5 minutos, até 300 $^{\circ}\text{C}$ (25 minutos), com acréscimo de 6 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ e vazão do gás de arraste hélio de 1,9 mL min^{-1} , com fluxo constante. A detecção foi realizada no espectrômetro de massas em modo de varredura com monitoramento de íons com razão massa/carga – m/z entre 100 e 400 daltons.

Os tempos de retenção apresentados pelos plastificantes DEHA e DEHP, quando detectados na amostra, foram comparados com os apresentados na mistura padrão. Diferenças no tempo de retenção de até 0,5 % foram consideradas satisfatórias (UE, 2002).

Para cada plastificante, foram selecionados através dos espectros de fragmentação disponíveis na biblioteca de espectros de massas, os três íons de fragmentação com maior abundância. Para o DEHA, foram selecionados os íons com m/z de 112, 129 e 147, enquanto para o DEHP foram selecionados os íons com m/z de 149, 167 e 279. Para cada plastificante, o íon de maior abundância foi denominado íon de quantificação. As razões entre a área de cada um dos demais íons selecionados (íons de confirmação) e a área do íon de quantificação foram comparadas com as razões determinadas para o plastificante na mistura padrão. As diferenças entre as razões determinadas na amostra e na mistura padrão foram

avaliadas conforme descrito na Tabela 6. Diferenças inferiores às descritas na tabela foram consideradas satisfatórias.

Tabela 6. Tolerância permitida entre as razões dos íons determinadas na amostra e padrão, de acordo com a intensidade relativa.

Razão dos Íons (Íon de Confirmação/ Íon de Quantificação)	Limite de Tolerância para as diferenças entre as razões apresentadas na amostra e no padrão
> 50 %	10 %
> 20 % a 50 %	15 %
> 10 % a 20 %	20 %
≤ 10 %	50 %

fonte: (UE, 2002)

3.2.3.4 *Efeito de matriz*

Souza (2007) descreve um procedimento analítico para avaliação do efeito de matriz, onde uma curva analítica preparada em solvente é comparada com uma curva preparada na presença da matriz da amostra. O efeito de 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 dos plastificantes avaliados. 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 etanol 95 %. Foi organizada uma batelada de amostras com a solução de matriz, 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 definidas no item 3.2.1.

3.2.3.4.1 Avaliação dos resultados

Primeiramente foi avaliada a linearidade da curva analítica preparada na presença da matriz. Uma vez confirmadas as premissas dos resíduos da regressão (normalidade, homoscedasticidade e independência) e as premissas do modelo (significância da regressão e não desvio da linearidade), a curva foi comparada com a curva em solvente, preparada anteriormente. Foi verificada a homogeneidade entre as variâncias dos resíduos das duas curvas através do teste de F (SNEDECOR; COCHRAN, 1989). A hipótese nula H_0 de que as variâncias dos resíduos das duas curvas (solvente e matriz) não diferem entre si foi confrontada com a hipótese alternativa H_1 de que as variâncias dos resíduos são diferentes. A hipótese nula é rejeitada quando a probabilidade da estatística F calculada (p -valor) for menor que a significância $\alpha/2$, para o nível de confiança estabelecido.

A estatística F do teste foi calculada através da Equação 15, com o maior valor de s_{res}^2 no numerador e foi utilizada para estimativa do p -valor. A homoscedasticidade entre as variâncias dos resíduos das duas curvas é observada quando p -valor for maior que a significância $\alpha/2$ de 0,025, para um nível de confiança de 95% e graus de liberdade para as variâncias das curvas iguais a $n_1 - 2$ (numerador) e $n_2 - 2$ (denominador).

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

As curvas foram comparadas através de teste t, confrontando a hipótese nula H_0 de que as inclinações e interseções não diferem entre si (não há efeito de matriz) com a hipótese alternativa H_1 de que as inclinações e interseções são diferentes (há efeito de matriz) (SOUZA, 2007). A hipótese nula de que não há efeito de matriz é rejeitada quando as probabilidades das estatísticas t_a e t_b calculadas (p -valor) são menores que a significância $\alpha/2$, para o nível de confiança estabelecido.

Havendo homoscedasticidade entre as variâncias das duas curvas, as inclinações (Equação 16) e interseções (Equação 17) são comparadas através do teste t com variâncias combinadas. Valores estimados para os p -valores de t_a e t_b

maiores que a significância $\alpha/2$ de 0,025, para um nível de confiança de 95% e $n_1 + n_2 - 4$ graus de liberdade, indicam que não há efeito de matriz. Os índices 1 e 2 diferenciam as curvas preparadas no solvente e na matriz respectivamente.

$$t_b = \frac{|b_1 - b_2|}{\sqrt{\frac{s_p^2}{S_{xx_1}} + \frac{s_p^2}{S_{xx_2}}}}, \quad \text{Equação 16}$$

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

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 não homogêneas. Valores estimados para os *p-valores* de t'_a e t'_b maiores que a significância $\alpha/2$ de 0,025, para um nível de confiança de 95% e ν graus de liberdade (Equação 20), indicam que não há efeito de matriz.

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

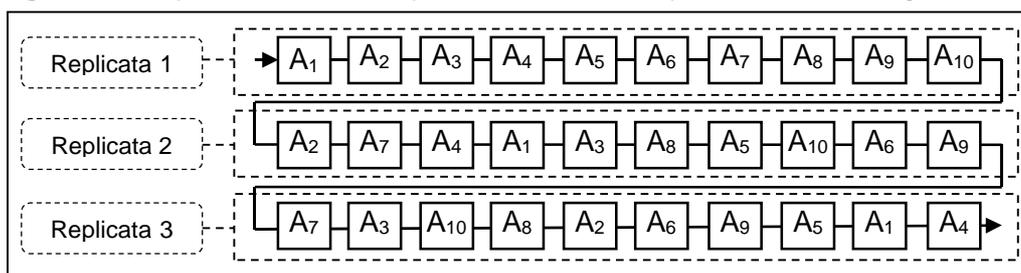
$$t'_a = \frac{|a_1 - a_2|}{\sqrt{\frac{s_{res1}^2 \sum x_1^2}{n_1 S_{xx_1}} + \frac{s_{res2}^2 \sum x_2^2}{n_2 S_{xx_2}}}}, \quad \text{Equação 19}$$

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

3.2.3.5 Repetibilidade

Para a avaliação da homogeneidade da amostra e repetibilidade do método, foi realizado o ensaio de migração de dez repetições genuínas de uma amostra contendo os plastificantes avaliados. 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 analisadas em sequência no CG-DIC nas condições definidas no desenvolvimento do método (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) (ABNT, 2012). A Figura 10 apresenta a sequência de injeção das soluções de migração.

Figura 10. Sequência de análises para os ensaios de repetibilidade e homogeneidade



3.2.3.5.1 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 foram organizadas como apresentado na Figura 11, e a variância das concentrações de cada grupo foi calculada. A homogeneidade da amostra foi testada através da análise de variância (Tabela 7) das concentrações dos grupos (A₁, A₂, A₃, ..., A₁₀) de replicatas das repetições (ABNT, 2012).

Figura 11. 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 7. Análise de variância (ANOVA) para avaliação da homogeneidade da amostra.

<i>FV</i>	<i>SQ</i>	<i>GL</i>	<i>QM</i>	<i>F</i>	<i>p – valor</i>
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 – valor*, probabilidade da estatística calculada; *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 *p – valor* estimado for maior que 0,05 para um nível de confiança de 95%. Se a amostra for considerada heterogênea deve-se repetir o teste com uma nova amostra.

3.2.3.5.2 Avaliação da repetibilidade do método

Para a avaliação da repetibilidade do método foi utilizada a primeira replicata de cada repetição genuína (replicata 1). Segundo Souza (2007), na condução de experimentos sob condições de repetibilidade a precisão é expressa em termos de desvio padrão relativo das concentrações das repetições genuínas ensaiadas. O teste foi 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 foi 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.

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

3.2.3.6 Precisão Intermediária

Em quatro dias diferentes, foram preparadas e analisadas, cinco repetições de uma mesma amostra. Por meio da curva analítica prepara anteriormente em solvente, 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.

$$HorRat_R = \frac{DPR_{precint}}{DPRP_R} . \quad \text{Equação 27}$$

3.2.3.7 Robustez

A avaliação da robustez foi realizada segundo o método de comparação de médias (teste t). Foram escolhidas pequenas variações críticas para o método na verificação da sua robustez. A Tabela 8 apresenta as variações avaliadas.

Tabela 8. Variações avaliadas na verificação da robustez.

Variação	Condição Normal	Condição Variada
Tempo de Migração	48 h	47 h 30 min
		48 h 30 min
Temperatura de Migração	20 °C	18 °C
		22 °C

Uma amostra foi analisada seguindo as condições normais do método. A mesma amostra foi analisada uma vez mais para cada variação escolhida, realizando em cada uma delas a variação correspondente no método. Ao final de cada procedimento, foram analisadas 3 alíquotas de cada solução.

Para cada variação, foi verificada 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. O teste confronta a hipótese nula H_0 de que as variâncias das amostras não diferem entre si contra a hipótese alternativa H_1 de que as variâncias das amostras são diferentes. A hipótese nula é

rejeitada quando a probabilidade da estatística F calculada (p -valor) do teste for menor que a significância $\alpha/2$ para o nível de confiança estabelecido.

A estatística F do teste foi calculada através da Equação 28 e foi utilizada para estimativa do p -valor. A homoscedasticidade é verificada quando p -valor for maior que a significância $\alpha/2$ de 0,025, para um nível de confiança de 95% e graus de liberdade para as variâncias das amostras iguais a $n_1 - 1$ (numerador) e $n_2 - 1$ (denominador).

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

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

Para cada variação, foi avaliada a robustez do método através de teste t para comparação de médias. A avaliação foi realizada comparando-se cada uma das quatro amostras com condição variada com a amostra nas condições normais. A hipótese nula H_0 de que as amostras são estatisticamente iguais (método robusto para a variação) é confrontada com a hipótese alternativa H_1 de que as amostras diferem entre si (método não robusto para a variação). A hipótese nula é rejeitada quando o p -valor calculado para a estatística t do teste for menor que a significância $\alpha/2$ para o nível de confiança estabelecido.

Havendo homoscedasticidade entre as variâncias da amostra avaliada e da amostra nas condições normais, as médias das concentrações são comparadas através do teste t para amostras com variâncias homogêneas. O método é considerado robusto para a variação quando o p -valor calculado para estatística $t_{\text{calculado}}$ do teste (Equação 29) for maior que a significância $\alpha/2$ de 0,025, para um nível de confiança de 95%, com $n - 1$ graus de liberdade.

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

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 não homogêneas. O método é considerado robusto para a variação quando o *p*-valor calculado para estatística t' calculado (Equação 30) for maior que a significância $\alpha/2$ de 0,025, para um nível de confiança de 95%, com ν graus de liberdade, definidos pela Equação 31.

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

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

3.2.4 Incerteza de medição

A incerteza de medição foi estimada através da 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.

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.

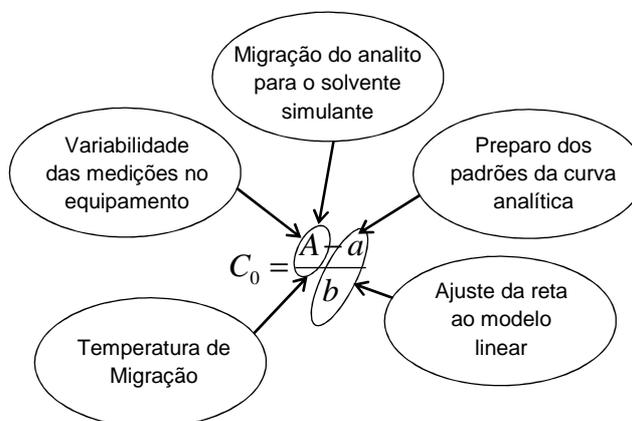
No ensaio de migração estudado o mensurando é representado pela concentração de migração do analito para o solvente simulante. A determinação da concentração de migração foi realizada através da Equação 32 proveniente da equação da curva analítica.

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

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 12 apresenta as fontes de incerteza mais importantes (LEITO; LEITO, 2004).

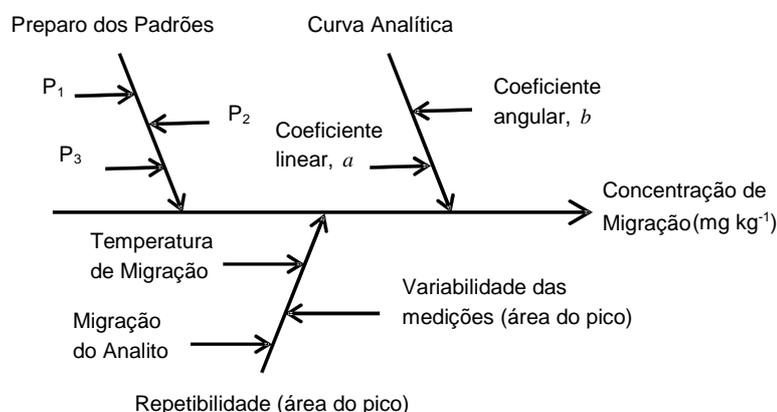
Figura 12. Incertezas de maior importância



Fonte: (Adaptado de LEITO; LEITO, 2004)

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 13 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 13. 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 à repetibilidade do método ($u_{(rep)}$) e a incerteza associada ao preparo dos padrões da curva analítica ($u_{(dil)}$).

3.2.4.1 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 ($u_{(P_1)}$, $u_{(P_2)}$, $u_{(P_3)}$, $u_{(P_4)}$, $u_{(P_5)}$, $u_{(P_6)}$) sendo uma incerteza combinada destas (IPAC, 2007). As incertezas associadas ao preparo de cada padrão $u_{(P_n)}$ foram calculadas através dos coeficientes de sensibilidade de cada variável e suas relações matemáticas como apresentado na Equação 33.

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

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

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

$$u_{(dil)} = \sqrt{\left(\frac{u_{(P_1)}}{C_{P_1}}\right)^2 + \left(\frac{u_{(P_2)}}{C_{P_2}}\right)^2 + \left(\frac{u_{(P_3)}}{C_{P_3}}\right)^2 + \left(\frac{u_{(P_3)}}{C_{P_4}}\right)^2 + \left(\frac{u_{(P_3)}}{C_{P_5}}\right)^2 + \left(\frac{u_{(P_3)}}{C_{P_6}}\right)^2} \quad \text{Equação 34}$$

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.

3.2.4.2 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.

$$u_{(C_0)} = \frac{S_{residual}}{b} \times \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(C_0 - \bar{C})^2}{S_{xx}}} \quad \text{Equação 35}$$

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.

3.2.4.3 Incerteza associada à repetibilidade $u_{(rep)}$

A incerteza associada à repetibilidade 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 repetibilidade 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 repetibilidade foi estimada através da Equação 36 (ÁVILA et al., 2009).

$$u_{(rep)} = \frac{s_{\acute{a}rea}}{\sqrt{p}} \times \frac{1}{b} \quad \text{Equação 36}$$

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.

3.2.4.4 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.

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

3.2.4.5 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 ν_{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).

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

onde,

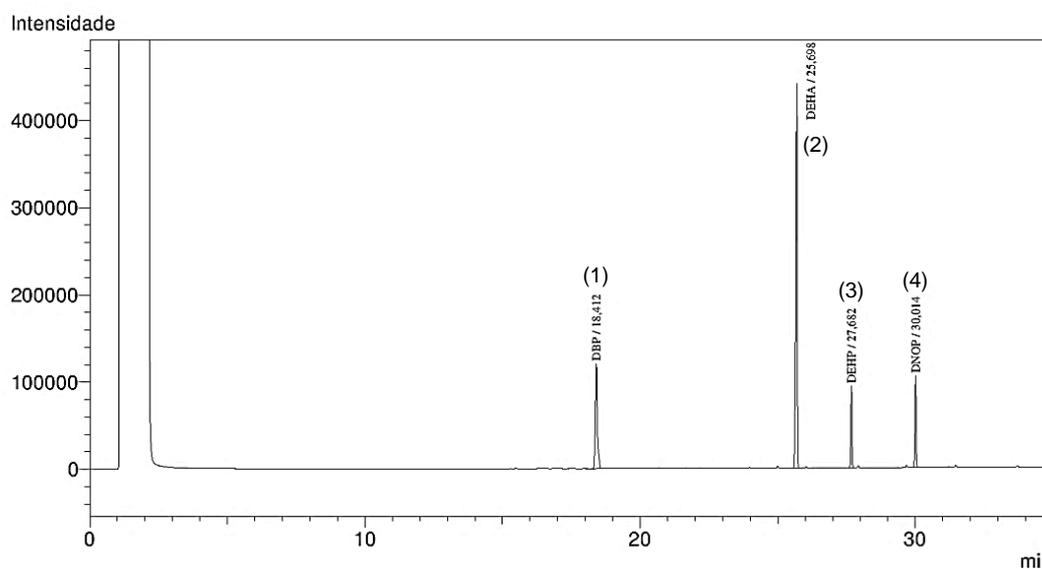
u_c é a incerteza combinada do método; u_i é a incerteza padrão da componente i e ν_i é o número de graus de liberdade da componente i .

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ENSAIO DE MIGRAÇÃO PRELIMINAR

As amostras foram identificadas univocamente com código “AM-XX”, sendo XX um número sequencial de 01 a 37 (AM-01 a AM-37). A Figura 14 apresenta o cromatograma referente à mistura padrão dos plastificantes.

Figura 14. Cromatograma referente à mistura padrão



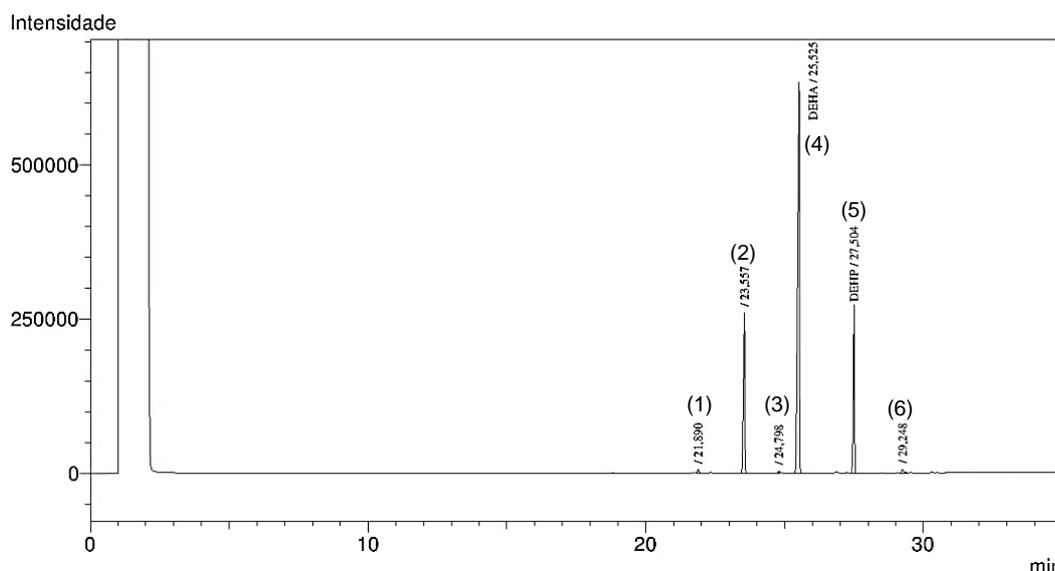
Picos cromatográficos: (1) DBP, 18,412 min, 8 mg kg⁻¹; (2) DEHA, 25,698 min, 15 mg kg⁻¹; (3) DEHP, 27,682 min, 3,5 mg kg⁻¹; (4) DNOP, 30,014 min, 10 mg kg⁻¹; volume de injeção: 2 µL (splitless); temperaturas do injetor e detector (FID): 250 e 320 °C respectivamente; temperatura da coluna (DB5, 5 % fenilmetilsilicone, 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm): 150 °C (10 min) $\xrightarrow{6\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}}$ 300 °C (20 min). Fluxo He: 1,86 mL min⁻¹.

A Tabela 9 apresenta os plastificantes identificados nas soluções provenientes do ensaio de migração das amostras de filme flexível de PVC.

Tabela 9. Presença de plastificantes nas soluções de migração

Amostra	Plastificantes presentes	Amostra	Plastificantes presentes
AM-01	DEHP, DEHA	AM-20	DEHA, DEHP
AM-02	DEHA	AM-21	DEHA, DEHP
AM-03	DEHP	AM-22	DEHA, DEHP
AM-04	DEHA	AM-23	DEHP
AM-05	DEHA	AM-24	DEHP
AM-06	DEHA	AM-25	DEHP
AM-07	DEHA, DEHP, DNOP	AM-26	DEHA, DEHP
AM-08	DEHP	AM-27	DEHA, DEHP
AM-09	DEHP, DNOP	AM-28	DEHA
AM-10	DEHA, DEHP	AM-29	DEHP
AM-11	DEHA, DEHP	AM-30	DEHA, DEHP
AM-12	DEHA, DNOP	AM-31	DEHA, DEHP
AM-13	DEHA, DEHP	AM-32	DEHA
AM-14	DEHA, DEHP	AM-33	DEHP, DNOP
AM-15	DEHP	AM-34	DEHA, DEHP
AM-16	DEHA, DEHP	AM-35	DEHA, DEHP, DNOP
AM-17	DNOP	AM-36	DEHA, DEHP
AM-18	DEHP	AM-37	DEHP
AM-19	DEHA, DEHP, DNOP		

A Figura 15 exemplifica a identificação dos plastificantes DEHA e DEHP na amostra A-31.

