

O ENFOQUE DA METROLOGIA QUÍMICA EM ANÁLISES TOXICOLÓGICAS NA ATIVIDADE TURFÍSTICA: VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE CAFEÍNA EM MATRIZES BIOLÓGICAS

India Maria H. de Lima

Laboratório Antidoping do Jockey Club Brasileiro, 22431-000 Rio de Janeiro - RJ, Brasil

Maurício N. Frota*

Departamento de Pós-Graduação em Metrologia para Qualidade e Inovação, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, 22453-900 Rio de Janeiro - RJ, Brasil

Recebido em 1/8/06; aceito em 11/5/07; publicado na web em 25/10/07

THE CHEMICAL METROLOGY APPROACH FOR TOXICOLOGICAL ANALYSIS IN HORSERACING: VALIDATION OF AN ANALYTICAL METHOD FOR THE DETERMINATION OF CAFFEINE IN BIOLOGICAL MATRICES. This paper proposes an alternate method to detect forbidden doping substances present in biological matrices of horseracing. The method was fully validated for caffeine, identified as the most frequent forbidden substance in the analysis conducted by the Antidoping Laboratory of the Brazilian Jockey Club, which adopts a zero threshold limit according to national and international horseracing practices. The metrological reliability of the method applied to toxicological analysis in biological matrices is discussed. Although the analytical method proposed for detection of a zero threshold level of the doping substance is qualitative, it was validated for the determination of the limiting value (also known as quantification limit value) introducing a criterion that prevents the issuing of incorrect results ("false-positives" and "false-negatives").

Keywords: metrological reliability; toxicological analysis; CG-MS.

INTRODUÇÃO

A confiabilidade laboratorial relacionada à atividade turfística tem merecido a atenção de estudiosos¹⁻⁴ pelo seu crescente interesse como desporto e pelo impacto econômico que dela resulta. Podendo afetar a vida de pessoas e animais, o turfe inter-relaciona criadores de cavalos de raça de elevado valor comercial, apostadores, industriais do ramo, veterinários, treinadores, todos que, de uma forma ou outra, dependem de confiabilidade das medições e das análises químicas que resultam dessa atividade. Análises toxicológicas, inclusive ensaios "antidoping", permitem avaliar a saúde dos animais e a lisura de competições, que também envolvem aspectos econômicos e éticos. Se por um lado a aplicação de drogas específicas a cavalos de corrida pode alterar de forma surpreendente o seu desempenho, por outro, pode levá-los à falência, colocando em risco não apenas a vida dos animais mas, também, a do atleta que o conduz (jôquei)⁵. Seja pelo aspecto ético, pela saúde dos animais e por aspectos econômicos envolvidos nas carreiras de cavalo, a confiabilidade metrológica das medições realizadas e a credibilidade dos serviços prestados pelos laboratórios de jôqueis clubes cada vez mais são levados em consideração, tendo em vista constituírem-se em fatores importantes que já não podem mais ser desprezados. Por esses motivos, a atividade laboratorial neste segmento tem se constituído em objeto de estudo e pesquisa, motivando organizações internacionais ligadas à acreditação desta atividade a desenvolver procedimentos específicos para regulamentá-la^{6,7}.

O trabalho de rotina desenvolvido no Laboratório Antidoping (LAD) do Jockey Club Brasileiro (JCB) consiste no rastreamento de substâncias controladas em matrizes biológicas (urina ou sangue) de cavalos de corrida, fundamentado em métodos analíticos qualitativos e/ou quantitativos. Uma vez detectada alguma substância dopante na matriz rastreada na etapa de triagem, esta é sub-

metida aos métodos de confirmação visando determinar, quando aplicável, se uma determinada substância dopante excede limites de tolerância ("threshold") previamente fixados com base em critérios definidos por consenso ou por organizações técnico-científicas que regulamentam a atividade turfística. A triagem qualitativa visa detectar a presença ou ausência de substância proibida nas amostras, enquanto a confirmação fornece a identificação inequívoca da substância proibida presente. Aderente ao rigor metrológico, o desafio que se impõe é garantir, à luz do equilíbrio técnico e econômico, que a triagem seja realizada com base em amostras investigadas por métodos confiáveis (validados), preferencialmente de aplicação simples e de baixo custo e que sejam capazes de produzir resultados confiáveis e em tempo hábil. Ou seja, uma triagem de qualidade poderá não apenas prevenir acidentes mas evitar re-testes desnecessários e onerosos, desperdício de tempo e material, retrabalho e perda de credibilidade. Esse é o preceito filosófico da metrologia e da acreditação preconizado pelo "International Accreditation Fórum" (IAF): "tested once accepted everywhere".

No curso da análise e das boas práticas laboratoriais, se confirmada a presença da substância dopante na amostra suspeita é então feita uma contraprova. Esta consiste na realização das análises toxicológicas na presença dos responsáveis pelo animal, acompanhados de um perito sempre que o proprietário do animal assim determinar. Conseqüentemente, se faz mister que os métodos analíticos do laboratório (operando segundo a norma internacional ISO/IEC 17025⁸ – já disponível no Brasil como norma nacional ABNT: NBR ISO/IEC 17025:2005) sejam validados nos seus parâmetros metrológicos críticos. Esses provêm a base técnica para fundamentar o monitoramento da atividade e a punição dos infratores, conforme previsto no Código Nacional de Corridas (CNC)⁹. Esta prática evita disputas judiciais e assegura decisões justas e confiáveis, prevenindo riscos de vidas humanas e de animais.

No contexto do que se entende por "validação de métodos", destacam-se pelo menos dois tipos^{10,11}: validação interna ("in-house validation") e validação completa ("full validation"). No primeiro

*e-mail: mfrota@metrologia.ctc.puc-rio.br

caso, entende-se que a validação interna aplica-se tanto ao método novo oriundo do próprio laboratório (portanto adequado à sua realidade) quanto àquele adotado de outros laboratórios. Já no que concerne ao segundo tipo (validação completa), este deve contemplar as características relevantes de desempenho, seguido da exposição do método à participação em programa de comparação interlaboratorial supervisionado por um organismo oficial (ou um provedor acreditado), evidência pragmática da sua aplicabilidade e da reprodutibilidade dos resultados.

No desempenho da sua prática laboratorial de rotina que segue normas internacionais, o laboratório antidoping do JCB dispõe de tecnologia e capacitação instalada para detectar 121 substâncias proibidas fazendo uso, na etapa de triagem, de oito métodos analíticos. Dentre estes métodos, dois foram desenvolvidos pelo próprio laboratório, portanto adequados à sua realidade e seis, adaptados de métodos utilizados em laboratórios congêneres de organizações turfísticas de outros países, com os quais mantém programas de cooperação.

Considerando que na atividade turfística, na maioria das situações, a tolerância para as substâncias dopantes é zero (“zero threshold”), não se faz necessário determinar a sua quantidade, mas sim a presença ou ausência dessas substâncias proibidas, o que pode ser alcançado pela utilização de métodos qualitativos. Apesar da generalidade de aplicação dos métodos universais (aplicáveis à detecção de famílias de substâncias) então utilizados pelo LAD, métodos específicos validados substância-a-substância oferecem maior confiabilidade metrológica que aqueles aplicáveis à detecção de mais de uma substância. Para atender esse propósito, o presente trabalho desenvolveu-se segundo duas vertentes de análise: pesquisar a substância dopante mais freqüente na atividade turfística brasileira e substituir o método generalista (universal) tradicionalmente em uso no laboratório, validando-o para esta substância dopante mais freqüente (identificada neste trabalho), assim contribuindo para a melhoria da confiabilidade dos resultados de ensaios analíticos emitidos pelo LAD/JCB.

Apesar de os métodos universais serem comumente utilizados para detecção de famílias de substâncias proibidas, a experiência mostra que métodos específicos tendem a oferecer maior confiabilidade metrológica já que são validados substância-a-substância. O presente trabalho encontrou motivação nessa assertiva, assim se direcionou para o desenvolvimento de um método especializado para detecção de cafeína em matrizes biológicas de cavalos de corrida. Dentre as alternativas possíveis, ao invés de se desenvolver um método absolutamente genuíno, optou-se por adequar o *Methode Alcalins Sur C18* anteriormente referenciado como o método de rotina para detecção da substância proibida cafeína. Denominado ALCAC-18, o método alternativo proposto enquadra-se dentro de um padrão de confiabilidade mais rigoroso (discutido neste trabalho) e, naturalmente, adequado à realidade laboratorial e instrumental do LAD/JCB, já que se enquadra na categoria acima descrita de “in-house validated method”. Dentre outras vantagens comparativas, o método especializado proposto faz uso de volumes mais reduzidos da matriz biológica, possibilitando, assim, redução de substâncias interferentes, melhor aproveitamento da amostra na etapa de extração, rotinas simplificadas de diluição e menores tempos de centrifugação.

