

8. FASE 2 DA PESQUISA: VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PROPOSTO PARA DETERMINAÇÃO DO AGENTE DOPANTE CAFEÍNA

No contexto da Fase 2 da Pesquisa, que visou capacitar o Laboratório Antidoping do Jockey Club Brasileiro com um método analítico confiável para determinação da substância dopante cafeína na matriz biológica (urina) de cavalos de corrida, o presente capítulo descreve a validação do método proposto (ALCAC-18), já incorporado à prática laboratorial de rotina.

8.1. Desenvolvimento experimental

Com base em planejamento prévio que permitiu definir experimentos-chave e fazendo uso do *aparatus* experimental e dos equipamentos já caracterizados no capítulo anterior o trabalho experimental desenvolveu-se com o propósito de validar o método analítico para determinação do agente dopante cafeína presente em amostras-padrão de urina de cavalos de corrida puro-sangue inglês. A validação do método foi realizada pela técnica da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas no modo de aquisição definido como *SCAN* (varredura), por intermédio do qual uma faixa de massas preestabelecida constitui objeto de análise. Conforme ilustrado na Figura 17, no contexto dos experimentos realizados, estabeleceu-se o espectro de massas do analito (cafeína) em questão identificando-se os íons característicos e as relações de área entre os mesmos. O espectro estabelecido para a cafeína foi comparado com dados de referência de uma biblioteca especializada mantida pela *Association of Official Racing Chemists* (AORC) assim permitindo comparar a autenticidade do analito. No espectro de massas da substância cafeína foram selecionados três íons característicos – os íons 194, 109 e 67 – cujas relações de área²⁵ foram utilizadas para qualificação do analito, sendo feitas três razões (combinação de três, dois a dois) entre esses íons (194/109, 194/67, 109/67). O

²⁵ Entende-se por “relação de área” o quociente entre as respostas cromatográficas associadas a quaisquer íons gerados pela análise espectrométrica.

percentual teórico de intensidade das relações entre os três íons é de 100%, 80% e 44% (Pfleger, 1992).

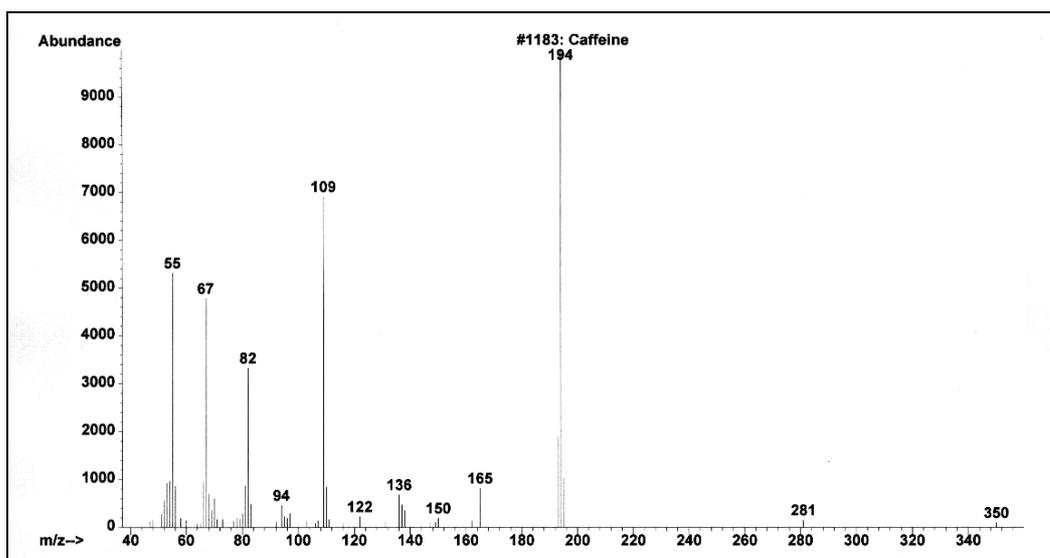


Figura 17. Espectro de massas da substância dopante cafeína.

8.2. Resultados da validação do método analítico proposto para determinação do agente dopante cafeína

O método analítico ALCAC-18 para determinação do agente dopante cafeína foi validado segundo oito fatores críticos, a seguir relacionados: (i) **seletividade**²⁶; (ii) **limite de detecção**; (iii) **linearidade**; (iv) **exatidão**; (v) **precisão**: (v-a) **repetitividade**; (v-b) **reprodutibilidade**; (vi) **recuperação**; (vii) **robustez** e (viii) **limite de determinação**. Individualmente conceituados no Capítulo 6 em conformidade ao Guia Eurachem²⁷, cada um desses fatores críticos são discutidos levando-se em conta o conceito propriamente dito, a análise das amostras, os resultados obtidos e a interpretação (discussão) desses resultados.

8.2.1. Validação: estudo do fator crítico seletividade (especificidade)

Conceito: refere-se à capacidade de resposta de um método a um determinado composto de interesse associado a uma matriz com várias substâncias químicas detectáveis ou não.

²⁶ Em amostras de fluidos biológicos (no presente estudo, a urina do cavalo puro-sangue inglês) submetidas a procedimentos analíticos, a presença de substâncias interferentes da matriz biológica pode representar problema na identificação de analitos.

O procedimento de validação do método analítico quanto ao fator crítico **seletividade** em análise cromatográfica consistiu em se demonstrar que, de fato, existe uma falta de resposta cromatográfica de interferentes no “branco”²⁸ (amostra isenta de substância dopante) da matriz biológica, associada ao tempo de retenção do analito em questão (cafeína).

Como etapa intrínseca do processo de determinação do agente dopante cafeína foram analisadas cinco amostras de “branco” da matriz biológica (urina) de diferentes cavalos puro-sangue inglês pertencentes ao laboratório para controle de dopagem do Jockey Club Brasileiro (LAD/JCB).

- **Análise das amostras** – As cinco amostras de “branco” de urina (isentas de substância dopante) acima mencionadas, de diferentes origens em volume de 6 mL cada foram previamente identificadas pelas letras A, B, C, D e E e submetidas ao procedimento analítico que compreende as etapas de extração (itens 7.3.5.3 e 7.3.5.4) e de análise cromatográfica (item 7.3.6.2), do capítulo 7 desta dissertação.
- **Apresentação de resultados** – Para todas as cinco amostras de “branco” de urina estudadas, a análise cromatográfica confirmou a ausência de substâncias interferentes, conforme documentado nos respectivos cromatogramas transcritos abaixo (Figuras 18 a 22) tendo sido considerado um tempo de retenção da cafeína de $T_r = 11,196 \text{ min}^{29}$. Para cada amostra, são apresentados os resultados típicos do cromatograma de íons totais e os respectivos espectros de massas, comparando-os aos espectros de referência da base de dados internacional da AORC.

²⁷ The fitness for purpose of analytical methods: A laboratory guide to method validation and related topics (1998).

²⁸ Define-se como amostra de “branco” qualquer amostra de fluidos biológicos (urina, plasma sanguíneo, saliva e outros) isenta de qualquer substância caracterizada como dopante.

²⁹ A leitura do tempo de retenção das substâncias analisadas é indicada pelo cromatógrafo a gás com a resolução de milésimo de minuto.

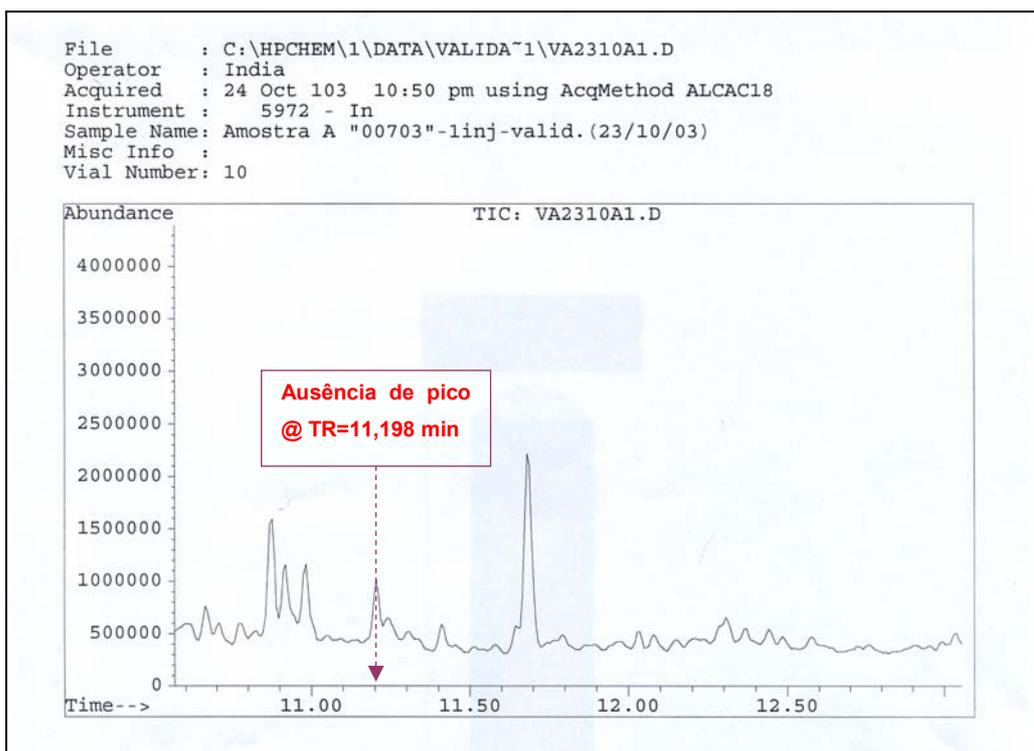


Figura 18-a. Cromatograma de Íons Totais da Amostra A (branco de urina).

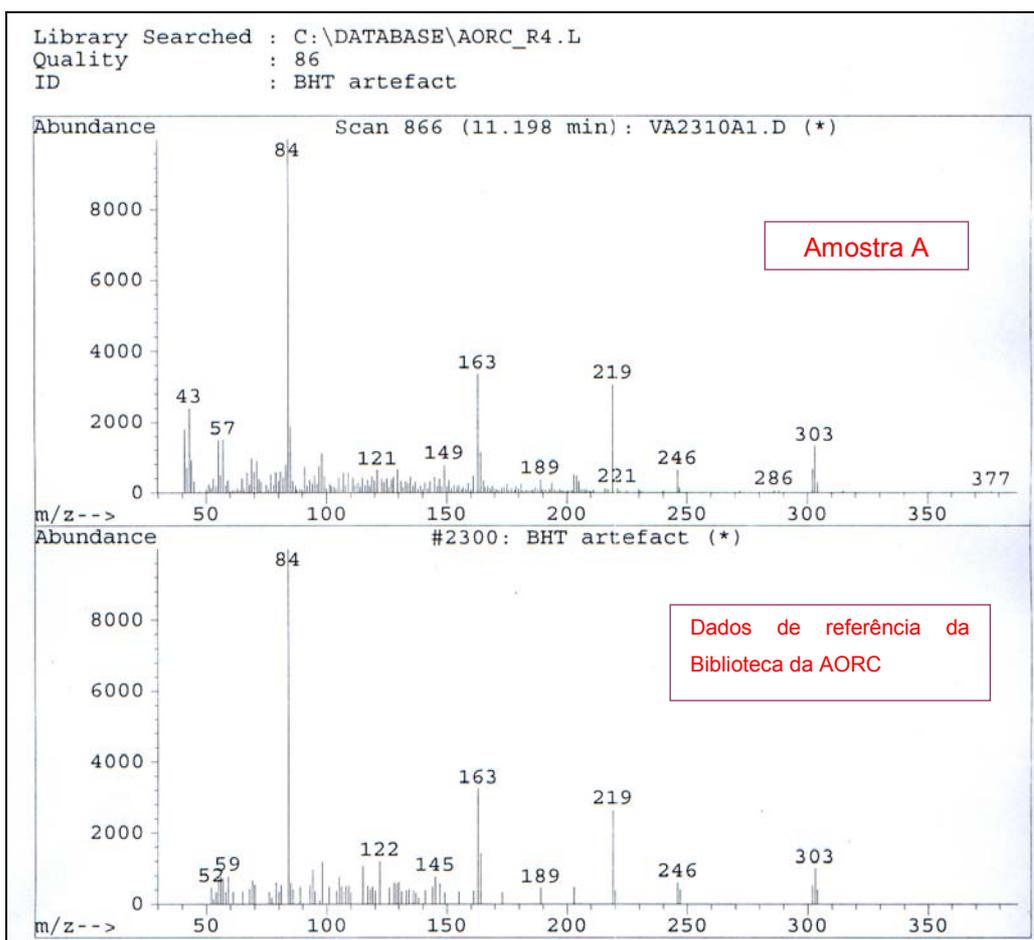


Figura 18-b. Espectro de massas relativo à amostra A e sua comparação com dados de referência da Biblioteca AORC.

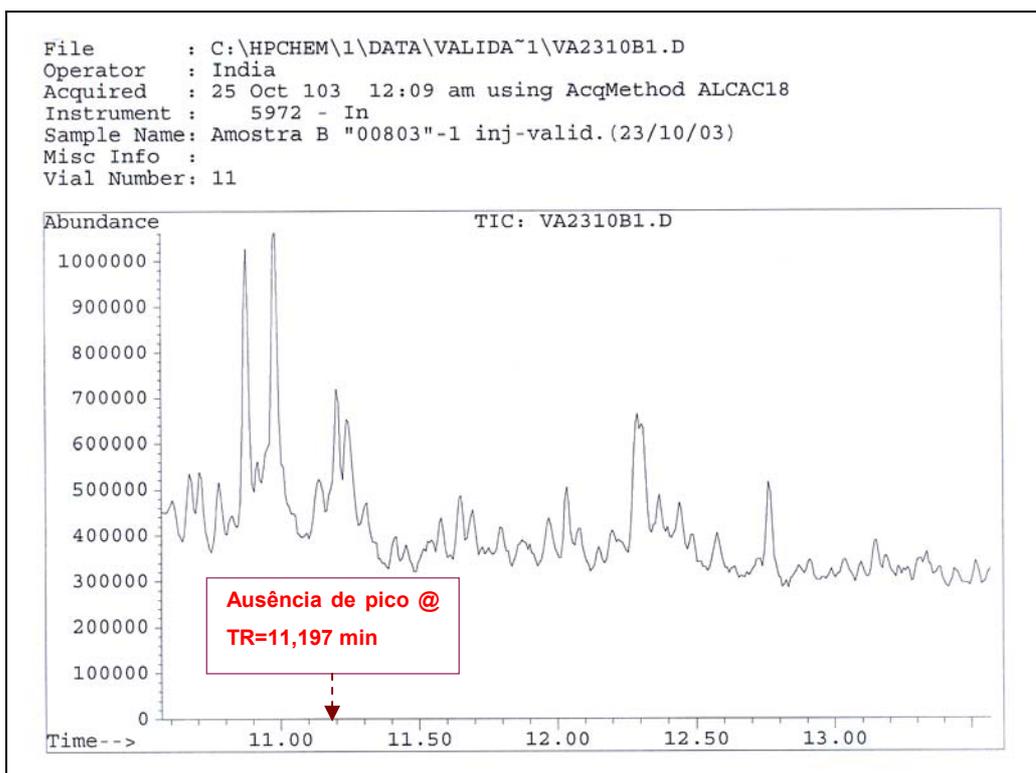


Figura 19-a. Cromatograma de Íons Totais da Amostra B (branco de urina).