Figura 15. Cromatograma referente à amostra A-31

Picos cromatográficos: (1-3,6) não identificados; (4) DEHA, 25,525 min; (5) DEHP, 27,504 min; volume de injeção: 2 μ L (splitless); temperaturas do injetor e detector (FID): 250 e 320 $^{\circ}$ C respectivamente; temperatura da coluna (DB5, 5 % fenilmetilsilicone, 30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m): 150 $^{\circ}$ C (10 min) $\xrightarrow{6^{\circ}\text{C}/\text{min}}$ 300 $^{\circ}$ C (20 min). Fluxo He: 1,86 mL min^{-1} .

Do total de trinta e sete amostras analisadas, vinte e quatro (65%) apresentaram migração específica do DEHA, trinta (81 %) amostras apresentaram migração específica do DEHP e sete (19 %) apresentaram migração específica do DNOP. Nenhuma das amostras analisadas apresentou migração específica do DBP. Em vinte e duas (59 %) amostras, foram observados pelo menos dois dos plastificantes pesquisados.

O DNOP não possui limite de migração específico, sendo estabelecido na legislação teor máximo de 5 % na massa plástica. Sendo assim, o DNOP não foi incluído na validação do método. O DBP não foi observado em nenhuma amostra e assim, também não foi incluído na validação do método.

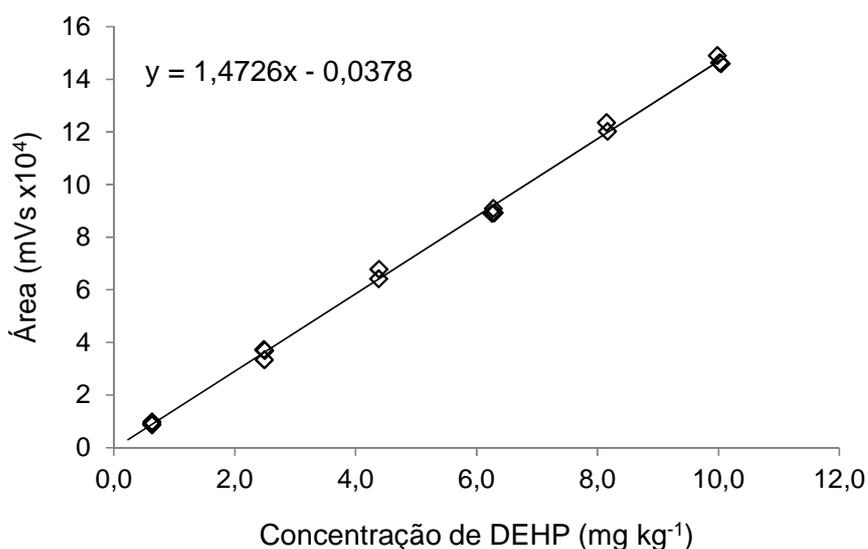
4.2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO

4.2.1 Avaliação da linearidade da curva analítica preparada em solvente

4.2.1.1 Tratamento de valores extremos

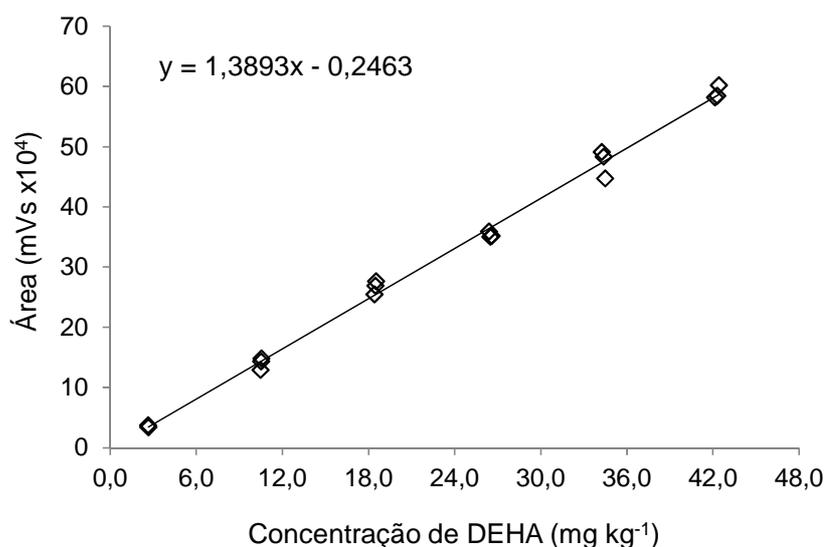
A presença de valores extremos foi avaliada pelo método dos resíduos padronizados Jackknife. Na curva analítica do DEHP, preparada em solvente, as repetições $i = 9$ e 15 foram consideradas extremas e removidas do conjunto de dados. A Figura 16 apresenta a curva analítica final após a remoção dos valores extremos.

Figura 16. Curva analítica final de DEHP em solvente



Na curva analítica do DEHA, preparada em solvente, nenhuma repetição foi removida do conjunto de dados. A Figura 17 apresenta a curva analítica final após a remoção dos valores extremos.

Figura 17. Curva analítica final de DEHA em solvente



4.2.1.2 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 10 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 10. Normalidade dos resíduos da regressão (teste de Ryan-Joiner) - R_{eq} e R_{crit} calculados

	DEHP	DEHA
R_{eq}	0,9831	0,9763
R_{crit} ($\alpha=0,05$)	0,9411	0,9461

R_{eq} , coeficiente de correlação entre e_i e q_i ;

R_{crit} , R crítico.

4.2.1.3 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 11 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, com um nível de confiança de 95%.

Tabela 11. Homoscedasticidade dos resíduos da regressão (teste de Levene) - Resultados Obtidos

Estatística	DEHP		DEHA	
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 1	Grupo 2
n	8	8	9	9
Mediana	$3,38 \times 10^2$	$-1,12 \times 10^3$	$8,03 \times 10^2$	$-1,40 \times 10^3$
dm	$1,13 \times 10^3$	$1,79 \times 10^3$	$6,46 \times 10^3$	$1,16 \times 10^4$
SQD	$1,17 \times 10^7$	$2,08 \times 10^7$	$4,69 \times 10^8$	$6,65 \times 10^8$
s_p^2	$2,33 \times 10^6$		$7,09 \times 10^7$	
t_L	0,858		1,302	
$t_{crítico}$	2,145		2,120	

n , número de observações no grupo; dm , média das diferenças entre cada resíduo e a mediana do seu grupo; SQD , soma dos quadrados dos desvios; s_p^2 , variância combinada; t_L , estatística t calculada; $t_{crítico}$, estatística t tabelada.

4.2.1.4 Teste de independência (autocorrelação dos resíduos)

A autocorrelação dos resíduos foi verificada através do teste de Durbin-Watson. A Tabela 12 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. As Figuras 18 e 19 apresentam graficamente a independência dos resíduos da regressão para as curvas analíticas do DEHP e DEHA, respectivamente.

Tabela 12. Independência dos resíduos da regressão (teste de Durbin-Watson) - Limites d_L e d_U calculados

	DEHP	DEHA
d	2,073	1,780
d_L	1,106	1,157
d_U	1,370	1,391

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

Figura 18. Gráfico de Durbin-Watson ($e_i \times e_{i-1}$), curva de DEHP em solvente

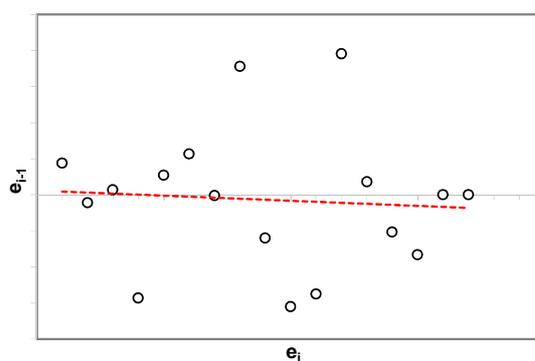
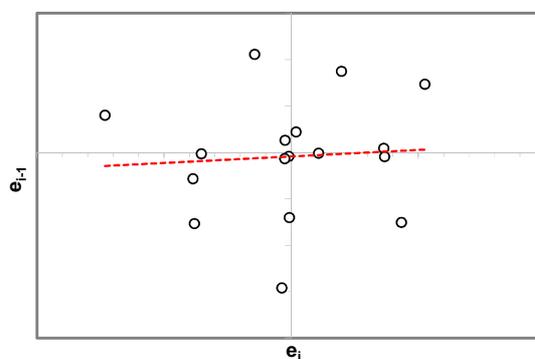


Figura 19. Gráfico de Durbin-Watson ($e_i \times e_{i-1}$), curva de DEHA em solvente



4.2.1.5 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. As Tabelas 13 e 14 apresentam os resultados obtidos para as curvas analíticas de DEHP e DEHA, respectivamente.

Tabela 13. Análise de variância para significância da regressão e do desvio da linearidade (DEHP)

<i>FV</i>	<i>GL</i>	<i>SQ</i>	<i>QM</i>	<i>F</i>	<i>p – valor</i>
Regressão	1	3,83x10 ¹⁰	3,83x10 ¹⁰	8,04x10 ³	1,00x10 ⁻²⁰
Resíduos	14	6,67x10 ⁷	4,76x10 ⁶		
Desvio da Linearidade	4	3,65x10 ⁷	9,12x10 ⁶	3,02	7,13x10 ⁻²
Erro Puro	10	3,02x10 ⁷	3,02x10 ⁶		
Total	15	3,84x10 ¹⁰			

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

Tabela 14. Análise de variância para significância da regressão e do desvio da linearidade (DEHA)

<i>FV</i>	<i>GL</i>	<i>SQ</i>	<i>QM</i>	<i>F</i>	<i>p – valor</i>
Regressão	1	6,39x10 ¹¹	6,39x10 ¹¹	3,61x10 ³	2,80x10 ⁻²⁰
Resíduos	16	2,83x10 ⁹	1,77x10 ⁸		
Desvio da Linearidade	4	1,01x10 ⁹	2,52x10 ⁸	1,67	2,22x10 ⁻¹
Erro Puro	12	1,82x10 ⁹	1,51x10 ⁸		
Total	17	6,41x10 ¹¹			

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

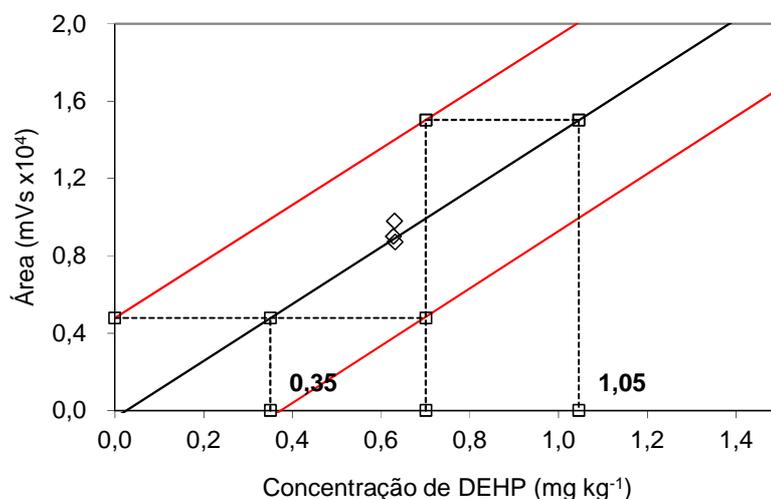
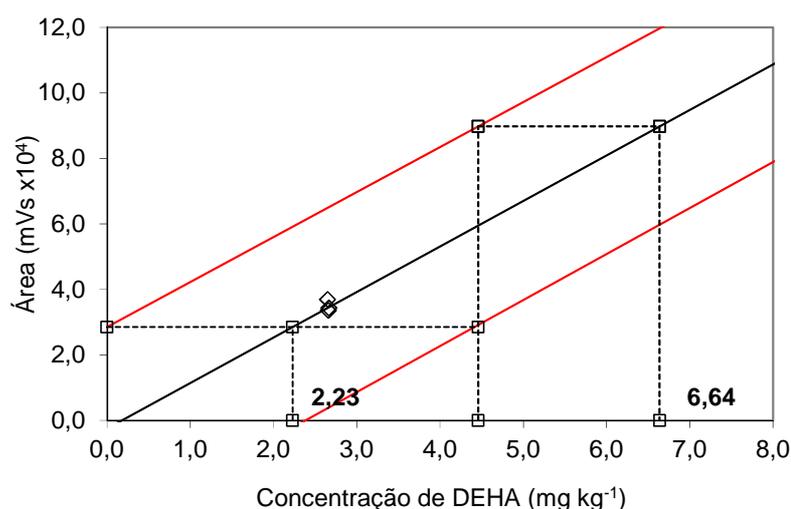
Os valores de *p – valor* observados para a regressão das curvas de DEHP e DEHA foram inferiores a 0,001 indicando que a regressão é significativa, com um nível de confiança de 99,9%. Os valores de *p – valor* observados para o desvio da linearidade das duas curvas foram superiores a 0,05 indicando que a falta de ajuste ao modelo linear não é significativa com um nível de confiança 95%. A linearidade das curvas preparadas, confirma a utilização da faixa de trabalho adotada, sendo esta de 0,6 a 10,0 mg kg⁻¹ para o DEHP e de 2,5 a 40,0 mg kg⁻¹ para o DEHA.

4.2.2 Limites de detecção e quantificação – LOD e LOQ

Os limites de detecção e quantificação foram obtidos por meio das curvas analíticas finais. A Tabela 15 apresenta os limites obtidos e as Figuras 20 e 21 apresentam os intervalos de confiança das retas.

Tabela 15. Limites de detecção e quantificação

Limite	DEHP	DEHA
Limite de Detecção, LOD (mg kg ⁻¹)	0,35	2,23
Limite de Quantificação, LOQ (mg kg ⁻¹)	1,05	6,64

Figura 20. Intervalo de Confiança da Reta (DEHP)**Figura 21.** Intervalo de Confiança da Reta (DEHA)

Para valores de LME superiores a $0,1 \text{ mg kg}^{-1}$, são esperados valores para LOD e LOQ inferiores ou iguais a $1/10$ e $1/5$ do LME, respectivamente (FAO/WHO, 2013). Assim espera-se obter valores para LOQ e LOD inferiores ou iguais a $1,8$ e $3,6 \text{ mg kg}^{-1}$, respectivamente, para o DEHA e inferiores ou iguais a $0,15$ e $0,30 \text{ mg kg}^{-1}$, respectivamente, para o DEHP. Contudo, tais valores representam uma estimativa teórica e devem ser confirmados com estudos práticos. O valor estabelecido para o LOQ do DEHP, por exemplo, é inferior ao limite mínimo da faixa de trabalho ($0,6 \text{ mg kg}^{-1}$), não correspondendo à situação real de quantificação. Segundo o Inmetro (2011), em análises de traços, é possível estabelecer o LOQ como a concentração do primeiro nível da curva analítica. Para Bratinova, Raffael e Simoneau (2009), o valor

estabelecido para o LOD deve ser duas vezes menor que o valor do LOQ. Para Thompson, Ellison e Wood (2002), embora seja importante a determinação destes limites, é preferível que seja utilizada a incerteza de medição para a verificação da confiabilidade do resultado analítico.

Os valores de LOD determinados para os plastificantes, por meio de suas respectivas curvas analíticas, foram inferiores ao primeiro nível de concentração e foram considerados adequados. Os valores de LOQ determinados para os plastificantes encontram-se entre o primeiro e o segundo níveis de concentração, representando uma estimativa coerente com a faixa de trabalho escolhida.

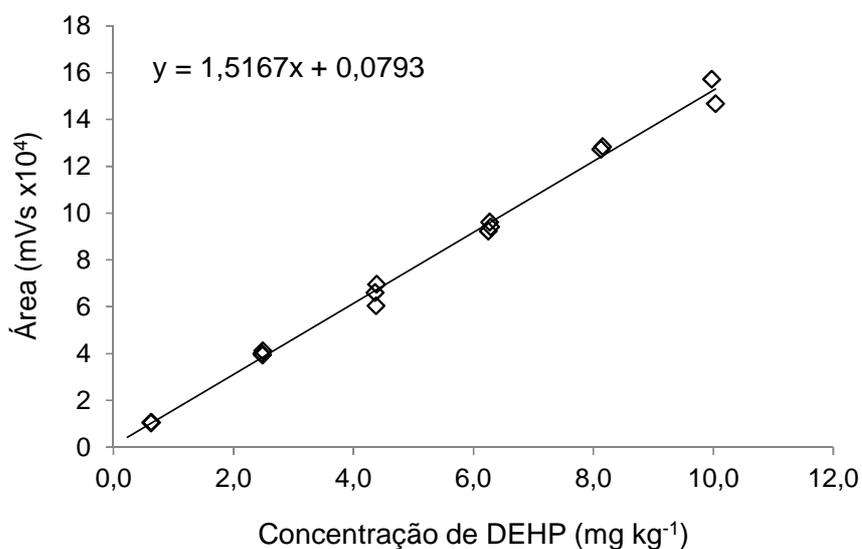
4.2.3 Efeito de matriz e seletividade

4.2.3.1 Avaliação da linearidade da curva preparada na presença da matriz

4.2.3.2 Tratamento de valores extremos

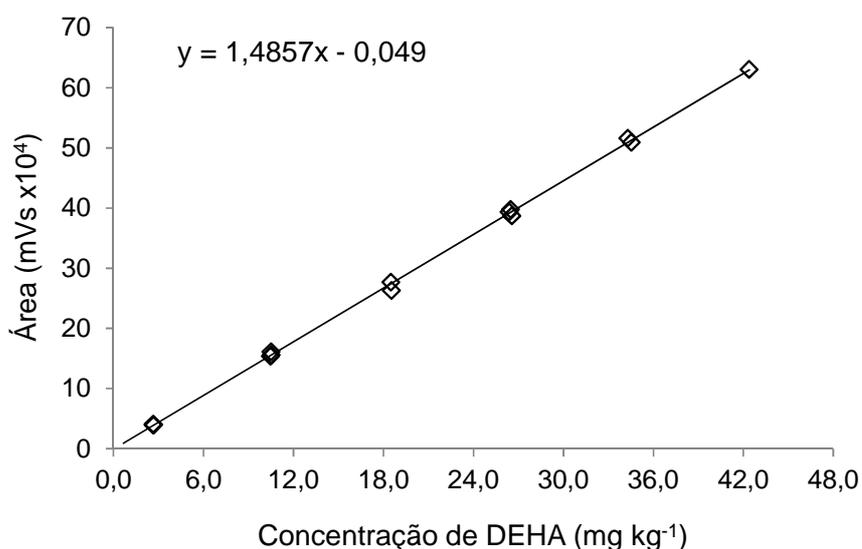
A presença de valores extremos foi avaliada pelo método dos resíduos padronizados Jackknife. Na curva analítica do DEHP, preparada na presença da matriz, as repetições $i = 14$ e 16 foram consideradas extremas e removidas do conjunto de dados. A Figura 22 apresenta a curva analítica final após a remoção dos valores extremos.

Figura 22. Curva analítica final de DEHP em matriz



Na curva analítica do DEHA, preparada na presença da matriz, as repetições $i = 7, 14, 16$ e 17 foram consideradas extremas e removidas do conjunto de dados. A Figura 23 apresenta a curva analítica final após a remoção dos valores extremos.

Figura 23. Curva analítica final de DEHA em matriz



4.2.3.3 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 16 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 16. Normalidade dos resíduos da regressão (teste de Ryan-Joiner) - R_{eq} e R_{crit} calculados

	DEHP	DEHA
R_{eq}	0,9711	0,9484
R_{crit} ($\alpha=0,05$)	0,9411	0,9351

R_{eq} , coeficiente de correlação entre e_i e q_i ; R_{crit} , R crítico.

4.2.3.4 Teste de homoscedasticidade

A homoscedasticidade dos resíduos da regressão foi verificada por meio do teste de Levene (1960), modificado por Brown e Forsythe (1974). A Tabela 17 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, com um nível de confiança de 95%.

Tabela 17. Homoscedasticidade dos resíduos da regressão (teste de Levene) - Resultados Obtidos

Estatística	DEHP		DEHA	
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 1	Grupo 2
n	9	7	8	6
Mediana	$1,25 \times 10^2$	$2,12 \times 10^2$	$4,03 \times 10^2$	$1,48 \times 10^3$
dm	$1,65 \times 10^3$	$3,38 \times 10^3$	$2,97 \times 10^3$	$3,78 \times 10^3$
SQD	$3,82 \times 10^7$	$2,45 \times 10^7$	$1,17 \times 10^8$	$4,91 \times 10^7$
s_p^2	$4,47 \times 10^6$		$1,38 \times 10^7$	
t_L	1,623		0,401	
$t_{crítico}$	2,145		2,179	

n , número de observações no grupo; dm , média das diferenças entre cada resíduo e a mediana do seu grupo; SQD , soma dos quadrados dos desvios; s_p^2 , variância combinada; t_L , estatística t calculada; $t_{crítico}$, estatística t tabelada.

4.2.3.5 Teste de independência (autocorrelação dos resíduos)

A autocorrelação dos resíduos foi verificada por meio do teste de Durbin-Watson. A Tabela 18 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. As Figuras 24 e 25 apresentam graficamente a independência dos resíduos da regressão para as curvas analíticas de DEHP e DEHA, respectivamente.

