

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Validação de uma câmara para exposição experimental a vapores pela via respiratória,  
pelo sistema "nose only exposure system"

Juliana do Carmo Molina

Araraquara

2011

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Validação de uma câmara para exposição experimental a vapores, pela via respiratória,  
pelo sistema "nose only exposure system"

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à

Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP –

Câmpus Araraquara, como parte dos requisitos

para obtenção do grau de Farmacêutico-Bioquímico

Área de atuação: Toxicologia

Nome da aluna: Juliana do Carmo Molina

Orientador: Prof. Dr. José Salvador Lepera

Araraquara

2011

## **Dedicatória**

Dedico este trabalho aos meus pais Wagner e Sonia, pelo esforço, confiança, dedicação e compreensão, em todos os momentos desta e de outras caminhadas.

Ao meu irmão, Rodrigo, pelo apoio, amor e carinho.

A todos meus amigos, que fizeram a diferença na minha vida, sempre me apoiando e me ajudando no que fosse preciso.

## **Agradecimento**

Ao Prof. Dr. José Salvador Lepera, não só pela orientação neste trabalho, mas também por sua amizade, paciência, confiança, dedicação e principalmente pelos ensinamentos, que não se limitaram apenas à Toxicologia e que me fizeram o ter não só como um exemplo de profissional, mas também como um exemplo de ser humano.

## Sumário

Resumo	i
Lista de figuras	ii
Lista de tabelas	iii
1. Introdução.....	1
2. Objetivos.....	5
3. Materiais e Métodos.....	6
4. Resultados.....	22
5. Discussão e conclusões.....	28
6. Referências Bibliográficas.....	30

## Resumo

Molina, J. C. **Validação de uma câmara para exposição experimental a vapores, pela via respiratória, pelo sistema "nose only exposure system"**. 2011. Monografia (graduação). Faculdade de ciências farmacêuticas – Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2011.

A exposição experimental a vapores de solventes pela via respiratória pode ser realizada em câmaras de dois tipos: a que expõe todo o animal por imersão na atmosfera experimental e aquela em que a exposição se dá apenas pelo nariz. O sistema para exposição apenas pelo nariz, denominado de NOES- Nose Only Exposure System, tem as vantagens de utilizar menos material, ter uma atmosfera continuamente renovada, produzir exposição mais uniforme entre os animais, ser mais facilmente controlado e evitar a penetração dos solventes por outras vias. A desvantagem está no fato na restrição do tempo do experimento por provocar estresse ao animal.

O projeto experimental consistiu na validação de uma câmara de exposição para ratos, do tipo NOES, dotada de 44 portas, através da avaliação da homogeneidade e da estabilidade das concentrações de voláteis na atmosfera a ser inalada, utilizando etanol combustível como agente químico para os testes. Os resultados indicaram que a variabilidade das concentrações entre os planos da câmara (portas da camada superior e inferior), entre portas de exposição e, também, entre as médias apuradas para cada tempo não diferem expressivamente entre si. Assim, pode-se considerar que o equipamento mostrou-se adequado para manter a homogeneidade e a estabilidade das concentrações durante as 6 horas de experimentação, para o etanol combustível.

## Lista de Figuras

Figura 1. Base da câmara.....	6
Figura 2. Câmara interna.....	7
Figura 3. Montagem do anel externo e trompetes.....	8
Figura 4. Montagem da câmara externa.....	9
Figura 5. Contentor e seu acoplamento ao sistema.....	10
Figura 6. Dispositivo gerador da atmosfera experimental.....	11
Figura 7. Câmara para exposição apenas pelo nariz completa.....	12
Figura 8. Localização da câmara na sala do biotério da disciplina de Toxicologia.....	13
Figura 9. Representação esquemática dos componentes da câmara de exposição a solventes.....	15
Figura 10. Diagrama da localização das portas de exposição ao redor da câmara.....	17
Figura 11. Conjunto montado para adsorção do etanol.....	20
Figura 12. Cromatograma da análise de etanol.....	22
Figura 13. Curva de calibração para determinação do etanol combustível no ar.....	23
Figura 14. Porcentagem de dessorção obtidos nos ensaios de dessorção do etanol combustível e respectivo valor médio para cada quantidade ensaiada.....	24

## **Lista de Tabelas**

Tabela 1. Posição do coletor , fluxo operacional, duração da coleta e volume coletado na primeira hora do ensaio.....	25
Tabela 2. Posição do coletor, fluxo operacional, duração da coleta e volume coletado na terceira hora do ensaio.....	25
Tabela 3. Posição do coletor , fluxo operacional, duração da coleta e volume coletado na sexta hora do ensaio.....	26
Tabela 4. Resultados da análise das concentrações de etanol nas portas da câmara de exposição (mg/m <sup>3</sup> ).....	27



## **1. Introdução**

A proposição de padrões para proteção da saúde pública tem uma longa história. A generalização do interesse no processo é, entretanto, recente, e segue par e passo as implicações econômicas do estabelecimento de um padrão (BATES, 1988).

As respostas humanas aos agentes tóxicos são, em geral, previstas em experimentos conduzidos em outras espécies. Evidentemente, além de diferenças óbvias como as de massa corpórea, de anatomia e de longevidade, há diferenças metabólicas cruciais entre espécies (consumo de oxigênio, necessidades de vitaminas e aminoácidos) além de diferenças em hábitos alimentares e de "estilo de vida". Porém, a despeito destas muitas diferenças, confrontamo-nos com a necessidade de extrapolar resultados experimentais obtidos em animais para o homem (BRAIN, 1998).

Para as substâncias às quais admite-se existir um limiar para a toxicidade, é derivado um Nível de Não Observação de Efeito Adverso (No Observed Adverse Effect Level - NOAEL) ou, quando isso não é possível, busca-se obter o menor nível em que o efeito adverso é observado (Lowest Observed Adverse Effect Level - LOAEL). Define-se NOAEL como a maior concentração ou quantidade da substância, com base experimental ou observacional, que não causa uma alteração adversa na morfologia, na capacidade funcional, no crescimento, no desenvolvimento ou longevidade do organismo alvo, sob condições definidas de exposição (WHO, 1994).

Existem três vias principais através das quais uma pessoa pode entrar em contato com um agente químico: a superfície corpórea (exposição dérmica), a deglutição após o contato com a cavidade oral (exposição oral) e a introdução com a respiração para os pulmões, através do nariz ou boca.