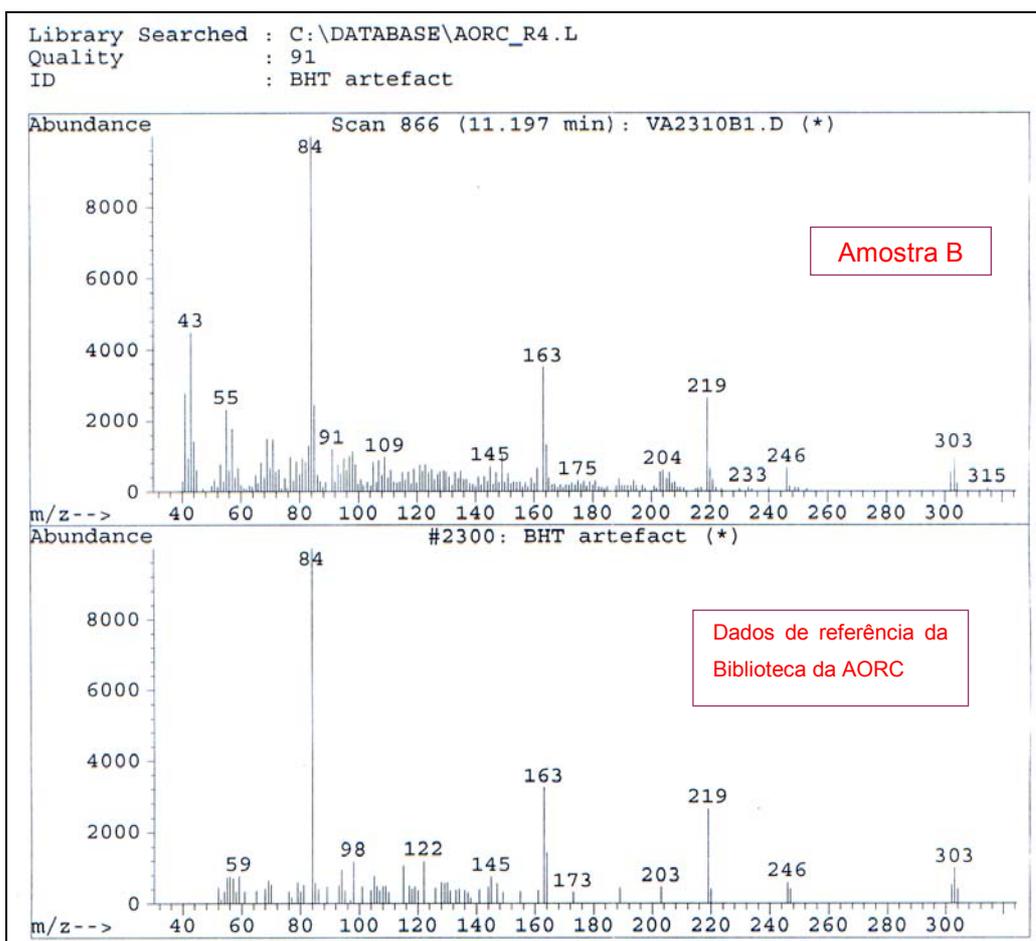


Figura 19-b. Espectro de massas relativo à amostra B e sua comparação com dados de referência da Biblioteca AORC.

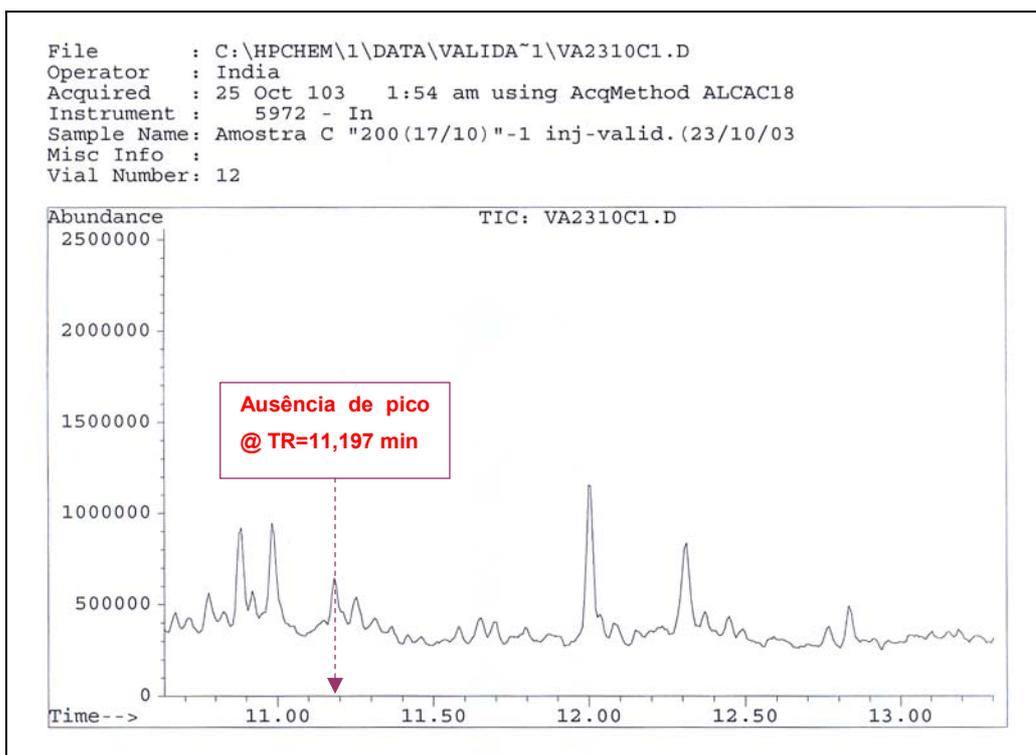


Figura 20-a. Cromatograma de Íons Totais da Amostra C (branco de urina).

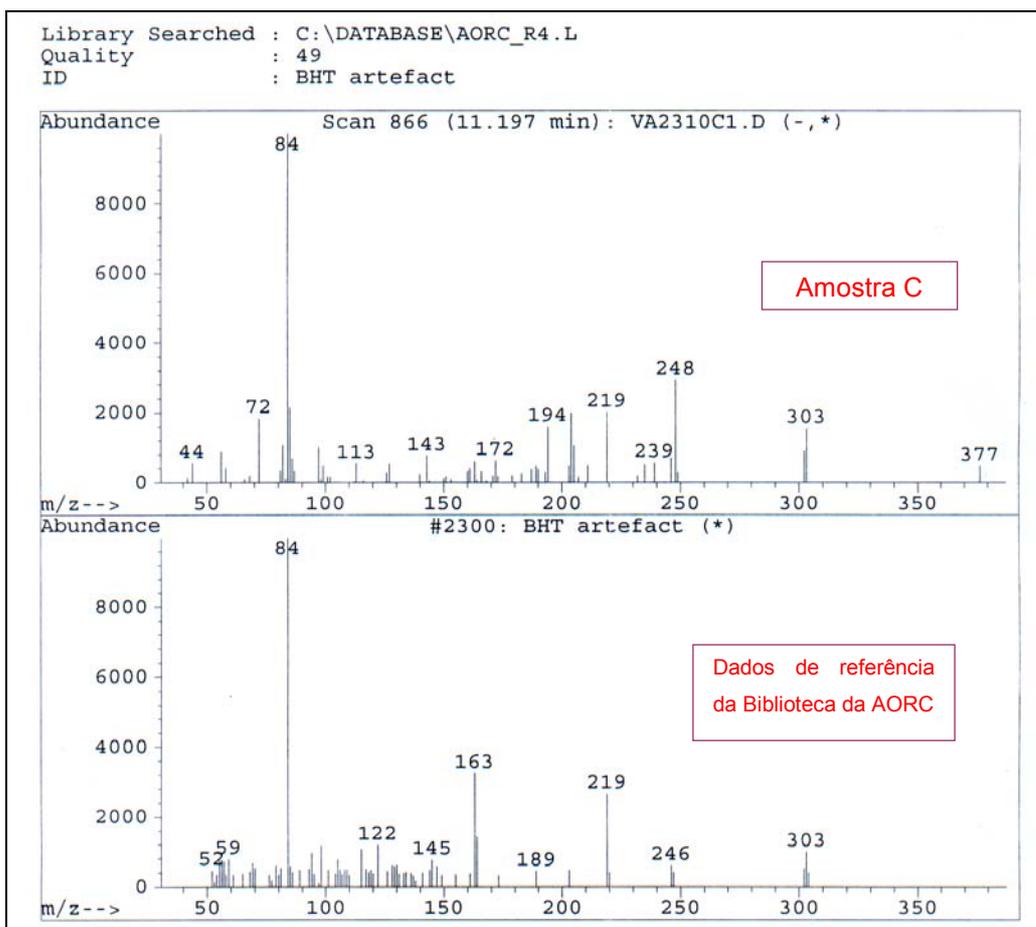


Figura 20-b. Espectro de massas relativo à amostra C e sua comparação com dados de referência da Biblioteca AORC.

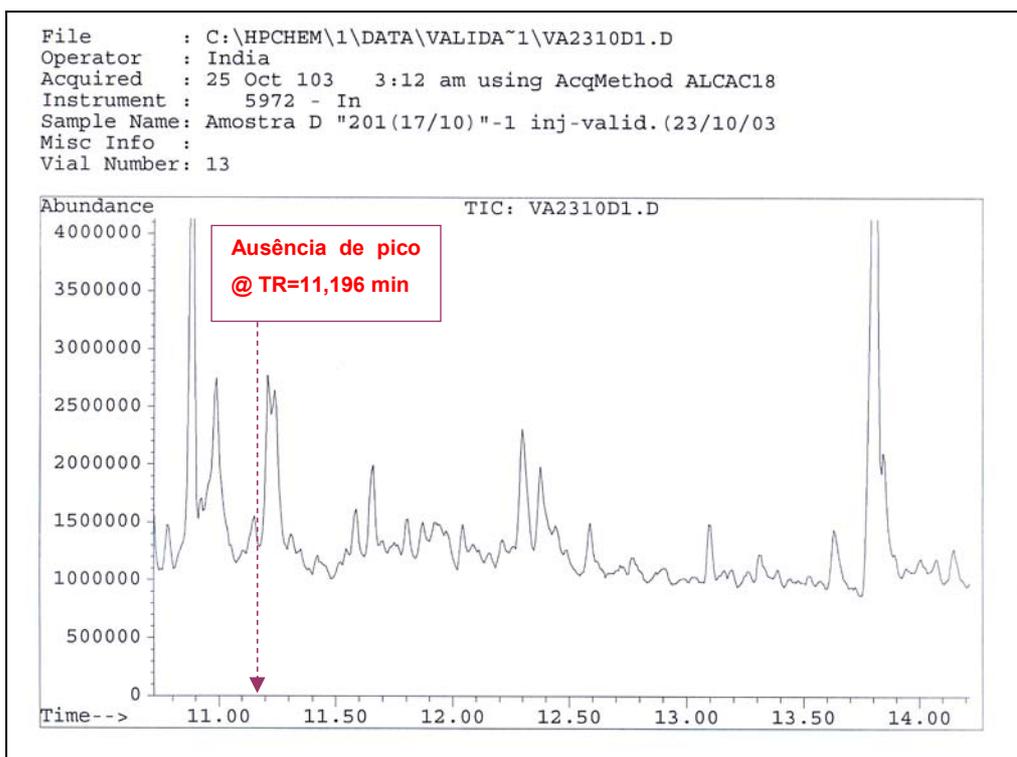


Figura 21-a. Cromatograma de Íons Totais da Amostra D (branco de urina).

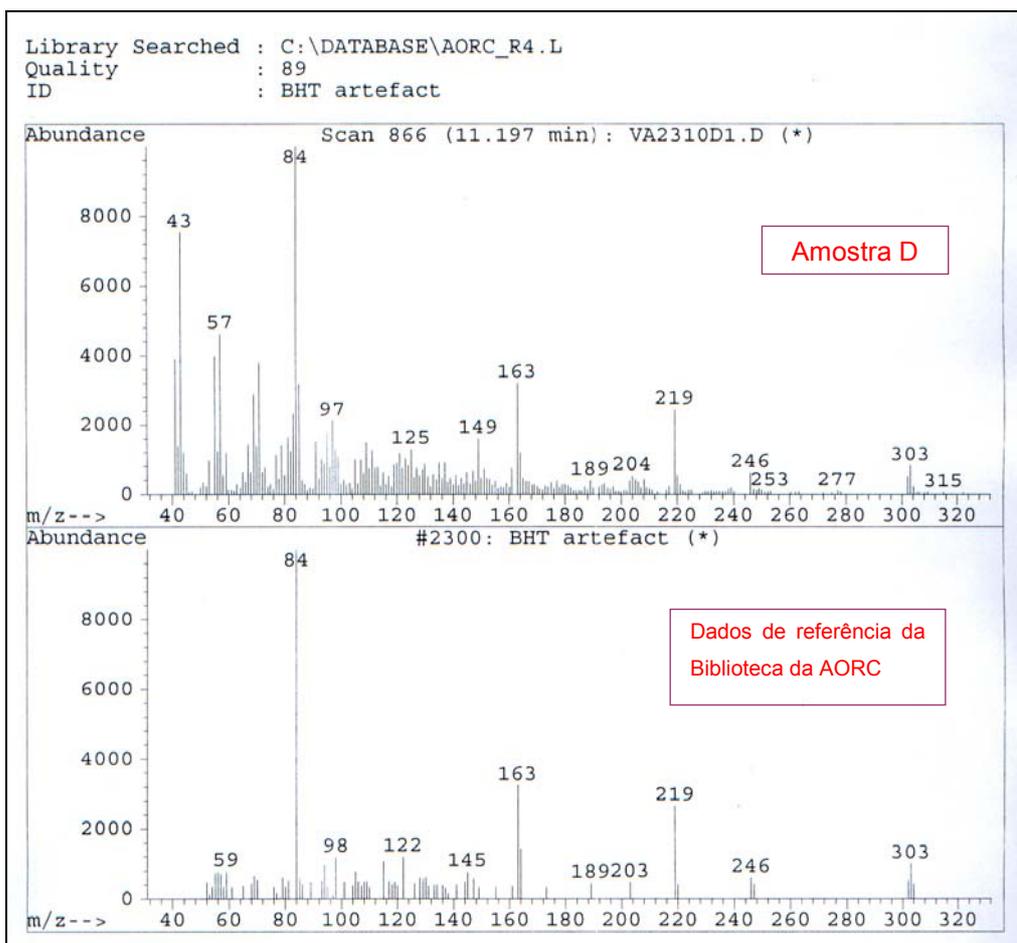


Figura 21-b. Espectro de massas relativo à amostra D e sua comparação com dados de referência da Biblioteca AORC.