Tabela 18. Independência dos resíduos da regressão (teste de Durbin-Watson) - Limites d_L e d_U calculados

	DEHP	DEHA
D	2,666	3,010
d_L	1,106	1,046
d_U	1,370	1,349

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

Figura 24. Gráfico de Durbin-Watson (e_i x e_{i-1}), curva de DEHP em matriz

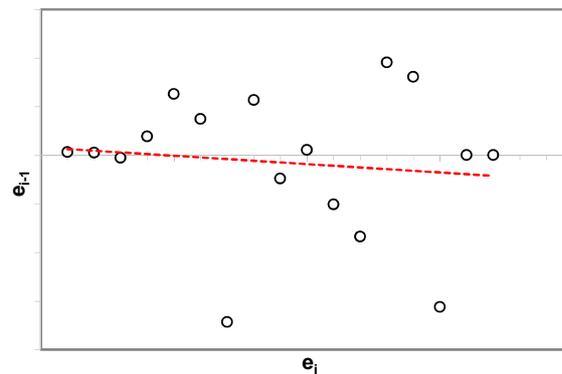
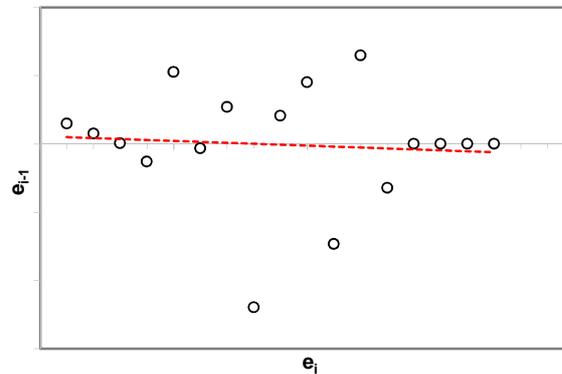


Figura 25. Gráfico de Durbin-Watson (e_i x e_{i-1}), curva de DEHA em matriz



4.2.3.6 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. As Tabelas 19 e 20 apresentam os resultados obtidos para as curvas analíticas de DEHP e DEHA, respectivamente.

Tabela 19. Análise de variância para significância da regressão e do desvio da linearidade (DEHP)

<i>FV</i>	<i>GL</i>	<i>SQ</i>	<i>QM</i>	<i>F</i>	<i>p – valor</i>
Regressão	1	3,49x10 ¹⁰	3,49x10 ¹⁰	2,93x10 ³	1,17x10 ⁻¹⁷
Resíduos	14	1,67x10 ⁸	1,19x10 ⁷		
Desvio da Linearidade	4	5,94x10 ⁷	1,49x10 ⁷	1,38	3,08x10 ⁻¹
Erro Puro	10	1,08x10 ⁸	1,08x10 ⁷		
Total	15	3,51x10 ¹⁰			

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

Tabela 20. Análise de variância para significância da regressão e do desvio da linearidade (DEHA)

<i>FV</i>	<i>GL</i>	<i>SQ</i>	<i>QM</i>	<i>F</i>	<i>p – valor</i>
Regressão	1	4,87x10 ¹¹	4,87x10 ¹¹	1,86x10 ⁴	1,64x10 ⁻²⁰
Resíduos	12	3,15x10 ⁸	2,62x10 ⁷		
Desvio da Linearidade	4	1,10x10 ⁸	2,74x10 ⁷	1,07	4,32x10 ⁻¹
Erro Puro	8	2,05x10 ⁸	2,57x10 ⁷		
Total	13	4,88x10 ¹¹			

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

Os valores de *p – valor* observados para a regressão das curvas de DEHP e DEHA foram inferiores a 0,001 indicando que a regressão é significativa, com um nível de confiança de 99,9%. Os valores de *p – valor* observados para o desvio da linearidade das duas curvas foram superiores a 0,05 indicando que a falta de ajuste ao modelo linear não é significativa, com um nível de confiança de 95%.

4.2.3.7 Avaliação do efeito de matriz

A homoscedasticidade entre as variâncias dos resíduos das duas curvas foi verificada através do teste F (SNEDECOR; COCHRAN, 1989). A Tabela 21 apresenta as variâncias de cada curva (solvente e matriz), preparadas para o DEHP e o DEHA, e as estatísticas *F*.

Tabela 21. Avaliação da homoscedasticidade entre as variâncias dos resíduos das duas curvas

Teste F	DEHP	DEHA
$S^2_{res\ Solvente}$	$4,45 \times 10^6$	$1,66 \times 10^8$
$S^2_{res\ Matriz}$	$1,11 \times 10^7$	$1,11 \times 10^8$
$n_{Solvente}$	16	18
n_{Matriz}	16	15
$F_{calculado}$	2,505	1,492
$p\text{-valor}$	0,048	0,236

S^2_{res} , variância dos resíduos da curva; n , número de pontos da curva analítica; $p\text{-valor}$, probabilidade da estatística calculada.

Sendo as variâncias das curvas analíticas dos dois plastificantes consideradas homoscedásticas, com um nível de confiança de 95%, as suas inclinações e interseções foram comparadas através do teste t com variâncias combinadas. A Tabela 22 apresenta os resultados das estatísticas t_b e t_a para as curvas analíticas do DEHP e DEHA. As Figuras 26 e 27 apresentam a comparação entre as curvas analíticas preparadas na presença do solvente e da matriz para os plastificantes DEHP e DEHA, respectivamente.

Tabela 22. Comparação das inclinações e interseções das curvas

Teste T	DEHP	DEHA
t_b	1,425	1,854
t_a	0,637	0,582
GL	28	29
$p\text{-valor}(t_b)$	0,165	0,074
$p\text{-valor}(t_a)$	0,529	0,565

t_b , valor de t calculado para a inclinação; t_a , valor de t calculado para a interseção; GL , graus de liberdade; $p\text{-valor}$, probabilidade da estatística calculada.

Figura 26. Comparação entre as curvas analíticas preparadas na presença do solvente (azul) e da matriz (vermelho) para o DEHP

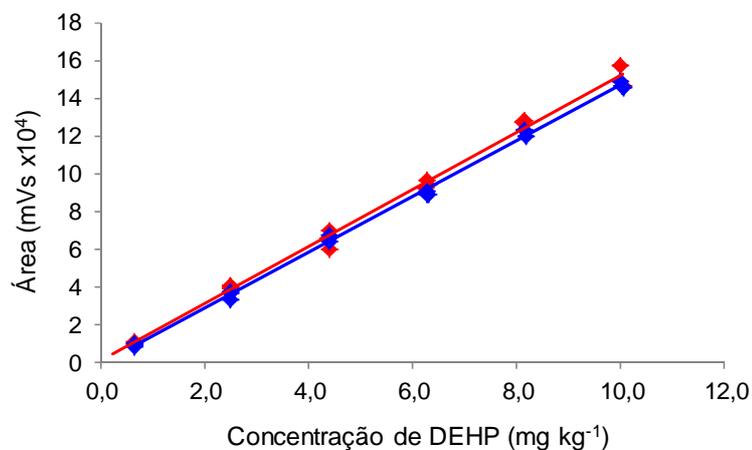
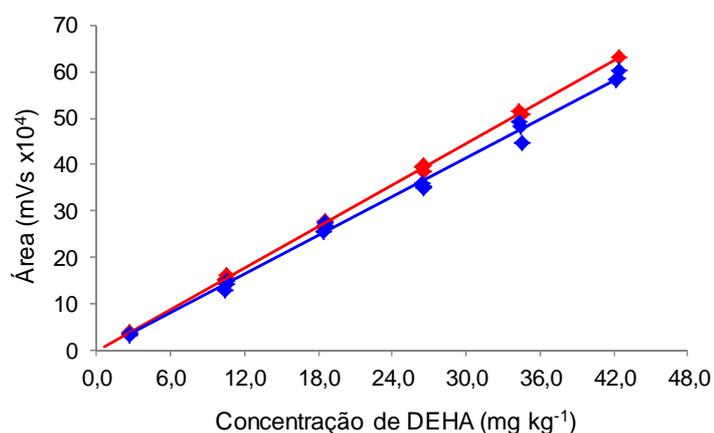


Figura 27. Comparação entre as curvas analíticas preparadas na presença do solvente (azul) e da matriz (vermelho) para o DEHA

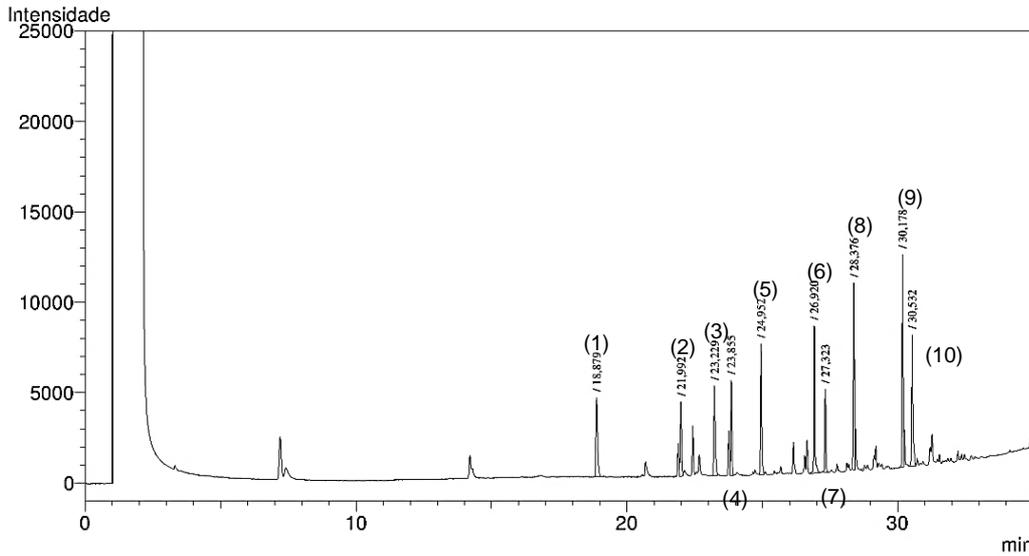


Os resultados dos testes permitem afirmar que o método não apresenta efeito de matriz, para os dois plastificantes, pois as curvas analíticas preparadas no solvente e na presença da matriz se equivalem, com um nível de confiança de 95%. Adicionalmente conclui-se que a matriz não apresenta interferência significativa na quantificação dos analitos de interesse.

4.2.3.8 Avaliação da seletividade

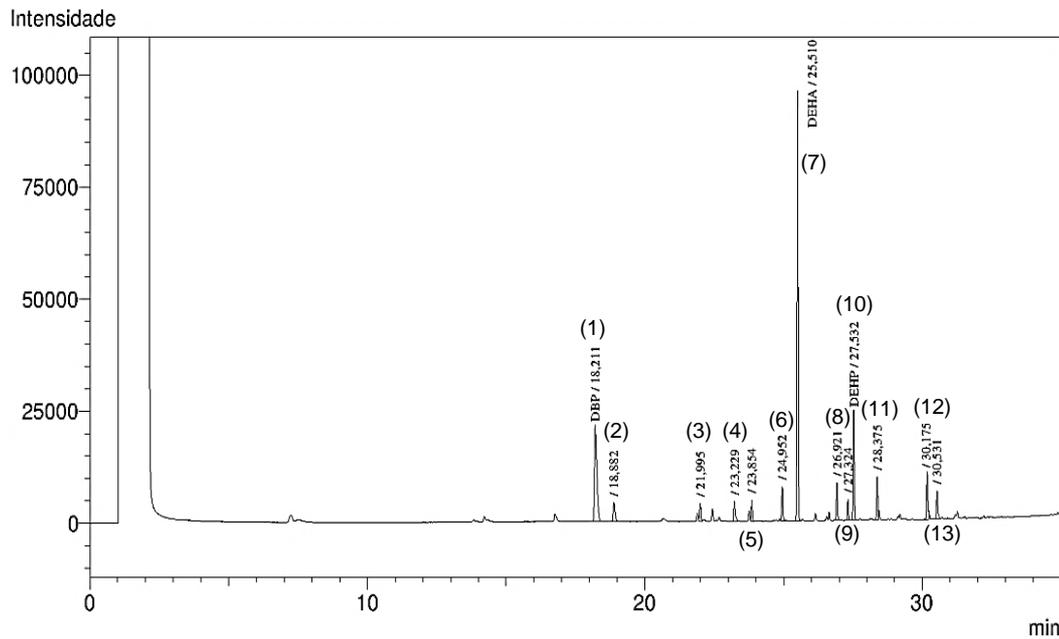
Na avaliação das amostras brancas, sem a presença dos plastificantes analisados, não foram observados picos cromatográficos nos tempos de retenção referentes ao DEHP e ao DEHA (Figuras 28 e 29).

Figura 28. Análise cromatográfica da solução proveniente do ensaio de migração da amostra branca, em etanol 95 %.



Picos cromatográficos: (1-10) não identificados (substâncias provenientes da matriz); volume de injeção: 2 μ L (splitless); temperaturas do injetor e detector (FID): 250 e 320 $^{\circ}$ C respectivamente; temperatura da coluna (DB5, 5 % fenilmetilsilicone, 30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m): 150 $^{\circ}$ C (10 min) $\xrightarrow{6^{\circ}\text{C}/\text{min}}$ 300 $^{\circ}$ C (20 min). Fluxo He: 1,86 mL min^{-1} .

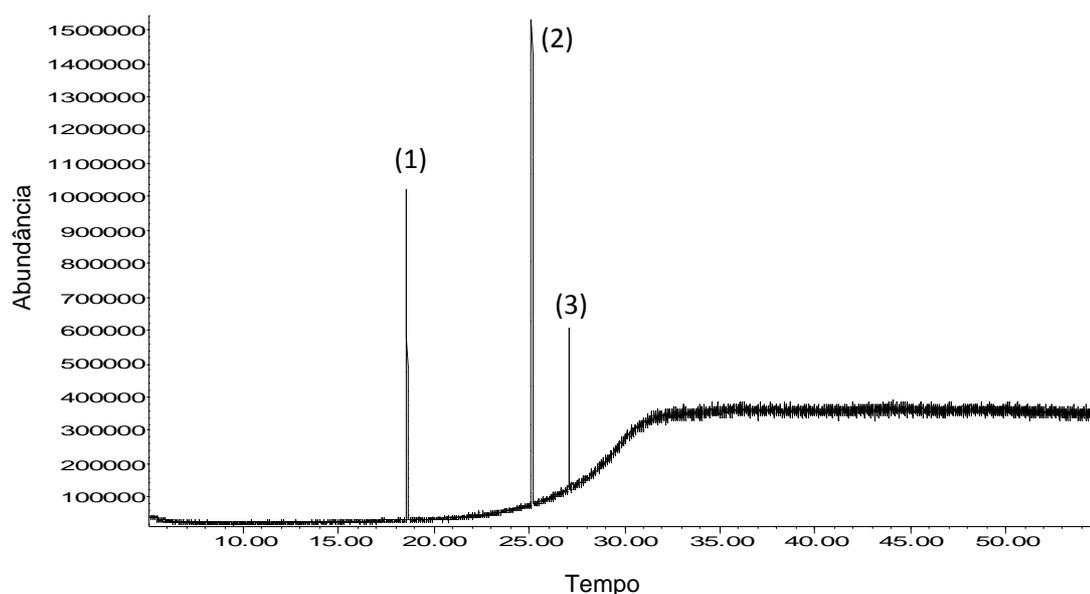
Figura 29. Análise cromatográfica da mistura padrão adicionada à solução proveniente do ensaio de migração da amostra branca, em etanol 95 %.



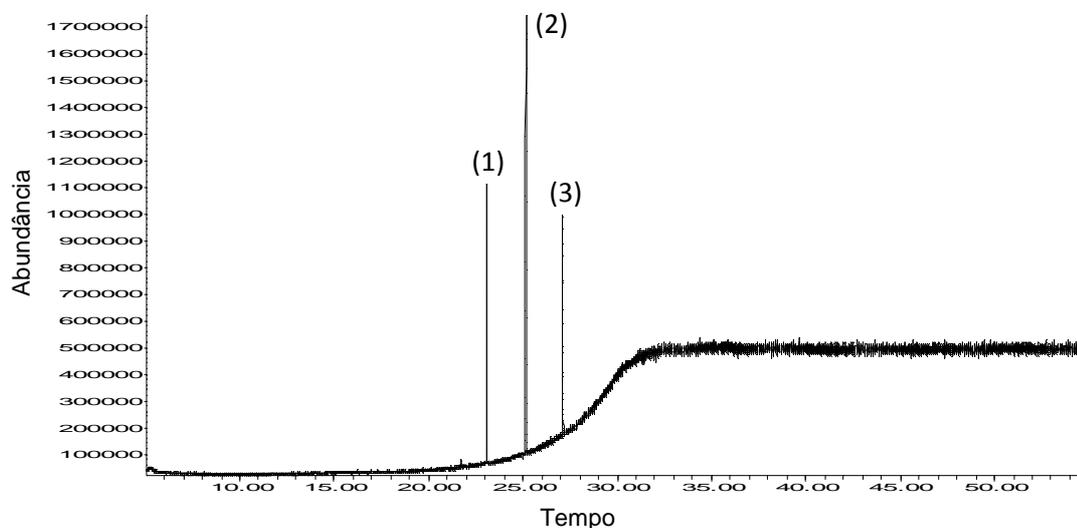
Picos cromatográficos: (2-6,8,9,11-13) não identificados; (1) DBP, 18,211 min, 8 mg kg^{-1} ; (7) DEHA, 25,510 min, 15 mg kg^{-1} ; (10) DEHP, 27,532 min, 3,5 mg kg^{-1} ; volume de injeção: 2 μ L (splitless); temperaturas do injetor e detector (FID): 250 e 320 $^{\circ}$ C respectivamente; temperatura da coluna (DB5, 5 % fenilmetilsilicone, 30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m): 150 $^{\circ}$ C (10 min) $\xrightarrow{6^{\circ}\text{C}/\text{min}}$ 300 $^{\circ}$ C (20 min). Fluxo He: 1,86 mL min^{-1} .

Na avaliação da identificação dos plastificantes nas amostras, foram analisadas as amostras AM-06, AM-07, AM-15, AM-17, AM-30 e AM-37. As amostras foram selecionadas de forma que representassem as diversas possibilidades de migração específica dos plastificantes (somente DEHA, somente DEHP, sem DEHA e DEHP, com DEHA e DEHP). O plastificante DEHA foi observado nas amostras AM-06, AM-07 e AM-30, enquanto o DEHP foi observado nas amostras AM-07, A AM-15, A AM-30 e A AM-37. Não foram observados os plastificantes DEHA e DEHP na amostra AM-17. As Figuras 30 e 31 apresentam os cromatogramas de íons totais referentes à mistura padrão e à amostra AM-07, respectivamente. Os cromatogramas de íons totais referentes às demais amostras são apresentados no ANEXO A.

Figura 30. Cromatograma de íons totais referente à mistura padrão



Picos cromatográficos: (1) não identificado; (2) DEHA, 25,149 min, 10 mg kg⁻¹; (3) DEHP, 27,101 min, 2,5 mg kg⁻¹; volume de injeção: 1 µL (splitless); temperatura do injetor: 250°C; modo de detecção: varredura (100 a 400 daltons); temperatura da coluna (DB5-MS, 5 % fenilmetilsilicone, 60 m x 0,25 mm x 0,25 µm): 150 °C (10 min) $\frac{6\text{ °C}}{\text{min}}$ > 300 °C (20 min). Fluxo He: 1,9 mL min⁻¹.

Figura 31. Cromatograma de íons totais referente à amostra AM-07

Picos cromatográficos: (1) não identificado; (2) DEHA, 25,153 min, 10 mg kg⁻¹; (3) DEHP, 27,119 min, 2,5 mg kg⁻¹; volume de injeção: 1 µL (splitless); temperatura do injetor: 250°C; modo de detecção: varredura (100 a 400 daltons); temperatura da coluna (DB5-MS, 5 % fenilmetilsilicone, 60 m x 0,25 mm x 0,25 µm): 150 °C (10 min) $\xrightarrow{6\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}}$ 300 °C (20 min). Fluxo He: 1,9 mL min⁻¹.

As diferenças entre os tempos de retenção dos plastificantes nas amostras e na mistura padrão foram abaixo de 0,5 %. A Tabela 23 apresenta os resultados obtidos.

Tabela 23. Tempos de retenção dos plastificantes observados nas amostras analisadas por CG-MS

Amostra	Plastificantes Observados	Tempo de Retenção (min)	Diferença (%)
Mistura Padrão	DEHA	25,149	-
	DEHP	27,101	-
AM-06	DEHA	25,149	0,000
AM-07	DEHA	25,153	0,016
	DEHP	27,119	0,066
AM-15	DEHP	27,109	0,030
AM-17	-	-	-
AM-30	DEHA	25,142	0,028
	DEHP	27,102	0,004
AM-37	DEHP	27,105	0,015

O íon de quantificação selecionado para o DEHA foi o com relação m/z de 129, e para o DEHP o com relação m/z de 149. As Figuras 32 e 33 apresentam os espectros de massas dos plastificantes, disponíveis na biblioteca de espectros de massas Wiley

e observados na mistura padrão, respectivamente. Os espectros de massas dos plastificantes observados nas amostras são apresentados no ANEXO B.