Cada via de exposição pode e contribui para a quantidade total e para a forma do agente que chega ao sistema biológico. Devido ao fato de que os pulmões formam uma ligação estreita entre o suprimento de sangue do corpo e o ambiente externo, a compreensão dos fatores que podem modificar a função ou a integridade pulmonar é de grande relevância para o toxicologista (KENNEDY & VALENTINE, 1994).

As bases da teoria de absorção e eliminação de compostos voláteis pela via pulmonar foram estabelecidas no final do século XIX. As transferências recíprocas de gases e vapores entre o sangue, o ar alveolar e os tecidos foram explicadas com os princípios da lei de Henry, utilizando-se os coeficientes de partição ar/sangue e sangue/tecidos para descrever os equilíbrios (FISEROVA-BERGEROVA, 1985). A velocidade com que o equilíbrio é atingido depende do débito cardíaco, da ventilação pulmonar, da solubilidade do agente nos tecidos, da difusão através da membrana alvéolo-capilar e da circulação sanguínea pelos pulmões e outros órgãos (ASTRAND, 1975).

Nos casos em que a exposição ao agente químico pelas vias inalatória ou dérmica não puder ser excluída, os estudos de toxicidade pelas vias específicas deve ser considerado para prevenir estimativas inadequadas de risco para humanos (RENNEN et al.,2004). O principal aspecto da toxicidade inalatória é a dose, porque a dose inalada é mais difícil de determinar do que dose por outras vias de exposição. Ainda, a extrapolação de uma via para outra é sujeita a erros expressivos (HOSKIN et al.,1997; PAULUHM, 2003).

Agências internacionais, como a "Organization for Economic Co-Operation and Development" (OECD), têm proposto que as agências regulatórias dos países implementem guias para a condução de testes de toxicidade. Além do objetivo de

uniformizar procedimentos, de modo que os dados obtidos em protocolos padronizados possam ser comparados, frequentemente se introduzem refinamentos metodológicos visando a redução do número de animais nos testes e a diminuição do estresse e do sofrimento dos mesmos (OECD 1981, 2002).

### **1.1.Sistemas de exposição por via respiratória**

Os sistemas de exposição por inalação envolvem a harmoniosa integração de diversos subsistemas, cujo delineamento e construção são críticos para um sistema que seja operacional (KENNEDY / VALENTINE, 1994). Uma câmara pode ser construída de acordo com o modo de exposição pretendido. O animal pode ser colocado dentro da atmosfera experimental, expondo o corpo todo em câmaras do tipo "whole body", ou a exposição pode ser feita apenas pelo nariz, em câmaras do tipo "nose only exposure system".

Na exposição do tipo "whole body", através da imersão do animal na atmosfera experimental, são apontados alguns inconvenientes relacionados ao processo e também ao comportamento do animal. Para mencionar alguns, em relação ao processo, é necessário gerar e manter constante um grande volume de atmosfera experimental o que, dependendo do agente ou da mistura de agentes em teste, constitui grande dificuldade, inclusive de custo operacional, e o processo não garante exposição apenas respiratória. Em relação ao comportamento do animal, a tendência de se aglomerarem dificulta a garantia de exposição equivalente a todos ou exige câmaras individuais. A aversão do animal à atmosfera em teste fará com que procure restringir o incômodo enfiando o nariz entre os pelos ou ainda, o comportamento de auto limpeza, que pode introduzir contribuição expressiva da via digestória na introdução do agente (KENNEDY / VALENTINE, 1994; HOSKIN et al.,1997; PAULUHM, 2003).

No sistema NOES o animal é exposto a uma atmosfera continuamente renovada, evitando a reinalação e, graças ao arranjo físico do sistema, praticamente elimina-se a possibilidade de introdução da substância no organismo do animal por via não respiratória (HOSKIN et al.,1997; PAULUHM, 2003a)

## **2. Objetivos**

O presente projeto é experimental e consiste na validação de uma câmara de exposição para ratos, do tipo “Nose Only Exposure System” (NOES), dotada de 44 portas, através da avaliação da homogeneidade e da estabilidade das concentrações de voláteis na atmosfera a ser inalada, utilizando álcool combustível como agente químico de teste.

Os objetivos específicos incluem:

1. Avaliação da homogeneidade feita através da monitorização das concentrações em quatro portas de exposição não contíguas e não coplanares;
2. Avaliação da estabilidade feita por monitorização das concentrações por 6 horas com amostras distribuídas em quatro portas não contínuas e não coplanares, e em intervalos regulares com duração mínima de 15 minutos, durante seis horas de funcionamento do sistema.

### 3. Materiais e métodos

#### 3.1. Montagem da Câmara

A câmara de exposição validada no presente trabalho foi construída por usinagem de peças de aço inoxidável e será descrita com o auxílio de uma sequência de fotografias para facilitar a apresentação, de modo a mostrar cada componente do sistema e a sua montagem progressiva, formando o equipamento e seus acessórios.

A base da câmara é constituída por um disco com uma abertura central e duas ranhuras concêntricas onde se apoiam os anéis que formam a câmara interna e externa do equipamento.



Figura 1. Base da câmara em que se vê o orifício central (1) para entrada da atmosfera experimental e duas ranhuras concêntricas (2 e 3) onde se encaixam os anéis que formarão a câmara interna e externa.