SUBSTÂNCIAS PROIBIDAS NA ATIVIDADE TURFÍSTICA BRASILEIRA

Pesquisa documental no acervo dos certificados e relatórios de ensaios emitidos pelo LAD/JCB no período 1996-2005 permitiu diagnosticar as substâncias proibidas mais freqüentes na sua ati-

vidade laboratorial. Pesquisa essa que também reflete as substâncias dopantes na atividade turfística brasileira, já que o laboratório atende ampla demanda nacional. Os resultados das 50.394 análises realizadas nesse período encontram-se resumidos na Tabela 1, que explicita 17 das 121 substâncias proibidas passíveis de detecção por 3 dos 8 métodos analíticos generalistas em uso no laboratório. Essas são as 17 substâncias proibidas mais freqüentes que foram identificadas pelo LAD, que faz uso da técnica da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM). Os resultados da pesquisa documental evidenciam que, para o período estudado e para as técnicas disponíveis, dentre o amplo espectro de substâncias dopantes usualmente pesquisadas, as substâncias “cafeína” e “flunixinina” mostraram-se, nesta ordem, ser as substâncias proibidas mais freqüentes nos ensaios antidoping associados à atividade turfística assistida pelo LAD/JCB.

Os resultados acima confirmam uma expressiva ampliação da capacidade interna de prestação de serviços do LAD/JCB. Cabe entretanto enfatizar que o aumento da incidência de casos de dopagem não deve ser explicado pela introdução de novos medicamentos – e, por conseguinte, por novos agentes dopantes – utilizados no tratamento físico dos animais já que estes, quando em tratamento, não estão habilitados a competir.

A pesquisa objetivou adaptar o método *Alcalins sur C18* – então em utilização no LAD/JCB como método generalista e caracterizado a seguir, ajustando-o à realidade do laboratório e validando-o para a detecção de “cafeína”, já que esta sempre se fez presente em todo o histórico de análises realizadas. A validação de um método para detecção de “flunixinina” (detectada pelo laboratório somente a partir de 2002) constitui objeto de outro trabalho atualmente em desenvolvimento. O método analítico proposto para detecção de “cafeína” derivou de um método generalista a seguir caracterizado.

DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL

O *Methode Alcalins Sur C18* – método generalista cedido ao LAD/JCB pelo laboratório francês *LAB-Contrôle Antidopage* no âmbito de um acordo de colaboração técnico-científica vigente desde 1997 – foi utilizado como base (método fonte) para o desenvolvimento do método alternativo proposto. Embora sem o respaldo de um processo estruturado de validação, esse método analítico vinha sendo utilizado para a determinação de 39 substâncias dopantes (inclusive cafeína), excretadas na forma livre na matriz biológica de cavalos de corrida. O método estrutura-se em duas etapas: extração em fase sólida das amostras em meio alcalino e análise do extrato obtido por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM)¹². A etapa de extração, por sua vez, realiza-se em duas fases: preparação e ajuste do valor do pH da amostra de fluido biológico e extração propriamente dita das substâncias em fase sólida.

Preparo das amostras

Com o objetivo precípuo de assegurar material biológico sabidamente isento de qualquer substância proibida, o LAD/JCB dispõe, mantém e controla, como parte de seu ativo patrimonial, cavalos puro-sangue inglês para produzir material biológico para fins de pesquisa e desenvolvimento de material de referência.

Sob criterioso controle metrológico, o preparo *in loco* das amostras permite o desenvolvimento dos seguintes padrões de referência: “controle negativo”, urina coletada de um pool de cavalos de referência (também denominada “branco de urina”); “solução estoque de cafeína”, preparada na concentração de 10 µg/mL pela diluição de cafeína (com grau de pureza superior a 99,9%, produzido pela Sigma

Tabela 1. Substâncias proibidas identificadas na atividade turfística brasileira pelo LAD/JCB, 1996-2005

Ano	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005
	Número total de ensaios:	Número total de ensaios:	Número total de ensaios:	Número total de ensaios:	Número total de ensaios:	Número total de ensaios:	Número total de ensaios:	Número total de ensaios:	Número total de ensaios:	Número total de ensaios:
Substâncias	2.643	4.891	4.649	5.492	5.709	5.151	5.490	5.746	5.452	5.171
Cafeína	3	3	11	8	6	4	10	4	6	4
Lidocaína	1	1	1	Aus	Aus	2	3	3	Aus	5
Procaína	Aus *	2	2	Aus	Aus	Aus	1	Aus	Aus	Aus
Mefentermina	Aus	1	Aus	Aus	Aus	Aus	Aus	Aus	Aus	Aus
Furosemida	Aus	1	1	Aus	1	1	Aus	Aus	Aus	Aus
Fenbutazona	Aus	1	1	Aus	Aus	Aus	3	2	1	1
Isoxsuprina	Aus	1	Aus	1	1	Aus	Aus	Aus	Aus	1
Dexametasona	Aus	Aus	Aus	Aus	1	Aus	Aus	Aus	Aus	Aus
Oxyfenbutazona	Aus	Aus	Aus	2	5	4	1	5	3	2
Dipirona	Aus	Aus	Aus	Aus	1	1	2	Aus	1	2
Nimesulide	Aus	Aus	Aus	Aus	1	Aus	Aus	Aus	Aus	Aus
Clembuterol	Aus	Aus	Aus	Aus	Aus	Aus	2	Aus	1	4
Diclofenaco	Aus	Aus	Aus	Aus	Aus	Aus	1	2	1	1
Celecoxibe	MI**	MI	MI	MI	Aus	Aus	1	Aus	Aus	Aus
Flunixinina	Aus	Aus	Aus	Aus	Aus	Aus	12	10	17	2
Teobromina	Aus	Aus	Aus	Aus	Aus	Aus	2	Aus	1	Aus
Teofilina	Aus	Aus	Aus	Aus	Aus	Aus	1	Aus	1	Aus
<i>Casos positivos</i>	<i>4</i>	<i>10</i>	<i>16</i>	<i>11</i>	<i>16</i>	<i>12</i>	<i>39</i>	<i>26</i>	<i>32</i>	<i>22</i>

*Aus: Ausente; **MI: Método Inexistente

Chemical Co., USA) em solvente metanol (comercializado pela Tedia Brazil Produtos para Laboratórios Ltda.); “controle positivo”; repetições da análise de 6 mL de amostras de branco de urina, fortificadas pela adição de alíquotas da solução estoque de cafeína, disponibilizando “padrões de controle” em sete concentrações (4, 6, 8, 10, 12, 18 e 24 ng/mL) e, “padrão interno”, solução metanólica de diazepam (Sigma Chemical Co., USA) preparado na concentração de 10 µg/mL e utilizada para monitoramento do processo analítico, inerente à técnica clássica de padronização interna.

Pela adição do “padrão interno” de diazepam nas urinas fortificadas com cafeína (“controle positivo”), preparada nas 7 concentrações indicadas, foram produzidas 174 amostras para extração em fase sólida e análise por CG-EM. A concentração do diazepam nessas amostras foi de 166 ng/mL (100 µL da solução de padrão interno na concentração de 10 µg/mL, em 6 mL de amostra).

Extração em fase sólida

Considerada etapa crítica do processo de análise para detecção de substâncias dopantes, a extração em fase sólida refere-se ao pré-tratamento das “amostras de controle” descrito na sessão anterior a serem submetidas à CG-EM.

A partir das diluições das 174 “amostras de controle positivo” e de uma amostra de “controle negativo” (6 mL de “branco de urina”) em 3 mL de água ultra-pura de grau reagente tipo 1 (sistema de purificação Milli-Q Plus), finalmente foi possível dar seqüência ao processo de extração em fase sólida, seguindo a rotina a seguir caracterizada: processo de precipitação de proteína (“salting out”), com 500 mg de sulfato de amônia por 10 min; ajuste de pH entre 9,4-9,8, pela adição de solução de hidróxido de amônio 10,80 mol L⁻¹; centrifugação a 4000 rpm, durante 20 min; condicionamento dos cartuchos de extração em fase sólida (C18HF, Varian Incorporated, USA) com 3 mL de metanol, seguidos de 3 mL de água ultra-pura de grau reagente tipo 1; transferência de 9 mL do sobrenadante oriundo

da centrifugação das amostras para os cartuchos; lavagem dos cartuchos com 3 mL da água tipo 1, secados por 3 min, processo repetido com 6 mL de hexano, secados por 2 min e eluídos com 6 mL de clorofórmio. Ainda como parte da rotina, os eluatos foram recolhidos e transferidos para cápsulas de evaporação à temperatura ambiente, processo usualmente conduzido à noite para se evitar a interrupção do processo. Em conformidade a prática laboratorial corrente, os resíduos da evaporação foram retomados com 400 µL de diclorometano e transferidos para “inserts” em frascos de injeção (“vials”), quando foram novamente evaporados à temperatura ambiente e os resíduos resultantes ressuspensos com 50 µL de acetato de etila, assim concluindo o processo de extração. Processo esse realizado em capelas devidamente equipadas com filtros e dispositivos de controle em atendimento a condições de segurança e de preservação ambiental.