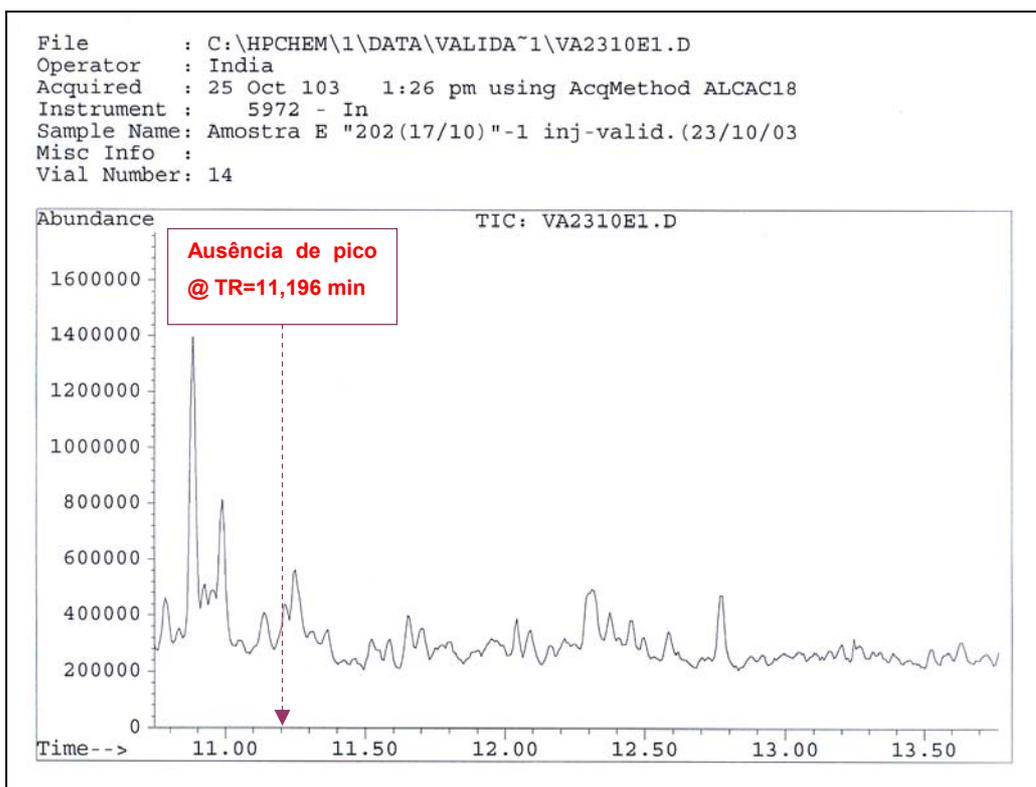


Figura 22-a. Cromatograma de Íons Totais da Amostra E (branco de urina).

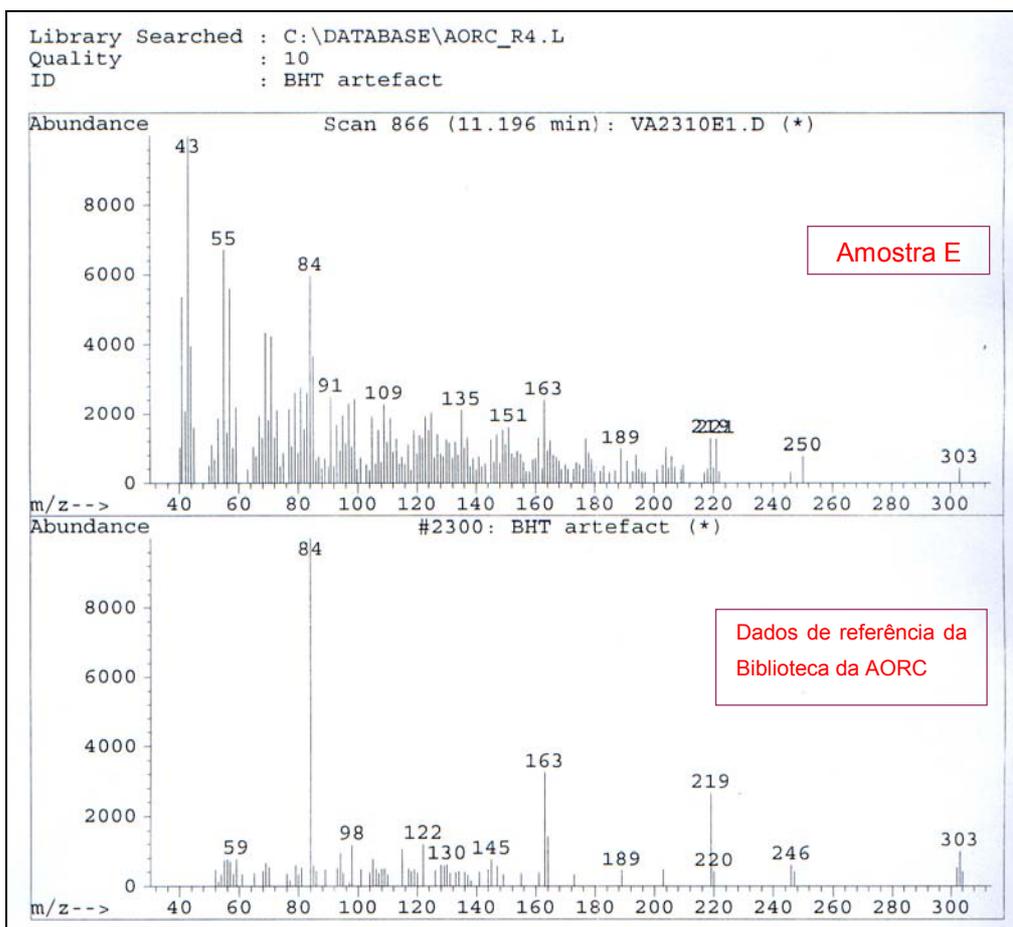


Figura 22-b. Espectro de massas relativo à amostra E e sua comparação com dados de referência da Biblioteca AORC.

- **Discussão dos experimentos** – Com base nos espectros de massas das amostras e nos resultados apresentados acima cabe a seguinte constatação: substâncias interferentes: a ausência de substâncias interferentes da matriz biológica foi comprovada por intermédio da interpretação do espectro de massas obtido do pico cromatográfico nos tempos de retenção de cada amostra quando comparados aos seus respectivos espectros típicos da biblioteca de referência AORC.

Conclusão do estudo do fator crítico seletividade

O Quadro 6 abaixo resume, para as cinco amostras analisadas nos seus respectivos tempos de retenção, que houve, de fato, ausência de interferentes na matriz biológica estudada.

Quadro 6. Síntese dos resultados da validação para o fator crítico Seletividade.

Amostra	TR (min)	Interferentes
A	11,198	Ausência
B	11,197	Ausência
C	11,197	Ausência
D	11,196	Ausência
E	11,196	Ausência

A seletividade do método ALCAC-18 para a substância cafeína foi demonstrada (i) pela falta de resposta cromatográfica de interferentes no “branco” da matriz biológica associada ao tempo de retenção da cafeína e (ii) pela comparação do espectro de massas da cafeína, obtido em uma amostra de branco “fortificada”³⁰, com o espectro padrão da biblioteca de referência da AORC para esta mesma substância, conforme ilustrado pela Figura abaixo.

³⁰ A denominação “fortificar” constitui parte do jargão utilizado em laboratórios de análise para controle de dopagem para indicar que uma substância dopante foi adicionada a uma amostra de fluido biológico.

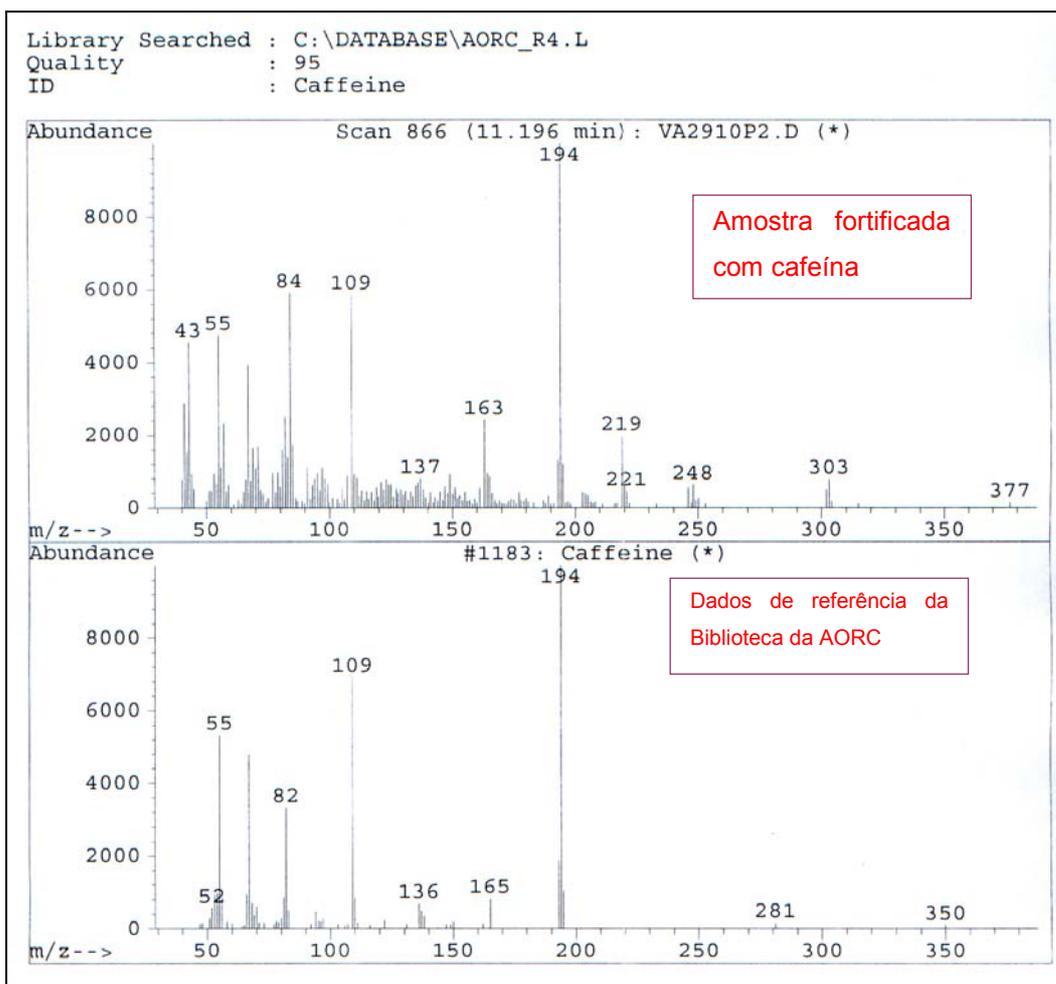


Figura 23. Espectro de massas relativo à substância cafeína e sua comparação com dados de referência da Biblioteca AORC.

Conforme evidenciado pelo espectro acima, pode-se afirmar que, de fato, existe um pico cromatográfico bem definido que corresponde à substância cafeína.

8.2.2. Validação: estudo do fator crítico limite de detecção

Conceito: refere-se a menor concentração de um analito em uma amostra, que pode ser detectada por um procedimento analítico.

Nesta etapa da validação, o objetivo foi a determinação do limite de detecção da cafeína na matriz biológica pela comprovação de uma probabilidade de 30% de positividade (presença de cafeína) em amostras de urina, para uma dada concentração, com enfoque na resposta binária SIM / NÃO, pelo método em questão (ALCAC-18). Em consonância ao tipo de análises desenvolvidas no laboratório para controle de dopagem (LAD/JCB), caracterizada como análises

de traços³¹, o critério de probabilidade adotado mostrou-se adequado e razoável para a avaliação conduzida pelo analista responsável.

- **Análise das amostras** – Alíquotas da solução-estoque padrão de cafeína (item 7.3.3) foram selecionadas para “fortificar” urinas negativas (isentas de substância dopante) em volume de 6 mL cada, resultando nas concentrações 4, 6, 8, 10 e 12 nanogramas de cafeína por mililitro de urina. Foram realizadas vinte repetições de extração de cada uma das cinco concentrações indicadas, portanto caracterizando um total de 100 experimentos. Adicionalmente, foi analisada uma amostra de 6 mL de urina negativa sem adição da solução-estoque padrão de cafeína, para servir de “branco” de urina, extraída juntamente com as amostras “fortificadas”. Todas as amostras foram submetidas ao procedimento analítico que compreende as etapas de extração (itens 7.3.5.3 e 7.3.5.4) e de análise cromatográfica (item 7.3.6.2). Em seguida, as amostras foram avaliadas individualmente, com base na análise dos picos associados à abundância dos três íons característicos da cafeína (íons 194, 109 e 67), decodificados pela interpretação “SIM” ou “NÃO”, caracterizando a “presença” ou “ausência” da substância cafeína, conforme documentado abaixo pelas figuras 24-a (resposta binária positiva) e 24-b (resposta binária negativa).

³¹ Análises que detectam substâncias dopantes quando estas se encontram em pequenas proporções na matriz biológica.

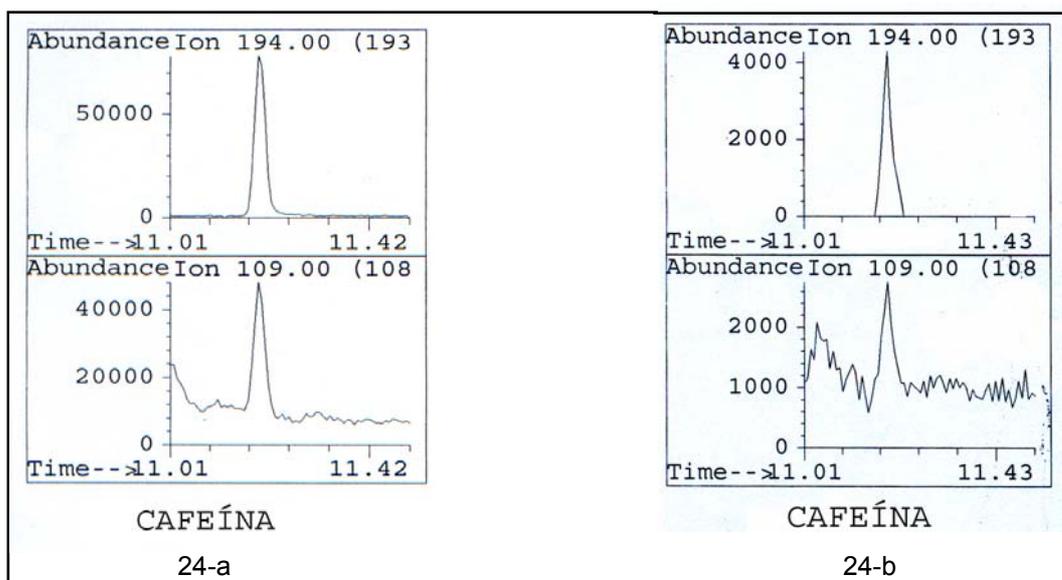


Figura 24. Espectogramas típicos da validação do fator crítico limite de detecção (24-a: resposta binária positiva e 24-b: resposta binária negativa).