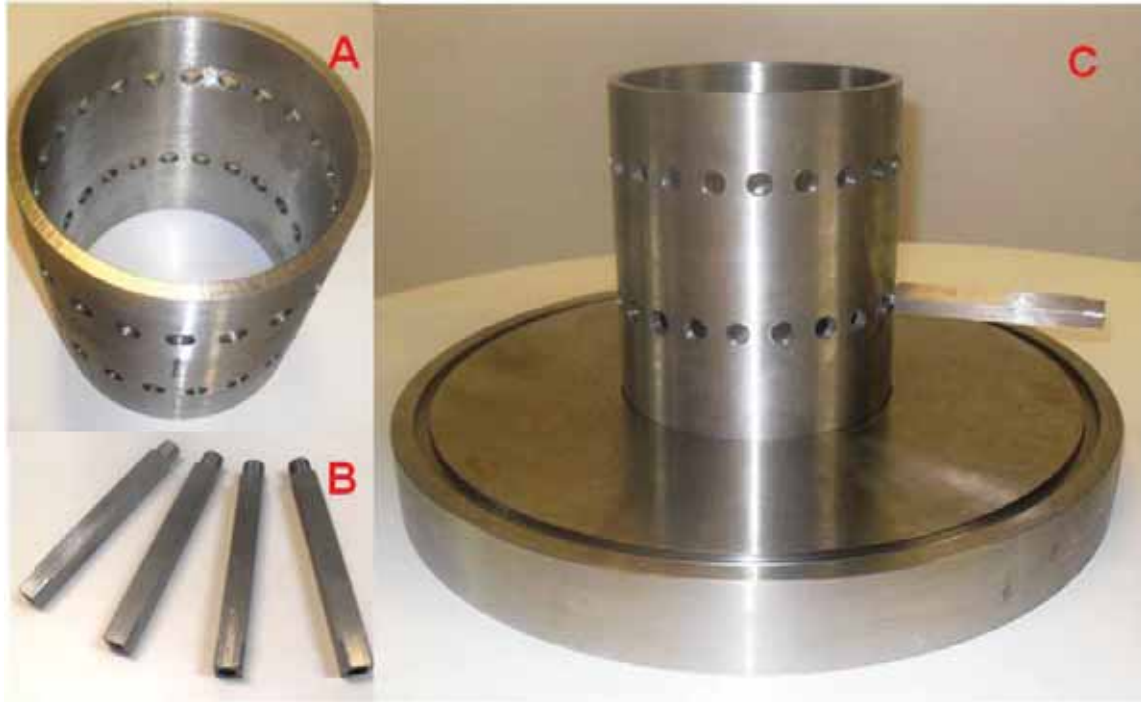


Figura 2. Câmara interna, onde se conectam os trompetes de distribuição da atmosfera em estudo para as portas de exposição. A) câmara interna, B) trompetes, C) câmara interna com um trompete conectado, em sua posição sobre a base do dispositivo.

A câmara interna recebe a atmosfera experimental, que ingressa pelo orifício central, em sentido ascendente, e a distribui através de trompetes que dela partem radialmente em direção às portas de exposição afixadas no anel externo.



Figura 3. Montagem do anel externo e trompetes - A) Vista do anel externo, com as portas de exposição, sobre a base B) montagem dos trompetes que distribuem a atmosfera para as portas de exposição C) vista interna das câmaras concêntricas D) montagem completa dos componentes internos





Figura 4. Montagem da câmara externa: O anel externo, com sua tampa, forma a câmara externa que faz a exaustão da atmosfera não inalada pelos animais e do ar que exalam, através de aspiração por uma abertura central na tampa da câmara do equipamento.

A cada porta de exposição é acoplado um contentor que posiciona o animal para que seja exposto apenas pelo nariz. O contentor cilíndrico tem a ponta em aço inox, com um furo central para exposição do nariz e os anéis para acoplamento na câmara. O corpo do contentor é de acrílico, assim como a tampa posterior deslizante, para permitir ajuste ao tamanho do animal, como mostra a Figura 5.



Figura 5. Contentor e seu acoplamento ao sistema. A) corpo do contentor em que se vê o acoplamento metálico, uma ranhura superior para ajustar a tampa posterior ao tamanho do animal e permitir acesso ao seu dorso, e uma abertura inferior para escoar fezes e urina durante a exposição. B) detalhe do acoplamento do contentor à câmara, C) detalhe da tampa de acrílico com a trava para fixar o seu posicionamento e uma ranhura na parte oposta para exteriorizar a cauda do animal permitindo a termorregulação e evitando a sua rotação dentro do contentor. D) Detalhe da parte do contentor que se acopla à câmara. E) detalhe da porta de exposição

A geração da atmosfera experimental é feita em fluxo contínuo através de um dispositivo também construído artesanalmente. Um fluxo de ar comprimido é dividido em duas correntes. A primeira vai para um borbulhador com água deionizada para restaurar-lhe a umidade e a segunda recebe um fluxo controlado do solvente, sendo a seguir recombinados e turbilhoados por estreitamento do tubo que conduz a mistura para ingressar na câmara de exposição. O estreitamento é feito de modo a produzir número de Reynolds superior a 2500, transformando o fluxo laminar em turbilhoados.

A Figura 6 representa o sistema de geração de atmosferas e uma breve descrição de seus componentes.