Figura 32. Espectros de massas dos plastificantes DEHA e DEHP, disponíveis na biblioteca de espectros de massas Wiley

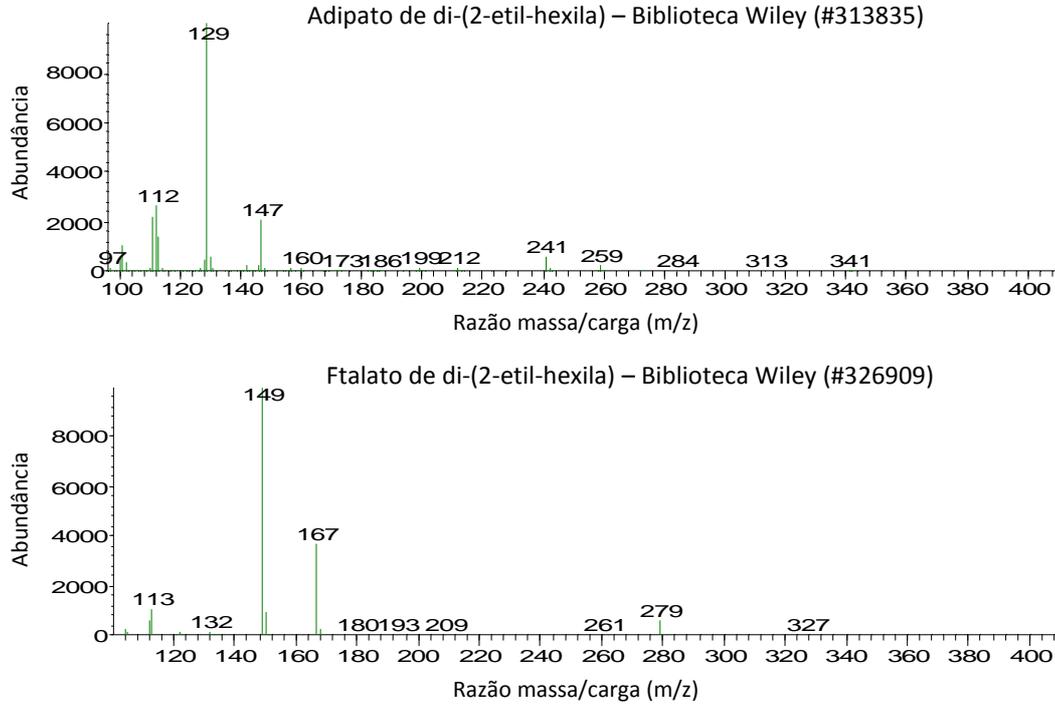
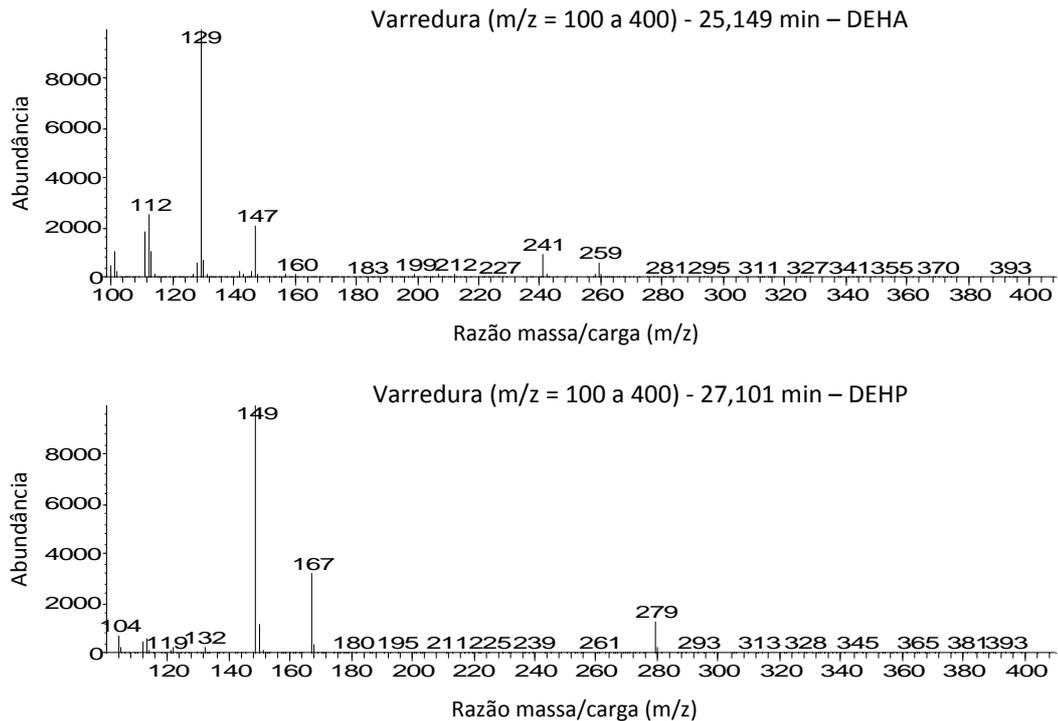


Figura 33. Espectros de massas dos plastificantes DEHA e DEHP referentes à mistura padrão



Os cromatogramas dos íons de fragmentação selecionados para os plastificantes observados nas amostras e na mistura padrão são apresentados no ANEXO C. As diferenças entre as razões das áreas dos íons de confirmação pelos íons de quantificação, encontrados para os plastificantes nas amostras e na mistura padrão, apresentaram valores abaixo do limite de tolerância. A Tabela 24 apresenta os resultados obtidos.

Tabela 24. Razões entre as áreas dos íons de confirmação e quantificação monitorados nas amostras e na mistura padrão.

Amostra	Plastificantes Observados	Íons Monitorados (m/z)	Razão	Diferença (%)	Limite de Tolerância (%)
Mistura Padrão	DEHA	112	0,266	-	-
		129	-	-	-
		147	0,209	-	-
	DEHP	149	-	-	-
		167	0,327	-	-
		279	0,127	-	-
AM-06	DEHA	112	0,265	0,47	15
		129	-	-	-
		147	0,209	0,33	15
AM-07	DEHA	112	0,258	3,15	15
		129	-	-	-
		147	0,211	1,05	15
	DEHP	149	-	-	-
		167	0,326	0,21	15
		279	0,125	2,11	20
AM-15	DEHP	149	-	-	-
		167	0,334	2,26	15
		279	0,115	9,43	20
AM-17	-	-	-	-	-
AM-30	DEHA	112	0,264	0,92	15
		129	-	-	-
		147	0,207	0,95	15
	DEHP	149	-	-	-
		167	0,306	6,24	15
		279	0,115	9,57	20
AM-37	DEHP	149	-	-	-
		167	0,325	0,53	15
		279	0,125	1,88	20

Com os resultados obtidos, foram confirmadas as identificações dos plastificantes realizadas por CG-DIC para as amostras analisadas. Foi confirmada a ausência do DEHA nas amostras AM-15, AM-17 e AM-37 e do DEHP nas amostras

AM-06, AM-15 e A-17. Assim, a análise por CG-EM confirma a seletividade do método com determinação por CG-DIC.

Estes resultados, associados aos obtidos no ensaio de amostras brancas por CG-DIC e à ausência de efeito de matriz, indicam seletividade adequada para os dois plastificantes. O método apresentou capacidade satisfatória de quantificação dos analitos, mesmo na presença dos interferentes da matriz.

4.2.4 Repetibilidade

Os resultados obtidos foram organizados em grupos de replicatas de cada amostra, calculando-se a variância de cada amostra. As Tabelas 25 e 26 apresentam as concentrações obtidas em mg kg^{-1} , e a variância de cada amostra, para os plastificantes DEHP e DEHA, respectivamente.

Tabela 25. Grupos de replicatas para o DEHP

Replicata	Concentrações de DEHP em mg kg^{-1} nas amostras									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	218,64	268,89	219,31	242,62	243,78	235,88	258,50	242,99	228,58	223,13
2	283,15	264,43	248,08	234,28	253,91	235,11	237,74	243,72	199,73	242,08
3	245,82	249,04	240,19	212,63	247,21	222,83	232,38	230,72	216,00	229,05
Variância	1048,74	108,45	221,01	239,61	26,52	53,62	190,25	53,34	209,24	94,05

Tabela 26. Grupos de replicatas para o DEHA

Replicata	Concentrações de DEHA em mg kg^{-1} nas amostras									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	68,78	68,27	66,11	61,73	59,13	61,61	62,25	63,69	58,24	59,06
2	67,22	62,23	61,48	61,61	56,41	66,31	64,69	62,83	63,93	66,91
3	67,79	60,54	63,47	62,79	66,91	55,32	59,04	64,07	63,55	62,23
Variância	0,62	16,53	5,41	0,42	29,71	30,42	8,01	0,41	10,11	15,60

A homogeneidade das amostras foi avaliada através da análise de variância - ANOVA. As Tabelas 27 e 28 apresentam os resultados obtidos para o DEHP e o DEHA, respectivamente.

Tabela 27. Análise de variância (ANOVA) para avaliação da homogeneidade da amostra (DEHP).

Fonte de Variação	<i>SQ</i>	<i>GL</i>	<i>QM</i>	<i>F</i>	<i>p – valor</i>
Entre os grupos (EG)	4422,26	9	491,36	2,189	0,069
Dentro dos grupos (DG)	4489,67	20	224,48		
Total	8911,92	29			

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

Tabela 28. Análise de variância (ANOVA) para avaliação da homogeneidade da amostra (DEHA).

Fonte de Variação	<i>SQ</i>	<i>GL</i>	<i>QM</i>	<i>F</i>	<i>p – valor</i>
Entre os grupos (EG)	111,35	9	12,37	1,0554	0,434
Dentro dos grupos (DG)	234,46	20	11,72		
Total	345,81	29			

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

Sendo a amostra considerada homogênea ($p\text{-valor} > 0,05$) quanto à concentração dos plastificantes DEHP e DEHA, a repetibilidade 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 29 apresenta os valores calculados para o desvio padrão relativo DPR_r , o $DPRP_r$ e o $HorRa\grave{t}$. Os resultados obtidos indicam que o método apresenta repetibilidade adequada para os dois plastificantes.

Tabela 29. Avaliação da Repetibilidade

	DEHP	DEHA
DPR_r	6,985	6,009
$DPRP_r$	4,660	5,691
$HorRa\grave{t}$	1,499	1,056

DPR_r , desvio padrão relativo (repetibilidade); $DPRP_r$, desvio padrão relativo previsto (repetibilidade); $HorRa\grave{t}$, razão de Horwitz (repetibilidade).

4.2.5 Precisão intermediária

As respostas encontradas foram avaliadas através das curvas analíticas preparadas (DEHP e DEHA) no solvente e suas concentrações foram determinadas.

As Tabelas 30 e 31 apresentam as concentrações das amostras e os resultados obtidos para o $DPR_{precint}$ para os plastificantes DEHP e DEHA, respectivamente. Os resultados obtidos indicam precisão intermediária adequada.

Tabela 30. Avaliação da Precisão Intermediária (DEHP)

Amostras	Concentração de DEHP em mg kg ⁻¹			
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4
1	256,03	238,98	265,12	250,40
2	264,07	250,27	266,40	231,86
3	241,53	257,00	240,81	248,59
4	255,01	229,56	234,63	255,30
5	249,80	257,58	261,49	239,34
Média	253,29	246,68	253,69	245,10
$S_i(\text{tempo})$	11,464			
$DPR_{precint}$	6,945			
$DPRP_R(\%)$	4,591			
$HorRat_R$	0,661			

$DPR_{precint}$, desvio padrão relativo (precisão intermediária); $DPRP_R$, desvio padrão relativo previsto (reprodutibilidade); $HorRat_R$, razão de Horwitz (reprodutibilidade).

Tabela 31. Avaliação da Precisão Intermediária (DEHA)

Amostras	Concentração de DEHA em mg kg ⁻¹			
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4
1	66,89	64,37	77,57	63,05
2	64,55	62,52	61,07	61,85
3	65,34	64,26	69,59	59,58
4	64,74	64,85	63,40	63,96
5	64,26	63,67	66,79	54,16
Média	65,16	63,93	67,68	60,52
$S_i(\text{tempo})$	3,818			
$DPR_{precint}$	8,507			
$DPRP_R(\%)$	5,935			
$HorRat_R$	0,698			

$DPR_{precint}$, desvio padrão relativo (precisão intermediária); $DPRP_R$, desvio padrão relativo previsto (reprodutibilidade); $HorRat_R$, razão de Horwitz (reprodutibilidade).

4.2.6 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. Para o DEHP, a amostra analisada com a variação de temperatura de migração de 18 °C apresentou variância não homogênea em relação à amostra nas condições normais, com *p-valor* calculado para a estatística *F* menor que a significância $\alpha/2$ de 0,025, para um nível de confiança de 95%. As demais variações apresentaram variâncias homogêneas em relação à amostra nas condições normais. Para o DEHA, a amostra analisada com a variação de tempo de migração de 47 h e 30 min apresentou variância não homogênea em relação à amostra nas condições normais, com *p-valor* calculado para a estatística *F* menor que a significância $\alpha/2$ de 0,025, para um nível de confiança de 95%. As demais variações apresentaram variâncias homogêneas em relação à amostra nas condições normais. As Tabelas 32 e 33 apresentam os resultados dos testes quanto às concentrações de DEHP e DEHA, em mg kg⁻¹, respectivamente.

Tabela 32. Teste F e teste t para comparação de médias (DEHP)

Variação	Média mg kg ⁻¹	Variância (mg kg ⁻¹) ²	Teste F <i>p-valor</i>	Teste t <i>p-valor</i>
Condições Normais	250,27	1271,12	-	-
Tempo de Migração: 47 h e 30 minutos	244,23	52,87	0,040	0,143
Tempo de Migração: 48 h e 30 minutos	252,47	146,47	0,233	0,153
Temperatura de Migração: 18 °C	237,73	30,30	0,023	0,304
Temperatura de Migração: 22 °C	267,16	158,18	0,111	0,073
$\alpha/2$, 95% de confiança			0,025	0,025

α , nível de significância; *p-valor*; probabilidade da estatística calculada.

Tabela 33. Teste F e Teste T para comparação de médias (DEHA)

Variação	Média mg kg ⁻¹	Variância (mg kg ⁻¹) ²	Teste F <i>p-valor</i>	Teste T <i>p-valor</i>
Condições Normais	64,52	1,73	-	-
Tempo de Migração: 47 h e 30 minutos	57,94	69,83	0,024	0,155
Tempo de Migração: 48 h e 30 minutos	65,84	9,72	0,151	0,271
Temperatura de Migração: 18 °C	64,22	0,71	0,290	0,298
Temperatura de Migração: 22 °C	66,43	10,06	0,147	0,203
$\alpha/2$, 95% de confiança			0,025	0,025

α , nível de significância; *p-valor*; probabilidade da estatística calculada.

Com os resultados obtidos o método apresenta-se robusto, com um nível de confiança de 95%, para todas as variações estudadas, para os plastificantes DEHP e DEHA. 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 ± 2) °C e $48 \text{ h} \pm 30$ minutos, respectivamente.

4.3 PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO – POP

Como resultado do processo de validação do método, foi elaborado um procedimento operacional padrão – POP para a determinação da migração específica dos plastificantes DEHA e DEHP da embalagem para alimentos gordurosos (ANEXO D). O procedimento descreve as condições de realização do ensaio a serem seguidas no laboratório de contaminantes orgânicos do Departamento de Química do INCQS e leva em consideração os parâmetros avaliados no processo de validação.

4.4 AMOSTRAS ENSAIADAS

Foram analisadas trinta e sete amostras de filme flexível de PVC recolhidas no comércio do estado do Rio de Janeiro através do programa PROMAC. As amostras foram provenientes de diversos estabelecimentos e de marcas e tamanhos variados.

4.4.1 Avaliação da concentração de migração de amostras de filme flexível de PVC

As amostras foram ensaiadas conforme o procedimento validado anteriormente para determinação da migração específica dos plastificantes DEHP e DEHA da embalagem para alimentos gordurosos. Para cada plastificante, foi estimada, através do método “*bottom-Up*”, a incerteza de medição relacionada às concentrações de migração de cada amostra. Foram utilizadas as identificações das amostras estabelecidas no ensaio preliminar. A Tabela 34 apresenta as concentrações de DEHP e DEHA, em mg kg^{-1} , determinadas nas soluções de migração provenientes das amostras ensaiadas. As Figuras 34 e 35 apresentam graficamente os resultados obtidos.

Tabela 34. Migrações específicas de DEHP e DEHA, determinadas para as amostras ensaiadas

Amostra	DEHP mg kg ⁻¹	DEHA mg kg ⁻¹	Amostra	DEHP mg kg ⁻¹	DEHA mg kg ⁻¹
AM-01	15,6 ± 0,89	95,2 ± 6,0	AM-20	<1,05 (LOQ)	62,8 ± 5,6
AM-02	<0,35 (LOD)	151 ± 12	AM-21	<1,05 (LOQ)	42,6 ± 3,5
AM-03	114 ± 14	<2,23 (LOD)	AM-22	109 ± 15	123 ± 17
AM-04	<0,35 (LOD)	26,8 ± 2,4	AM-23	126,8 ± 7,6	<2,23 (LOD)
AM-05	<0,35 (LOD)	29,0 ± 2,4	AM-24	195 ± 11	<2,23 (LOD)
AM-06	<0,35 (LOD)	231 ± 23	AM-25	167 ± 23	<2,23 (LOD)
AM-07	58,7 ± 4,0	157 ± 11	AM-26	5,13 ± 0,39	11,9 ± 1,5
AM-08	234 ± 16	<2,23 (LOD)	AM-27	50,2 ± 2,8	165 ± 11
AM-09	120,6 ± 7,3	<2,23 (LOD)	AM-28	<0,35 (LOD)	123,7 ± 8,1
AM-10	198 ± 11	<2,23 (LOD)	AM-29	162 ± 20	<2,23 (LOD)
AM-11	187 ± 18	<2,23 (LOD)	AM-30	51,1 ± 3,1	146,3 ± 9,6
AM-12	<0,35 (LOD)	123,9 ± 8,8	AM-31	54,3 ± 3,9	190 ± 15
AM-13	45,8 ± 2,7	136,2 ± 9,0	AM-32	<0,35 (LOD)	12,6 ± 1,6
AM-14	304 ± 17	<2,23 (LOD)	AM-33	20,8 ± 1,6	<2,23 (LOD)
AM-15	131,3 ± 7,9	<2,23 (LOD)	AM-34	28,4 ± 1,6	97,4 ± 6,2
AM-16	168 ± 18	<2,23 (LOD)	AM-35	28,9 ± 2,5	<2,23 (LOD)
AM-17	<0,35 (LOD)	<2,23 (LOD)	AM-36	173 ± 11	10,0 ± 1,5
AM-18	214 ± 22	<2,23 (LOD)	AM-37	118,5 ± 8,3	<2,23 (LOD)
AM-19	8,20 ± 0,54	<2,23 (LOD)			

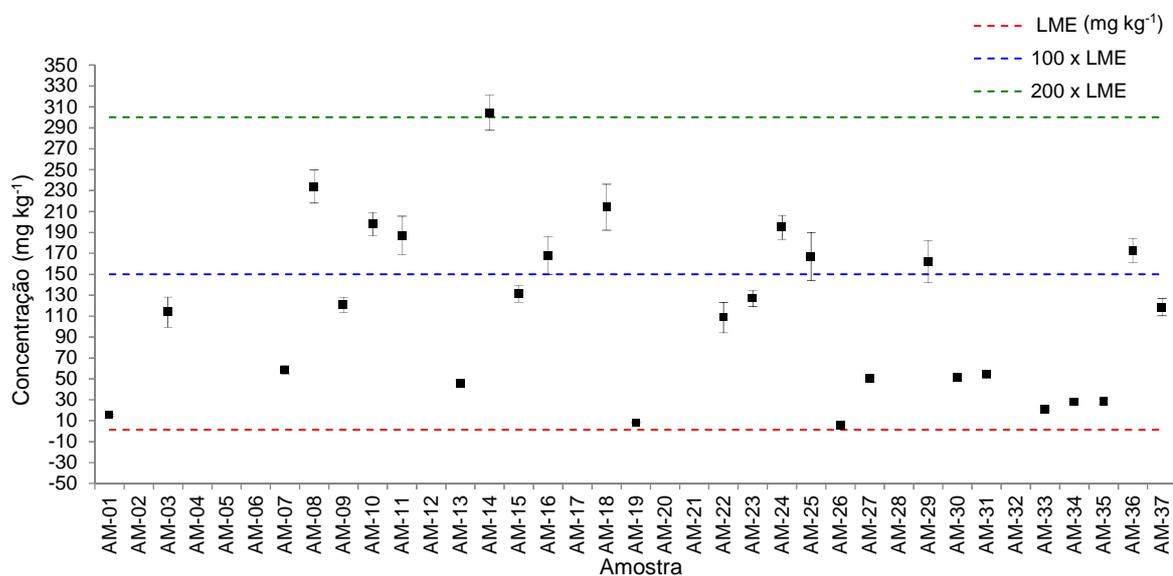
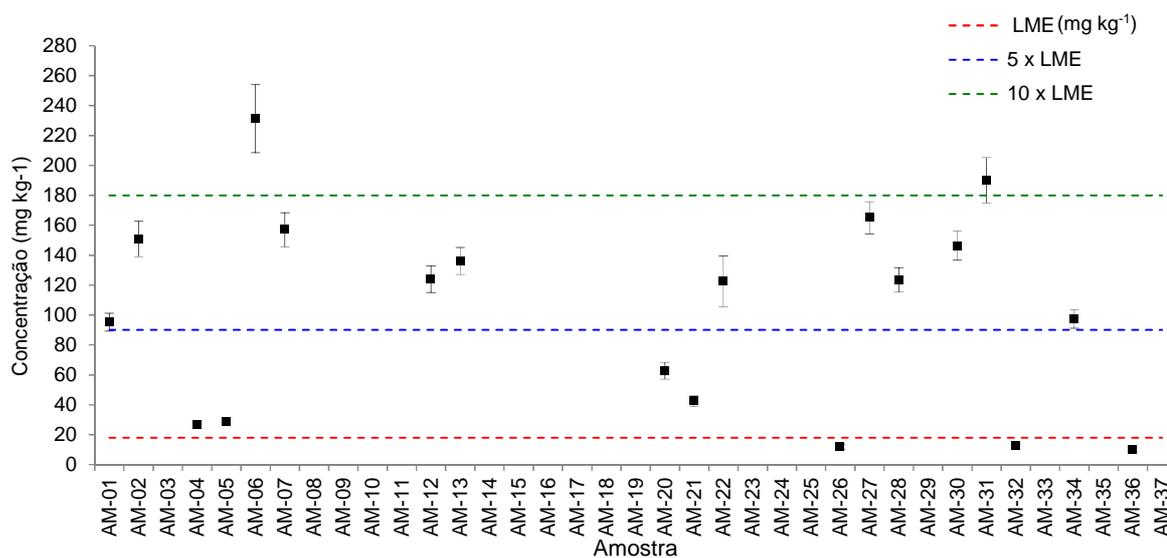
Figura 34. Distribuição gráfica das migrações específicas de DEHP, determinadas para as amostras ensaiadas

Figura 35. Distribuição gráfica das migrações específicas de DEHA, determinadas para as amostras ensaiadas



Do total de amostras ensaiadas, vinte e sete (73 %) apresentaram resultado insatisfatório para DEHP e dezesseis (43 %) apresentaram resultado insatisfatório para DEHA. Trinta e cinco (95 %) amostras apresentaram-se insatisfatórias para pelo menos um dos plastificantes. Somente duas (0,1 %) amostras foram aprovadas com relação à concentração de migração específica dos plastificantes DEHP e DEHA.