- **Apresentação dos resultados** – No procedimento analítico acima caracterizado, as amostras de urina, na concentração de 6 ng/mL apresentaram resultado positivo em 30% de suas determinações. Pela interpretação do sistema cromatógrafo a gás/espectrômetro de massas (CG/EM) que faz uso do parâmetro de integração denominado “valid.e³²”, foram determinados os valores das áreas dos três íons característicos da cafeína (íons 194, 109 e 67). Como verificação da presença de valores aberrantes dentre os experimentos realizados (valores que podem ser rejeitados com justificativa) foram utilizados os testes tradicionalmente usados em química analítica³³: o Teste de Grubbs³⁴ e o Teste Q³⁵ (Critério de Dixon), conforme documentados nas Tabelas I-1 e I-2 (Anexo I), testes de consistência esses aplicados ao valores determinados para a área do íon 194 (íon mais abundante da cafeína). A partir dos valores das áreas do íon 194, para cada uma das cinco concentrações estudadas, foram calculados a média, o desvio-padrão e o coeficiente de variação das vinte repetições de extração e da razão entre os três íons característicos da cafeína (194, 109 e

³² Nomenclatura própria adotada para caracterizar todos os parâmetros de integração necessários para o cálculo das áreas dos íons característicos da cafeína. A integração é realizada pelo *software* do sistema cromatógrafo a gás/espectrômetro de massas

³³ Uma alternativa também usual seria utilizar o critério de Chauvenet. Optou-se, entretanto, pelos critérios indicados já que constituem práticas usuais em química analítica.

³⁴ Teste unilateral, ou seja, aplicado para valores altos ou baixos em relação aos dados analisados, para identificação de valores dispersos.

³⁵ Teste bilateral, ou seja, aplicado para valores altos e baixos (em relação à série numérica em questão), para identificar valores dispersos.

67), apresentados na Tabela I-3 (Anexo I), que documenta os resultados destas vinte repetições de extração de cada uma das cinco concentrações de cafeína presente na urina.

- **Correção dos resultados** – Cada resultado correspondente às análises cromatográficas de cafeína foi corrigido pelo desvio local do padrão interno de diazepam em relação à média do mesmo, já que para cada amostra foi feita uma “fortificação” independente de diazepam. A Tabela I-4 (Anexo I) documenta o fator de correção. É interessante observar que a média dos valores locais do fator de correção tende ao valor unitário, o que confirma que os desvios refletem variações estocásticas no preparo das 100 amostras independentes do padrão interno de diazepam (20 replicatas para cada uma das concentrações estudadas), conforme evidenciado pela Figura 26 (item 8.2.3), que compara os resultados originais (Figura 26-a) com os resultados corrigidos pela aplicação do fator de correção, os resultados locais da cromatografia da cafeína mantem a linearidade e suavizam a correlação da resposta cromatográfica do íon 194 com as diferentes concentrações de cafeína estudadas.
- **Discussão dos experimentos** – A análise das amostras e a apresentação dos resultados referentes ao estudo do limite de detecção possibilitaram calcular (i) o desvio-padrão relativo e (ii) a razão entre íons e componentes das incertezas associadas, a seguir discutidos:
 - **Desvio-padrão relativo** – calculado com base (i) nas médias e desvios-padrão das repetições das medições associadas às concentrações preestabelecidas e (ii) nas médias e desvios-padrão das relações entre os íons característicos da cafeína (194/109; 194/67 e 109/67), documentados na Tabela 2 foi possível determinar os respectivos desvios-padrão relativos, que satisfazem o critério preconizado por Chasin (1994), uma vez que seus valores são iguais ou inferiores a 20%, refletindo a prática dos laboratórios de controle de dopagem.
 - **Razão entre íons e componentes da incerteza associada** – Com base nos dados da Tabela 3 que documenta o valor das razões entre as áreas dos três íons característicos da cafeína (194/109; 194/67 e 109/67), foi possível calcular os componentes da incerteza

associada devido ao desvio padrão dessas razões de área. A partir desses dados foram construídos os gráficos (Figura 25), relacionando essas razões às respectivas concentrações de cafeína em urina (expressa em ng/mL). A interpretação dos referidos gráficos demonstrou que, para as concentrações estudadas, as razões dos íons exibem um comportamento semelhante entre si, possuindo um mesmo nível de componentes da incerteza associada devido ao desvio padrão das medições realizadas.

A síntese desses resultados reflete o estudo do fator crítico limite de detecção, conforme resumidamente caracterizados pelos dados da Tabela 2 (Síntese das Tabelas I-3 e I-4, Anexo I) e da Tabela 3 (razões entre os íons da cafeína), a seguir apresentadas.

Tabela 2. Síntese dos resultados das Tabelas I-3 e I-4.

Concentração ng/mL		4	6	8	10	12
CV ($\leq 20\%$) (ÁREA)	Íon 194	20	20	20	14	17
	Íon 194 (c/correção)	15	19	10	13	11
	Razão 194/109	7	8	12	9	8
	Razão 194/67	15	20	10	15	7
	Razão 109/67	17	12	10	13	8
CV $\leq 2\%$	TR* do Íon 194	0,030	0,031	0,036	0,037	0,038

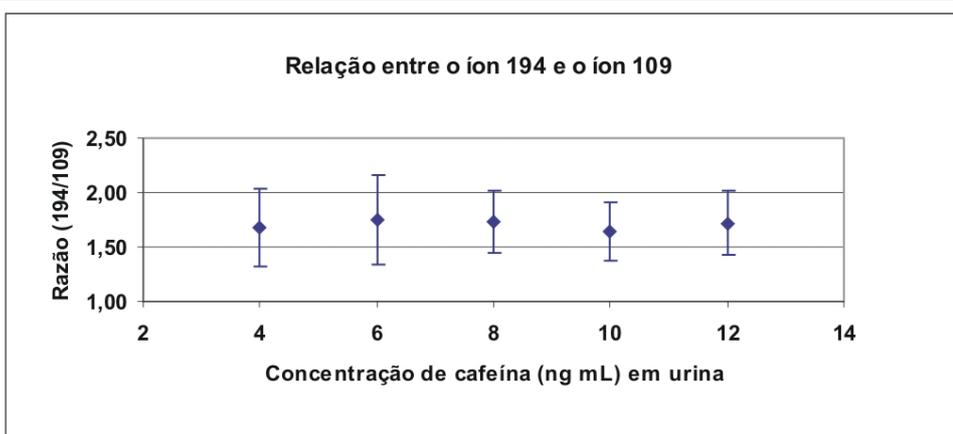
*TR – tempo de retenção (min).

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

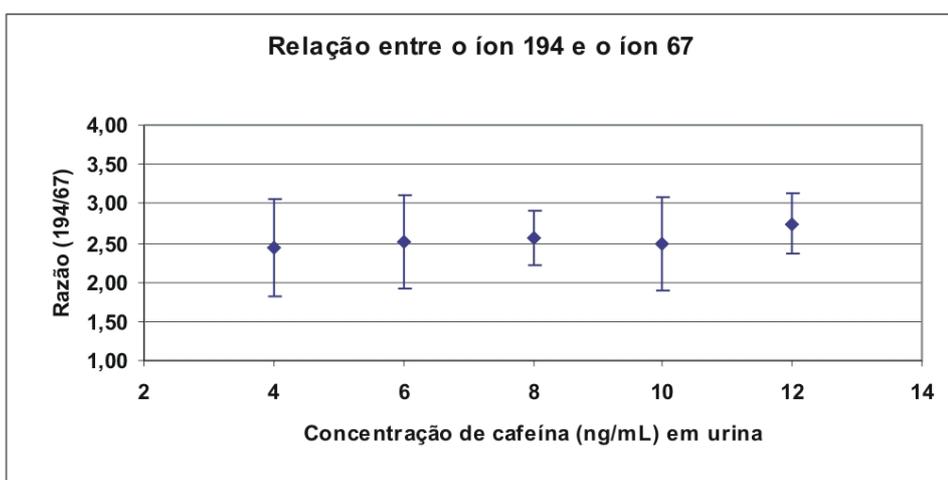
Concentrações (ng/mL)	Média da razão 194/109	Média da razão 194/67	Média da razão 109/67	*Incerteza da razão 194/109	*Incerteza da razão 194/67	*Incerteza da razão 109/67
4	1,68	2,44	1,45	0,36	0,63	0,40
6	1,74	2,51	1,44	0,41	0,60	0,34
8	1,73	2,57	1,48	0,29	0,35	0,25
10	1,64	2,48	1,52	0,27	0,59	0,33
12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

Nota: *Os valores indicados na Tabela como “Incerteza da razão”, na realidade correspondem apenas ao componente da incerteza devido ao desvio padrão (propagação das incertezas associadas a cada um dos íons na relação indicada). Para se calcular a incerteza global, faz-se necessário incluir na propagação todos os demais fatores: incerteza de pesagem, de pipetagem, dos materiais de referência, procedimento de cálculo não trivial.

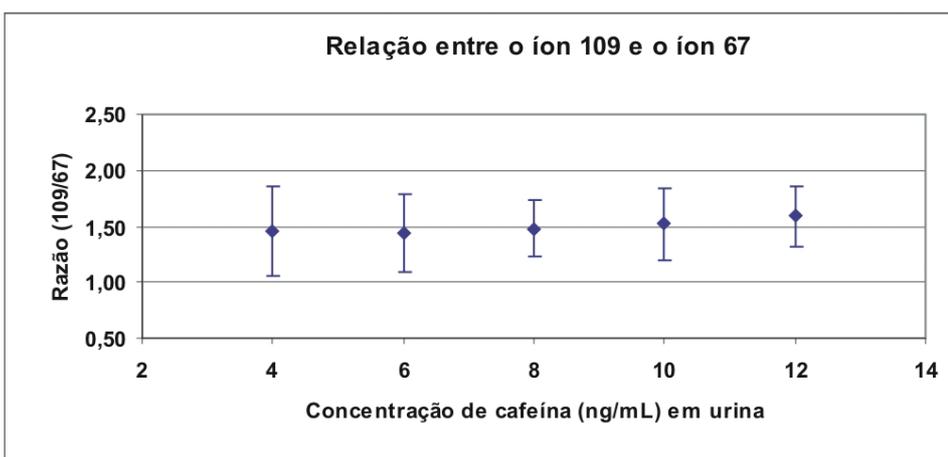
Os dados da tabela 3 podem ser visualizados pelos gráficos da Figura 25, que exibem, em barras, esses componentes da incerteza propagada devida ao desvio padrão de cada íon.



25a. Razão (194/109) *versus* Concentração de cafeína (ng/mL) em urina e componente da Incerteza propagada devido ao desvio padrão.



25b. Razão (194/67) *versus* Concentração de cafeína (ng/mL) em urina e componente da Incerteza propagada devido ao desvio padrão.



25c. Razão (109/67) *versus* Concentração de cafeína (ng/mL) em urina e componente da Incerteza propagada devido ao desvio padrão.

Figura 25: Razão entre íons *versus* concentração (ng/mL), indicando as barras dos componentes da incerteza propagada, devido ao desvio padrão de cada íon.

Conclusão do estudo do fator crítico limite de detecção

O presente estudo (validação do método proposto para o fator crítico limite de detecção), realizado a partir dos cem experimentos já caracterizados nas Tabelas I-3 e I-4 (Anexo I), permitiu determinar, para as cinco concentrações estudadas, o valor de 6 ng/mL para limite de detecção da cafeína no método ALCAC-18, uma vez foi esta a concentração que apresentou resultado positivo em 30% das repetições realizadas.

No que concerne os componentes da incerteza da medição indicados na Tabela 3, a discussão foi remetida para o item 8.2.6 que trata especificamente do valor-limite de determinação, entendido como uma estimativa das incertezas associadas.

8.2.3. Validação: estudo do fator crítico linearidade

Conceito: refere-se à habilidade de um método em gerar resultados que sejam diretamente proporcionais às concentrações do analito correspondente a uma determinada faixa de concentração.

No âmbito desta pesquisa a linearidade foi avaliada pela análise de regressão pelos mínimos quadrados. Por intermédio de uma análise computacional fundamentada no sistema cromatógrafo a gás/espectrômetro de massas (CG/EM) e utilizando o parâmetro de integração denominado “valid.e”, foram determinados os valores das áreas do íon mais abundante da cafeína (íon 194) para cada concentração preestabelecida, com o objetivo de construir o gráfico que relaciona concentração de cafeína em urina (expressa em ng/mL) *versus* área do íon 194.

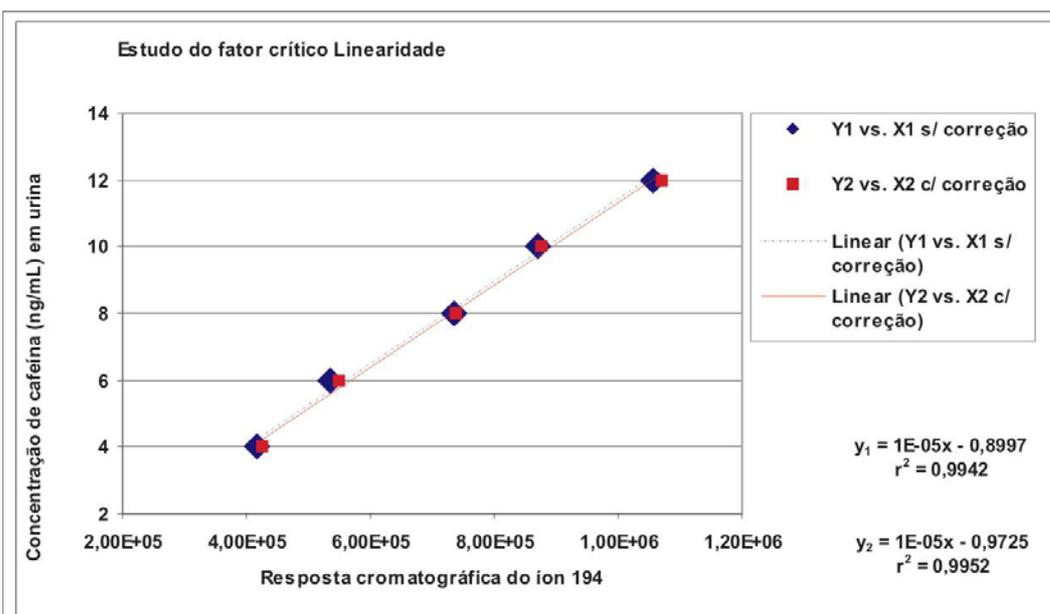
- **Análise das amostras** – Alíquotas da solução-estoque padrão de cafeína (item 7.3.3) foram selecionadas para fortificar urinas negativas (isentas de substância dopante) em volume de 6 mL cada, resultando nas concentrações 4, 6, 8, 10 e 12 nanogramas de cafeína por mililitro de urina. Foram realizadas vinte repetições de extração de cada uma das concentrações indicadas, portanto caracterizando um total de 100 experimentos. Adicionalmente, foi analisada uma amostra de 6 mL de urina negativa sem adição da solução-estoque padrão de cafeína, para servir de “branco” de urina, extraída juntamente com as amostras “fortificadas”. Todas as amostras foram submetidas ao procedimento analítico que compreende as etapas de extração (itens 7.3.5.3 e 7.3.5.4) e de análise cromatográfica (item 7.3.6.2).