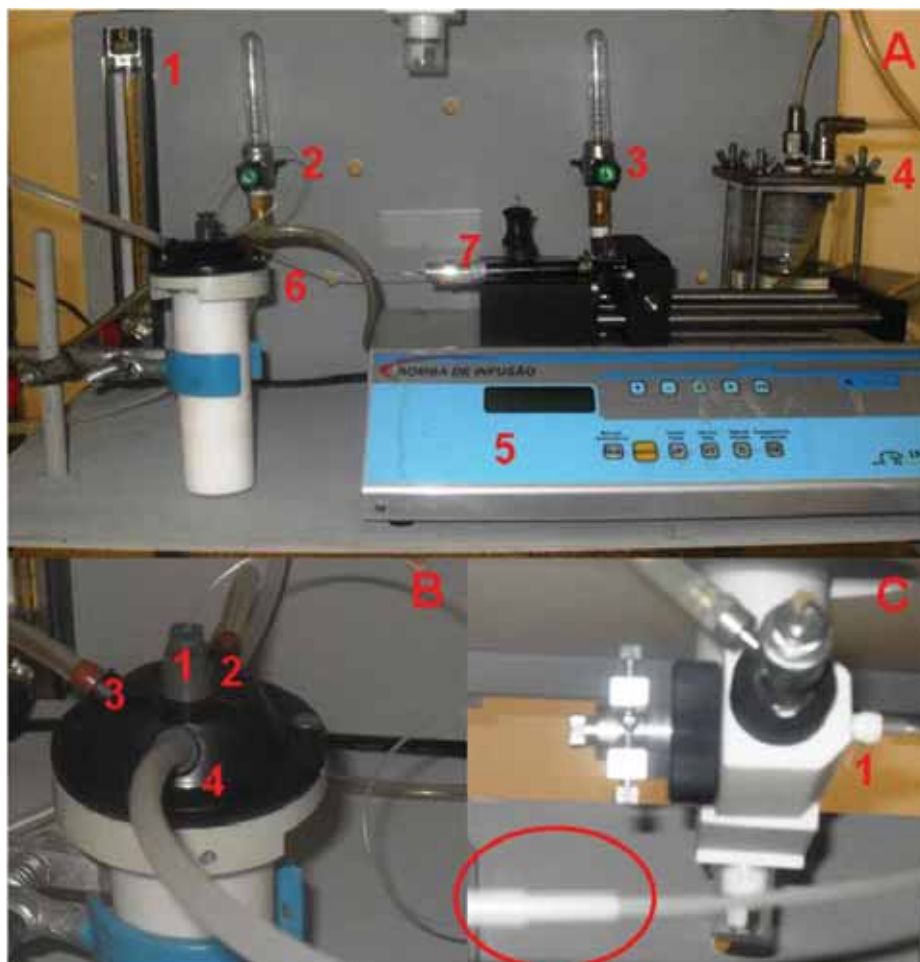


Figura 6. Dispositivo gerador da atmosfera experimental. A) O ar comprimido entra pelo rotâmetro principal (1) e é dividido para os rotômetros secundários (2) e (3) que dirigem parte do fluxo principal para o borbulhador umidificador do ar (4) e parte para o dispositivo onde recebe o solvente (6), o qual é bombeado continuamente por um bomba de infusão (5), usando uma seringa “gas-tight” (7). B) detalhe da tampa do dispositivo gerador da atmosfera: (1) capilar que traz o solvente, (2) entrada de ar seco, (3) entrada de ar úmido e (4) saída da mistura. C) entrada na câmara de exposição (1) e, no detalhe circundado em vermelho, o estreitamento do tubo para forçar o turbilhonamento e homogeneizar a mistura solvente -ar.

Na fotografia a seguir (Figura 7) pode ser observada uma vista lateral da câmara completamente montada. A peça no centro da tampa é a saída para exaustão, a qual é controlada por uma bomba aspirante de vazão programável em função do fluxo que ingressa, de modo a evitar pressões positivas ou negativas no interior do sistema. A câmara possui 44 portas e capacidade para até 42 animais, considerando a reserva de, no mínimo, duas portas para monitorização da atmosfera experimental.



Figura 7. Câmara para exposição apenas pelo nariz completa.

Na Figura 8 apresentamos uma fotografia do equipamento em sua locação. Ele foi instalado em uma sala de aproximadamente 14 m<sup>2</sup>, contígua ao biotério da disciplina de Toxicologia do Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP. A sala é dotada de climatização própria, permitindo condições adequadas para que os animais façam a termorregulação.



Figura 8. Localização da câmara na sala do biotério da disciplina de Toxicologia

## 3.2. Materiais

### 3.2.1. Equipamentos

- Cromatógrafo GC-500 (Instrumentos Científicos CG, São Paulo), equipado com coluna empacotada Carbowax 20M 5% sobre Chromossorb WHP, 1,8m e 1/8” diâmetro (Instrumentos Científicos CG, São Paulo).
- Bombas de amostragem microprocessadas modelo 224-PCXR7 (SKC<sup>®</sup> Inc, Eighty Four, PA, USA,).
- Tubos de carvão ativo 100X50 mg ( Anasorb SKC<sup>®</sup> Inc, Eighty Four, PA, USA, lote 2000)
- Termoigrômetro digital modelo NEW 11-661-14 (Control Company, Friendswood, TX, USA)
- bomba de infusão digital programável (Insight, Ribeirão Preto, S.P., Brasil).
- Seringas “gas-tight” 10ml (Hamilton, Reno, NV, USA)

### 3.2.2. Reagentes

- Etanol combustível - adquirido de revendedor da Petrobras distribuidora, no município de Araraquara
- Dissulfeto de Carbono foi obtido da Riedel de Haen (Seelze, Germany)
- Álcool n-butílico da Merck (Rio de Janeiro, Brasil)

### 3.3. Métodos

#### 3.3.1. Controle da umidade relativa do ar (URA)

O diagrama da Figura 9 representa o circuito do fluxo de ar filtrado no equipamento, a partir do rotâmetro de entrada (fonte).

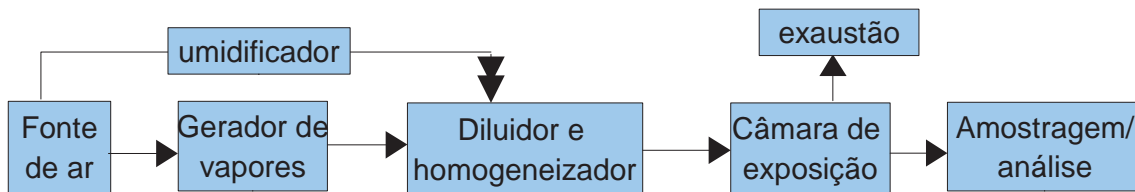


Figura 9. Representação esquemática dos componentes da câmara de exposição a solventes

A umidade relativa do ar foi ajustada por mistura de dois fluxos de ar, divididos após o rotâmetro de entrada do sistema. O primeiro, proveniente do filtro de ar comprimido e, portanto, com baixa umidade, e o segundo, uma derivação que passa por um micro borbulhador de plástico sintetizado, imerso em recipiente contendo água deionizada. As proporções são controladas por fluxômetros individuais, permitindo umidade máxima equivalente ao ar umidificado por borbulhamento em água e mínima equivalente à presente no fluxo de ar comprimido, de modo a proporcionar URA entre 65 e 70%. As medições são feitas na entrada da câmara utilizando um termoigrômetro digital.

### 3.3.2. Controle da concentração na câmara

A concentração nominal, isto é, a massa de solvente injetada por volume de ar e pelo tempo, é obtida por ajuste do fluxo total de ar e da velocidade de injeção do solvente no fluxo. O fluxo de ar é determinado por ajuste do rotâmetro de entrada, cuja calibração foi feita utilizando um fluxímetro de bolha.

O fluxo mínimo para a câmara completamente ocupada é determinado considerando que o rato albino apresenta um volume respiratório de 750 mL por quilograma de peso e por minuto (MAUDERLAY, 1986). Assim, 1 rato de 250 g necessita do fornecimento de 187,5 mL por minuto, o que representa 8,25 L/min para a câmara completamente ocupada por 44 animais.