Condições de análise no CG-EM

As análises foram realizadas por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas – sistema HP 5890 Series II Plus, interfaciado com detector de massas HP 5972 – em coluna capilar de 0,25 mm de d.i., fase estacionária de 35% fenilmetilpolisiloxano, 30 m de comprimento e 0,25 µm de espessura de filme (ValcoBond, USA ou equivalente). Foram as seguintes as condições de análise: temperaturas do injetor: 280 °C; temperatura da interface: 295 °C; temperatura inicial do forno da coluna: 60 °C, à qual foram impostas as seguintes taxas de aquecimento: 22 °C/min, até 200°C; 10 °C/min, até 270 °C e 30 °C/min, até 305 °C, permanecendo nessa temperatura por um período de 6 min. Completando as condições de análise, a injeção de 1 µL de amostra foi no modo Splitless, com um fluxo de 0,9 mL/min de hélio; a detecção realizou-se no modo de ionização por elétrons (IE), com energia de ionização de 70 eV; em faixa de varredura de 40 a 550 unidades de massa atômica (u.m.a.).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No curso de adequação do método alternativo, a sua validação se deu com base nos parâmetros clássicos recomendados por organismos regulatórios nacionais¹³, levando-se em conta as boas práticas internacionalmente aceitas¹⁴. Com base em experimentos-chave e fazendo uso do aparato experimental descrito, procedeu-se à completa validação do método analítico – com base em parâmetros críticos convencionais – para detecção do agente dopante cafeína presente nas amostras “controle positivo”. Conforme a Figura 1, estabeleceu-se o espectro de massas do analito (cafeína), identificando-se seus íons característicos m/z e as respectivas relações entre os mesmos – entende-se por “relação entre os íons” o quociente (massa/carga) entre as respostas cromatográficas associadas a quaisquer íons gerados pela detecção.

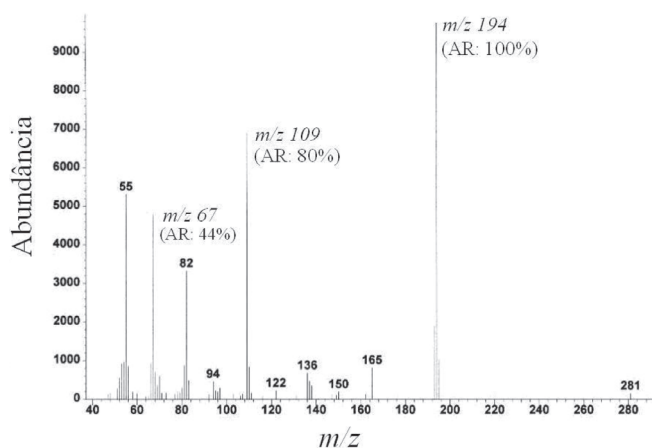


Figura 1. Espectro de massas da cafeína, indicando as “abundâncias relativas” (AR) para os íons m/z característicos

O espectro estabelecido para a cafeína foi comparado com dados de referência de uma biblioteca especializada mantida pela “Association of Official Racing Chemists (AORC)”¹⁵, permitindo comparar a autenticidade do analito. Nesse espectro foram selecionados três íons característicos: m/z 194, 109 e 67 – e analisadas as razões m/z que resultam da combinação de três dois a dois desses íons (m/z 194/109, 194/67, 109/67). Conforme ilustrado na Figura 1, a cada um dos íons característicos, associam-se, respectivamente, suas abundâncias relativas características 100, 80 e 44%¹⁶.

Validação do método analítico proposto

Conforme enfatizado, o detalhado processo de validação seguiu recomendações de organismos nacionais e internacionais e se desenvolveu com base nos seguintes oito parâmetros analíticos: seletividade; limite de detecção; linearidade; exatidão; precisão (repetitividade e reprodutibilidade); recuperação; robustez e limite de determinação (este último, em particular, não comumente considerado por analistas de laboratórios de ensaios “antidoping”).

Cada uma dessas etapas do processo de validação requer a utilização de amostras preparadas para atender requisitos específicos de cada parâmetro. Mais especificamente, no que concerne ao parâmetro seletividade, foram utilizadas cinco amostras de branco de urina extraídas dos cavalos-padrão puro sangue inglês pertencentes ao LAD/JCB. Já para os demais parâmetros analíticos, foram realizadas réplicas de extração de “controle positivo” (urina de branco fortificada), preparadas em concentrações que variaram na faixa 4, 6, 8, 10, 12, 18 e 24 ng de cafeína por mL da urina, concentrações essas que serão a seguir especificadas no curso de cada etapa da validação.

Caracterizadas as amostras utilizadas para cada etapa do processo de validação e observadas as recomendações e conceitos definidos pelo Guia Eurachem¹⁴, a validação propriamente dita foi caracterizada segundo cada um dos atributos clássicos.

Cabe aqui esclarecer que, por limitação de espaço, apenas extratos relevantes das muitas análises desenvolvidas serão relatados nas sessões de validação. O acervo total dos resultados das análises realizadas encontra-se documentado em detalhe e devidamente caracterizado em outro trabalho¹⁷.

Confiabilidade metrológica

O resultado de uma medição é uma estimativa do seu valor verdadeiro. Por este motivo, ao se relatar esse resultado, torna-se fundamental prover uma indicação quantitativa da sua qualidade, ou seja, associar ao valor medido um intervalo de valores com probabilidade conhecida, dentro do qual o valor verdadeiro se encontra.

Parâmetro conexo ao resultado de uma medição, a incerteza a ela associada caracteriza a dispersão dos valores que podem ser atribuídos a um mensurando¹⁸, normalmente expresso por um desvio padrão (ou múltiplo dele) ou pela metade de um intervalo correspondente a um nível de confiança previamente estabelecido. Em conformidade ao GUM¹⁹, a “incerteza padrão” é expressa como um desvio padrão, definindo duas categorias distintas: a “incerteza do Tipo A” (cuja avaliação se dá pela análise estatística de séries de observações) e a “incerteza do Tipo B” (que não tenha sido obtida através de observações repetidas, ou seja, avaliada por julgamento científico, baseando-se em todas as informações disponíveis sobre a possível variabilidade de X_i). Aplicada ao presente estudo, a incerteza “tipo A” é aquela diretamente associada às respostas cromatográficas, enquanto as incertezas “tipo B” são originárias de fontes externas. Estas, originárias de diferentes fontes, podendo estar associadas aos padrões de medição calibrados (pesagem, pipetagem), materiais de referência certificados (cafeína e diazepam de alta pureza, relatados pelo fabricante) e dados de referência obtidos de normas e manuais técnicos (parâmetros de calibração e estabilidade do cromatógrafo e da coluna cromatográfica).

Na maioria dos casos, a melhor estimativa disponível do valor esperado de uma grandeza que varia aleatoriamente e para a qual observações independentes foram obtidas sob as mesmas condições de medição, é a média aritmética \bar{q} , cuja variância experimental das observações permite expressar não apenas a distribuição de probabilidade de q , dada por:

$$s^2(q_k) = \frac{1}{n-1} \cdot \sum_{k=1}^n (q_k - \bar{q})^2 \quad (1)$$

como, também, o desvio padrão experimental $s(q_k)$, caracterizando uma dispersão em torno da média \bar{q} . Assim, para uma grandeza de entrada X_i determinada por n observações repetidas e independentes X_{ik} , relacionadas pelo funcional $Y = f(X_1, X_2, \dots, X_N)$, a incerteza padrão $u(x_i)$ de sua estimativa $x_i = \bar{X}_i$ é $u(x_i) = s(\bar{X}_i)$.

Por conveniência, $u^2(x_i) = s^2(\bar{X}_i)$ e $u(x_i) = s(\bar{X}_i)$ são denominados uma variância do Tipo A e uma incerteza padrão do Tipo A, respectivamente. Para o caso em que todas as grandezas de entrada são independentes, a incerteza padrão $u_c(y)$ (y é a estimativa do mensurando Y) é obtida pela combinação apropriada de incertezas padrão das estimativas de entrada x_1, x_2, \dots, x_N , calculada pela raiz quadrada positiva da variância combinada $u_c^2(y)$, dada pela equação:

$$u_c^2(y) = \sum_{i=1}^N \left[\frac{\partial f}{\partial x_i} \right]^2 \cdot u^2(x_i) \quad (2)$$

Para o presente caso, entretanto, em que as análises são de natureza qualitativa e a cromatografia refere-se a análises de matrizes biológicas (complexas por natureza, por esse motivo com critério de repetitividade conservador, da ordem de 20%²⁰), somente as “incertezas do tipo A” (respostas cromatográficas) foram consideradas. As incertezas do “tipo B” nitidamente refletem incertezas de ordem de grandeza inferior (materiais de referência com grau de pureza superior a 99,9%; certificados de calibração da balança analítica e da pipeta com incertezas relatadas de 0,0023 e de 0,27%, respectivamente, para as escalas utilizadas), portanto desprezadas no cálculo da incerteza padrão quando comparadas às incertezas do tipo A. Embora não calculado no presente trabalho, a incerteza expandida U poderia ser facilmente obtida, multiplicando-se a incerteza padrão combinada $u_c(y)$ por um fator de abrangência k .

Assim, tomando-se por base este preceito da incerteza padrão, foi possível expressar a incerteza associada aos parâmetros de validação do método analítico proposto, caracterizada para cada um dos oito parâmetros analíticos.