A legislação brasileira não prevê a interpretação do resultado analítico, segundo a conformidade do mesmo, levando-se em consideração a incerteza de medição estimada. Assim, para fins de declaração de conformidade da amostra ensaiada, foram consideradas somente as concentrações de migração dos plastificantes. Resultados superiores ao LME foram considerados insatisfatórios, enquanto resultados inferiores ao LME foram considerados satisfatórios.

Os resultados obtidos neste trabalho representam mais uma evidência da possível contaminação dos alimentos em contato com os filmes de PVC assim como encontrado em estudos anteriores.

Em estudo conduzido na Dinamarca, cinquenta e uma amostras de filme flexível de PVC foram analisadas quanto à migração específica do DEHA (PETERSEN; BREINDAHL, 1998). O ensaio foi realizado através do contato da amostra com solvente simulante isoctano por 48 horas a 40 °C. A migração do DEHA apresentou concentrações entre 8,1 e 48,1 mg dm⁻². De acordo com o estabelecido pela União Europeia (EU, 2011), um quilograma de alimento pode ser representado por um cubo com 1 dm² de lado, sendo 1 mg dm⁻² equivale a 6 mg kg⁻¹ do alimento.

Assim, os resultados obtidos podem ser expressos de 48,6 a 288,6 mg kg⁻¹ de alimento.

Barros (2010) realizou análise de uma amostra de filme flexível de PVC em contato com cinco diferentes alimentos gordurosos, sendo estes os com maior ocorrência em uma pesquisa de consumo realizada durante o estudo. O ensaio de migração foi realizado através do contato do alimento com o filme de PVC, e o resultado final foi obtido pela diferença entre o teor do plastificante no filme antes e depois do contato. As análises do filme flexível de PVC apresentaram migração específica do DEHP entre 79 e 2668 mg kg⁻¹ do alimento e migração específica do DEHA entre 38 e 659 mg kg⁻¹ do alimento. A amostra foi considerada insatisfatória quanto à migração dos plastificantes DEHA e DEHP para o contato com os cinco alimentos selecionados.

Bazilio (2012) aponta para a migração específica do DEHA em concentrações entre 7 e 149 mg kg⁻¹, dentre as quais 48% apresentaram resultado acima do limite estabelecido na legislação. As análises foram realizadas com amostras de filme flexível de PVC em contato com solvente simulante isoctano por 48 horas a 20 °C. Neste estudo, foi observada a presença de DEHP nas soluções de migração, porém não houve quantificação do plastificante. Com a determinação da migração específica do DEHP, o índice de amostras insatisfatórias seria maior.

Os resultados obtidos nos estudos anteriores, em conjunto com os obtidos no presente trabalho, evidenciam um problema relacionado à migração de plastificantes de filmes flexíveis de PVC para alimentos gordurosos. Tais resultados expõem a necessidade de um maior controle da produção dos filmes flexíveis de PVC utilizados, e confirmam a importância da implementação do método validado no setor de contaminantes orgânicos do INCQS.

Durante o ensaio de seletividade, na análise por CG-EM, foi possível observar em duas amostras das seis analisadas, a possível presença de citrato de acetiltributíla, substância utilizada como plastificantes em resinas de PVC. A avaliação dos resultados obtidos demonstrou uma compatibilidade de 84% do espectro de massas da substância observada nas amostras com o espectro de massas disponível na biblioteca de espectros de massas. Porém, para a confirmação da sua identificação e presença nas amostras, se faz necessária a análise de um padrão do plastificante. A legislação brasileira cita o plastificante como um possível aditivo ou adjuvante de polimerização, porém, não define LME para a substância.

4.5 AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DOS PLASTIFICANTES DEHP E DEHA

Segundo a literatura, os dois plastificantes são de grande importância toxicológica. O DEHP é relacionado a diversos efeitos tóxicos para a saúde humana devido à exposição a doses elevadas, tais como danos causados no sistema reprodutivo, e efeitos no desenvolvimento de câncer. A utilização do plastificante tem sido reduzida em diversos países, sobretudo na Europa. A IARC elevou o grau de risco do DEHP, classificando o mesmo no grupo 2B (possível agente carcinogênico ao homem).

A avaliação toxicológica do DEHA está em discussão, tendo um recente aumento no número de publicações sobre seus efeitos no organismo. O DEHA possui semelhanças estruturais com outras substâncias já classificadas como possíveis e prováveis agentes carcinogênicos ao homem. O que faz com que este seja tratado com precaução. No entanto, já existem na literatura estudos com animais que mostram o potencial tóxico do DEHA, relacionando o mesmo à proliferação de peroxissomas hepáticos e danos causados à gestação, tais como prolongamento do período de gestação e aumento relacionado à morte peri- e pós-natal. Além de danos em parâmetros específicos do sistema reprodutivo masculino.

O citrato de acetiltributíla, possível plastificante observado nas amostras de filme de PVC, não é classificado pela IARC. Segundo o Comitê Científico para Toxicidade, Ecotoxicidade e Ambiente da União Europeia, a partir de um estudo em voluntários humanos com exposição bucal a discos de PVC contendo o plastificante, foi estimada uma dose oral diária máxima de 227 mg kg^{-1} de peso corporal. Um estudo de 13 semanas em ratos com exposição *in utero* identificou um NOAEL de 100 mg kg^{-1} de peso corporal por dia, com taxas de sobrevivência e crescimento semelhantes em todos os grupos (CSTEE, 2004).

5 CONCLUSÃO

- As amostras ensaiadas durante o ensaio preliminar apresentaram migração específica para DEHP e DEHA, sendo observado ao menos um dos plastificantes em 97% do total de amostras. Os resultados observados foram utilizados para escolha dos plastificantes a serem utilizados na validação do método analítico.

- O método desenvolvido para detecção e quantificação da migração do DEHP e do DEHA a partir de filmes flexíveis de PVC em simulante etanol 95 % foi considerado adequado ao propósito. Todos os parâmetros avaliados como linearidade, efeito de matriz, seletividade, repetibilidade, precisão intermediária e robustez apresentaram resultados satisfatórios para as faixas de concentração definidas na validação do método.

- Com base no método validado foi elaborado um procedimento operacional para o ensaio de migração. O procedimento irá padronizar o ensaio realizado no laboratório de contaminantes orgânicos do Departamento de Química do INCQS, sendo futuramente um possível candidato para o aumento do escopo de acreditação do laboratório, pelo INMETRO. Contudo, 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 não detectável ($<2,23 \text{ mg kg}^{-1}$) e 190 mg kg^{-1} de solvente simulante, dentre as quais 43 % apresentaram resultado acima do limite estabelecido na legislação (18 mg kg^{-1}). Dezoito amostras (50 %) apresentaram migração específica de DEHA abaixo do limite de detecção do método ($2,23 \text{ mg kg}^{-1}$). Para o DEHP, as amostras apresentaram resultados entre não detectável ($<0,35 \text{ mg kg}^{-1}$) e 304 mg kg^{-1} , dentre as quais 73 % apresentaram resultado acima do limite estabelecido na legislação ($1,5 \text{ mg kg}^{-1}$). Oito amostras (22 %) apresentaram migração específica de DEHP abaixo do limite de detecção do método ($0,35 \text{ mg kg}^{-1}$), e duas (0,1 %) apresentaram migração específica do DEHP abaixo do limite de quantificação do método ($1,05 \text{ mg kg}^{-1}$).

- O índice de reprovação de amostras analisadas pelo método anteriormente desenvolvido pelo setor de contaminantes orgânicos do INCQS, somente com relação ao DEHA, foi de 40 %. Com a inclusão da determinação da migração específica do DEHP, o índice de reprovação de amostras subiu para 95 %, confirmando a importância da determinação da migração específica dos dois plastificantes.

- Diante dos resultados encontrados e da possibilidade de danos à saúde do ser humano, se faz necessária uma maior conscientização sobre a utilização do DEHP e do DEHA em filmes flexíveis de PVC. Autores têm apontado para a utilização de plastificantes de maior peso molecular como uma alternativa de menor risco à saúde. No entanto, plastificantes como o DEHA e o DEHP continuam sendo utilizados em um grande número de filmes flexíveis de PVC, como evidenciado neste estudo. Para que este cenário se altere, é necessário um maior controle dos filmes de PVC comercializados, devendo haver um aumento da fiscalização sobre o produto final, vendido ao consumidor e ainda sobre os filmes utilizados no comércio, para embalagem de alimentos.

- Assim, o método desenvolvido e validado será uma importante ferramenta de suporte para a fiscalização junto à vigilância sanitária. Através da determinação da migração específica dos plastificantes DEHA e DEHP em filmes flexíveis de PVC comercializados, é possível levantar dados com a finalidade de direcionar ações regulatórias para promover uma maior confiabilidade nos produtos disponíveis à população. Porém é necessário que as ações tomadas, com base nos ensaios laboratoriais, sejam eficazes, devendo ainda haver ações no sentido da prevenção, através da promoção da informação. É necessário ainda um estudo futuro para identificação e quantificação de outros possíveis plastificantes utilizados nos filmes flexíveis de PVC.

REFERÊNCIAS

ABNT. **Guia para a Expressão da Incerteza de Medição**. 3ª ed., Rio de Janeiro, 2003.

_____. **Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração: NBR ISO/IEC 17025/2005**. 2ª ed., Rio de Janeiro, 2005.

_____. **Materiais de referência – Princípios gerais e estatísticos para certificação: ABNT ISO GUIA 35/2012**. Rio de Janeiro, 2012.

ABRANTES, S. M. P. **Uso da eletroforese capilar para a determinação da migração química em alimentos em contato com embalagens**. 1998. 186f. Tese (Doutorado em Química Orgânica)- Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química, Rio de Janeiro, 1998.

ABRE. **Dados de Mercado**. 2013. Disponível em: <<http://www.abre.org.br/setor/dados-de-mercado/>>. Acesso em: 12 jun. 2013.

AIGNASSE, M. F. et al. A new simple and rapid HPLC method for determination of DEHP in PVC packaging and releasing studies. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 113, n. 2, p. 241-246, 1995.

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.

ATSDR. **Toxicological profile for di(2-ethylhexyl)phthalate**, 2002. Disponível em: <<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp9.pdf>>. Acesso em: 16 jun. 2014.

_____. **Minimal Risk Levels (MRLs)**, 2013. Disponível em: <<http://www.atsdr.cdc.gov/mrls/index.asp>>. Acesso em: 09 Jun. 2014.

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.

BARAM, G. et al. Determination of bis(2-ethylhexyl) phthalate in water by high-performance liquid chromatography with direct on-column preconcentration. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 55, n. 8, p. 750-754, 2000.

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.

BARROS, H. D. **Estudo da exposição do consumidor aos plastificantes Ftalato e adipato de di-(2-etil-hexila) adicionados a filmes de PVC, utilizados para acondicionamento de alimentos Gordurosos**. 2010. 79 f. Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária)- Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Rio de Janeiro, 2010.

BAZILIO, F. S. et al. Estimativa da incerteza de medição: estudo de caso no ensaio de migração de ϵ -caprolactama com determinação por CG-DIC. **Química Nova**, v. 35, p. 1664-1667, 2012a.

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, 2012b.

BAZILIO, F. S. **Validação intralaboratorial de método analítico para a determinação da migração do adipato de di-(2-etil-hexila) da embalagem para alimentos gordurosos**. 2012. 71 f. Trabalho de conclusão de curso (Especialização em Vigilância Sanitária)-Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Rio de Janeiro, 2012.

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

BRASIL. Resolução nº 105 de 19 de maio de 1999. Aprova os regulamentos técnicos e disposições gerais para embalagens e equipamentos plásticos em contato com alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, DF, 20 de maio de 1999. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/96d114004d8b6a7baa2debc116238c3b/ALIMENTOS+RESOLU%C3%87%C3%83O+N%C2%BA+105,+DE+19+DE+MAIO+DE+1999.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 16 jun. 2014.

_____. 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>. Acesso em: 16 jun. 2014.

_____. 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>. Acesso em: 16 jun. 2014.

_____. 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>. Acesso em: 16 jun. 2014.

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>. Acesso em: 16 jun. 2014.

_____. **Relatório da Administração 2013**. São Paulo, 2013. 27p. Disponível em: <file:///C:/Users/AdheNote/Downloads/RA_2013_13022014_PORT_Arquivar.pdf>. Acesso em: 16 jun. 2014.

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>>. Acesso em: 16 jun. 2014.

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.

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.

CARDOSO, M. H. W. M. **Preparação de um material de referência certificado para controle de agrotóxicos em hortifrutigranjeiros**. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2008. 191 p. (Tese Doutorado) – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Rio de Janeiro.

CASTLE, L.; MERCER, A. J.; GILBERT, J. Migration from plasticized films into foods. 4. Use of polymeric plasticizers and lower levels of di-(2-ethylhexyl)adipate plasticizer in PVC films to reduce migration into foods. **Food Additives and Contaminants**, v. 5, n. 3, p. 277-282, 1988.

CHANG, Y.-J.; LIN, K.-L.; CHANG, Y.-Z. Determination of Di-(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) metabolites in human hair using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Clinica Chimica Acta**, 2012.

CHOI, K. et al. In vitro intestinal and hepatic metabolism of Di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) in human and rat. **Toxicology in Vitro**, v. 27, n. 5, p. 1451-1457, 2013.

COLTRO, L.; PITTA, J. B.; MADALENO, E. Performance evaluation of new plasticizers for stretch PVC films. **Polymer Testing**, v. 32, n. 2, p. 272-278, 2013.

CROSBY, N.T. **Food packaging materials: aspects of analysis and migration of contaminants**. London: Applied Science, 1981. 190p.

CORSO, M. P. **Embalagens**. Medianeira, 2007, 79 p. Apostila do Curso de Tecnologia em Alimentos – Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

COULTATE, T. P. **Alimentos: a química de seus componentes**. Porto Alegre: Artmed, 2004. 368 p.

CSTEE. **Opinion on the risk assessment for acetyl tributyl citrate (atbc) plasticizer used in children's toys**. 8 Jan. 2004. Disponível em: <http://ec.europa.eu/health/archive/ph_risk/committees/sct/documents/out222_en.pdf>. Acesso em: 16 jun. 2014.

DALGAARD, M. et al. Di(2-ethylhexyl) adipate (DEHA) induced developmental toxicity but not antiandrogenic effects in pre- and postnatally exposed Wistar rats. **Reproductive Toxicology**, v. 17, n. 2, p. 163-170, 2003.

DAVID, R. M. et al. Chronic Toxicity of Di(2-ethylhexyl)phthalate in Rats. **Toxicological Sciences**, v. 55, n. 2, p. 433-443, 2000.

DAVIS, B. J.; MARONPOT, R. R.; HEINDEL, J. J. Di-(2-ethylhexyl) Phthalate Suppresses Estradiol and Ovulation in Cycling Rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 128, n. 2, p. 216-223, 1994.

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.

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

DURBIN, J.; WATSON, G. S. Testing for Serial Correlation in Least Squares Regression. II. **Biometrika**, v. 38, n. 1/2, p. 159-177, 1951.

ECPI. **High phthalates**. [2014]. Disponível em: <http://www.plasticisers.org/en_GB/plasticisers/high-phthalates>. Acesso em: 14 Fev. 2014.

ENDO, K. Synthesis and structure of poly(vinyl chloride). **Progress in Polymer Science**, v. 27, n. 10, p. 2021-2054, 2002.

ESTEVEES, 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.

EURACHEM/CITAC WORKING GROUP. **The fitness for purpose of analytical methods: A laboratory guide to method validation and related topics**. 1^a ed., London, 1998.

_____. **Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement**. 3^a ed., London, 2012.

EC. **European Union Risk Assessment Report Bis(2-Ethylhexyl) Phthalate (DEHP), CAS-No. 117-81-7**. Vol. 80; EUR 23384EN; Office for Official Publications of the European Communities: Luxembourg, 2008. Disponível em: <<http://echa.europa.eu/documents/10162/e614617d-58e7-42d9-b7fb-d7bab8f26feb>>. Acesso em: 16 jun. 2014.

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

FERNANDES, M.H.C.; GARCIA, E.E.C.; PADULA, M. **Migração de componentes de embalagens plásticas para alimentos**. Campinas: ITAL/CETEA. 1987, 153p.

FIERENS, T. et al. Analysis of phthalates in food products and packaging materials sold on the Belgian market. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 7, p. 2575-2583, 2012.

GERMANO, P.M.L.; GERMANO, M.I.S. **Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos**. 2. ed. São Paulo: Varela, 2001, 655 p.

GILBERT, S.G.; MILTZ, J.; GIANCINI, J.R. Transport considerations of potencial migrants from food packaging materials. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 4, p. 27-49, 1980.

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.

HHS. **Carcinogenesis Bioassay of Di(2-ethylhexyl)phthalate (CASNo. 117-81-7) in F344 Rats and B6C3F1 Mice (Feed Studies)**, 1982. Disponível em: <http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/lt_rpts/tr217.pdf>. Acesso em: 16 jun. 2014.

_____. **12th Report on Carcinogens (RoC)**, 2011. Disponível em: <<http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/roc/twelfth/roc12.pdf>>. Acesso em: 16 jun. 2014.

HOEFFDING, W.; MADOW, W.G.; MANN, H.B. (Ed.). **Contributions to probability and statistics**. Stanford University Press, p. 278-292, 1960.

HORWITZ, W. Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies. **Pure Applied Chemistry**. v. 67, p. 331-43, 1995.

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.

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>>. Acesso em: 16 jun. 2014.

_____. **Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans**: v. 101, 2012. Disponível em: <<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol101/mono101-006.pdf>>. Acesso em: 16 jun. 2014.

_____. **Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans**: List of Classifications, 2014. Disponível em: <<http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/ClassificationsAlphaOrder.pdf>>. Acesso em: 16 jun. 2014.

ICH. **Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1)**. Geneva, 2005. Disponível em: <http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf>. Acesso em: 16 jun. 2014.

IHCP. **Bis (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP): Summary Risk Assessment Report**. Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities, 2008. Disponível em: <<http://echa.europa.eu/documents/10162/060d4981-4dfb-4e40-8c69-6320c9debb01>>. Acesso em: 16 jun. 2014.

INCQS. **Validação de metodologias com determinação através de curva analítica linear: POP nº 65.3120.126**. Revisão 02. Rio de Janeiro, 2012.

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>. Acesso em: 16 jun. 2014.

_____. **Vocabulário Internacional de Metrologia: Conceitos Fundamentais e Gerais e Termos Associados (VIM 2012)**, 1ª ed., Rio de Janeiro, 2012.

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>. Acesso em: 13 Ago. 2013.

_____. **A fabricação do PVC**. [2013]. Disponível em: <http://www.institutodopvc.org/publico/?a=conteudo&canal_id=39&subcanal_id=40>. Acesso em: 13 Ago. 2013.

IPAC - INSTITUTO PORTUGUÊS DE ACREDITAÇÃO. **Guia para a Quantificação de Incerteza em Ensaios Químicos: OGC007**, Caparica, 2007. Disponível em: < <http://www.ipac.pt/docs/publicdocs/regras/OGC007.pdf>>. Acesso em: 16 jun. 2014.

IUPAC. **Compendium of Chemical Terminology - Gold Book**, Versão 2.3.3, Oxford, 2014. Disponível em: < <http://goldbook.iupac.org/PDF/goldbook.pdf>>. Acesso em: 16 jun. 2014.

KAVLOCK, R. et al. NTP Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction: phthalates expert panel report on the reproductive and developmental toxicity of di(2-ethylhexyl) phthalate. **Reproductive Toxicology**, v. 16, n. 5, p. 529-653, 2002.

LAKE, B. G. et al. Comparison of the effects of di-(2-ethylhexyl)adipate on hepatic peroxisome proliferation and cell replication in the rat and mouse. **Toxicology**, v. 123, n. 3, p. 217-226, 1997.

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.

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.

LÓPEZ-CARRILLO, L. et al. Exposure to phthalates and breast cancer risk in northern Mexico. **Environ Health Perspect**, v. 118, n. 4, p. 539-544, 2010.

MADALENO, E. et al. Estudo do uso de plastificantes de fontes renovável em composições de PVC. **Polímeros**, v. 19, p. 263-270, 2009.

MARCILLA, A.; GARCÍA, S.; GARCÍA-QUESADA, J. C. Study of the migration of PVC plasticizers. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 71, n. 2, p. 457-463, 2004.

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.

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

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>>. Acesso em: 16 jun. 2014.

_____. **Livro de química na web: Bis(2-ethylhexyl) phthalate**. 2011a. Disponível em: <<http://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C117817&Units=SI>>. Acesso em: 17 fev. 2014.

_____. **Livro de química na web: Bis(2-ethylhexyl) adipate**. 2011b. Disponível em: <<http://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C103231&Mask=200>>. Acesso em: 17 fev. 2014.

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.

PARK, J. D.; HABEEBU, S. S. M.; KLAASSEN, C. D. Testicular toxicity of di-(2-ethylhexyl) phthalate in young Sprague–Dawley rats. **Toxicology**, v. 171, n. 2–3, p. 105-115, 2002.

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.

POON, R. et al. Subchronic oral toxicity of di-n-octyl phthalate and di(2-ethylhexyl) phthalate in the rat. **Food and Chemical Toxicology**, v. 35, n. 2, p. 225-239, 1997.

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.

RAIS-BAHRAMI, K. et al. Follow-Up study of adolescents exposed to di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) as neonates on extracorporeal membrane oxygenation (ECMO) support. **Environ Health Perspect**, v. 112, n. 13, p. 1339-1340, 2004.