O solvente foi injetado em velocidade constante, diretamente no fluxo de ar, utilizando bomba de infusão contínua acoplada a uma seringa “gas-tight”. A taxa de infusão (TI) foi calculada pela equação:

$$TI (\mu\text{L}/\text{min}) = F \cdot \text{fluxo de ar (LPM)} / 1000, \text{ onde}$$

- F= concentração (mg/m<sup>3</sup>)/densidade do etanol
- LPM= litros por minuto

A homogeneização é obtida por turbilhonamento, introduzindo o fluxo em tubo de dimensões apropriadas para obter n° Reynolds mínimo de 2000 (PORTO et al., 2001).



### 3.3.3. Procedimentos para amostragem

Para estimar a concentração do solvente na atmosfera experimental foi usado um procedimento indicado para essa finalidade em higiene ocupacional. As amostras foram coletadas em tubos de carvão ativo com 100 mg de material para coleta e 50 mg como “back-up”, para controle de saturação (ref. 226.01, SKC<sup>®</sup> Inc, Eighty Four, PA, USA.), com bombas de amostragem pré-calibradas e dotadas de controle microprocessado de vazão (LEPERA & COLACIOPPO, 2002).

Os meios de coleta foram posicionados nos contentores da câmara de exposição, de maneira similar ao nariz dos animais.

Para verificação das flutuações de concentração da atmosfera experimental entre as portas de exposição (homogeneidade) e ao longo do tempo, durante um ciclo de exposição de seis horas (estabilidade), foram coletadas amostras de 15 minutos na primeira, terceira e sexta horas de funcionamento da câmara. As amostras foram coletadas como indicado no diagrama da Figura 10, em duas portas diametralmente opostas para cada um dos dois planos da câmara (superior e inferior) em que se acoplam os contentores para os animais, de modo a possibilitar a identificação da eventual formação de gradientes de concentração, tanto no plano horizontal quanto no vertical.

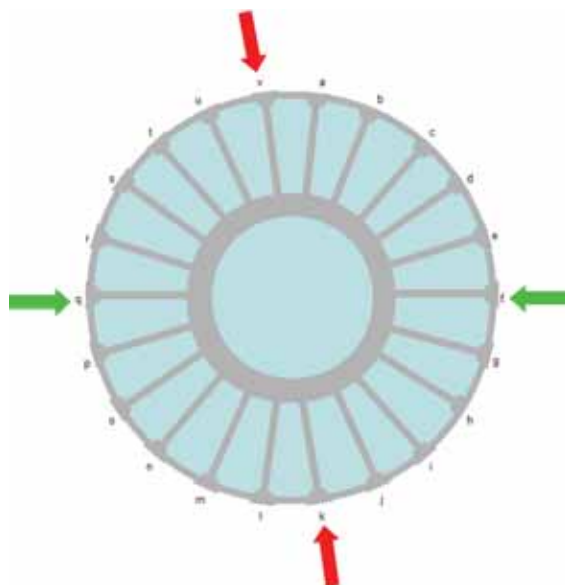


Figura 10. Diagrama da localização das portas de exposição ao redor da câmara, idênticos no plano inferior e superior. As setas verdes indicam as portas amostradas no plano inferior e as vermelhas no plano superior

Condições de coleta:

- vazão das bombas ajustadas para valores ao redor de 100mL/min
- duração da amostragem: 15 minutos
- coletas realizadas aos 40, 200 e 330 minutos

### 3.3.4. Análise das amostras coletadas

- Curva de calibração

Em “vials” de 3 mL dotados de tampas de rosca com septo teflonado foi adicionado 1mL de dissulfeto de carbono contendo 2 $\mu$ L de n-butanol (como padrão interno), e volumes de etanol combustível de 0 $\mu$ L, 1 $\mu$ L, 2 $\mu$ L, 4 $\mu$ L e 8 $\mu$ L, em triplicata, para construção da curva de calibração. Na padronização foi utilizada uma alíquota de etanol combustível adquirida em lote suficiente para os experimentos a serem executados futuramente, na exposição dos animais. As massas correspondentes de etanol combustível foram calculadas considerando a densidade do etanol combustível 0,800 g/mL, face o especificado pela Agência Nacional do Petróleo pela resolução 23 de 2 de maio de 2011 que determina que a densidade do etanol hidratado esteja entre 0,7964 e 0,8027 g/mL.

As análises foram realizadas injetando-se 1 $\mu$ L de cada solução padrão nas seguintes condições: Temperatura da coluna 120°C, Temperatura do vaporizador: 200°C e Temperatura do injetor: 220°C

A precisão da calibração foi calculada pelo coeficiente de variação ponderado ponto a ponto, em todo o intervalo de calibração através da seguinte expressão:

$$\overline{CV} = \left[ \frac{\sum_{i=1}^n f_i (CV_i)^2}{\sum_{i=1}^n f_i} \right]^{1/2}$$

onde: CV= coeficiente de variação ponderado para a curva

$i$  = índice usado para as 4 concentrações usadas na calibração

$f_i$  = graus de liberdade (replicadas menos 1 para cada ponto)

$CV_i$  = CV observado para a concentração  $i$

- Determinação dos coeficientes de dessorção para o etanol combustível

Os ensaios foram realizados como proposto por LEPERA & COLACIOPPO, 2002.

Brevemente, os passos do processo foram:

a- foram conectados tubos adsorventes de coleta a tubos de vidro silanizados de 2 x 0,7cm (comprimento x diâmetro externo) contendo cerca de 50 mg de lã de vidro também silanizada. O conjunto foi conectado a uma bomba amostradora calibrada para operar a 100 ml/min, conforme mostra a Figura 11.