Seletividade

O procedimento de validação do método analítico quanto ao parâmetro seletividade refere-se à capacidade de resposta do método a um determinado componente de interesse presente em uma matriz contendo várias substâncias químicas, detectáveis ou não. As análises realizadas para cumprir este propósito demonstraram que, de fato, para todas as amostras estudadas, o método respondeu à presença da substância cafeína no seu tempo de retenção característico, já que a ausência de interferentes no branco (isenta de substância dopante) da matriz biológica foi sempre confirmada nesses casos. Dentre as cinco amostras de “branco de urina” analisadas (amostras A, B, C, D e E) em trabalho mais amplo que deu origem ao presente artigo¹⁷, reproduz-se, o cromatograma de íons totais (Figura 2) referente à Amostra E, no respectivo tempo de retenção ($TR = 11,196$ min) associado à substância cafeína. Como evidências desta resposta e no tempo de retenção da cafeína, os resultados confirmam ausência de pico cromatográfico de interferentes; ausência de pico cromatográfico associado ao padrão interno (diazepam) adicionado à amostra de controle negativo e presença de sinal cromatográfico, conforme revelado pelo controle positivo de cafeína.

Limite de detecção

Segundo orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos¹³ fornecidas pelo organismo brasileiro acreditador de laboratórios (INMETRO), a validação para o parâmetro limite de detecção (LD) refere-se “ao menor valor de concentração do analito que pode

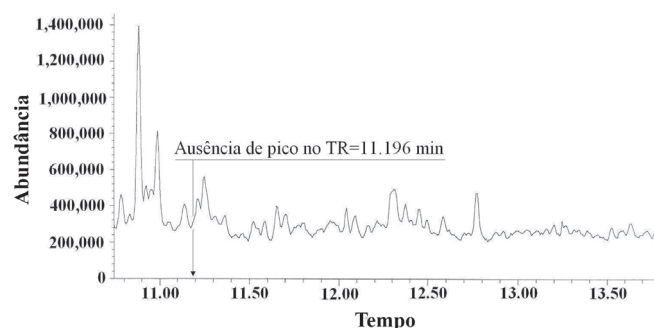


Figura 2. Cromatograma de íons totais da amostra E (branco de urina). Transcrição da impressão original emitida pelo sistema de aquisição de dados CG-EM

ser detectado pelo método”. Complementando este conceito, na visão da EURACHEM¹⁴, o LD refere-se à “menor concentração de um analito em uma amostra, que pode ser detectada por um procedimento analítico ao qual se associa um nível de confiança especificado, mas não necessariamente quantificado”. De forma mais ampla, no contexto da revisão validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos²¹, o LD pode, alternativamente, ser calculado por: método visual, permitindo a distinção entre ruído e sinal analítico pela visualização da menor concentração detectável; método relação sinal-ruído, pela comparação entre a medição dos sinais de amostras em baixas concentrações conhecidas do composto de interesse na matriz e um branco e método baseado em parâmetros da curva analítica, cujo valor do limite de detecção é calculado pelo produto do fator 3,3 pelo quociente entre o desvio padrão da resposta cromatográfica e o coeficiente angular da curva analítica. Dentre as opções propostas na literatura e adequado à rotina do LAD/JCB, optou-se pelo “método visual” que, a partir do “controle positivo” permite distinguir entre ruído e sinal analítico pela visualização da menor concentração visível (detectável). Para cumprir este propósito, estabeleceu-se como critério de referência uma probabilidade de 30% de positividade (presença de cafeína) em amostras de urina, para uma dada concentração, com enfoque na resposta binária SIM/NÃO caracterizando a “presença” ou “ausência” da substância cafeína, que se constitui na essência do “método visual”. Embora subjetivo, com base na prática laboratorial do LAD em análises de traços – detecção de substâncias dopantes em pequenas proporções na matriz biológica – o critério-de-corte de 30% foi utilizado como um valor limite inferior ao qual se atribui sensibilidade de detecção ao método. Já a decisão pelo “SIM” ou pelo “NÃO” foi definida pela interpretação visual do cromatograma, Figuras 3a e 3b. A opção pelo “SIM” fundamentou-se na observância de picos cromatográficos bem definidos (abundância > 70.000 para o íon m/z 194 e abundância > 40.000 para o íon m/z 109) no respectivo tempo de retenção da cafeína. A opção pelo NÃO fundamentou-se na inexistência dessa característica, i.e. nem os picos encontram-se visualmente bem definidos e tampouco as abundâncias são expressivas, conforme claramente ilustrado na Figura 3.

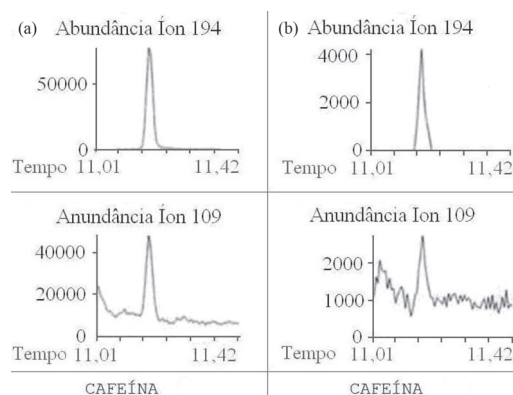


Figura 3. Cromatogramas típicos da validação pelo parâmetro limite de detecção (3a: resposta binária positiva e 3b: resposta binária negativa)

Os experimentos de validação para o limite de detecção referem-se a análises de amostras de “controle positivo” (20 repetições de cada) nas concentrações de 4, 6, 8, 10 e 12 ng de cafeína por mL da urina. Todas as amostras foram submetidas ao procedimento analítico que compreende as etapas de extração e de análise cromatográfica. Com base nessas análises foi possível constatar que 30% das amostras de urina na concentração de 6 ng/mL apresentaram resultado positivo em suas determinações, concentração defini-

da como sendo o valor limite de detecção do método. A consistência dos dados utilizados para definir este valor limite de detecção foi verificada pelo Teste de Grubbs e pelo Teste Q (Critério de Dixon), conforme discutidos em detalhe em outro trabalho¹⁷.

A partir do estudo do íon m/z 194, nas cinco concentrações consideradas, foram calculados a média, o desvio-padrão e o coeficiente de variação (desvio-padrão relativo) das 20 repetições de extração (totalizando 100 experimentos) e da razão entre os três íons característicos da cafeína (m/z 194, 109 e 67), resultados apenas parcialmente aqui relatados, por limitação de espaço. A coerência desses dados pode ser confirmada pelo extrato das análises relacionadas na Tabela 2 (síntese dos 100 experimentos realizados) que evidencia um valor do “coeficiente de variação” (CV) igual ou inferior a 20%^{20,21}, para todas as concentrações estudadas. Para cada uma das concentrações foi também relatado o valor corrigido pelo desvio local do padrão interno de diazepam do íon m/z 194, assim normalizando a resposta cromatográfica no valor do padrão previamente definido. Esta melhoria é revelada pela redução dos valores do Coeficiente de Variação (CV), inferiores àqueles referentes às situações “sem correção”, conforme a Tabela 2.

Tabela 2. Síntese dos resultados do Coeficiente de Variação (CV) para a cafeína (íon m/z 194 e relações m/z de íons)

m/z	CV (%)					Critério de aceitação
	Concentração (ng/mL)					
	4	6	8	10	12	
Ion 194	20	20	20	14	17	CV ($\leq 20\%$)
Ion 194 (c/correção)	15	19	10	13	11	(Resposta
Razão 194/109	7	8	12	9	8	cromato-
Razão 194/67	15	20	10	15	7	gráfica)
Razão 109/67	17	12	10	13	8	
TR ⁽¹⁾ de m/z 194	0,030	0,031	0,036	0,037	0,038	CV $\leq 2\%$

⁽¹⁾ Tempo de retenção (min).

A Tabela 3 documenta o valor das razões (duas a duas) entre as respostas cromatográficas dos três íons característicos da cafeína (m/z 194/109; 194/67 e 109/67) e os respectivos componentes da incerteza padrão associada a cada uma delas, estimadas com base na propagação da soma quadrática do desvio-padrão relativo associado às respostas cromatográficas de cada íon.

Tabela 3. Média das razões entre os íons m/z 194, 109 e 67 e incertezas padrão associadas devido ao desvio padrão relativo

Concentrações (ng/mL)	Média \pm Incerteza da razão m/z	Média \pm Incerteza da razão m/z	Média \pm Incerteza da razão m/z
	194/109	194/67	109/67
4	1,68 \pm 0,36	2,44 \pm 0,63	1,45 \pm 0,40
6	1,74 \pm 0,41	2,51 \pm 0,60	1,44 \pm 0,34
8	1,73 \pm 0,29	2,57 \pm 0,35	1,48 \pm 0,25
10	1,64 \pm 0,27	2,48 \pm 0,59	1,52 \pm 0,33
12	1,72 \pm 0,29	2,74 \pm 0,38	1,59 \pm 0,27

Linearidade

No que concerne à validação pelo parâmetro linearidade, este reflete a habilidade do método gerar resultados que sejam diretamente proporcionais às concentrações do analito correspondente a uma determinada faixa de concentração. Nesse contexto, a

linearidade foi avaliada pela análise de regressão por mínimos quadrados, fazendo uso das mesmas amostras utilizadas na validação pelo parâmetro limite de detecção.