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.

RSC. **Bis(2-ethylhexyl)phthalate**. 2014a. Disponível em: <<http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.21106505.html?rid=19c4df30-f1cf-49e4-b1b8-f28725d8963a>>. Acesso em: 17 Fev. 2014.

_____. **Bis(2-ethylhexyl)adipate**. 2014b. Disponível em: <<http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.7358.html?rid=204347fc-7d19-42ad-94b9-cbf80ca291fd>>. Acesso em: 17 Fev. 2014.

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

SANCO. **Method Validation and Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed: SANCO/12571/2013**. 01 Jan. 2014.

Disponível em: <

http://ec.europa.eu/food/plant/plant_protection_products/guidance_documents/docs/qualcontrol_en.pdf>. Acesso em: 16 jun. 2014.

SARANTÓPOULOS, C. I. G. L. et al. **Embalagens plásticas flexíveis: principais polímeros e avaliação de propriedades**. Campinas: CETEA/ITAL, 2002. 267p.

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.

SILVA, A. V. P. **Avaliação da toxicidade do plastificante adipato dedi-(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.

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.

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.

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.

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.

THIESS, A. M., FLEIG, I. [Chromosome studies in workers exposed to di-2-ethylhexyl phthalate]. **Zentralbl Arbeitsmed Arbeitsschutz Prophyl**, v. 28, p. 351-355, 1978.

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.

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.

UE. Decisão N^o 2002/657/CE, 12 de Agosto de 2002. Dá execução ao disposto na Directiva 96/23/CE do Conselho relativamente ao desempenho de métodos analíticos e à interpretação de resultados. **Official Journal of the European Union**, L. 221/8, 2002. Disponível em: <<http://old.eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2002:221:0008:0036:PT:PDF>>. Acesso em: 16 jun. 2014.

_____. Regulamento N^o 10/2011, 14 de Janeiro de 2011. Relativo aos materiais e objectos de matéria plástica destinados a entrar em contacto com os alimentos. **Official Journal of the European Union**, L. 12/1, 2011. Disponível em: <<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:012:0001:0089:PT:PDF>>. Acesso em: 16 jun. 2014.

U.S.EPA. **Bis (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP)**, 2000. Disponível em: <<http://www.epa.gov/ttnatw01/hlthef/eth-phth.html>>. Acesso em: 17 Fev. 2014.

_____. **Integrated Risk Information System - Di(2-ethylhexyl) phthalate**. 2012a. Disponível em: <<http://www.epa.gov/iris/subst/0014.htm>>. Acesso em: 12 jun. 2013.

_____. **Integrated Risk Information System - Di(2-ethylhexyl) adipate**. 2012b. Disponível em: <<http://www.epa.gov/iris/subst/0420.htm>>. Acesso em: 17 Fev. 2014.

VESSMAN, J. et al. Selectivity in analytical chemistry (IUPAC Recommendations 2001). **Pure Applied Chemistry**, v.73, p.1381-1386, 2001.

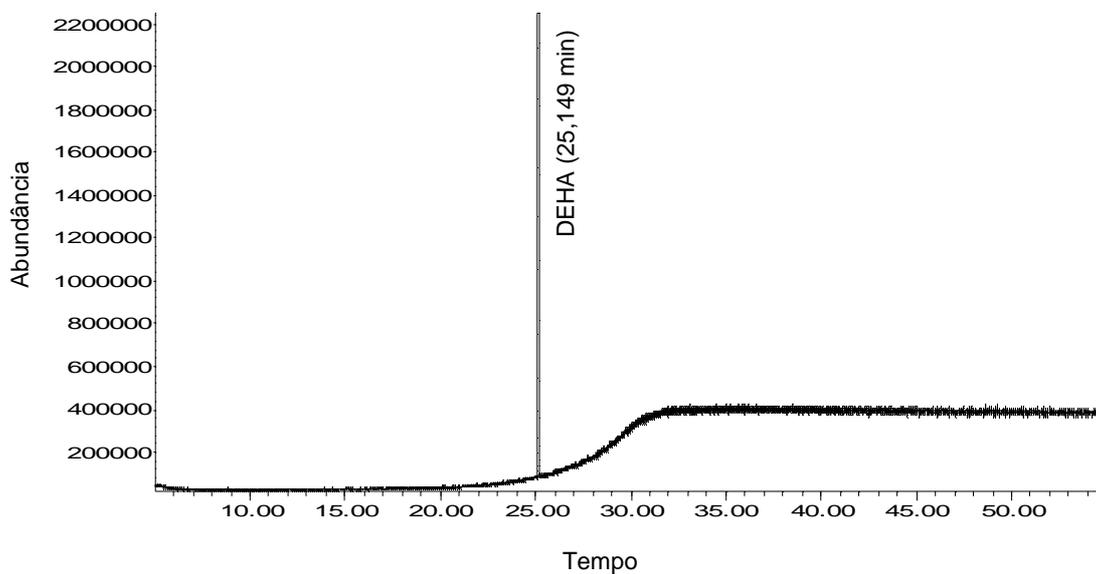
VINHAS, G. M. et al. Degradation studies on plasticized PVC films submitted to gamma radiation. **Materials Research**, v. 6, p. 497-500, 2003.

VOM BRUCK, C. G. et al. **Application of the diffusion theory to migration of plastics components into packed goods: survey of recent migration studies**. 1979. 153-7. Disponível em: <<http://www.biomedsearch.com/nih/Application-diffusion-theory-to-migration/383589.html>>. Acesso em: 16 jun. 2014.

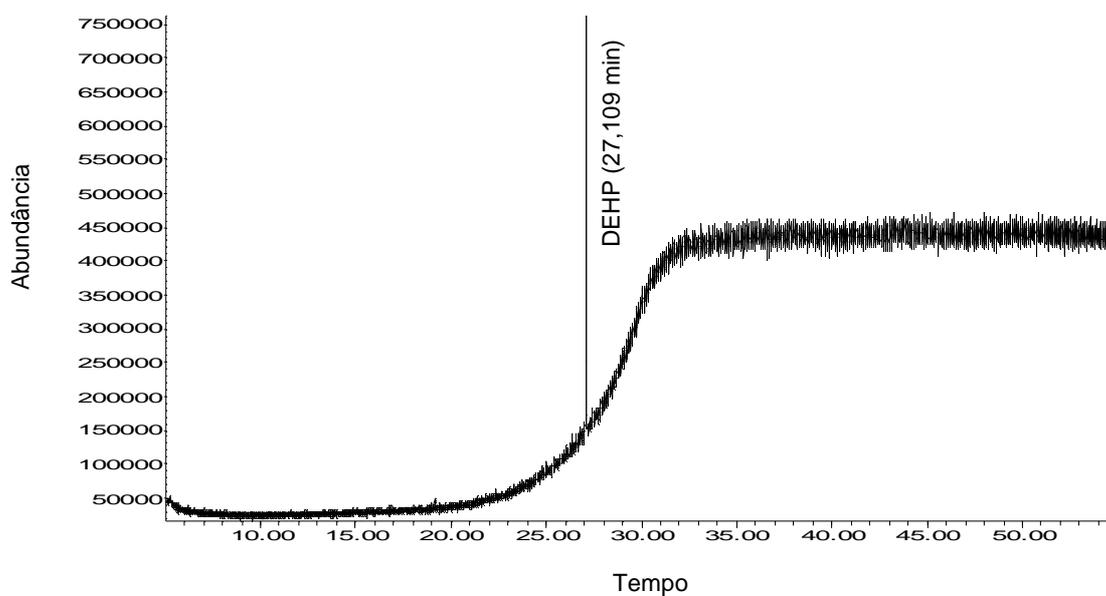
ZYGOURA, P. D. et al. Determination of diethylhexyladipate and acetyltributylcitrate in aqueous extracts after cloud point extraction coupled with microwave assisted back extraction and gas chromatographic separation. **Journal of Chromatography A**, v. 1093, n. 1-2, p. 29-35, 2005.

ANEXO A - CROMATOGRAMAS DE ÍONS TOTAIS REFERENTES ÀS AMOSTRAS.

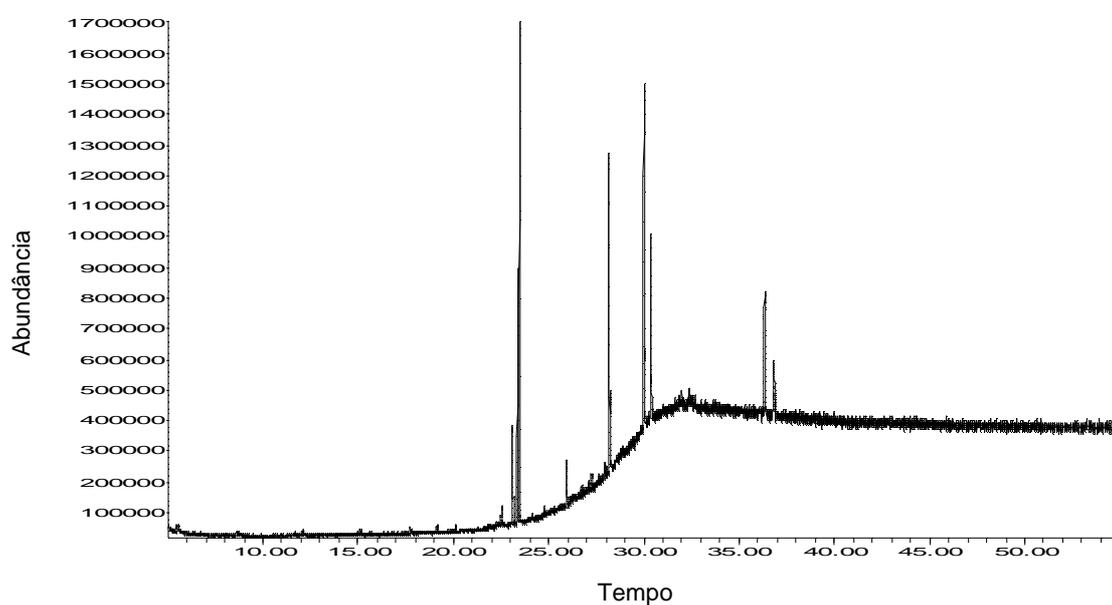
Cromatograma de íons totais referente à amostra AM-06.



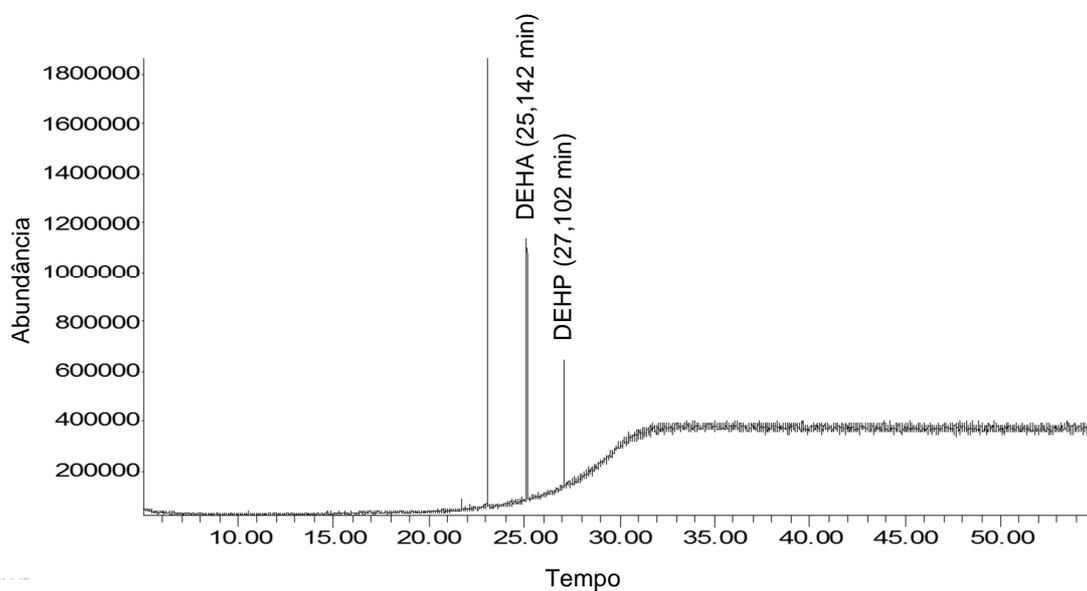
Cromatograma de íons totais referente à amostra AM-15.



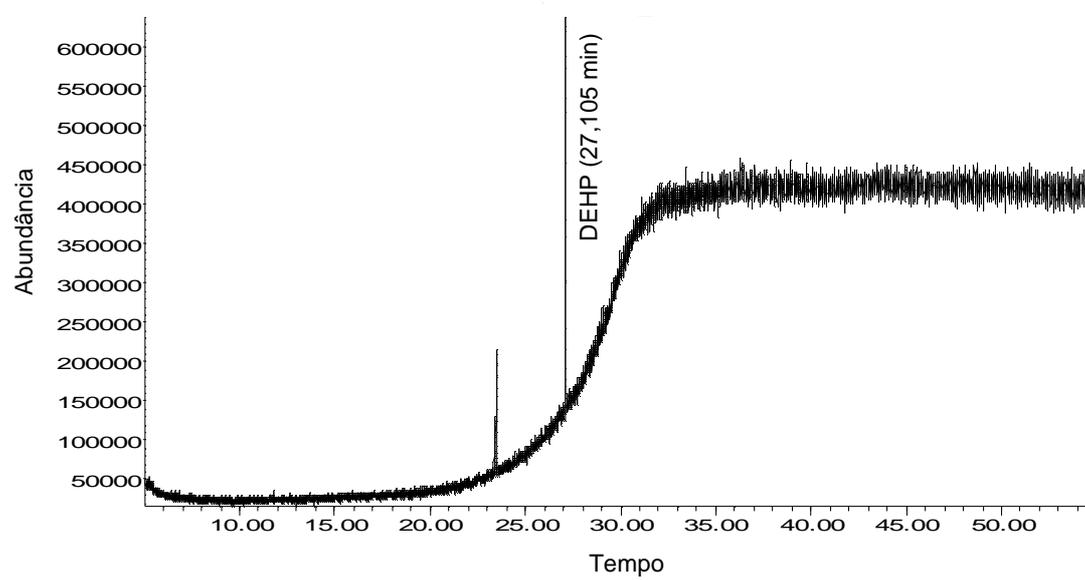
Cromatograma de íons totais referente à amostra AM-17.



Cromatograma de íons totais referente à amostra AM-30.

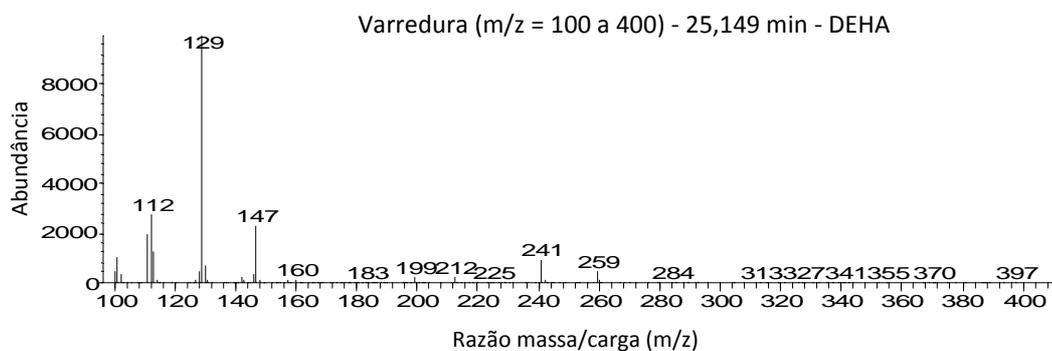


Cromatograma de íons totais referente à amostra AM-37.

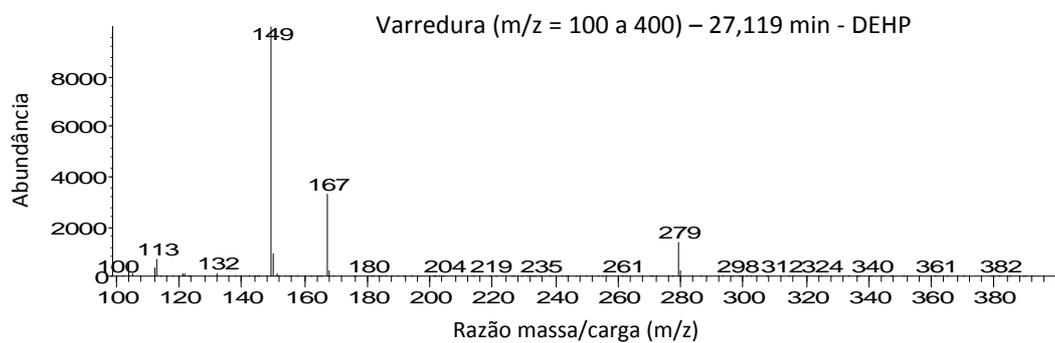
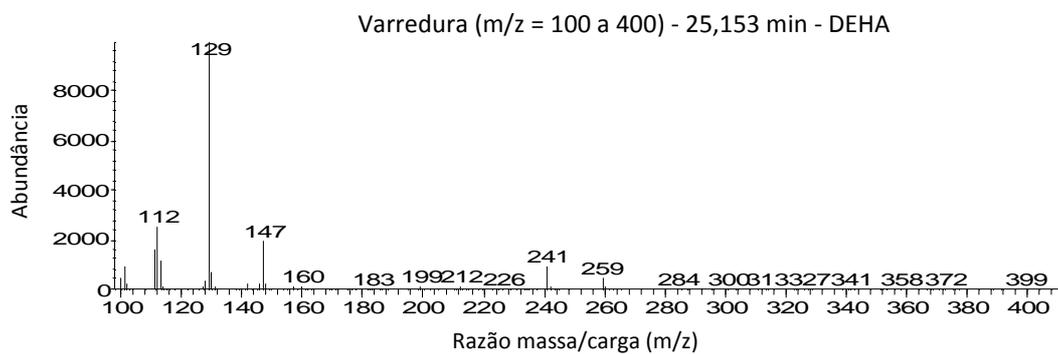


ANEXO B - ESPECTROS DE MASSAS OBTIDOS PARA OS PLASTIFICANTES DEHA E DEHP OBTIDOS NAS AMOSTRAS

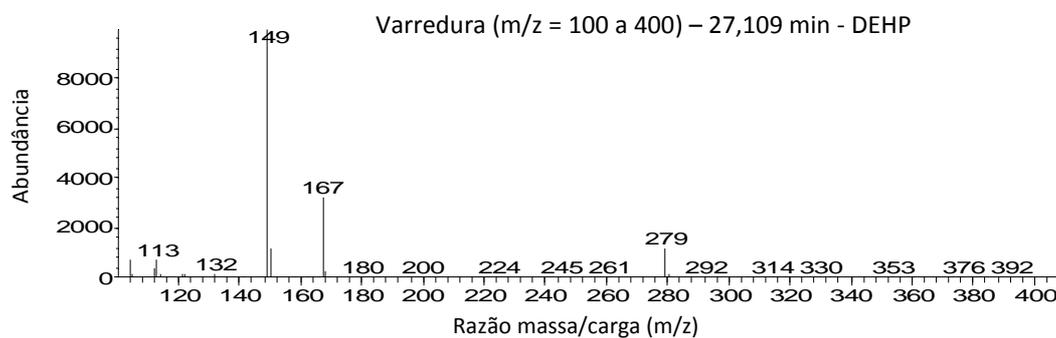
Espectro de massas do plastificante DEHA referente à amostra AM-06.



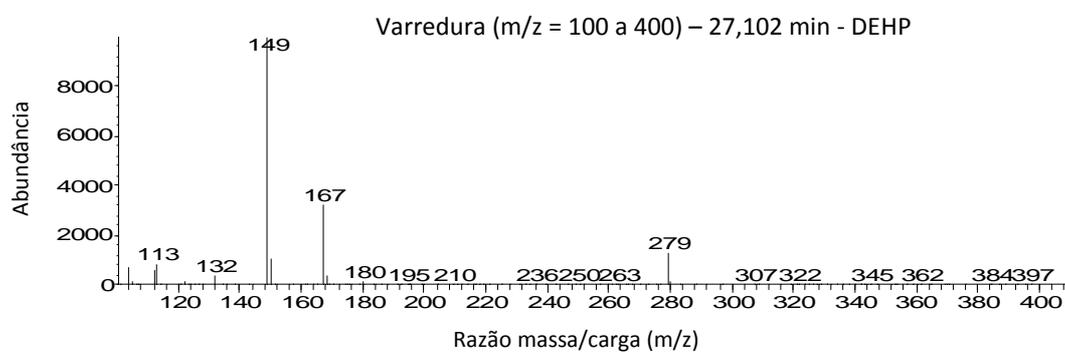
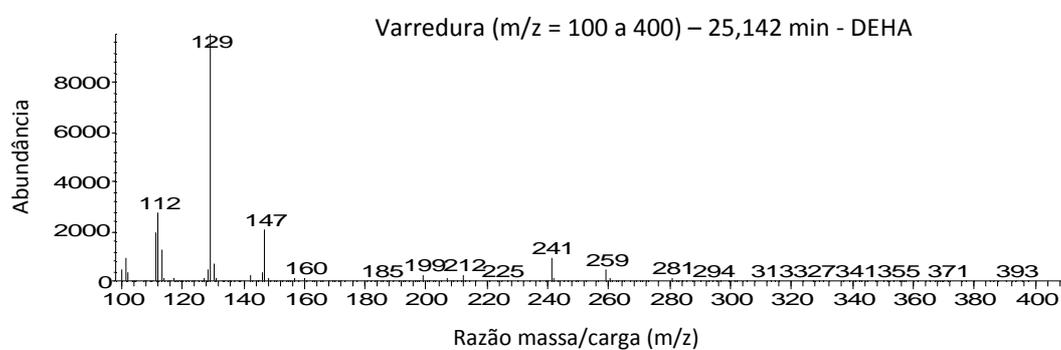
Espectros de massas dos plastificantes DEHA e DEHP referentes à amostra AM-07.