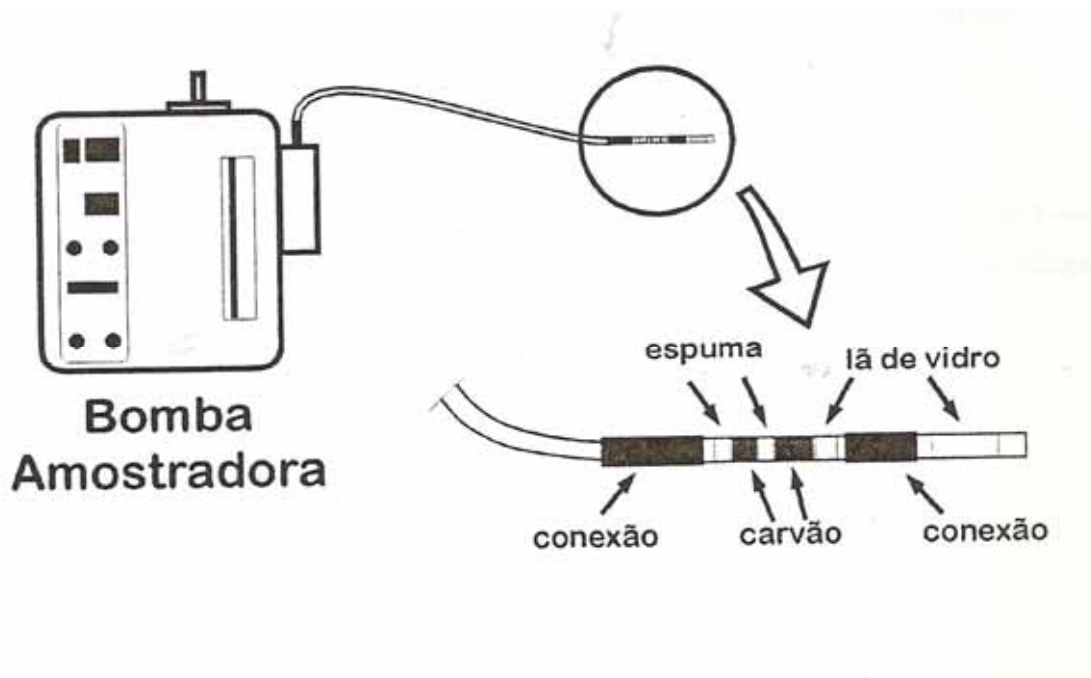


Figura 11. Conjunto montado para adsorção do etanol

b- Com a bomba em funcionamento, foram injetados volumes de 1, 2, 4 e 8 microlitros de etanol combustível, correspondentes ao da lã de vidro silanizada. Após duas horas de funcionamento das bombas, os tubos de carvão com a lã de vidro foram desconectados, selados com tampas apropriadas e mantidos à temperatura ambiente por 12 horas antes da análise. Os ensaios foram realizados em duplicata para cada volume de etanol.

c. Para análise, a porção frontal do carvão ativo e a lã de vidro que recebeu o etanol foram dessorvidos em separado em 1 mL de dissulfeto de carbono contendo 2 microlitros de n-butanol, por no mínimo 30 minutos, e foram analisados nas mesmas condições das amostras e padrões.

d- A dessorção foi calculada pela equação:

$$D(\%) = \frac{\text{massa recuperada do amostrador}}{\text{massa injetada} - \text{massa recuperada da lã de vidro}} \times 100$$

- Análise das amostras

As amostras foram analisadas como os padrões, após dessorção da porção frontal do meio de coleta (100 mg) durante 30 minutos em 1 mL de dissulfeto de carbono contendo 2 $\mu$ L de n-butanol. A quantidade de etanol obtida pela calibração foi corrigida pelo coeficiente de dessorção, usando uma regra de três simples.

## 4. Resultados

### 4.1. Determinação do etanol no ar.

A Figura 12 mostra os cromatogramas obtidos com a injeção do branco (CS<sub>2</sub>/n-butanol) e de um padrão de 1 µL de etanol, nas condições indicadas.

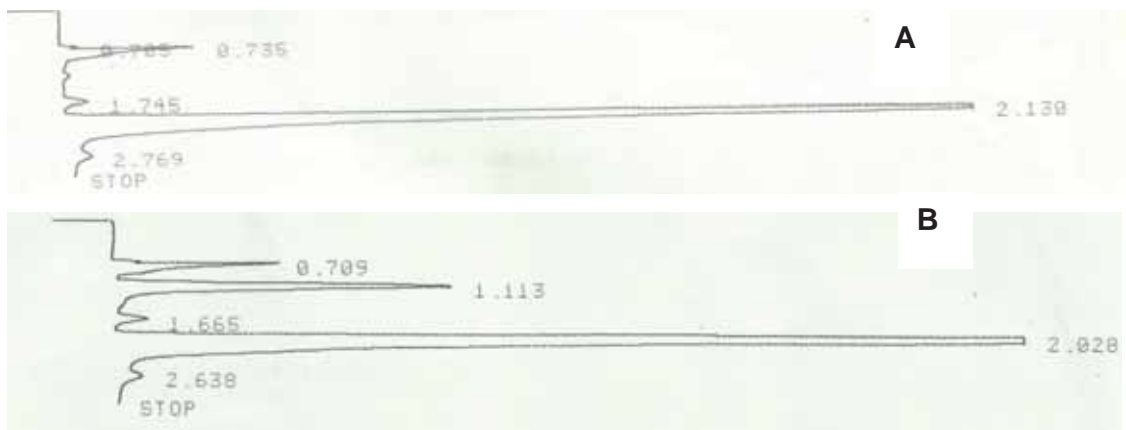


Figura 12. Cromatograma da análise de etanol. A = branco. B = 1 µL de etanol - Os picos com retenção 0,705; 1,113 e 2,028 minutos correspondem, respectivamente, ao dissulfeto de carbono, etanol e n-butanol, e os picos com retenção 1,665 e 2,638 correspondem a substâncias não identificadas presentes no padrão interno.

### 4.2. Curva de calibração

A calibração resultou na equação de regressão  $y = 0,1517 x + 0,0247$ ,  $R^2 = 0,9970$  e com precisão ponderada ponto a ponto de 4,31%.

A representação da curva de calibração está na Figura 13.