A Figura 4 ilustra resultados de análises realizadas para o teste de linearidade, repetido para duas situações distintas, na ausência e na presença de amostra de “branco” (urina isenta de cafeína, i.e.: concentração zero). Conforme evidenciado nessa figura (que inclui em sua legenda os valores calculados do coeficiente “r-quadrado” e do coeficiente Pearson²⁰ de correlação “r”) a linearidade foi confirmada em ambos os testes, na faixa de concentração estudada. Para todos os casos, $r^2 > 0,990$ e $r > 0,992$, este último em conformidade com os critérios recomendado pelo INMETRO¹³ ($r > 0,90$) e pela ANVISA²² ($r > 0,99$). Na realidade, os dados da Figura 4 ilustram duas regressões realizadas independentemente, incluindo e ausentando a “amostra de branco”, a primeira apresentando grau de ajuste da regressão (r^2) e coeficiente de correlação (r) mais próximos do valor ideal unitário.

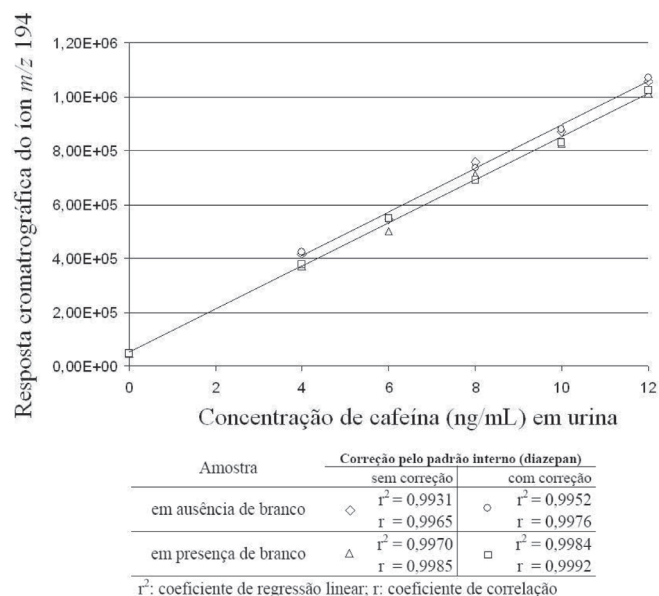


Figura 4. Validação pelo parâmetro linearidade. Validação repetida em ausência e presença de “amostra de branco”

Exatidão

No que concerne à validação para o parâmetro exatidão, esta avalia o grau de concordância entre o resultado de uma medição e o respectivo valor de referência aceito como verdadeiro.

Assim, a exatidão do método foi verificada fazendo uso das amostras de “controle positivo” nas concentrações 6, 8, 12, 18 e 24 ng de cafeína por mL de urina, cada resultado final representando a média de três experimentos. Na realidade, essas concentrações foram definidas para representar múltiplos do “valor do limite de detecção” e o “valor do limite de determinação” (discutido na sequência deste processo de validação). Expressa em porcentagem, a exatidão foi calculada com base na Equação 3:

$$\text{Exatidão} = \left(1 - \left| \frac{\text{valor obtido} - \text{valor real}}{\text{valor real}} \right| \right) \times 100 \quad (3)$$

Nesta expressão, o “valor obtido” resulta de análises cromatográficas individuais das 15 amostras preparadas enquanto o “valor real” se origina da análise da solução metanólica de cafeína nas concentrações indicadas.

Os resultados obtidos confirmaram uma exatidão superior a 77% (comparação entre as respostas cromatográficas do íon m/z

194 obtido pelo processo analítico e o “valor real” de referência dado pela solução metanólica de cafeína).

Precisão

A precisão do método ALCAC-18, objeto deste estudo, foi avaliada segundo os conceitos repetitividade e reprodutibilidade.

Repetitividade

O conceito refere-se ao grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas em condições de repetitividade. A repetitividade foi avaliada com base: no cálculo do coeficiente de variação (desvio padrão relativo), cujo valor deve ser menor ou igual a 20% e no tempo de retenção do analito (cafeína), cujo valor do coeficiente de variação deve ser menor ou igual a 2%, ambos em conformidade com o critério referenciado por Chasin²⁰. Similarmente ao teste de linearidade, a repetitividade foi verificada com base nas mesmas análises realizadas no estudo para a validação do limite de detecção, cujos resultados já foram relatados na Tabela 2, concluindo-se assim que o método apresentou um adequado grau de concordância.

Reprodutibilidade

Refere-se ao grau de concordância entre os resultados efetuados sob condições diversas de medição. Igualmente referenciada aos critérios²⁰ de validação da repetitividade, a validação para a reprodutibilidade baseou-se em repetições de análises realizadas em dois dias (dia 1 e dia 2) e conduzidas por analistas distintos (Analista 1 e Analista 2), nas concentrações 6, 8, 12, 18 e 24 ng de cafeína por mL de urina (todos os experimentos repetidos três vezes).

A Tabela 4 apresenta os dados das análises realizadas nos dias 1 e 2, indicando a média das respostas cromatográficas para o íon m/z 194 e para a razão de íons m/z 194/109, devidamente corrigidas pelo padrão interno de diazepam, como também os respectivos des-

vios padrão e coeficientes de variação (desvio-padrão relativo), para cada uma das concentrações estudadas. A reprodutibilidade dos dados foi confirmada: para o valor médio do íon m/z 194 (16,1% para a concentração mais baixa de 6 ng/mL, melhorando para uma reprodutibilidade de 1,6%, na concentração mais alta de 24 ng/mL) e da razão m/z 194/109 (5% para a concentração mais baixa de 6 ng/mL, melhorando para uma reprodutibilidade de 3%, na concentração mais alta de 24 ng/mL), tendência de melhora já esperada para as concentrações mais altas já que a recuperação do analito normalmente melhora nessas situações.

A Figura 5 ilustra a média da razão dos íons m/z 194/109 (íons mais abundantes da cafeína), com suas barras de incerteza representativas das respectivas incertezas padrão propagadas, para os dias 1 e 2 de análises de reprodutibilidade realizadas. Nessa figura, cada barra de incerteza refere-se à repetitividade das análises nos dias 1 e 2, considerados separadamente. Já a reprodutibilidade do valor médio da razão entre desses íons, resulta da comparação entre os resultados obtidos para cada concentração, em dias diferentes.

Com base nessas evidências experimentais e para os níveis de incerteza padrão relatados, fica validado o método para o parâmetro “reprodutibilidade” já que foi observado um adequado grau de concordância entre os resultados das medições realizadas por analistas distintos operando em dias diferentes, resultando nos seguintes valores dos coeficientes de variação da reprodutibilidade associada aos resultados dos dias 1 e 2: CV_R (%) = 13,56; 10,55; 14,7; 10,24 e 11,77 para cada uma das concentrações estudadas, respeitada a repetitividade segundo o critério adotado^{20,21} para as análises realizadas em dias distintos. Coeficientes de variação considerados aceitáveis, tendo em vista tratar-se de amostras de matrizes biológicas.

Recuperação

A validação pelo parâmetro recuperação refere-se à capacidade

Tabela 4. Síntese dos resultados dos Coeficientes de Variação (CV) para a cafeína (íon m/z 194 e relações m/z de íons) – dia 1 (Analista 1) e dia 2 (Analista 2)

Concentração	Respostas Cromatográficas* do íon m/z 194 e da razão íon m/z (194/109)	Analista 1 Dia 1	Analista 2 Dia 2	Dif. \n(%)
6 ng/mL	Média íon m/z 194	598456 a.i.	713592 a.i.	16%
	Desvio padrão	26826	33220	
	CV (%)	4	5	
	Média razão íon m/z (194/109)	2,03	1,94	5%
	Incerteza Padrão	0,22	0,10	
8 ng/mL	Média íon m/z 194	788662 a.i.	888075 a.i.	11%
	Desvio padrão	39830	63722	
	CV (%)	5	7	
	Média razão íon m/z (194/109)	2,15	1,96	10%
	Incerteza Padrão	0,11	0,17	
12 ng/mL	Média íon m/z 194	1131369 a.i.	1336825 a.i.	15%
	Desvio padrão	43641	55208	
	CV (%)	4	4	
	Média razão íon m/z (194/109)	2,06	2,10	2%
	Incerteza Padrão	0,35	0,13	
18 ng/mL	Média íon m/z 194	1680600 a.i.	1790266 a.i.	6%
	Desvio padrão	91115	195378	
	CV (%)	5	11	
	Média razão íon m/z (194/109)	2,05	2,01	2%
	Incerteza Padrão	0,18	0,32	
24 ng/mL	Média íon m/z 194	2408601 a.i.	2449091 a.i.	2%
	Desvio padrão	385248	126574	
	CV (%)	16	5	
	Média razão íon m/z (194/109)	2,08	2,01	3%
	Incerteza Padrão	0,46	0,16	

*Respostas cromatográficas corrigidas pelo padrão interno de diazepam; a. i.: intensidade de abundância (abundance intensity)