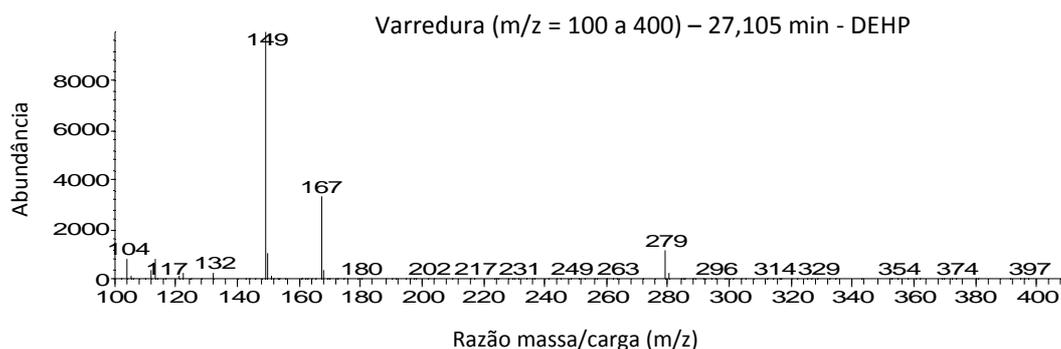
Espectro de massas do plastificante DEHP referente à amostra AM-15.



Espectros de massas dos plastificantes DEHA e DEHP referentes à amostra AM-30.

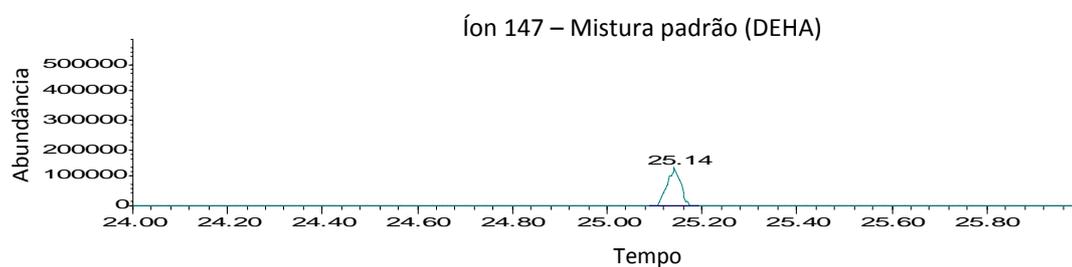
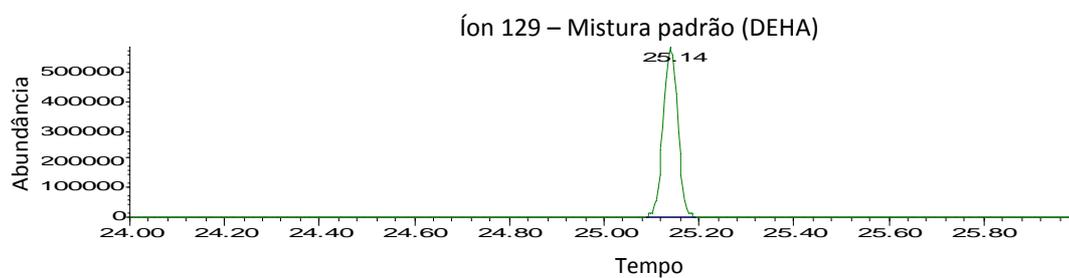
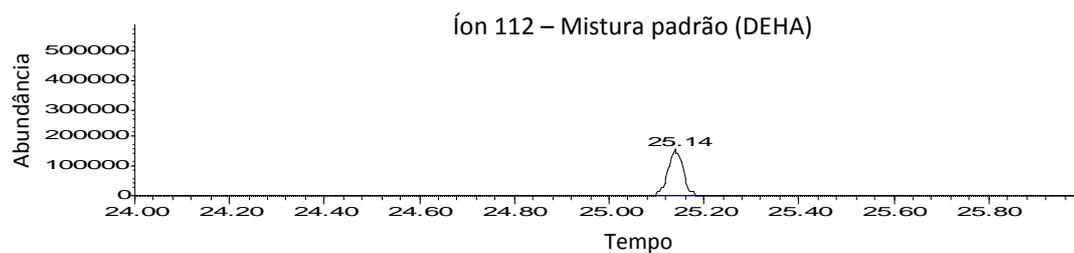


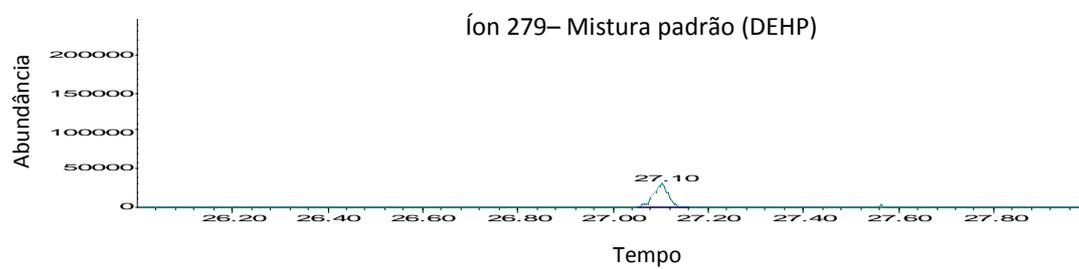
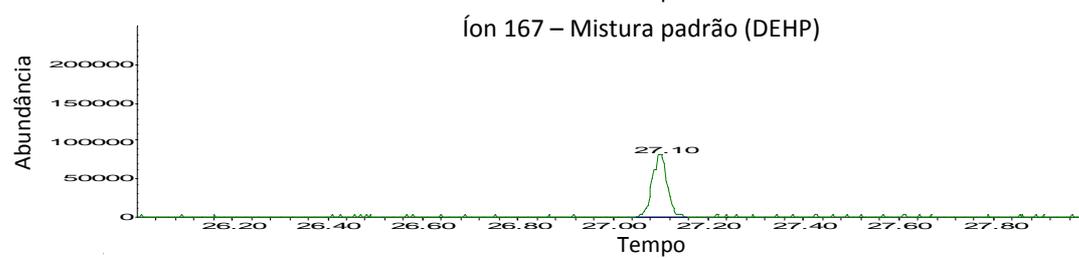
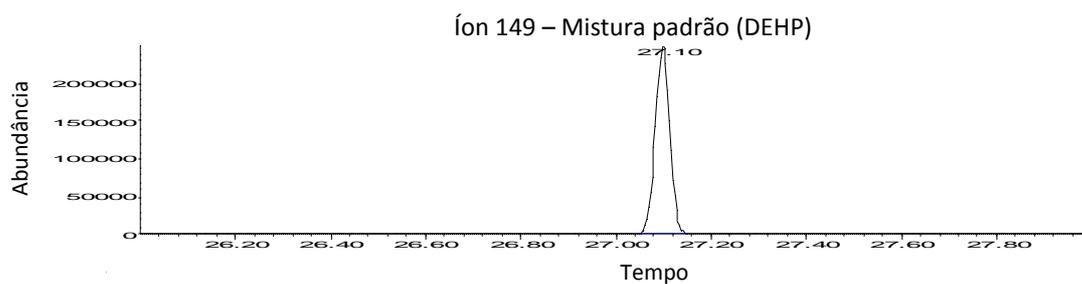
Espectro de massas do plastificante DEHP referente à amostra AM-37.



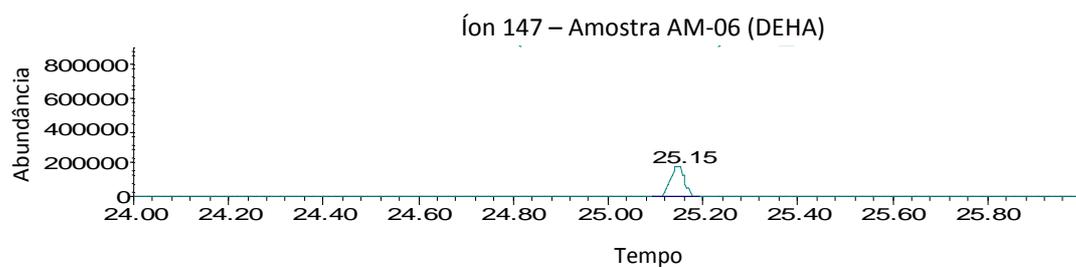
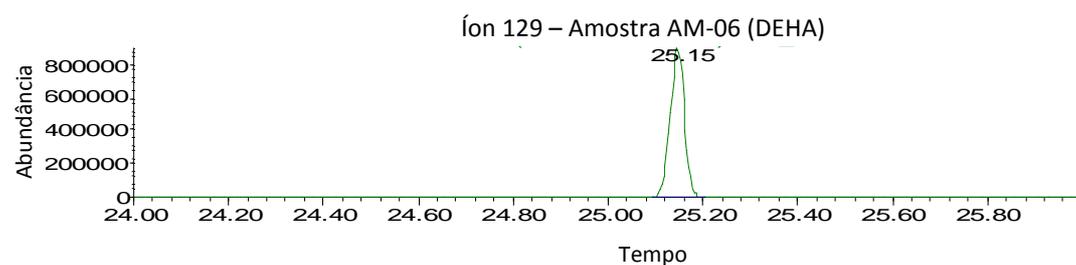
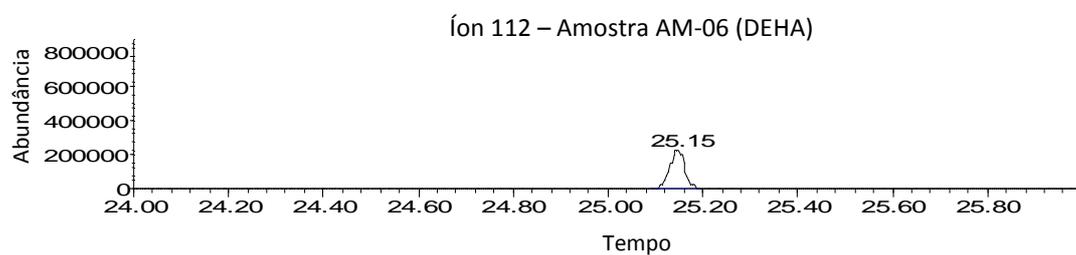
ANEXO C - CROMATOGRAMAS DOS ÍONS FRAGMENTO DOS PLASTIFICANTES DEHA E DEHP REFERENTES À MISTURA PADRÃO E ÀS AMOSTRAS

Cromatogramas dos íons fragmento monitorados dos plastificantes DEHA e DEHP referentes à mistura padrão.

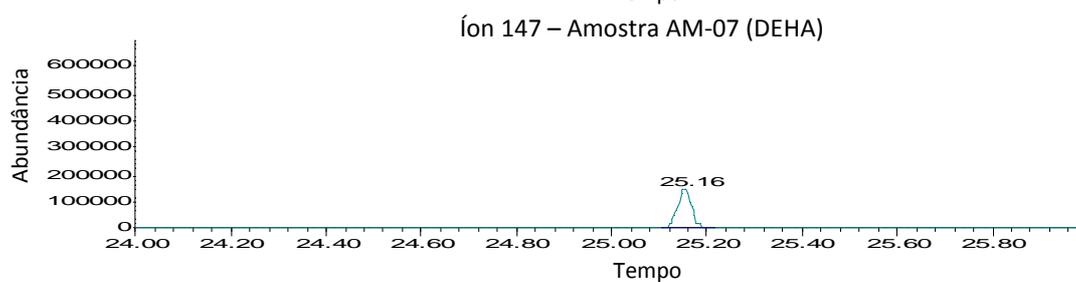
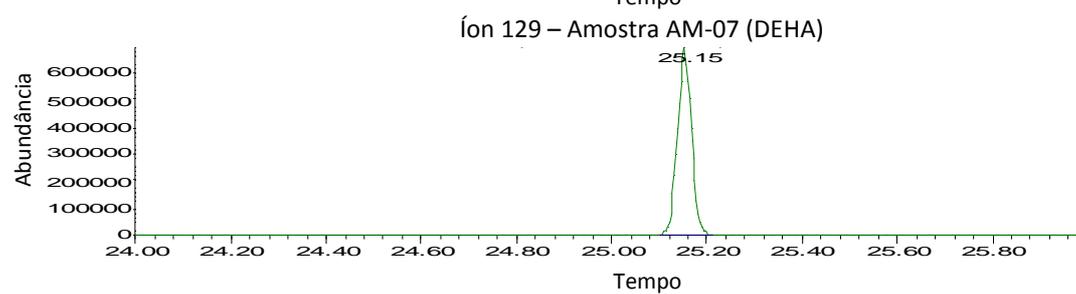
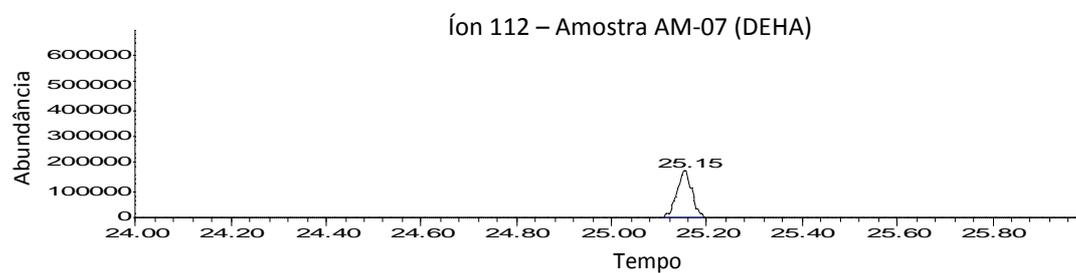


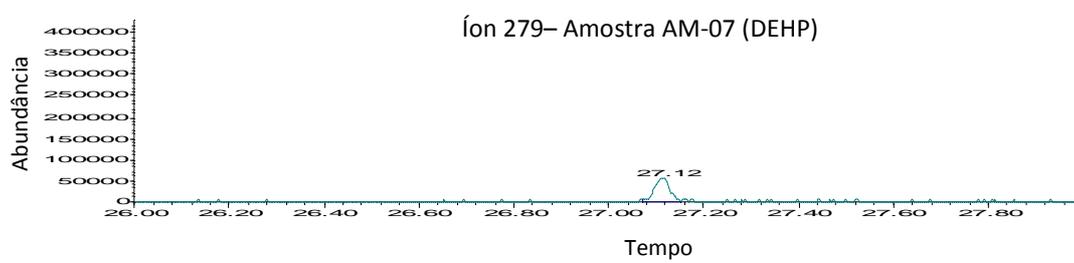
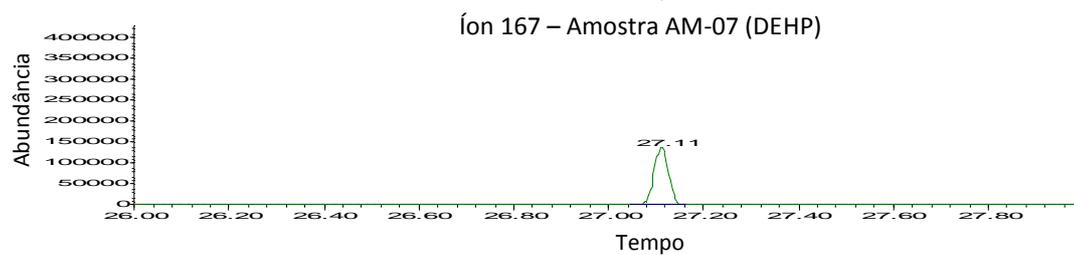
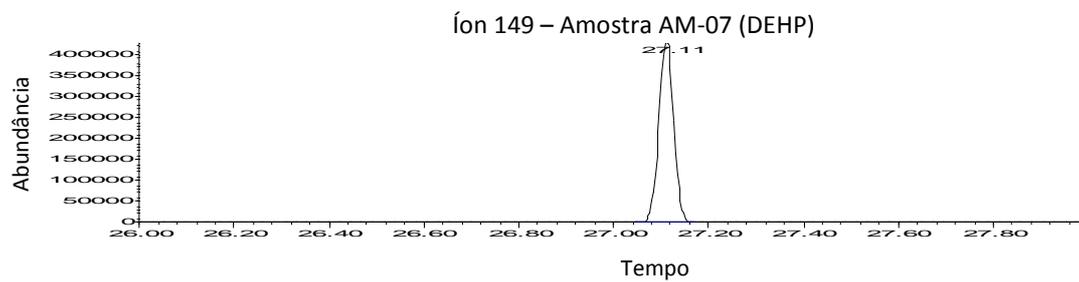


Cromatogramas dos íons fragmento monitorados do plastificante DEHA referente à amostra AM-06.

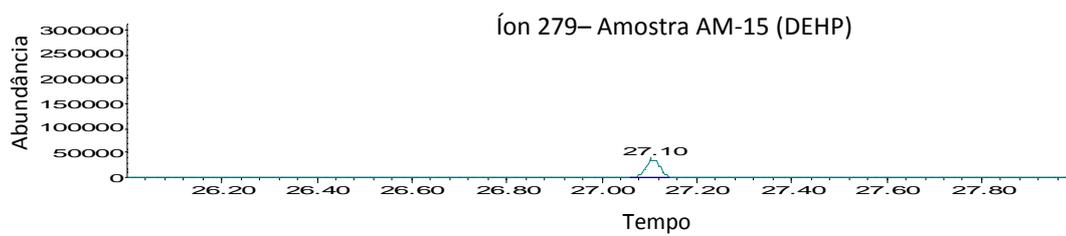
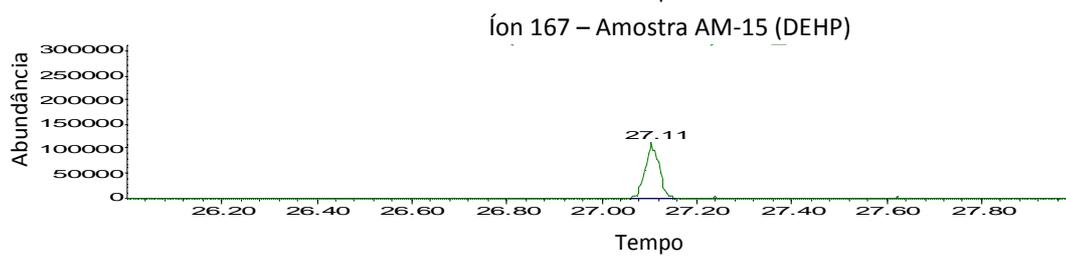
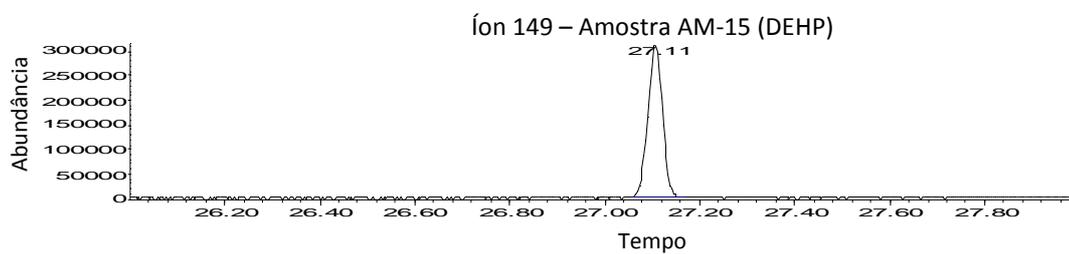


Cromatogramas dos íons fragmento monitorados dos plastificantes DEHA e DEHP referentes à amostra AM-07.