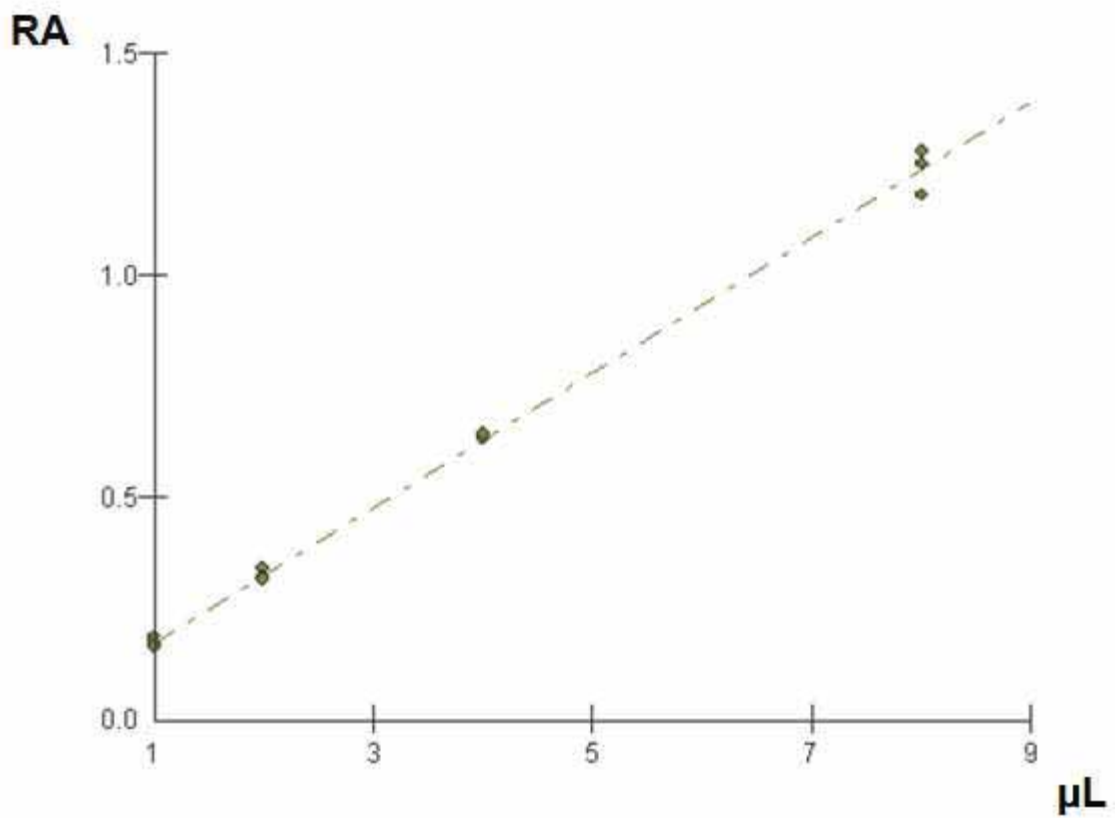


Figura 13. Curva de calibração para determinação do etanol combustível no ar ( $y=0,1517x + 0,0247$ ,  $R^2=0,9970$ ).

### 4.3. Determinação do coeficiente de dessorção do etanol

Os resultados dos ensaios de dessorção estão representados na Figura 14.

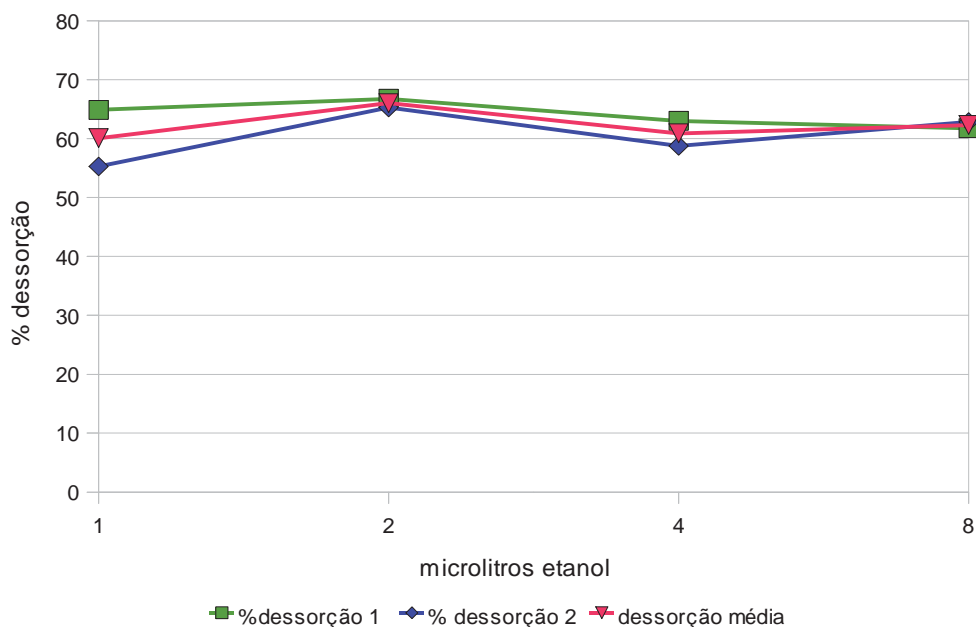


Figura 14. Porcentagem de dessorção obtidos nos ensaios de dessorção do etanol combustível e respectivo valor médio para cada quantidade ensaiada.

### 4.4. Estudo da homogeneidade e da estabilidade das concentrações

Para os ensaios de homogeneidade e estabilidade das concentrações de etanol nas portas da câmara de exposição, foi realizado um ensaio com as seguintes características operacionais para o sistema:

- o entrada de ar (medida após o rotâmetro de entrada: 8,467 LPM)
- o taxa de infusão do etanol: 39,88 microlitros por minuto



As tabelas 1 a 3 mostram as características das amostras coletadas durante o ensaio.

Tabela 1: Posição do coletor , fluxo operacional, duração da coleta e volume coletado na primeira hora do ensaio

Bomba	Fluxo mL/min	Tempo coleta	Volume coletado
Inferior	82,162	16min	1,31L
Inferior	82,766	15min	1,24L
Superior	92,402	12min	1,11L
Superior	82,162	15min	1,23L

Tabela 2: Posição do coletor , fluxo operacional, duração da coleta e volume coletado na terceira hora do ensaio

Bomba	Fluxo (ml/min)	Tempo coleta	Volume coletado
Inferior	82,162	15min	1,23L
Inferior	82,162	15min	1,23L
Superior	82,766	15min	1,24L
Superior	82,766	15min	1,24L

Tabela 3: Posição do coletor , fluxo operacional, duração da coleta e volume coletado na sexta hora do ensaio

Bomba	Fluxo mL/min	Tempo coleta	Volume coletado
Inferior	82,162	15min	1,23L
Inferior	92,072	15min	1,38L
Superior	82,766	15min	1,24L
Superior	82,766	15min	1,24L

A tabela 4 mostra os resultados individuais obtidos nas amostragens realizadas, para a concentração pretendida de 3.768,5 mg/m<sup>3</sup>, equivalentes a duas vezes o Limite de Exposição Ocupacional para o etanol.