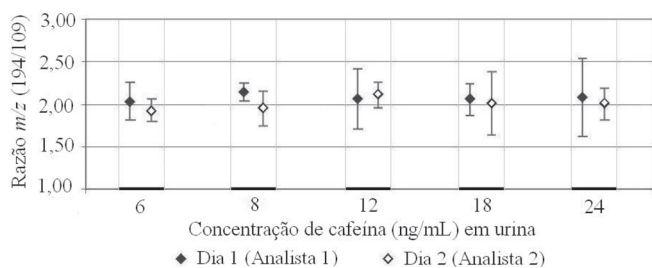


Figura 5. Repetitividade e reprodutibilidade. Razão entre íons m/z 194/109 versus concentração de cafeína (ng/mL), indicando a barra representativa da incerteza padrão associada às respostas cromatográficas realizada por dois analistas independentes

do método recuperar o analito adicionado à amostra, parâmetro esse que indica o grau de exatidão do método analítico. A recuperação do analito (Rec_{an}) foi calculada com base na Equação 4, que totaliza as respostas cromatográficas (Y) do íon (mais abundante da cafeína) m/z 194 nas “ n ” réplicas dos experimentos na concentração definida.

$$Rec_{an} = \frac{1}{n} \sum_j Rec_j \quad (4)$$

nesta equação,

$$Rec_j = \frac{Y_p}{Y_r} \times 100 \quad \bar{Y}_r = \frac{1}{n} \sum_j Y_{rj}$$

enquanto “ p ” denota a amostra submetida ao procedimento analítico completo, “ r ” refere-se à amostra fortificada após todas as etapas do procedimento de extração e “ j ” à repetição correspondente na concentração definida.

No curso desta etapa do processo de validação, sete amostras de “controle positivo” (3 fortificadas antes e 4 após o procedimento de extração) foram analisadas (cada experimento representando a média de 3 repetições) pelo método objeto da validação, em dois dias subsequentes, sempre na concentração do limite de detecção (6 ng de cafeína por mL de urina).

A partir dessas análises foram calculados a média, o desvio-padrão e o coeficiente de variação, o que então permitiu o cálculo dos componentes das incertezas tipo A (incerteza padrão), essas propagadas pela soma média quadrática (incerteza combinada associada à etapa de validação do método pelo parâmetro recuperação do analito). Para se verificar a coerência da validação desse parâmetro, o método experimental foi repetido em dois dias subsequentes, exibindo, respectivamente, recuperações de 88 ± 22 e $92 \pm 25\%$ do analito para os níveis de incerteza indicados. Embora aparentemente elevados, esses níveis de incerteza são aceitáveis para a prática de controle de dopagem.

Robustez

A validação pelo parâmetro robustez diz respeito à capacidade do método permanecer inalterado frente a pequenas, mas deliberadas, variações de seus parâmetros intrínsecos. No presente caso, pela sua relevância, o parâmetro selecionado foi o ajuste de pH (potencial de hidrogênio), crítico no processo analítico já que pequenas variações no valor da faixa de pH podem modificar o comportamento da substância em estudo²³.

As amostras de “controle positivo” foram analisadas em três repetições nas concentrações 6, 8, 12, 18 e 24 ng de cafeína por mL de urina, tendo sido submetidas ao procedimento analítico que compre-

ende as etapas de extração e de análise cromatográfica. Nessa avaliação, por sua vez, cada repetição foi injetada três vezes, assim assegurando maior representatividade ao processo de análise cromatográfica. Com o propósito de cobrir com segurança a faixa de trabalho da rotina laboratorial interna própria do método objeto da validação ($9,4 \leq pH \leq 9,8$), o valor do pH foi ajustado numa faixa ampliada, variando de 9,2 a 10,0, para as concentrações intermediárias. Para a concentração de 6 ng de cafeína por mL de urina, manteve-se um valor de $pH = 9,2$ e $pH = 10,0$ para a concentração de 24 ng/mL.

Seguindo procedimentos similares de cálculo, com base nos resultados das análises cromatográficas e no tratamento estatístico desses dados, foram calculados os coeficientes de variação dos íons mais abundantes e as incertezas padrão associadas às razões desses íons.

Tomando-se como referência o critério de repetitividade ($CV < 20\%$ ²⁰) e considerando-se as incertezas avaliadas (CV para o caso da média e incerteza padrão propagada para o caso da razão) concluiu-se que o método é robusto para a faixa de pH investigada.

Limite de determinação

Também denominado de limite de quantificação, o conceito é definido pelo INMETRO¹³ como sendo “a menor concentração do analito que pode ser determinada com um nível aceitável de precisão e veracidade”. Conforme o próprio nome indica, a validação pelo fator limite de quantificação é próprio de métodos quantitativos. Assim, sob esta perspectiva, a validação para este parâmetro não deveria interessar à validação do método aqui proposto (ALCAC-18) já que este é de natureza essencialmente qualitativa (desenvolvido para detecção da substância cafeína cuja tolerância é zero na atividade turfística). Entretanto, a adequação deste conceito de natureza quantitativa para aprimoramento do “método visual” provou ser de interesse às avaliações do LAD/JCB, permitindo que seja estabelecida uma faixa na qual podem ocorrer falso-positivos e falso-negativos, atuando como elemento de auxílio à decisão do método então puramente visual.

A própria essência do conceito de limite de quantificação, que se refere à “menor concentração com um nível aceitável de precisão e veracidade”, sugere que este limite (aqui denominado limite de determinação) seja definido para um valor de concentração superior àquele definido para o limite de detecção; i.e. superior a 6 ng de cafeína por mL de urina, conforme anteriormente fixado para o limite de detecção. Cabe aqui entender que a definição de uma concentração superior àquela eleita para o “limite de detecção” constitui condição necessária mas não suficiente para se definir o valor “limite de determinação”. A condição de suficiência deve ser satisfeita pela análise visual, i.e., ser capaz de diferenciar entre resultados positivos e resultados negativos segundo uma probabilidade de acerto considerada razoável. Por exemplo, não seria razoável considerar a concentração de 8 ng/mL como o limite de determinação se a probabilidade erro-acerto associada à essa concentração fosse apenas marginalmente superior àquela encontrada na concentração definida como limite de detecção. A constatação de que na concentração de 8 ng/mL a análise visual dos resultados das respostas cromatográficas confirmou um índice erro-acerto de 50% foi decisiva para se aceitar esta concentração como o valor do limite de determinação. Não tivesse esta probabilidade erro-acerto sido verificada nesta concentração, nova pesquisa erro-acerto deveria ser desenvolvida nas concentrações imediatamente superiores até que um valor razoável da probabilidade “ p ” fosse encontrado ($p = 50\%$ caracteriza o critério adotado).

Considerando que as análises aqui utilizadas para se definir o limite de determinação foram exatamente as mesmas utilizadas para a etapa de validação pelo fator limite de detecção, a conformidade

ao critério coeficiente de variação menor ou igual a 20%²¹ fica automaticamente verificada pelo valor deste desvio padrão relativo. Assim, partindo dos resultados dessas análises previamente qualificadas e, à luz da avaliação visual, a distribuição de probabilidade erro-acerto de positividade de cafeína foi avaliada para todas as concentrações estudadas, resultados esses resumidos na Figura 7, definida pelo número de erro-acerto da análise visual. Embora prático do ponto de vista da rotina laboratorial, a limitação do método reside na possibilidade de se atribuir um eventual falso-negativo numa eventualidade de positividade, o que violaria o preceito da tolerância zero. Entretanto, essa limitação do método somente ocorre em concentrações inferiores à do limite de detecção, concentração essa para a qual o método é descartado.

Esta distribuição de probabilidade estabelecida pelo método visual, baseado na experiência do laboratório, provou ser uma ferramenta de interesse para a identificação de faixas de concentração associadas à probabilidade de falso-positivo e de falso-negativo (faixas de não-confiança); i.e. situações que induzem o analista (método visual) a erroneamente decidir pela presença ou ausência de cafeína. A partir dessa distribuição de probabilidade, torna-se possível identificar zonas de falso positivo e falso negativo, conforme será discutido a seguir.

É nesse contexto que o limite de determinação, tal qual aqui proposto, se constitui em indicador da confiabilidade dos resultados de positividade das amostras realizadas, fornecendo também informação para a tomada de decisão que orienta o analista (em sua análise visual do cromatograma) a evitar repetições desnecessárias de análises, sistemática normalmente onerosa e que demanda tempo de laboratório.

Beneficiando-se dessa faixa de não-confiança o analista é capaz de explicar erros associados que nem sempre são detectáveis pela avaliação humana, assim habilitando-se a distinguir entre respostas negativa ou positiva.

Não tivesse o conceito de limite de determinação sido introduzido, a distribuição de probabilidade associada à detecção de cafeína seria de forma simplista representada pela Figura 6, que claramente reflete uma distribuição teórica irreal da transição entre resultados positivos e negativos.

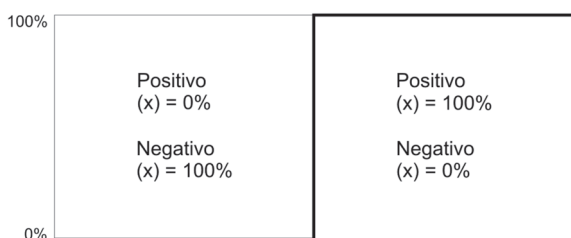


Figura 6. Representação binária pragmática (SIM ou NÃO) do resultado da análise qualitativa

A Figura 7 corrige essas distorções e corresponde a uma representação mais real da situação anteriormente caracterizada, vez explicitando, à luz da distribuição de probabilidades erro-acerto, as faixas de não-confiança às quais são associadas zonas de falso-positivos e de falso-negativos, portanto, entendido como um critério de auxílio à tomada de decisão.