- **Apresentação dos resultados** – Os valores da área do íon 194 para cada concentração estudada foram determinados pela interpretação do sistema cromatógrafo a gás/espectrômetro de massas (CG/EM), fazendo uso do parâmetro de integração denominado “valid.e”. A partir desses dados foram construídas as curvas de correlação, ilustradas na Figura 26a, que se mostraram lineares e que relacionam os valores das concentrações preestabelecidas de cafeína e as médias das áreas do íon 194 para cada uma dessas concentrações, valores esses documentados na Tabela I-3 (Anexo I). Novas curvas de correlação foram construídas pelo fato de o “branco” de urina ter indicado presença do íon 194 no tempo de retenção da cafeína. Para complementar o estudo foram realizados novos cálculos da área do íon 194 subtraindo deste o valor da área respectiva no “branco” de urina, procedimento de cálculo metrologicamente adequado. Com os novos valores, demonstrados na Tabela 4, foram construídas novas curvas de correlação, ilustradas na Figura 26b, que também se mostraram lineares.
- **Correção dos resultados** – Similarmente ao que foi utilizado no caso da validação do fator crítico limite de detecção, também para a validação do fator crítico linearidade, cada resultado da cromatografia da cafeína foi corrigido pelo desvio local do padrão interno de diazepam em relação à média do mesmo, conforme caracterizado na Tabela I-4 do Anexo I.

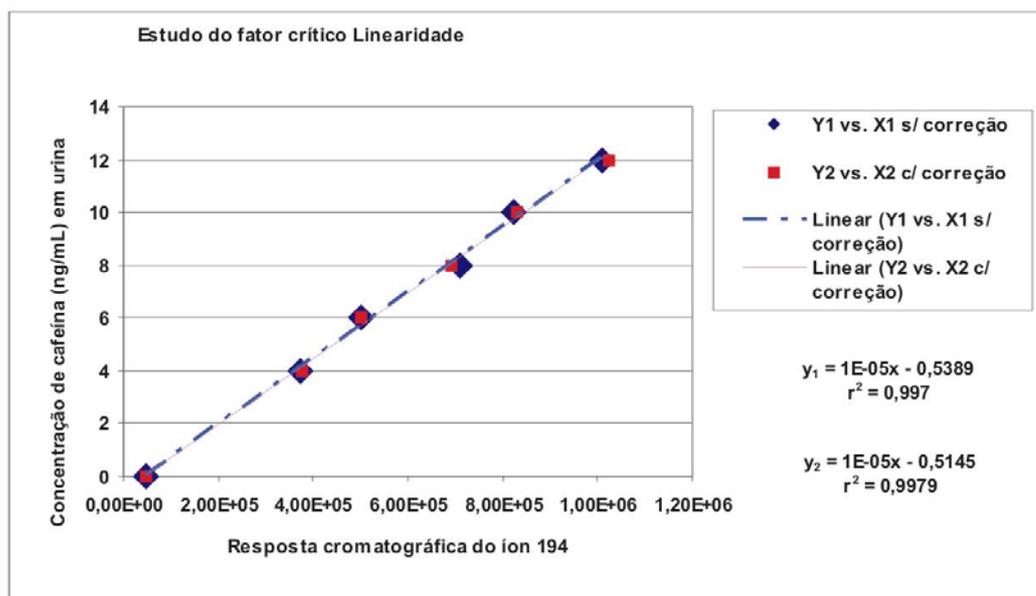
Tabela 4. Área do íon 194 subtraído o valor da área respectiva no “branco” de urina.

Amostras analisadas Concentração de cafeína (ng/mL) em urina	Nova área do íon 194 (valores expressos em ucc*)	Nova área do íon 194 corrigida (valores expressos em ucc*)
4	371921 ucc	378029 ucc
6	499913 ucc	548387 ucc
8	710631 ucc	690784 ucc
10	824677 ucc	831217 ucc
12	1011352 ucc	1025068 ucc
BRANCO (0 ng/mL)	46186 ucc	46186 ucc

*ucc: unidade indicada pelo cromatógrafo, proporcional aos impactos do íon característico da cafeína captados pelo detector acoplado ao cromatógrafo (visualizados pelas áreas dos picos cromatográficos medidos por integral de área).



26a. Correlação em ausência de amostra de “branco”



26b. Correlação em presença de amostra de “branco”

Figura 26. Curvas de correlação do estudo do fator crítico Linearidade.

- **Discussão dos experimentos** – Com base na análise das amostras e apresentação dos resultados referentes ao estudo da linearidade, foi possível calcular o valor do coeficiente de correlação linear. Para as curvas de correlação construídas (Figura 26), que se mostraram lineares, foi possível determinar os respectivos coeficientes de correlação linear: $r^2=0,9942$ e $r^2=0,9952$ (área do íon 194 corrigida) e $r^2=0,997$ e $r^2=0,9979$ (área do íon 194 corrigida), valores esses maiores que 0,90, portanto em conformidade com a orientação INMETRO (DOQ/CGCRE-008, INMETRO 2003).

Conclusão do estudo do fator crítico linearidade

O presente estudo, realizado a partir dos cem experimentos já caracterizados na Tabela I-3 (Anexo I), que possibilitaram construir as curvas de correlação e calcular os coeficientes de correlação linear permitiram comprovar a linearidade do método na faixa de concentração estudada, conforme ilustrado na Figura 26.

8.2.4. Validação: estudo do fator crítico exatidão

Conceito: refere-se ao grau de concordância entre o resultado de uma medição e um valor verdadeiro do mensurando.

A exatidão do método foi avaliada “fortificando-se” três amostras de urina negativa (isentas de substância dopante) com alíquotas da solução-estoque padrão de cafeína nas concentrações 6, 8, 12, 18 e 24 nanogramas de cafeína por mililitro de urina, que correspondem respectivamente a: (a) limite de detecção; (b) valor limite de determinação; (c) duas vezes o limite de detecção; (d) três vezes o limite de detecção e (e) quatro vezes o limite de detecção. Após a extração do analito (cafeína) das amostras “fortificadas” e injeção no instrumento analítico, a área do íon mais abundante da cafeína (íon 194) dessas amostras é comparada com a área deste mesmo íon do material de referência (cafeína) quando adicionado a um solvente puro (metanol, utilizado no presente trabalho) nas mesmas concentrações. O valor do material de referência é o valor “assumido” como sendo o valor real. A exatidão é expressa em porcentagem dos erros sistemáticos e aleatórios e calculada com base na expressão:

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

- **Análise das amostras** – Alíquotas da solução-estoque padrão de cafeína (item 7.3.3) foram selecionadas para “fortificar” urinas negativas (isentas de substância dopante) em volume de 6 mL cada, resultando nas concentrações 6, 8, 12, 18 e 24 nanogramas de cafeína por mililitro de urina. Foram realizadas três repetições de extração de cada uma das concentrações indicadas. Adicionalmente, foi analisada uma amostra de 6 mL de urina negativa sem adição da solução-estoque padrão de cafeína, para servir de

“branco” de urina, extraída juntamente com as amostras “fortificadas”. Todas as amostras foram submetidas ao procedimento analítico que compreende as etapas de extração (itens 7.3.5.3 e 7.3.5.4) e de análise cromatográfica (item 7.3.6.2). Nessa avaliação cada repetição foi injetada em triplicata para análise cromatográfica, como também o material de referência (cafeína) adicionado ao solvente puro – metanol – nas mesmas concentrações.

- **Apresentação dos resultados** – Pela interpretação do sistema cromatógrafo a gás/espectrômetro de massas (CG/EM) e utilizando o parâmetro de integração denominado “valid.e”, foram obtidos os valores da área do íon mais abundante da cafeína (íon 194). Como o “branco” de urina apresentou sinal para o íon 194 no mesmo tempo de retenção da cafeína, para os cálculos da área de íon 194 foi subtraído o valor da área respectiva no “branco”, procedimento metrologicamente adequado. A partir desses dados, para cada concentração considerada foram calculados a média, o desvio-padrão e o coeficiente de variação das repetições de extração, resultados estes documentados nas Tabelas I-5 e I-6 (Anexo I). Com os dados da Tabela I-6 foram construídos dois gráficos, ilustrados na Figura 27, que se mostraram linear e que relacionam, respectivamente, a concentração de cafeína em urina (expressa em ng/mL) *versus* área do íon 194 e a concentração de cafeína em metanol (expressa em ng/mL) *versus* área do íon 194, proporcional à resposta cromatográfica.

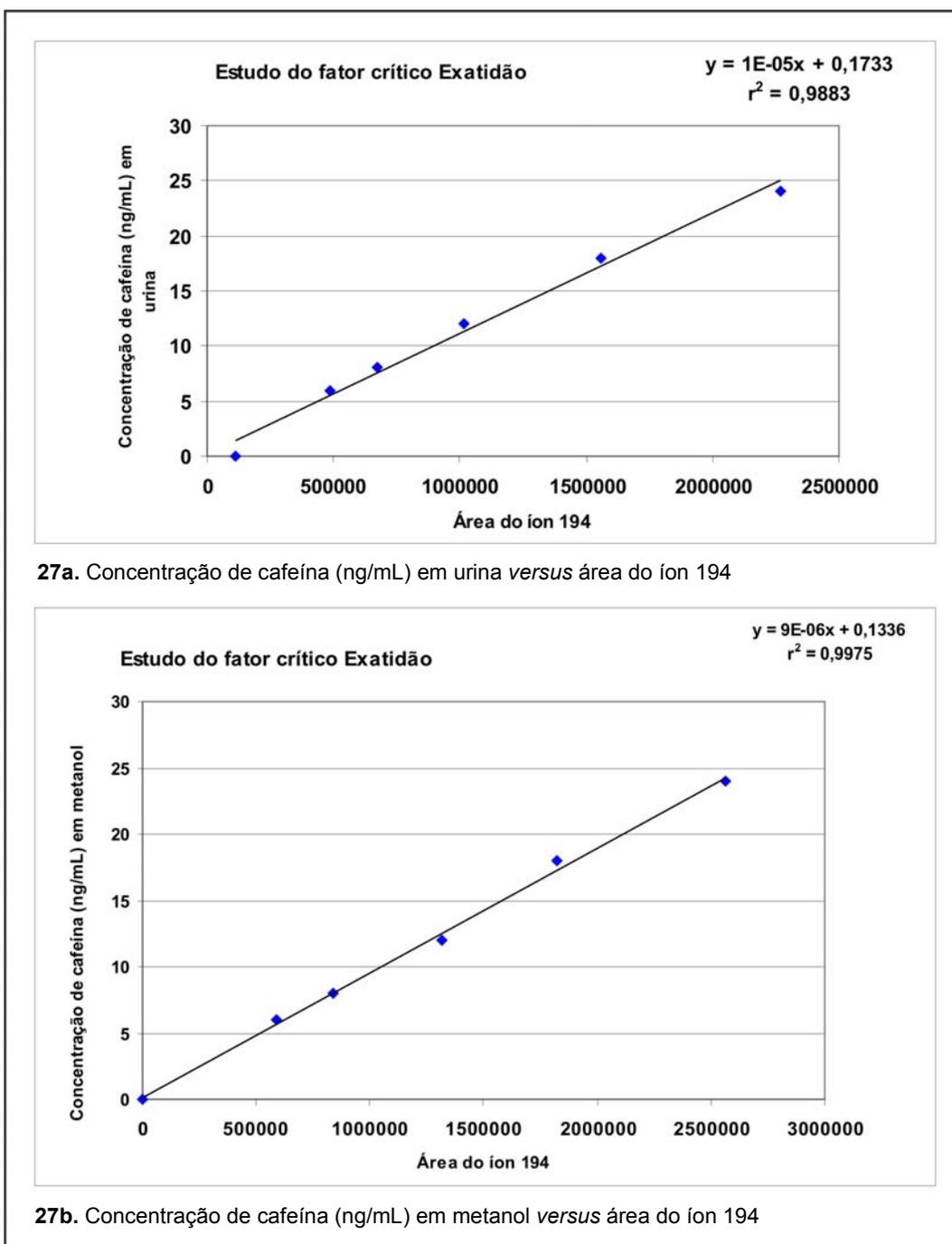


Figura 27. Curvas de correlação do estudo do fator crítico Exatidão.

- **Discussão dos experimentos** – A análise das amostras e a apresentação dos resultados referentes ao estudo da exatidão possibilitaram calcular (i) variação da concentração obtida em relação à adicionada (teórica), (ii) o desvio-padrão relativo e (ii) valor do coeficiente de correlação linear, a seguir discutidos:
 - **Variação da concentração obtida em relação a concentração adicionada (teórica)** – o valor da média das áreas do íon 194 de cada concentração indicada variou de uma quantidade inferior a

20% em relação a média das áreas do íon 194 da respectiva concentração adicionada (Tabelas I-5 e I-6 no Anexo I), considerado como resultado adequado para análises de controle de dopagem segundo o critério de Chasin (1994).

- **Desvio-padrão relativo** – calculado com base nas médias e desvios-padrão das áreas do íon mais abundante da cafeína (íon 194), foi possível determinar os respectivos desvios-padrão relativos, documentados nas Tabelas I-5 e I-6 (Anexo I), que satisfazem o critério preconizado por Chasin (1994), uma vez que seus valores são inferiores a 20% o que caracteriza a prática dos laboratórios de controle de dopagem.
- **Valor do coeficiente de correlação linear** – para as curvas de correlação construídas (Figura 27), que se mostraram linear, foi possível determinar os respectivos coeficientes de correlação linear: $r^2=0,9883$ e $r^2 =0,9975$, valores esses maiores que 0,90, conforme referenciado pelo INMETRO (DOQ/CGCRE-008, INMETRO 2003).

Conclusão do estudo do fator crítico exatidão

A partir dos valores encontrados para a exatidão do método nas duas situações estudadas, resumidamente caracterizados pelos dados da Tabela 5, concluiu-se que a exatidão foi adequada, demonstrando uma concordância aceitável entre o valor real da substância na amostra e o obtido pelo processo analítico. Os gráficos ilustrados na Figura 27 demonstraram uma adequada correlação entre concentração de cafeína em urina e área do íon 194 e entre concentração de cafeína em metanol e área do íon 194, com $r^2 = 0,9883$ e $r^2 =0,9975$, respectivamente.