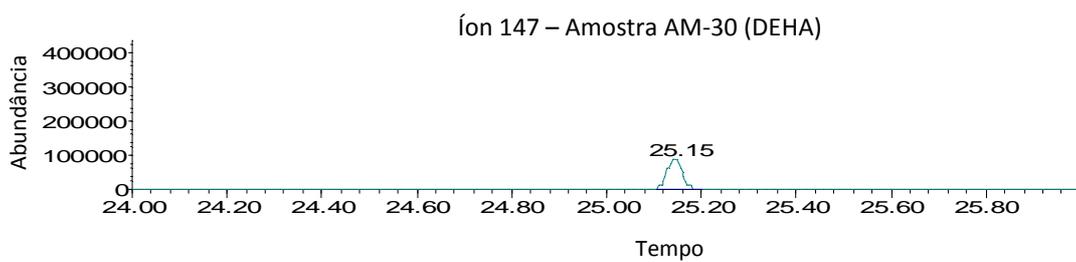
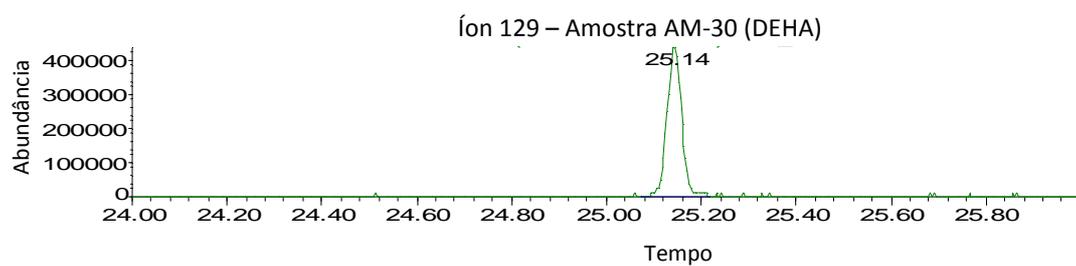
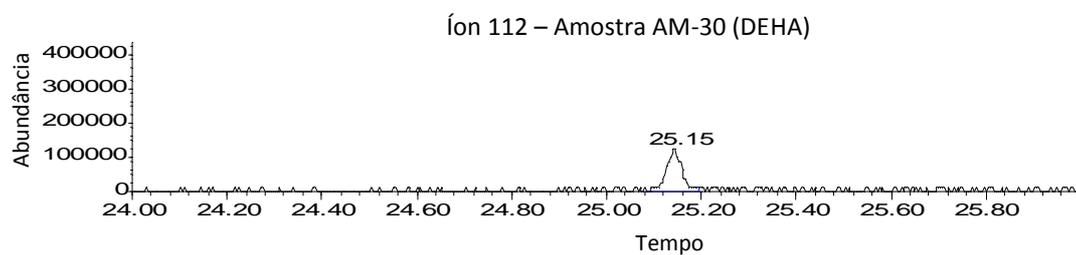


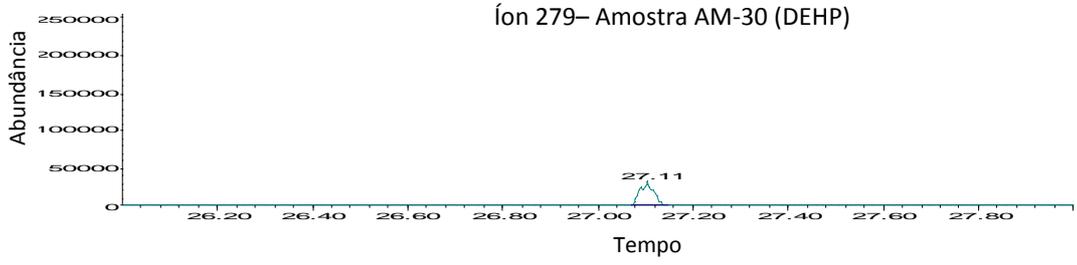
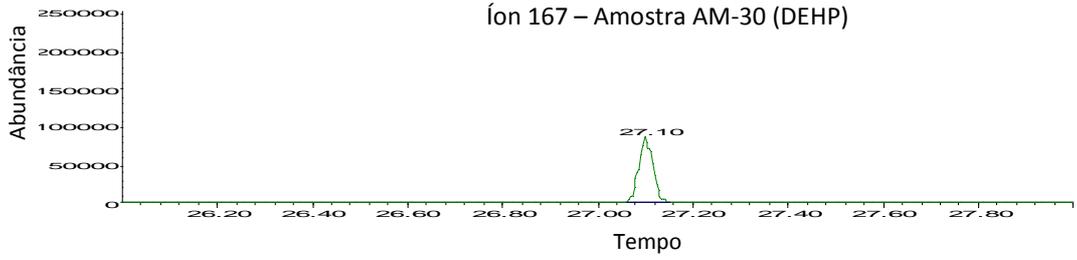
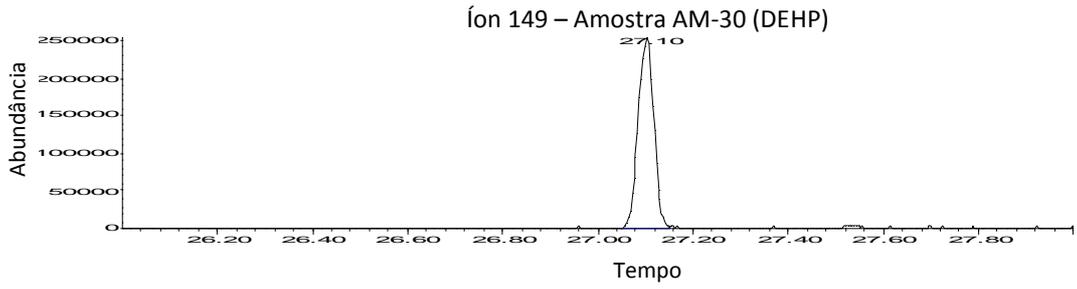


Cromatogramas dos íons fragmento monitorados do plastificante DEHP referente à amostra AM-15.

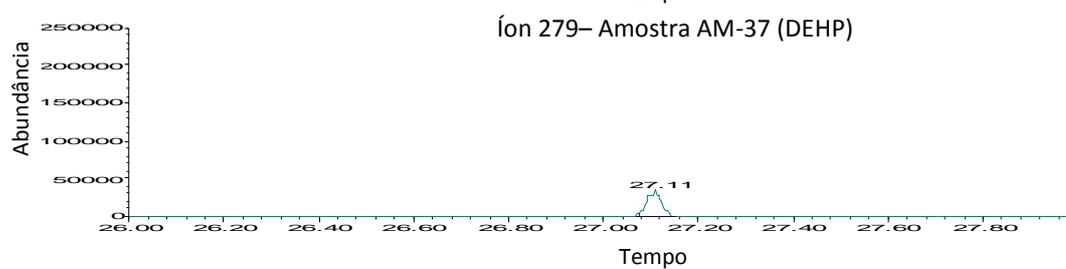
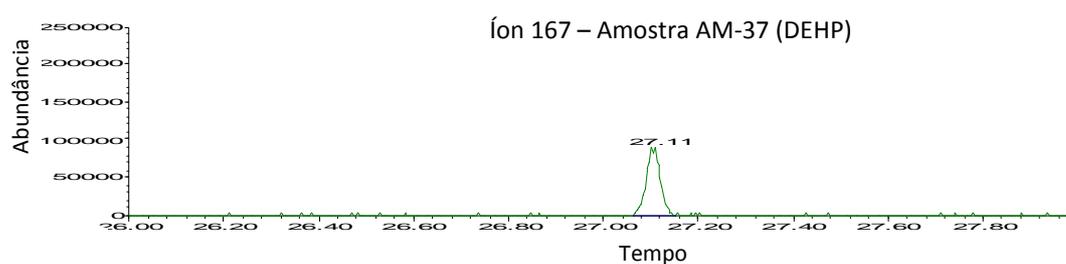
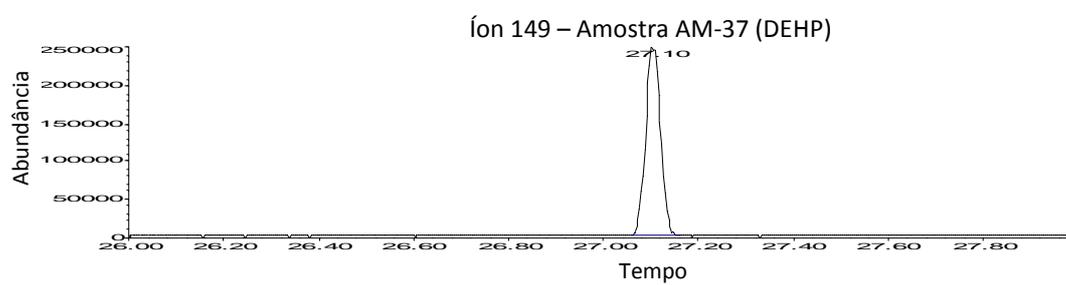


Cromatogramas dos íons fragmento monitorados dos plastificantes DEHA e DEHP referentes à amostra AM-30.





Cromatogramas dos íons fragmento monitorados do plastificante DEHP referente à amostra AM-37.



ANEXO D – PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO PARA A DETERMINAÇÃO DA MIGRAÇÃO ESPECÍFICA DOS PLASTIFICANTES DEHA E DEHP DA EMBALAGEM PARA ALIMENTOS GORDUROSOS

SUMÁRIO

1. Objetivo
2. Campo de aplicação
3. Definições
4. Siglas
5. Condições gerais
6. Condições específicas

1. OBJETIVO

Este POP fixa condições, padroniza, define e estabelece regras e recomendações que devem ser aplicadas no Setor de Contaminantes, área de migrantes orgânicos, para a determinação da migração do adipato de di-(2-etil-hexila) - DEHA e do ftalato de di-(2-etil-hexila) - DEHP provenientes de amostras de filmes flexíveis de PVC destinadas a acondicionar alimentos gordurosos.

2. CAMPO DE APLICAÇÃO

Este POP se aplica na determinação da migração do adipato de di-(2-etil-hexila) e do ftalato de di-(2-etil-hexila) provenientes de amostras de filmes flexíveis de PVC.

3. DEFINIÇÕES

Para efeito deste POP, são adotadas as seguintes definições:

3.1 – Filme Flexível de PVC

Filme plástico flexível confeccionado de poli-(cloreto de vinila) plastificado com adipato de di-(2-etil hexila) e/ou ftalato de di-(2-etil-hexila), utilizado no acondicionamento de alimentos.

3.2 – Plastificante

Substância química denominada de aditivo que é incorporada normalmente no processo de fabricação da resina (polímero) objetivando a modificação das propriedades mecânicas do material.

3.3 - Alimentos gordurosos

São alimentos que contenham gordura ou óleos entre seus componentes.

3.4 – Simulante

Substância que simula as características físico-químicas do alimento e que, por possuir uma composição mais simples que o alimento, é utilizado para realização de ensaios de migração.

3.4.1 - Simulante D

É o simulante de escolha para alimentos gordurosos. A Resolução n.º 51, de 26 de Novembro de 2010, estabelece os seguintes simulantes D: óxido de polifenileno modificado, isooctano e etanol 95%.

3.5 – Repetição

Alíquotas de uma mesma amostra preparadas e analisadas independentemente.

3.6 – Replicata

Injeções, leituras de uma mesma alíquota de análise.

4. SIGLAS

São utilizadas no texto deste POP as seguintes siglas:

- CQI - Controle de Qualidade Interno
- DEHA - Adipato de di-(2-etil-hexila)
- DEHP - Ftalato de di-(2-etil-hexila)

5. CONDIÇÕES GERAIS

A determinação da migração dos plastificantes DEHA e DEHP baseia-se em deixar 1 dm² do filme em contato com 100 mL de etanol 95 % a (20 ± 2,0) °C por 48 h ± 30 min (condições tempo x temperatura estabelecidos pela Resolução nº 51, de 26 de Novembro de 2010 para o simulante etanol 95 %), e posterior análise por cromatografia a gás da solução de migração resultante.

6. CONDIÇÕES ESPECÍFICAS

6.1 – Vidraria

- a) Balões volumétricos calibrados de 50 e 100 mL;
- b) Erlenmeyers com tampa esmerilhada de vidro de 250 ou 500 mL;
- c) Bureta de 100 mL calibrada ou dispensador de líquidos de 100 mL calibrado ou pipeta volumétrica de 100 mL calibrada;
- d) Bureta de 5 ou 10 mL calibrada;
- e) Pipetas volumétricas calibradas de 20 e 25 mL;
- f) Funil de vidro.

6.2 – Equipamentos

- a) Balança analítica de resolução 0,01 mg calibrada;
- b) Cromatógrafo a gás, equipado com detector por ionização em chama, qualificado;
- c) Coluna de sílica fundida com 5% de fenilmetilsilicone nas dimensões 30 m x 0,25 mm x 0,25 μm ;
- d) Moldes de 0,5 ou 1 dm^2 .

A coluna cromatográfica descrita acima é a utilizada neste laboratório com as condições estabelecidas no item 6.5 deste POP. Para colunas de diferentes polaridades, ou diferentes fabricantes, as condições cromatográficas poderão ser outras.

6.3 - Materiais de referência e reagentes

- a) Etanol com pureza acima de 99%;
- b) Adipato de di-(2-etil-hexila) com pureza acima de 95%;
- c) Ftalato de di-(2-etil-hexila) com pureza mínima de 95%;
- d) Material de referência de filme flexível de PVC com migrações de DEHA e DEHP para alimentos gordurosos conhecidas e adquirido de fabricante sendo sua homogeneidade testada;
- e) Água desionizada tipo 1 ou 2.

6.4 – Controle de Qualidade Interno

Uma amostra de controle de qualidade interno (CQI) deve ser preparada através de um material de referência de filme flexível de PVC ou amostra de filme flexível de PVC, com migrações de DEHA e DEHP para alimentos gordurosos conhecidas. Realizar todos os passos para preparo da amostra descritos no item 6.8.

6.4.1 – Preparo da Carta Controle

Preparar uma carta controle como descrito no POP 65.3120.125 - Controle de Qualidade Interno.

6.4.2 – Análise das Amostras de Controle de Qualidade Interno

Analisar um controle de qualidade interno a cada batelada de análise, realizando três repetições do ensaio, e transportar a média dos três resultados (em mg kg^{-1}) para a carta controle.

6.4.3 – Avaliação dos Resultados

Avaliar os resultados obtidos para cada controle de qualidade interno analisado conforme descrito no POP 65.3120.125 – Controle de Qualidade Interno.

6.5 – Condições cromatográficas

- a) Detector: detector por ionização em chama;
- b) Vaporizador: vaporizador sem divisão de fluxo;
- c) Coluna: 5 % fenilmetilsilicone (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm);
- d) Temperatura do injetor: 250°C;
- e) Temperatura do detector: 320°C;
- f) Temperatura da coluna: 150°C (10 min) $\xrightarrow{6^\circ\text{C}/\text{min}}$ 300°C (20 min);
- g) Volume Injetado: 2 μL ;
- h) Fluxo de Helio = 1,86 mL/min;
- i) Fluxo de H_2 = 30 mL/min;
- j) Fluxo de ar = 300 mL/min;
- k) Modo de injeção: sem divisão de fluxo.

As condições descritas acima são relativas ao cromatógrafo a gás modelo Shimadzu GC-2010 com detector por ionização em chama equipado com a respectiva coluna cromatográfica. Para outros equipamentos e/ou colunas cromatográficas devem ser efetuadas modificações segundo as necessidades operacionais.

6.6 – Confeção da curva analítica

A curva analítica deve ser preparada durante cada batelada de análise com três níveis de concentração, analisados em triplicata. A curva analítica será confeccionada através das soluções de trabalho P₁; P₂ e P₃, com concentrações nominais, respectivamente, de 2,5, 21 e 40 mg de DEHA por kg de etanol 95 % e 0,6, 5,3 e 10,0 mg de DEHP por kg de etanol 95 %.

6.6.1 – Preparo da solução estoque de DEHA

Medir em balança analítica calibrada (100 ± 10) mg de DEHA. Transferir quantitativamente para um balão de 50 mL calibrado. Solubilizar com quantidade apropriada de etanol 95 % e avolumar até a marca do balão. A solução estoque possui concentração nominal de 2000 mg L⁻¹, sendo necessário determinar sua concentração corrigida através da massa medida e do volume do balão contido no seu respectivo certificado de calibração. A solução estoque deve ser armazenada em geladeira.

6.6.2 - Preparo da solução estoque de DEHP

Medir em balança analítica calibrada (50 ± 5) mg de DEHP. Transferir quantitativamente para um balão de 100 mL calibrado. Solubilizar com quantidade apropriada de etanol 95 % e avolumar até a marca do balão. A solução estoque possui concentração nominal de 500 mg L⁻¹, sendo necessário determinar sua concentração corrigida através da massa medida e do volume do balão contido no seu respectivo certificado de calibração. A solução estoque deve ser armazenada em geladeira.

6.6.3 - Preparo da solução intermediária

Medir utilizando pipetas volumétricas de 25 mL calibradas, 25 mL das soluções estoques de DEHA e DEHP. Transferir para um balão volumétrico de 100 mL calibrado e avolumar a marca com etanol 95 %. As concentrações nominais dos plastificantes DEHA e DEHP na solução intermediária são 500 e 125 mg L⁻¹, respectivamente,

sendo necessário determinar sua concentração verdadeira através dos volumes das pipetas e do balão contidos nos seus respectivos certificados de calibração. As identificações das pipetas e do balão devem ser registradas no formulário de registros do ensaio.

6.6.4 – Preparo das soluções de trabalho

Medir utilizando bureta de 5 ou 10 mL calibrada, 0,2, 1,7 e 3,2 mL da solução intermediária. Transferir para balões de 50 mL calibrados e avolumar a marca com etanol 95 %. As concentrações nominais das soluções de trabalho são 2,5, 21 e 40 mg kg⁻¹ para o DEHA e 0,6, 5,3 e 10,0 mg kg⁻¹ para o DEHP, sendo necessário determinar suas concentrações verdadeiras através dos volumes da bureta e dos balões contidos nos seus respectivos certificados de calibração. As identificações da bureta e dos balões devem ser registradas no formulário de registros do ensaio.

6.7 – Verificação da curva analítica

6.7.1 – Preparo das soluções estoque de verificação da curva analítica

Preparar soluções estoque de DEHA e DEHP com aproximadamente 500 e 2000 mg L⁻¹, respectivamente, conforme itens 6.6.1 e 6.6.2. As soluções estoque de verificação da curva analítica devem ser preparadas através de padrões de DEHA e DEHP de lotes diferentes dos utilizados para o preparo das soluções estoque utilizadas no preparo das soluções de trabalho da curva analítica.

6.7.2 – Preparo da solução de verificação da curva analítica

Medir utilizando pipetas volumétricas de 1 mL calibradas, 1 mL das soluções estoque de verificação da curva analítica. Transferir para um balão de 100 mL calibrado e avolumar a marca com etanol 95 %. As concentrações nominais dos plastificantes DEHA e DEHP na solução de verificação da curva analítica são 25 e 6,2

mg kg¹, respectivamente, sendo necessário determinar suas concentrações corrigidas através dos volumes das pipetas e do balão contidos nos seus respectivos certificados de calibração. As identificações das pipetas e do balão devem ser registradas no formulário de registros do ensaio.

6.7.3 – Análise da solução de verificação da curva analítica

Analisar uma solução de verificação da curva analítica a cada batelada de análise (item 6.10), realizando três injeções da solução.

6.7.4 – Avaliação dos resultados

Determinar as concentrações médias de DEHA e DEHP na solução de verificação da curva analítica como descrito no item 6.11.1. Comparar, as concentrações experimentais determinadas através da curva com as concentrações corrigidas através dos volumes das alíquotas das soluções e do balão e calcular a diferença percentual. Para cada plastificante, a variação máxima entre as duas concentrações deve ser de 20%.

$$D(\%) = \frac{|C_{corr.} - C_{exp.}|}{C_{corr.}} \times 100$$

Onde:

$D(\%)$ = Diferença percentual entre as concentrações corrigida e experimental;

$C_{corr.}$ = Concentração corrigida;

$C_{exp.}$ = Concentração experimental.

6. 8 – Preparo da amostra

Munido de luvas cortar uma área de 1 dm² da amostra, com auxílio de bisturi, utilizando molde de 0,5 ou 1 dm² e transferir para um erlenmeyer com tampa. Adicionar cuidadosamente com o auxílio de uma bureta calibrada de 100 mL ou dispensador de líquidos de 100 mL, 100 mL de etanol 95 % em cada erlenmeyer. Acondicionar o sistema em estufa à 20 °C com uma tolerância de ± 2 °C, levando-se

em consideração a incerteza e o erro do termômetro, por 48 horas com uma tolerância de ± 30 minutos. Após esse período, homogeneizar a solução e retirar o filme do contato com o solvente simulante. Realizar três repetições do ensaio. Caso haja a necessidade de diluição das soluções proceder como descrito no item 6.9.

A leitura da temperatura da estufa deve ser medida através do termômetro digital externo, com capacidade de leitura de temperaturas máxima e mínima. As identificações do termômetro, da estufa, do molde e da bureta ou do dispensador de líquidos devem ser registradas no formulário de registros do ensaio.

6.9 – Diluição das amostras

Caso a concentração de DEHA ou DEHP de uma solução de migração proveniente da amostra se encontre acima da faixa de trabalho, diluir cada solução de maneira que a concentração final esteja a mais próxima possível do ponto médio da curva analítica. Realizar a diluição das soluções com o auxílio de pipetas volumétricas calibradas de volume apropriado e balões volumétricos calibrados de volume apropriado.

As identificações das pipetas e dos balões volumétricos utilizados devem ser registradas no formulário de registros do ensaio.

6.10 – Preparo da batelada de análise

Colocar em frascos de análise (vials) de vidro de 2 mL, as alíquotas das soluções a serem analisadas. Colocar no suporte do injetor automático do cromatógrafo a gás uma amostra em branco (etanol 95%) seguida dos frascos de análise contendo, na ordem:

- a) Alíquota da solução de trabalho P₁;
- b) Em qualquer ordem, as alíquotas das soluções de migração provenientes da amostra (três repetições agrupadas), as alíquotas do CQI (três repetições agrupadas), a alíquota da solução de trabalho P₂ e a alíquota da solução de verificação da curva analítica;
- c) Alíquota da solução de trabalho P₃.

Injetar 2µL de cada solução nas condições descritas no item 6.5. Medir as áreas dos picos correspondentes aos tempos de retenção do DEHA e do DEHP.

6.11 – Determinação da Migração de DEHA e DEHP em Alimentos Gordurosos, (mg kg⁻¹)

A quantificação dos plastificantes DEHA e DEHP em mg kg⁻¹ será feita por interpolação da área dos picos cromatográficos nas curvas analíticas.

6.11.1 – Cálculos dos parâmetros de regressão

$$A = bC(\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}) + a$$

Então, a concentração de migração dos plastificantes em mg kg⁻¹ de solvente simulante é:

$$C(\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}) = \frac{(A - a)}{b} \times \frac{100}{v_{\text{solv.}}}$$

Onde,

- C = Concentração do plastificante em mg kg⁻¹;
- A = Área do pico cromatográfico correspondente aos plastificantes;
- a = Interseção da equação da reta obtida pela curva analítica;
- b = Inclinação da equação da reta obtida pela curva analítica;
- $v_{\text{solv.}}$ = Volume de solvente simulante.

6.11.2 – Resultados

A migração final de cada plastificante é dada pela média das três repetições da amostra.

6.12 – Avaliação

A Resolução nº 17, de 17 de março de 2008 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabelece o limite de migração específica do adipato de di-(2-etil-

hexila) em 18 mg de DEHA por kg de solvente simulante. Para o ftalato de di-(2-etilhexila), o limite de migração específica estabelecido é de 1,5 mg de DEHP por kg de solvente simulante.

6.14 – Armazenamento das Amostras

As amostras devem ser armazenadas em temperatura ambiente.