Para o presente estudo, o limite de determinação possui relevância principalmente pelo fato das análises aqui consideradas estarem normalmente associadas à detecção de traços de substâncias dopantes, situação que requer do laboratório a habilidade de detectar substâncias em baixas concentrações. É exatamente por essa razão que a validação de métodos qualitativos para análise de tra-

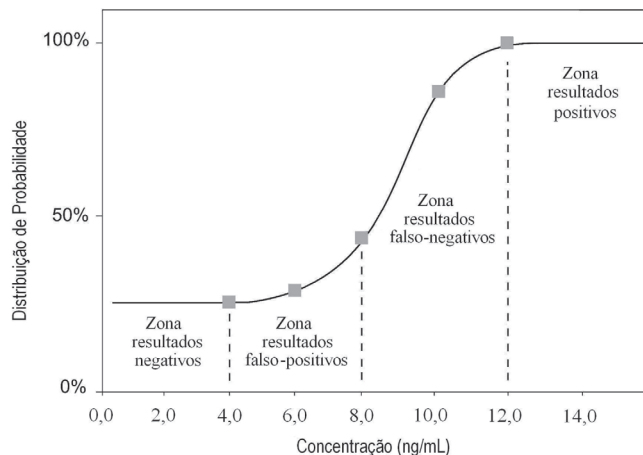


Figura 7. Distribuição de probabilidade para definição das zonas de falso-positivos e falso-negativos

ços também seja verificada para o “limite de determinação”.

PARTICIPAÇÃO EM PROGRAMAS INTERLABORATORIAIS

Adicionalmente à validação do método analítico realizada com base nos parâmetros tradicionais (seletividade, limite de detecção, linearidade, exatidão, precisão, recuperação, robustez e limite de determinação) o mesmo foi exposto a um programa de ensaio de proficiência (comparação interlaboratorial) conduzido pela “Association of Official Racing Chemists (AORC)” como evidência independente de sua confiabilidade. No contexto da rodada 2005 desse ensaio qualitativo de proficiência, do qual participaram 47 laboratórios de países de quatro continentes, com critério de aprovação fixado em 80% (sem resultados falso-positivos), o LAD/JCB classificou-se com índice de acerto de 100%, comprovando a eficácia do método. Por se tratar de um programa de proficiência de análises qualitativas, os resultados são usualmente expressos na forma de um certificado que apenas atesta o índice de acerto do laboratório participante, contrapondo-se ao resultado em gráfico tradicional utilizado em ensaios de proficiência (quantitativos) no qual é explicitado o número de desvios padrão de cada laboratório participante calculado em relação ao valor de referência designado pela coordenação da comparação interlaboratorial.

CONCLUSÕES

Com base no trabalho desenvolvido, o Laboratório Antidoping do Jockey Club Brasileiro (LAD/JCB) passou a ter acesso a um método validado para detecção da substância cafeína, à época do estudo, classificada dentre as substâncias proibidas mais presentes nas análises toxicológicas realizadas pelo laboratório ao longo de quase uma década de sua atuação (1996 a 2005). Importante ressaltar que até a data, o LAD/JCB apenas dispunha de um método generalista (*Alcalins SUR C-18*) cedido no âmbito de um convênio de colaboração com um laboratório congênera francês, método esse, entretanto, sem evidências de validação e não adaptado à infra-estrutura de equipamentos do LAD/JCB. Ao atribuir credibilidade aos seus laudos de análise toxicológica via validação do método analítico, respaldado pela participação em programas internacionais de ensaios de proficiência, o LAD/JCB também avança no seu processo de conquista da acreditação formal de sua competência técnica. A acreditação pretendida segue o rigor da NBR ISO/IEC 17025 e, no Brasil, é de responsabilidade do INMETRO, organismo acreditador signatário dos acor-

dos de reconhecimento mútuo com o “International Laboratory Accreditation Cooperation (ILAC)”.

Embora aplicável a análises essencialmente qualitativas (já que na atividade turfística, usualmente, a tolerância para substâncias proibidas é zero) o método proposto foi validado não apenas para os parâmetros convencionais, mas também para o fator “limite de quantificação” (típico de análises quantitativas). A validação do método qualitativo proposto incluindo o parâmetro limite de quantificação, embora não usual, permitiu caracterizar uma “faixa de não confiança” (falso-positivos e falso-negativos), considerada ferramenta relevante de auxílio ao analista no seu complexo processo de tomada de decisão. A dificuldade está associada à probabilidade erro-acerto de positividade da substância proibida em análises de traços, fonte de problemas para métodos generalistas. Esse é o motivo pelo qual o “limite de determinação” é sempre tomado como superior ao “limite de detecção”, assim assegurando que nenhum resultado positivo seja declarado ainda que na presença de traços não justificáveis com base em critérios de positividade.

Neste sentido, o método proposto e validado agrega credibilidade aos laudos emitidos pelo LAD/JCB, assim atendendo expectativas de criadores de animais e apostadores e estabelecendo uma base justa para a atividade turfística. Em consequência, reduz conflitos forenses já que laudos positivos acarretam sanções aos infratores segundo as regras estabelecidas pelo Código Nacional de Corridas.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Detalhes do processo de validação do método ALCAC-18 (para detecção de cafeína, substância proibida na atividade turfística) e informações adicionais referentes à validação pelos parâmetros analíticos seletividade, exatidão, reprodutibilidade, robustez, bem como a confirmação do método em programa interlaboratorial de ensaio de proficiência encontram-se disponíveis na forma de material suplementar em <http://quimica.nova.s bq.org.br>, com acesso livre ao arquivo em PDF.

AGRADECIMENTOS

Ao Jockey Club Brasileiro por ter percebido a relevância do presente trabalho para o aprimoramento da confiabilidade metrológica do Laboratório Antidoping do Jockey Club Brasileiro (LAD/JCB). À Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) e ao Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT), pelo apoio institucional com recursos do Fundo Setorial Verde-Amarelo (Convênio FINEP/MCT no.

22.01.0692.00) tornando possível o desenvolvimento da pesquisa de mestrado que deu origem a este trabalho. A J. M. Ticona e A. L. de M. Medeiros Maia, pelo apoio técnico na arte gráfica final.

REFERÊNCIAS

- Carregaro, A. B.; Mataqueiro, M. I.; Soares, O. A. B.; Queiroz-Neto A.; *J. Appl. Toxicol.* **2004**, *24*, 513.
- Jassaud, P.; Courtot, D.; *Revue de Medecine Veterinaire* **1989**, *21*, 140.
- Dyke, T. M.; Sams, R. A.; *J. Anal. Toxicol.* **1998**, *22*, 112.
- Moraes, E. C. F.; Rieser, D. S. A.; Palma, F. A.; Sznclwvar, R. B.; *Anais farm. e quim.* **1957**, *8*, 7.
- Salvadori, M. C.; *Cademo Técnico Escola de Veterinária UFMG*, **1997**, *19*, 77. <http://www.horserecingintfed.com>, acessada em Agosto 2003.
- ILAC (International Laboratory Accreditation Cooperation); *Accreditation, Requirements and operating criteria for horseracing Laboratories: ILAC-G7*, 1996.
- ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas); *NBR ISO/IEC 17025: Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaios e calibração*, Rio de Janeiro, 2005.
- Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária do BRASIL. Secretaria de Desenvolvimento Rural. Departamento de Fiscalização e Fomento da Produção Animal; *Código Nacional de Corrida*, Brasília, DF, 1996.
- Thompson, M.; Ellison, S. L. R.; Wood, R.; *Pure Appl. Chem.* **2002**, *74*, 835.
- van der Voet, H.; van Rhijn, J. A. H.; van de Wiel, H. J.; *Anal. Chim. Acta.* **1999**, *391*, 159.
- Silverstein, R. M.; Bassler, G. C.; Morrill, T. C.; *Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos*, 5ª ed., Livros Técnicos e Científicos: Rio de Janeiro, 1994.
- INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial); *Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos*. DOQ-CGCRE-008, Rio de Janeiro, 2003.
- EURACHEM; *The Fitness for Purpose of Analytical Methods: A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*, 1ª ed., Teddington: UK, 1998. ISBN 0-948926-12-0.
- <http://sp.uconn.edu/~mchem1/aorchome/AORCHome.html>, acessada em Janeiro 2004.
- Pfleger, K.; Maurer, H. H.; Weber, A.; *Mass Spectral and CG Data of Drugs, Poisons, Pesticides, Pollutants and their Metabolites*, 2ª ed., VCH: Federal Republic of Germany, 1992.
- Lima, I. M. H. de; *Dissertação de Mestrado*, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Brasil, 2004.
- INMETRO; *Vocabulário Internacional de Termos Fundamentais e Gerais de Metrologia*, Rio de Janeiro, 1995.
- BIPM, IEC, IFCC, ILAC, ISO, IUPAC, IUPAP and OIML (1993); *Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement (GUM)*, 1ª ed. corrected and reprinted 1995.
- Chasin, A. M.; Chasin, M.; Salvadori, M. C.; *Rev. Farm. Bioquim.* **1994**, *30*, 49.
- Ribani, M.; Bottoli, C. B. G.; Collins, C. H.; Jardim, I. C. S. F.; Melo, L. F. C.; *Quim. Nova* **2004**, *27*, 771.
- ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária); *Resolução RE n°899*, de 29/05/2003.
- Tobin, T.; *Drugs and The Performance Horse*, Charles C. Thomas: Illinois, 1981.