Tabela 5. Síntese dos resultados dos valores da Exatidão.

Concentração ng/mL	Resposta cromatográfica do íon 194* - valor obtido	Resposta cromatográfica do íon 194** - valor real	Exatidão %
Branco ***	109867 ucc	0	
6	487792 ucc	591870 ucc****	82
8	676300 ucc	840451 ucc	80
12	1016304 ucc	1316557 ucc	77
18	1561100 ucc	1825573 ucc	85
24	2268996 ucc	2563160 ucc	88

*Íon mais abundante da cafeína nas amostras de urina.

** Íon mais abundante da cafeína em solução metanólica.

*** Concentração igual a 0 ng/mL.

**** **ucc**: unidade indicada pelo cromatógrafo, proporcional aos impactos do íon característico da cafeína captados pelo detector acoplado ao cromatógrafo (visualizados pelas áreas dos picos cromatográficos medidos por integral de área).

8.2.5. Validação: estudo do fator crítico precisão

A precisão do método ALCAC-18, objeto deste estudo, é avaliada nas suas duas categorias: (i) repetitividade e (ii) reprodutibilidade.

8.2.5.1. Estudo do fator crítico repetitividade

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) que deve apresentar valor menor ou igual a 20% em conformidade ao critério referenciado por Chasin (1994), validado pela prática dos laboratórios para controle de dopagem. A análise considerou as áreas do íon mais abundante da cafeína (íon 194) em cinco concentrações de cafeína diferentes, com vinte repetições de cada concentração, analisadas num mesmo dia. A repetitividade foi avaliada para o tempo de retenção do analito (cafeína) que deve apresentar coeficiente de variação menor ou igual a 2%.

- **Análise das amostras** – Alíquotas da solução-estoque padrão de cafeína (item 7.3.3) foram selecionadas para “fortificar” urinas negativas (isentas de substância dopante) em volume de 6 mL cada, resultando nas concentrações 4, 6, 8, 10 e 12 nanogramas de cafeína por mililitro de urina. Foram realizadas vinte repetições de extração de cada uma das concentrações indicadas, perfazendo um total de 100 experimentos. Adicionalmente, foi

analisada uma amostra de 6 mL de urina negativa sem adição da solução-estoque padrão de cafeína, para servir de “branco” de urina, extraída juntamente com as amostras “fortificadas”. Todas as amostras foram submetidas ao procedimento analítico que compreende as etapas de extração (itens 7.3.5.3 e 7.3.5.4) e de análise cromatográfica (item 7.3.6.2).

- **Apresentação dos resultados** – Por intermédio de uma análise computacional fundamentada no sistema cromatógrafo a gás/espectrômetro de massas (CG/EM), utilizando o parâmetro de integração denominado “valid.e”, foram determinados os valores das áreas dos três íons característicos da cafeína (íons 194, 109 e 67). Objetivando a verificação da presença de valores aberrantes dentre os experimentos realizados foram aplicados os testes tradicionalmente usados em química analítica: o Teste de Grubbs e o Teste Q – Critério de Dixon, como demonstrado nas Tabelas I-1 e I-2 (Anexo I), testes esses aplicados aos valores determinados para a área do íon 194 (íon mais abundante da cafeína). A partir dos valores das áreas do íon 194, para cada concentração foram calculados a média, o desvio-padrão e o coeficiente de variação das vinte repetições de extração e da razão entre os três íons característicos da cafeína (194, 109 e 67), resultados esses apresentados na Tabela I-3 (Anexo I).
- **Correção dos resultados** – Similarmente às validações anteriores, os resultados da cromatografia da cafeína foram corrigidos pelo fator de correção que leva em consideração desvios da média do padrão interno de diazepam (Tabela I-4, Anexo I).
- **Discussão dos experimentos** – A análise das amostras e a apresentação dos resultados referentes ao estudo da repetitividade possibilitaram calcular: (i) o desvio-padrão relativo, (ii) o desvio-padrão relativo do tempo de retenção e (iii) a razão entre os íons e as incertezas associadas, a seguir discutidos:
 - **Desvio-padrão relativo** – calculado com base (i) nas médias e desvios-padrão das repetições das medições associadas às concentrações preestabelecidas e (ii) nas médias e desvios-padrão das relações entre os íons característicos da cafeína (194/109; 194/67 e 109/67), documentados na Tabela 2 (apresentada no item 8.2.2), foi possível determinar os respectivos desvios-padrão

relativos, que satisfazem o critério preconizado por Chasin (1994), uma vez que seus valores são iguais ou inferiores a 20%, refletindo a prática dos laboratórios de controle de dopagem.

- **Desvio-padrão relativo do tempo de retenção** – calculado com base na média e desvio padrão do tempo de retenção das repetições de extração, (Tabela I-3 no Anexo I), o desvio-padrão relativo do tempo de retenção do analito (cafeína) ficou menor que 2%, para cada concentração estudada, em conformidade com análises de controle de dopagem.
- **Razão entre íons e componentes da incerteza associada** – Com base nos dados da Tabela 3 (apresentada no item 8.2.2), que documenta o valor das razões entre as áreas dos três íons característicos da cafeína (194/109; 194/67 e 109/67), foi possível calcular os componentes da incerteza associada devido ao desvio padrão dessas razões de área. A partir desses dados foram construídos os gráficos (Figura 25) apresentados no item 8.2.2, relacionando essas razões às respectivas concentrações de cafeína em urina (expressa em ng/mL). A interpretação dos referidos gráficos demonstrou que, para as concentrações estudadas, as razões dos íons exibem um comportamento semelhante entre si, possuindo um mesmo nível de componentes das incertezas associadas devido ao desvio padrão das medições realizadas.

A síntese desses resultados reflete o estudo do fator crítico repetitividade, resumidamente caracterizados nas Tabelas 2 e 3, apresentadas no item 8.2.2.

Conclusão do estudo do fator crítico repetitividade

O presente estudo do fator crítico repetitividade realizado a partir dos cem experimentos já caracterizados na Tabela I-3 (Anexo I), permitiu concluir que o método ALCAC-18 foi repetitivo, isto é, apresentou um adequado grau de concordância entre os resultados das medições sucessivas realizadas para o propósito a que se destina, que é extração e detecção da substância dopante cafeína.

8.2.5.2. Estudo do fator crítico reprodutibilidade

Conceito: refere-se ao grau de concordância entre os resultados de medição efetuados sob condições variadas de medição.

Foi avaliada com base no cálculo do coeficiente de variação (desvio padrão relativo) que deve apresentar valor menor ou igual a 20% em conformidade ao critério referenciado por Chasin (1994), validado pela prática dos laboratórios para controle de dopagem. A análise considerou a área do íon mais abundante da cafeína (íon 194) em cinco concentrações de cafeína diferentes, com três repetições de cada concentração, em dias e analistas diferentes. A reprodutibilidade também foi avaliada para o tempo de retenção do analito (cafeína) que deve apresentar coeficiente de variação menor ou igual a 2%.

- **Análise das amostras** – Alíquotas da solução-estoque padrão de cafeína (item 7.3.3) foram selecionadas para “fortificar” urinas negativas (isentas de substância dopante) em volume de 6 mL cada, resultando nas concentrações 6, 8, 12, 18 e 24 nanogramas de cafeína por mililitro de urina. Foram realizadas três repetições de extração de cada uma das concentrações indicadas. Adicionalmente, foi analisada uma amostra de 6 mL de urina negativa sem adição da solução-estoque padrão de cafeína, para servir de “branco” de urina, extraída juntamente com as amostras “fortificadas”. Todas as amostras foram submetidas ao procedimento analítico que compreende as etapas de extração (itens 7.3.5.3 e 7.3.5.4) e de análise cromatográfica (item 7.3.6.2). Nessa etapa, cada repetição foi injetada em triplicata para análise cromatográfica.
- **Apresentação dos resultados** – Por intermédio de uma análise computacional fundamentada no sistema cromatógrafo a gás/espectrômetro de massas (CG/EM) e utilizando o parâmetro de integração denominado “valid.e” foram obtidos os valores das áreas dos três íons característicos da cafeína (íons 194, 109 e 67). Objetivando detectar valores aberrantes dentre os experimentos realizados foram utilizados: o Teste de Grubbs e o Teste Q - Critério de Dixon, conforme documentados nas Tabelas I-7, I-8, I-9 e I-10 (Anexo I). A partir dos valores da área do íon 194, para cada concentração foram calculados a média, o desvio-padrão e o coeficiente de variação das três repetições de extração e da razão entre os três íons característicos da cafeína. Os resultados obtidos no primeiro dia de extração pelo operador 1 e

no segundo dia de extração pelo operador 2, estão documentados nas Tabelas I-11 e I-13 (Anexo I), respectivamente.

- **Correção dos resultados** – Similarmente às validações anteriores, os resultados da cromatografia da cafeína foram corrigidos pelo fator de correção que leva em consideração desvios da média do padrão interno de diazepam (Tabelas I-12 e I-14, Anexo I).

- **Discussão dos experimentos** – A análise das amostras e a apresentação dos resultados referentes ao estudo da reprodutibilidade possibilitaram calcular (i) o desvio padrão relativo, (ii) o desvio-padrão relativo do tempo de retenção e (iii) a razão entre íons e componentes das incertezas associadas, a seguir discutidos:
 - **Desvio-padrão relativo** – calculado com base (i) nas médias e desvios-padrão das repetições das medições associadas às concentrações preestabelecidas e (ii) nas médias e desvios-padrão das relações entre os íons característicos da cafeína (194/109; 194/67 e 109/67), documentados nas Tabelas 6 e 7, foi possível determinar os respectivos desvios-padrão relativos, que satisfazem o critério preconizado por Chasin (1994), uma vez que seus valores são iguais ou inferiores a 20%, refletindo a prática dos laboratórios de controle de dopagem.

 - **Desvio-padrão relativo do tempo de retenção** – calculado com base na média e desvio padrão do tempo de retenção das repetições de extração (Tabelas I-11 e I-13, no Anexo I), o desvio-padrão relativo do tempo de retenção do analito (cafeína) ficou menor que 2%, para cada concentração estudada, em conformidade às análises de controle de dopagem.

 - **Razão entre íons e componentes da incerteza associada** – Com base nos dados das Tabelas 8 e 9, que documentam o valor das razões entre as áreas dos três íons característicos da cafeína (194/109; 194/67 e 109/67), foi possível calcular os componentes da incerteza associada devido ao desvio padrão dessas razões de área. A partir desses dados foram construídos os gráficos (Figuras 28 e 29) relacionando essas razões às respectivas concentrações de cafeína em urina (expressa em ng/mL). A interpretação dos

referidos gráficos demonstrou que, para as concentrações estudadas, as razões dos íons exibem um comportamento semelhante entre si, possuindo um mesmo nível de componentes das incertezas associadas devido ao desvio padrão das medições realizadas.

A síntese dos resultados encontrados reflete o estudo do fator crítico reprodutibilidade, resumidamente caracterizados pelos dados das Tabelas 6 e 7 (síntese das Tabelas I-11, I-12, I-13 e I-14), Anexo I) e das Tabelas 8 e 9 (razões entre os íons da cafeína), a seguir apresentadas.

Tabela 6. Síntese dos resultados das Tabelas I-11 e I-12.

Concentração ng/mL		6	8	12	18	24
CV ($\leq 20\%$) (ÁREA)	Íon 194	12	10	19	11	7
	Íon 194 (c/correção)	4	5	4	5	16
	Razão 194/109	6	5	7	2	0
	Razão 194/67	17	11	5	6	5
	Razão 109/67	12	16	5	8	4
CV $\leq 2\%$	TR* do Íon 194	0,045	0,033	0,018	0,005	0,024

*TR – tempo de retenção (min).

Tabela 7. Síntese dos resultados das Tabelas I-13 e I-14.

Concentração ng/mL		6	8	12	18	24
CV ($\leq 20\%$) (ÁREA)	Íon 194	19	11	12	17	9
	Íon 194 (c/correção)	5	7	4	11	5
	Razão 194/109	6	5	1	3	4
	Razão 194/67	13	8	10	1	3
	Razão 109/67	7	7	9	2	5
CV $\leq 2\%$	TR* do Íon 194	0,010	0,017	0,035	0,031	0,017

*TR – tempo de retenção (min).

Tabela 8. Média das razões entre os íons 194, 109 e 67 e componentes das incertezas associadas devido ao desvio padrão no primeiro dia de análise.

Concentrações (ng/mL)	Média da razão 194/109	Média da razão 194/67	Média da razão 109/67	Incerteza da razão 194/109	Incerteza da razão 194/67	Incerteza da razão 109/67
6	2,03	2,41	1,19	0,22	0,48	0,26
8	2,15	2,75	1,28	0,11	0,44	0,19
12	2,06	2,85	1,38	0,35	0,43	0,37
18	2,05	2,78	1,35	0,18	0,17	0,10
24	2,08	2,81	1,35	0,46	0,73	0,35

Tabela 9. Média das razões entre os íons 194, 109 e 67 e componentes das incertezas associadas devido ao desvio padrão no segundo dia de análise.

Concentrações (ng/mL)	Média da razão 194/109	Média da razão 194/67	Média da razão 109/67	Incerteza da razão 194/109	Incerteza da razão 194/67	Incerteza da razão 109/67
6	1,94	2,41	1,24	0,10	0,24	0,10
8	1,96	2,54	1,29	0,17	0,17	0,08
12	2,10	2,53	1,21	0,13	0,33	0,15
18	2,01	2,68	1,33	0,32	0,40	0,21
24	2,01	2,72	1,35	0,16	0,24	0,13

Os dados das Tabelas 8 e 9 podem ser visualizados pelos gráficos das Figuras 28 e 29, que mostram, em barras, os componentes da incerteza propagada devido ao desvio padrão de cada íon.