TABELA 4: Resultados da análise das concentrações de etanol nas portas da câmara de exposição (mg/m<sup>3</sup>)

	40 minutos		200 minutos		330 minutos
	inferior	superior	inferior	superior	inferior
Amostra 1	3.694,8	3864,6	3623,1	3514,7	3720
Amostra 2	3.797,3	3785,3	3809,4	3818,1	3853
Média	3785,44		3691,36		3778,33
Desvio-padrão	69,8		148,16		50,17
CV (%)	1,8		4,01		1,32

## 5. Discussão e Conclusões

O Cromatograma da análise de etanol extraído com dissulfeto de carbono, usando n-butanol como padrão interno mostra separação adequada dos picos para a utilização pretendida para o método.

A calibração, no intervalo testado, mostrou-se satisfatória para referenciar a quantificação do etanol em amostras de ar, com linearidade aparentemente satisfatória.

Nos ensaios de validação, considerando todas as amostras, as médias, desvios-padrão e coeficientes de variação (%) foram  $3.749,63 \pm 85,34 \text{ mg/m}^3$ ,  $CV=2,28\%$  para as portas do plano inferior e de  $3.748,83 \pm 123,34 \text{ mg/m}^3$ ,  $CV= 3,29\%$  para as portas do plano superior. As médias e desvios-padrão geométricos foram  $3.748,79 \times / 1.0231 \text{ mg/m}^3$  para as portas do plano inferior da câmara e  $3.752,10 \times / 1,0342 \text{ mg/m}^3$  para as portas do plano superior.

A comparação da média obtida com as amostras coletadas no plano superior com aquela obtida para o plano inferior resultou  $t= -0,0973$ ,  $p=0,9263$ , indicando que não se forma gradiente de concentração no plano vertical da câmara.

A comparação entre as médias das concentrações de álcool nas amostras coletadas aos 40, 200 e 330 minutos resultaram em  $t= 1,067$ ,  $p=0,364$  para 40 vs 200 minutos,  $t=0,2464$ ,  $p=0,8212$  para 40 vs 330 minutos e  $t=1,202$ ,  $p= 0,3155$  para 200 vs 330 minutos, apontando que as diferenças entre médias não são significativas.

Assim, considerando que os coeficientes de variação apurados indicam que a variabilidade das concentrações entre os planos da câmara (portas da camada superior e inferior) e entre portas de exposição e, também, que as médias apuradas para cada

tempo não diferem expressivamente entre si, pode-se considerar que o equipamento mostrou-se adequado para manter a homogeneidade e a estabilidade das concentrações durante as 6 horas de experimento, para o etanol combustível.

## 6. Referências Bibliográficas

1. ASTRAND, I. Uptake of solvents in the blood and tissues of man. A review. *Scand. J. Work Environ. Health*. v. 1, p. 199-218, 1975.
2. BATES, D.V. Standard-Setting as an integrative exercise: alchemy, juggling, or science?. In MOHR, U. ed. *Inhalation Toxicology*. New York: Springer Verlag, 1988. p.1-10.
3. BRAIN, J.D. Species differences in inhalation toxicology: Variations in exposure-dose relationships and macrophage function. In MOHR, U. ed. *Inhalation Toxicology*. New York: Springer Verlag, 1988. p.11-24.
4. BRASIL. Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. Resolução Nº 23 de 2 de maio de 2011. *Diário Oficial da União*, 83: Seção I, p. 52, 3/5/2011. Disponível em:  
<http://www.in.gov.br/imprensa/visualiza/index.jsp?jornal=1&pagina=52&data=03/05/2011>. Acesso em 26/09/2011.
5. FISEROVA-BERGEROVA, V. Toxicokinetics of organic solvents. *Scand. J. Work Environ. Health*. v. 11 (suppl. 1), p. 7-21, 1985.
6. HOSKINS, J.A. et al. The construction and validation of a high containment nose-only rodent inhalation facility. *Ann. Occup. Hyg.* V. 41, p 51-61, 1997.
7. KENNEDY, G.L.Jr.; VALENTINE, R. *Inhalation Toxicology*. In. Hayes, A.W. ed. *Principles and methods in Toxicology*. New York: Raven Press, 1994. p.805-38.
8. LEPERA, J.S., COLACIOPPO, S. Rapid determination of desorption efficiency and analysis of solvent mixtures for occupational exposure studies. *Chromatographia*, v. 55, p. 463-66, 2002.

9. MAUDERLAY, J.L. Respiration of F-344 rats in nose-only inhalation exposure tubes. *J. Appl. Pharmacol.* v.6, p. 25-30, 1986.
10. OECD - Guideline for testing of chemicals. N° 403: Acute inhalation toxicity. Organisation for Economic Co-operation and Development. Paris, 1981. 14p.
11. OECD - Proposal for a new guideline N° 433: Acute inhalation toxicity - Fixed concentration procedure. Organization for Economic Co-operation and Development. Paris, 2002. 23p. Disponível em: <http://www.oecd.org>. Acesso em 10/07/2011.
12. PAULUHN, J. Issues of dosimetry in inhalation toxicity. *Toxicol Letters* v. 140-141, p. 229-38, 2003.
13. PAULUHN, J. Overview of testing methods used in inhalation toxicity: from facts to artifacts. *Toxicol Letters*, v. 140-141, p. 183-93, 2003.
14. PORTO, A.V.L. et al. FLUIDOS. Apostila - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2001. 33p.
15. RENNEN, M.A.J. et al Oral-to-inhalation route extrapolation in occupational health risk assessment: a critical assessment. *Reg. Toxicol. Pharmacol.* v.39, p. 5-11, 2004.
16. WHO- IPCS - Assessing human health risks of chemicals: derivation of guidance values for health-based exposure limits. (Environmental Health Criteria 170) 1994. World Health Organization, Geneva, 1994. Disponível em <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc170.htm>. Acesso em 25 de agosto de 2011.