O ENFOQUE DA METROLOGIA QUÍMICA EM ANÁLISES TOXICOLÓGICAS NA ATIVIDADE TURFÍSTICA: VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE CAFEÍNA EM MATRIZES BIOLÓGICAS.

India Maria H. de Lima

Laboratório Antidoping do Jockey Club Brasileiro, 22431-000 Rio de Janeiro - RJ, Brasil

Maurício N. Frota*

Departamento de Pós-Graduação em Metrologia para Qualidade e Inovação, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, 22453-900 Rio de Janeiro - RJ, Brasil

Como evidência de que a amostra E representa uma “amostra de branco” (portanto isenta de cafeína), o espectro de massas da Amostra E no tempo de retenção associado à substância cafeína foi comparado com dados de referência da Biblioteca da “Association of Official Racing Chemists (AORC)”, que claramente confirmou ausência de íons m/z característicos da cafeína nessa amostra, conforme ilustrado na Figura 1S.

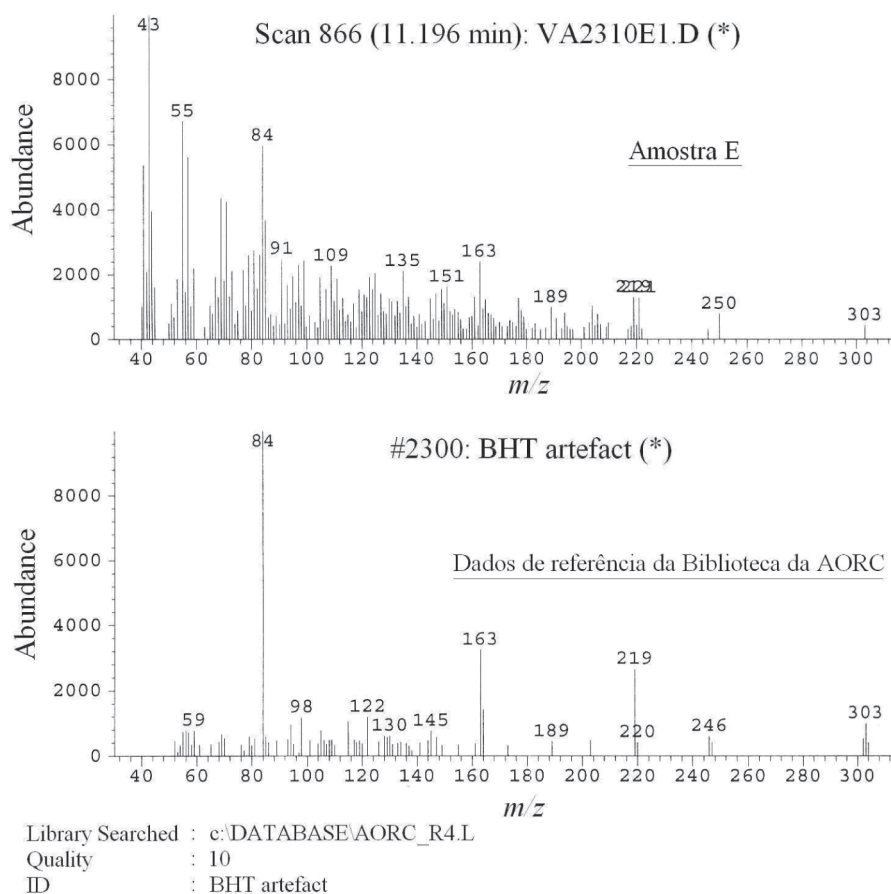


Figura 1S. Espectro de massas relativo à amostra E e sua comparação com dados de referência da base de dados da Biblioteca da Association of Official Racing Chemists (AORC)

Os dados da Tabela 1S confirmam a validação para o parâmetro “exatidão”, mostrando grau de exatidão superior a 77% para todas as concentrações estudadas.

Tabela 1S. Síntese dos resultados dos valores da exatidão.

Concentração (ng/mL)	“Valor obtido” (resposta cromatográfica do íon <i>m/z</i> 194)	“Valor real” (resposta cromatográfica do íon <i>m/z</i> 194)	Exatidão %
Branco ⁺	109867 a.i.	0	-
6	487792 a.i.	591870 a.i.	82
8	676300 a.i.	840451 a.i.	80
12	1016304 a.i.	1316557 a.i.	77
18	1561100 a.i.	1825573 a.i.	85
24	2268996 a.i.	2563160 a.i.	88

⁺ “branco de urina”, concentração igual a 0 ng de cafeína/mL de urina. “a.i.”: uma medida da intensidade de abundância (“abundance intensity”).

Os dados da Tabela 2S fundamentam a validação pelo parâmetro “reprodutibilidade”, realizada nos dias 1 e 2 de análises discutidos no trabalho. Para as concentrações estudadas, documenta os valores das razões (duas a duas) entre as respostas cromatográficas dos três íons característicos da cafeína (*m/z* 194/109; 194/67 e 109/67) bem como os respectivos componentes da “incerteza padrão” (tipo A), estimados com base na propagação da soma quadrática do desvio-padrão relativo associado às respostas cromatográficas de cada íon.

Tabela 2S. Média das razões entre os íons *m/z* 194, 109 e 67 e incertezas padrão associadas devido ao desvio padrão relativo (dias 1 e 2)

Concentrações (ng/mL)	Dia 1 (Analista 1)			Dia 2 (Analista 2)		
	Média ± Incerteza da razão <i>m/z</i> 194/109	Média ± Incerteza da razão <i>m/z</i> 194/67	Média ± Incerteza da razão <i>m/z</i> 109/67	Média ± Incerteza da razão <i>m/z</i> 194/109	Média ± Incerteza da razão <i>m/z</i> 194/67	Média ± Incerteza da razão <i>m/z</i> 109/67
	6	2,03±0,22	2,41±0,48	1,19±0,26	1,94±0,10	2,41±0,24
8	2,15±0,11	2,75±0,44	1,28±0,19	1,96±0,17	2,54±0,17	1,29±0,08
12	2,06±0,35	2,85±0,43	1,38±0,37	2,10±0,13	2,53±0,33	1,21±0,15
18	2,05±0,18	2,78±0,17	1,35±0,10	2,01±0,32	2,68±0,40	1,33±0,21
24	2,08±0,46	2,81±0,73	1,35±0,35	2,01±0,16	2,72±0,24	1,35±0,13

Fundamentando a conclusão de que o método mostrou-se robusto para a faixa de pH investigada, a Tabela 3S apresenta os valores médios (de nove réplicas) das respostas cromatográficas do íon *m/z* 194 e da razão *m/z* 194/109 (íons mais característicos da cafeína), indicando suas respectivas incertezas padrão, para os diferentes valores de pH e nas cinco concentrações investigadas.

Tabela 3S. Média da resposta cromatográfica do íon *m/z* 194 e da razão entre os íons *m/z* 194, 109 e respectivos componentes das incertezas padrão associadas, na faixa (9,2 ≤ pH ≤ 10), nas concentrações de 6, 8, 12, 18 e 24 ng de cafeína por mL de urina

Concentração (ng/mL)	pH	Média da resposta cromatográfica ± incerteza	
		íon <i>m/z</i> 194	razão <i>m/z</i> 194/109
6	9,2	536 618 ± 5%	1,66 ± 9%
8	9,2 ≤ pH ≤ 10	731 148 ± 1%	1,82 ± 10%
12	9,2 ≤ pH ≤ 10	1067939 ± 5%	1,85 ± 7%
18	9,2 ≤ pH ≤ 10	1491569 ± 15%	1,79 ± 22%
24	10,0	2133654 ± 8%	1,96 ± 11%

Não obstante o processo universalmente aceito de validação de métodos analíticos com base nos parâmetros analíticos discutidos no presente trabalho, cada vez mais, a participação em ensaios de proficiência tem sido recomendada¹⁴ como confirmação desse processo de validação. A Figura 2S ilustra o certificado de Participação do LAD/JCB em Programa oficial de Comparação Interlaboratorial coordenado pela Association of Official Racing Chemists (AORC).



Association of Official Racing Chemists

This Document Certifies that

Anti-Doping Laboratory, Jockey Club Brasileiro

has participated in the **2005** Proficiency Testing Program,

and has successfully isolated and identified the required number of unknown specimens in accordance with the Association's requirements.

Signature
Chairman, Proficiency Testing Committee

Signature
President, AORC

A O R C

Figura 2S. Participação do LAD/JCB em Programa oficial de Comparação Interlaboratorial