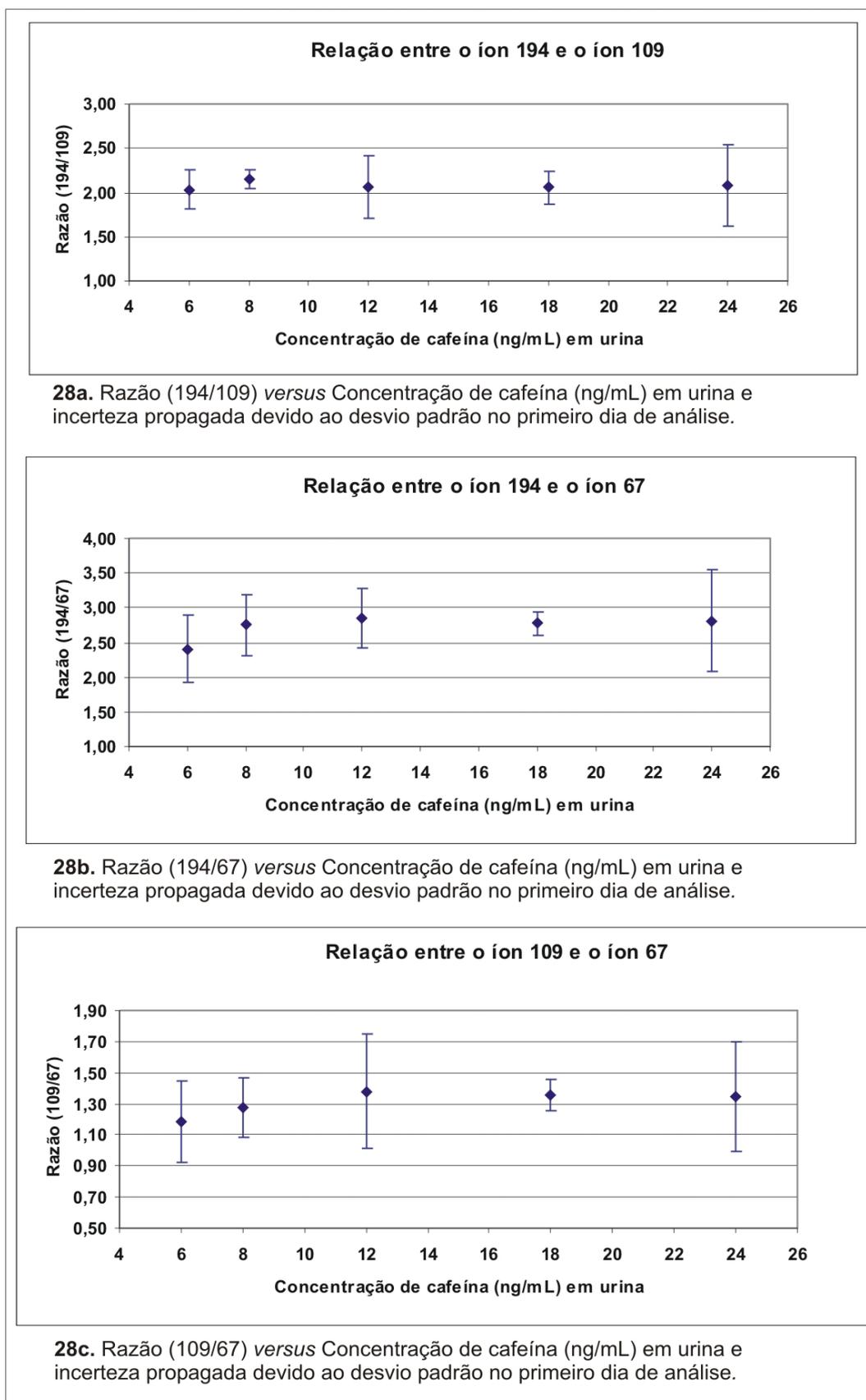
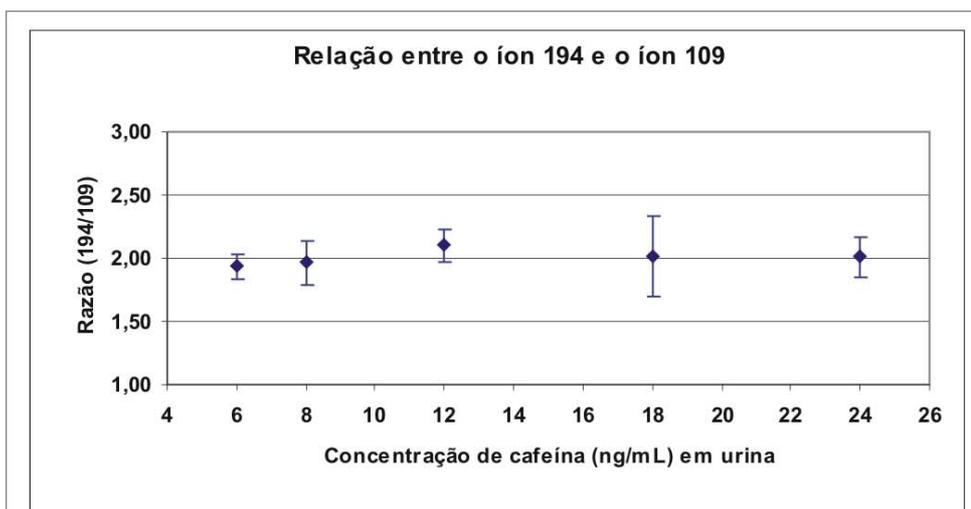
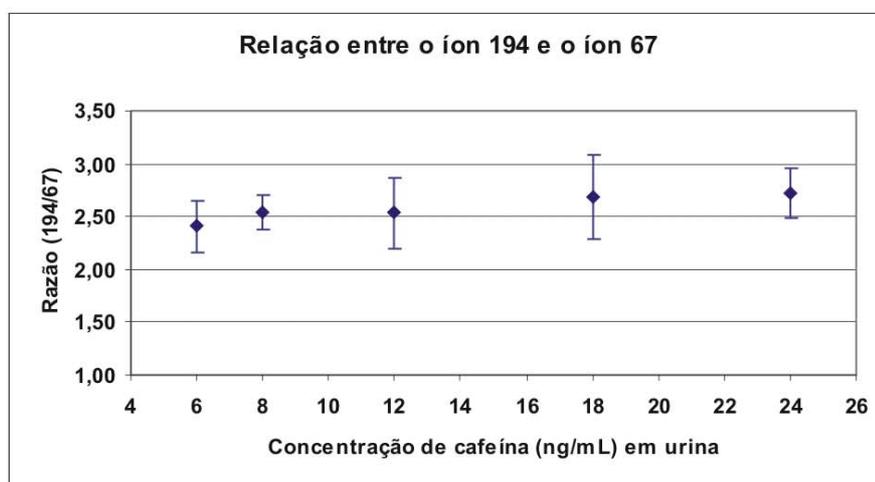


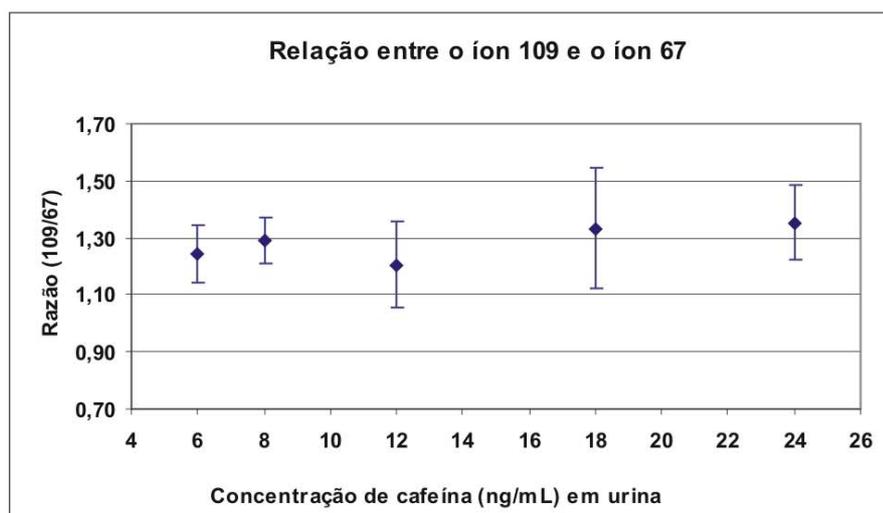
Figura 28. Razão entre íons *versus* concentração de cafeína (ng/mL), indicando as barras dos componentes da incerteza propagada, devido ao desvio padrão de cada íon no primeiro dia de análise.



29a. Razão (194/109) versus Concentração de cafeína (ng/mL) em urina e incerteza propagada devido ao desvio padrão no segundo dia de análise.



29b. Razão (194/67) versus Concentração de cafeína (ng/mL) em urina e incerteza propagada devido ao desvio padrão no segundo dia de análise.



29c. Razão (109/67) versus Concentração de cafeína (ng/mL) em urina e incerteza propagada devido ao desvio padrão no segundo dia de análise.

Figura 29. Razão entre íons versus concentração de cafeína (ng/mL), indicando as barras dos componentes da incerteza propagada, devido ao desvio padrão de cada íon no segundo dia de análise.

Conclusão do estudo do fator crítico reprodutibilidade

O presente estudo do fator crítico reprodutibilidade realizado a partir dos experimentos caracterizados nas Tabelas I-11, I-12, I-13, e I-14 (Anexo I) permitiu concluir que o método ALCAC-18 foi reprodutivo, isto é, apresentou um adequado grau de concordância entre os resultados das medições realizadas por operadores diferentes em dias diferentes, para o propósito a que se propõe, que é extração e detecção da substância dopante cafeína.

8.2.6. Validação: estudo do fator crítico recuperação

Conceito: refere-se à capacidade de um método em recuperar um analito adicionado a uma amostra que será submetida a um processo analítico.

Foi avaliada pela recuperação da substância cafeína, por intermédio da comparação da relação existente entre a área do íon mais abundante da cafeína (íon 194) em amostras de urinas negativas (isentas de substância dopante) “fortificadas” com essa substância numa concentração definida, seguindo o procedimento analítico completo e amostras de urinas negativas (isentas de substância dopante) “fortificadas” com essa substância, na mesma concentração, após todas as etapas do procedimento de extração. A concentração correspondente ao limite de detecção do método (6 ng/mL) foi a escolhida para o cálculo da recuperação. A recuperação do analito (Rec_{an}) foi calculada com base na expressão 4:

$$Rec_{an} = \sum \frac{Rec_j}{ni} \quad (4)$$

Na qual:

$$Rec_j = \frac{Yp_j}{\bar{Y}} \times 100$$

e

$$\bar{Y} = \sum \frac{Yr_j}{ni}$$

Y = área do íon 194.

p = amostra submetida ao procedimento analítico completo.

r = amostra “fortificada” após todas as etapas do procedimento de extração.

j = replicata na concentração definida.

ni = número de replicatas da concentração definida.

- **Análise das amostras (submetida ao procedimento analítico)** – Alíquotas da solução-estoque padrão de cafeína (item 7.3.3) foram selecionadas para “fortificar” urinas negativas (isentas de substância dopante) em volume de 6 mL cada, resultando na concentração de 6 nanogramas de cafeína por mililitro de urina. As amostras foram analisadas em triplicata. Adicionalmente, foi analisada uma amostra de 6 mL de urina negativa sem adição da solução-estoque padrão de cafeína, para servir de “branco” de urina, extraída juntamente com as amostras “fortificadas”. Todas as amostras foram submetidas ao procedimento analítico que compreende as etapas de extração (itens 7.3.5.3 e 7.3.5.4) e de análise cromatográfica (item 7.3.6.2). Nessa avaliação, cada repetição foi injetada em triplicata para análise cromatográfica.

- **Análise das amostras (amostra “fortificada” após etapa de extração)** – Foram selecionadas quatro amostras de urinas negativas (isentas de substância dopante) em volume de 6 mL cada. Todas as amostras foram submetidas ao procedimento analítico que compreende as etapas de extração (itens 7.3.5.3 e 7.3.5.4) e de análise cromatográfica (item 7.3.6.2), sendo que antes de serem submetidas à análise cromatográfica alíquotas da solução-estoque padrão de cafeína (item 7.3.3) foram selecionadas para “fortificar” essas quatro amostras, resultando na concentração de 6 nanogramas de cafeína por mililitro de urina. Nessa avaliação cada repetição foi injetada em triplicata para análise cromatográfica. A recuperação foi calculada em dois dias diferentes.

- **Apresentação dos resultados** – Por intermédio do sistema cromatógrafo a gás/espectrômetro de massas (CG/EM) e interpretando o parâmetro de integração denominado “valid.e”, foram obtidos os valores das áreas do íon mais abundante da cafeína (íon 194). Como o “branco” de urina apresentou sinal para o íon 194 no mesmo tempo de retenção da cafeína, no primeiro dia de análise, para os cálculos da área de íon 194 foi subtraído o valor da área respectiva no “branco”, procedimento metrologicamente adequado. A partir desses dados foram calculados a média, o desvio-padrão e o coeficiente de variação das três e quatro repetições, respectivamente. Os resultados obtidos, com os cálculos da recuperação e da incerteza associada

a essa medição nos primeiro e segundo dias de análise encontram-se nas Tabelas I-15 e I-16 (Anexo I), respectivamente.

- **Correção dos resultados** – Similarmente às validações anteriores, os resultados da cromatografia da cafeína foram corrigidos pelo fator de correção que leva em consideração desvios da média do padrão interno de diazepam (Tabelas I-15 e I-16, Anexo I).
- **Discussão dos experimentos** – A análise das amostras e a apresentação dos resultados referentes ao estudo da recuperação, em cada dia de ensaio permitiram o cálculo dos desvios-padrão relativos, com base nas médias e desvios-padrão das repetições das medições associadas às concentrações preestabelecidas (Tabelas I-15 e I-16 no Anexo I). Esses valores satisfazem o critério preconizado por Chasin (1994), uma vez que são iguais ou inferiores a 20%, refletindo a prática dos laboratórios de controle de dopagem.

Conclusão do estudo do fator crítico recuperação

O presente estudo do fator crítico recuperação permitiu concluir que o valor obtido para a recuperação da substância cafeína (Tabelas I-15 e I-16 no Anexo I) foi bastante adequado para o método aplicado. O resultado das análises foi considerado reprodutivo, como ilustra a Figura 30.

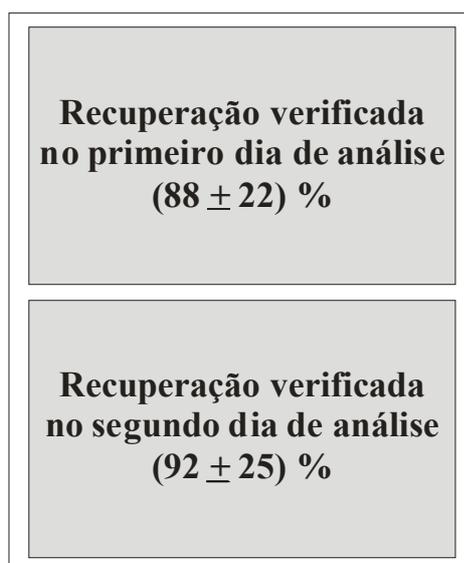


Figura 30. Representação do valor da recuperação e incerteza total combinada para os dois dias de análise.

8.2.7. Validação: estudo do fator crítico robustez

Conceito: refere-se à capacidade do método de permanecer inalterado frente a pequenas, mas deliberadas variações de parâmetros do mesmo.

No método analítico, especificamente na etapa de extração, o procedimento denominado “ajuste de pH” foi o parâmetro escolhido para fundamentar a robustez do método, objeto do presente estudo. O ajuste de pH (potencial de hidrogênio) é um parâmetro crítico no processo analítico, pois pequenas variações no valor da faixa de pH podem modificar o comportamento da substância em estudo (TOBIN, 1981, p.439-443).

- **Análise das amostras** – Alíquotas da solução-estoque padrão de cafeína (item 7.3.3) foram selecionadas para “fortificar” urinas negativas (isentas de substância dopante) em volume de 6 mL cada, resultando nas concentrações 6, 8, 12, 18 e 24 nanogramas de cafeína por mililitro de urina. As amostras foram analisadas em triplicata. Adicionalmente, foi analisada uma amostra de 6 mL de urina negativa sem adição da solução-estoque padrão de cafeína, para servir de “branco” de urina, extraída juntamente com as amostras “fortificadas”. Todas as amostras foram submetidas ao procedimento analítico que compreende as etapas de extração (itens 7.3.5.3 e 7.3.5.4) e de análise cromatográfica (item 7.3.6.2). Nessa avaliação cada repetição foi injetada em triplicata para análise cromatográfica. O valor do pH foi ajustado na faixa de 9,2 à 10,0 para as concentrações intermediárias e mantido a 9,2 para a primeira concentração e 10,0 para a última concentração.

- **Apresentação dos Resultados** – Por intermédio da análise computacional fundamentada no sistema cromatógrafo a gás/espectrômetro de massas (CG/EM) e utilizando o parâmetro de integração denominado “valid.e”, foram obtidos os valores das áreas dos três íons característicos da cafeína (íons 194, 109 e 67). Como verificação da presença de valores aberrantes dentre os experimentos realizados foram utilizados os testes comumente usados em análise química: o Teste de Grubbs e o Teste Q – Critério de Dixon, como demonstrado nas Tabelas I-17 e I-18 (Anexo I). A partir dos valores da área do íon 194, para cada concentração foram calculados a média, o desvio-padrão e o coeficiente de variação das cinco repetições de extração e da

razão entre os íons característicos da cafeína (íons 194, 109 e 67). Os resultados desses cálculos estão documentados na Tabela I-19 (Anexo I).

- **Correção dos resultados** – Similarmente às validações anteriores, os resultados da cromatografia da cafeína foram corrigidos pelo fator de correção que leva em consideração desvios da média do padrão interno de diazepam (Tabela I-20, Anexo I).
- **Discussão dos experimentos** – A análise das amostras e a apresentação dos resultados referentes ao estudo da robustez possibilitaram calcular: (i) o desvio-padrão relativo do tempo de retenção, (ii) o desvio-padrão relativo, (iii) o valor do coeficiente de correlação linear e (iv) a razão entre íons e incertezas associadas, a seguir discutidos:
 - **Desvio-padrão relativo do tempo de retenção** – calculado com base na média e desvio padrão do tempo de retenção das repetições de extração, documentados na Tabela I-19 (Anexo I), o desvio-padrão relativo do tempo de retenção do analito (cafeína) ficou menor que 2%, para cada concentração estudada, critério adotado para análises de controle de dopagem.
 - **Desvio-padrão relativo** – calculado com base (i) nas médias e desvios-padrão das repetições das medições associadas às concentrações preestabelecidas e (ii) nas médias e desvios-padrão das relações entre os íons característicos da cafeína (194/109; 194/67 e 109/67), documentados na Tabela 10, foi possível determinar seus respectivos desvios-padrão relativos, que satisfazem o critério preconizado por Chasin (1994), uma vez que seus valores são iguais ou inferiores a 20%, refletindo a prática dos laboratórios de controle de dopagem.
 - **Valor do coeficiente de correlação linear** – Para a curva de correlação (Figura 32) que se mostrou linear, foi possível determinar o coeficiente de correlação linear: $r^2=0,99$, valor maior que 0,90, portanto em conformidade com a orientação do INMETRO (DOQ/CGCRE-008, INMETRO 2003).
 - **Razão entre íons e componentes da incerteza associada** – Com base nos dados da Tabela 11, que documenta o valor das

razões entre as áreas dos três íons característicos da cafeína (194/109; 194/67 e 109/67), foi possível calcular os componentes da incerteza associada devido ao desvio padrão dessas razões de área. A partir desses dados foram construídos os gráficos (Figura 31) relacionando essas razões às respectivas concentrações de cafeína em urina (expressa em ng/mL). A interpretação dos referidos gráficos demonstrou que, para as concentrações estudadas, as razões dos íons exibem um comportamento semelhante entre si, possuindo um mesmo nível de componentes das incertezas associadas devido ao desvio padrão das medições realizadas.

A síntese desses resultados reflete o estudo do fator crítico robustez, conforme resumidamente caracterizados pelos dados da Tabela 10 (síntese das Tabelas I-19 e I-20 (Anexo I) e da Tabela 11 (razões entre os íons da cafeína), a seguir mostradas.

Tabela 10. Síntese dos resultados das Tabelas I-19 e I-20.

Concentração ng/mL		6	8	12	18	24
CV ($\leq 20\%$) (ÁREA)	Íon 194	11	16	7	17	2
	Íon 194 (c/correção)	5	1	5	15	8
	Razão 194/109	11	2	1	6	1
	Razão 194/67	16	9	16	13	2
	Razão 109/67	20	7	15	14	3
CV $\leq 2\%$	TR* do Íon 194	0,090	0,076	0,048	0,049	0,003

*TR – tempo de retenção (min).

Tabela 11. Média das razões entre os íons 194, 109 e 67 e componentes das incertezas associadas devido ao desvio padrão.

Concentração (ng/mL)	Média da razão 194/109	Média da razão 194/67	Média da razão 109/67	Incerteza da razão 194/109	Incerteza da razão 194/67	Incerteza da razão 109/67
6	1,66	3,02	1,82	0,15	0,60	0,38
8	1,82	2,92	1,61	0,18	0,23	0,12
12	1,85	2,86	1,55	0,13	0,40	0,21
18	1,79	2,83	1,58	0,41	0,85	0,47
24	1,96	3,26	1,66	0,21	0,39	0,19

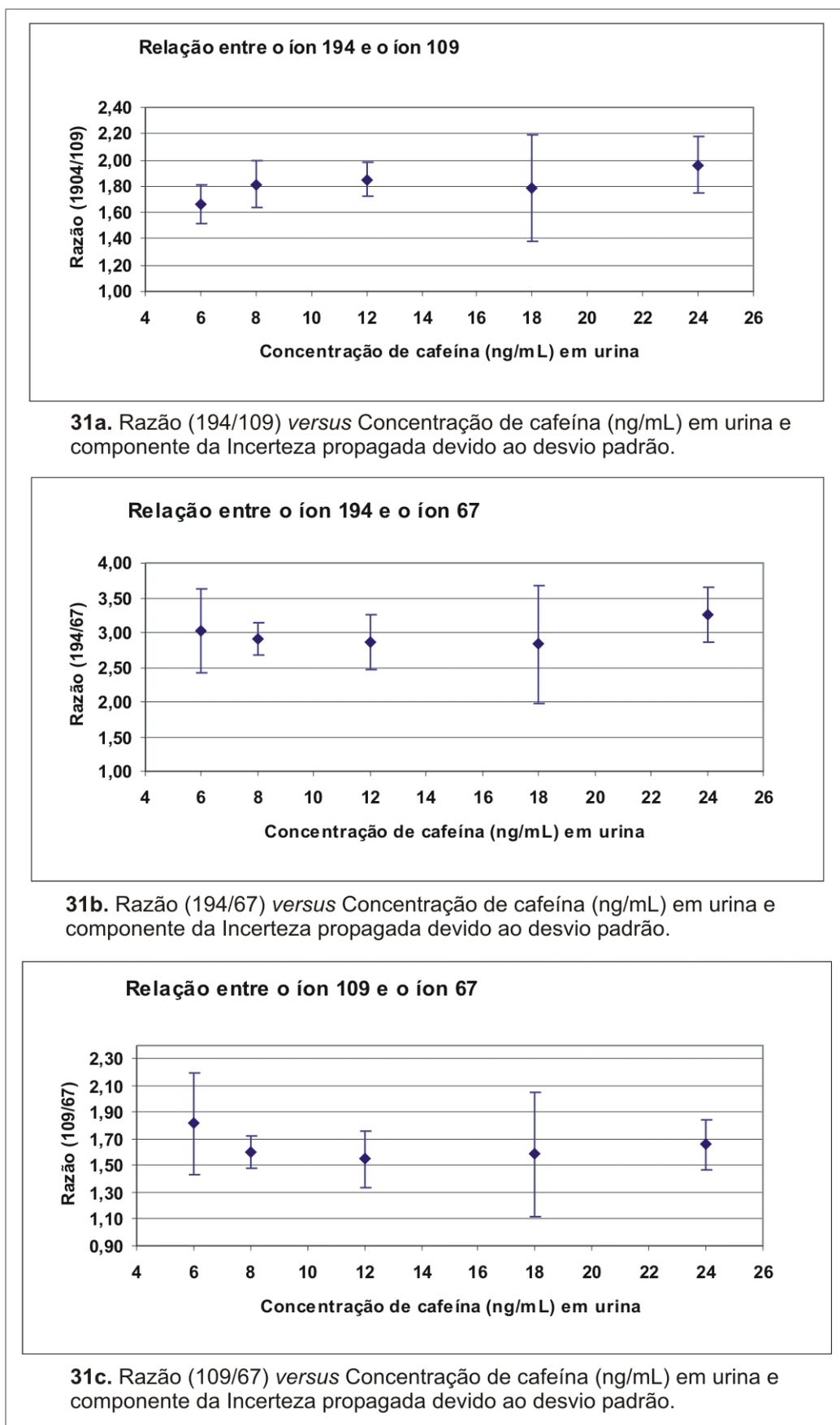


Figura 31. Razão entre íons *versus* concentração de cafeína (ng/mL), indicando as barras dos componentes da incerteza propagada, devido ao desvio padrão de cada íon.

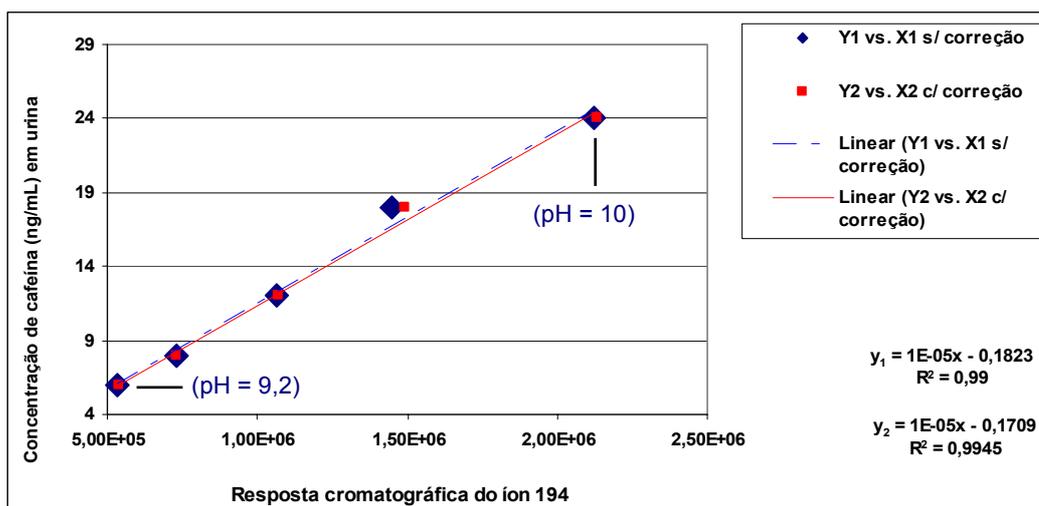


Figura 32. Concentração de cafeína (ng/mL) em urina *versus* resposta cromatográfica do íon 194.

Conclusão do estudo do fator crítico robustez

O presente estudo do fator crítico robustez realizado a partir dos experimentos caracterizados nas Tabelas I-19 e I-20 (Anexo I), permitiu concluir que o método ALCAC-18 mostrou-se robusto, uma vez que foi aplicável para análises de amostras cujo pH varia na faixa de 9,2 a 10,0 demonstrando sua confiabilidade para uso na rotina de trabalho.

8.2.8. Proposição de um novo fator crítico de validação: o valor-limite de determinação

Conceito: refere-se ao valor limite da concentração de um analito (cafeína) em uma amostra que determina uma faixa na qual podem ocorrer falsos-positivos e falsos-negativos.

O “valor-limite de determinação” da cafeína caracteriza um novo atributo introduzido no processo de validação do método ALCAC-18. Com base num critério específico de probabilidade, o novo conceito introduzido estabelece a ausência de falso-positivos em 50% das repetições realizadas de uma determinada concentração de cafeína na matriz biológica, tomando-se como referência o método de triagem qualitativo (o próprio ALCAC-18), com enfoque na resposta binária SIM/NÃO. Em consonância ao tipo de análises desenvolvidas no laboratório para controle de dopagem (LAD/JCB),

caracterizada como análises de traços³⁶, esse critério de 50 % de probabilidade adotado mostrou-se adequado e razoável para a avaliação conduzida pelo analista.

- **Análise das amostras** – Alíquotas da solução-estoque padrão de cafeína (item 7.3.3) foram selecionadas para “fortificar” urinas negativas (isentas de substância dopante) em volume de 6 mL cada, resultando nas concentrações 4, 6, 8, 10 e 12 nanogramas de cafeína por mililitro de urina. Foram realizadas vinte repetições de extração de cada uma das cinco concentrações indicadas, portanto caracterizando um total de 100 experimentos. Adicionalmente, foi analisada uma amostra de 6 mL de urina negativa sem adição da solução-estoque padrão de cafeína, para servir de “branco” de urina, extraída juntamente com as amostras “fortificadas”. Todas as amostras foram submetidas ao procedimento analítico que compreende as etapas de extração (itens 7.3.5.3 e 7.3.5.4) e de análise cromatográfica (item 7.3.6.2). Para assegurar descontinuidade da interpretação de “presença” ou “ausência” da substância cafeína, em todo processo de análise, as amostras foram injetadas no cromatógrafo a gás de forma randômica. Em seguida, as amostras foram avaliadas individualmente, com base na análise dos picos associados à abundância de dois dos três íons característicos da cafeína (íons 194, 109), decodificados pela interpretação “SIM” ou “NÃO”, caracterizando a “presença” ou “ausência” da substância cafeína, conforme documentado pelas Figuras 24-a (resposta binária positiva) e 24-b (resposta binária negativa), já ilustradas no item 8.2.2.
- **Apresentação de resultados** – No procedimento analítico acima caracterizado, as amostras analisadas, na concentração de 8 ng/mL apresentaram resultado positivo em 50% de suas determinações. Os valores das áreas dos três íons característicos da cafeína (íons 194, 109 e 67) foram determinados pela interpretação do sistema cromatógrafo a gás/espectrômetro de massas (CG/EM) utilizando o parâmetro de integração denominado “valid.e”³⁷. Como verificação da presença de valores aberrantes dentre os experimentos realizados foram utilizados dois testes: o Teste de Grubbs e o Teste Q – Critério de Dixon, como documentado nas Tabelas I-1 e I-2 (Anexo I), testes aplicados aos valores encontrados para a área do íon

³⁶ Análises que detectam substâncias dopantes quando estas se encontram em pequenas proporções na matriz biológica.

194. A partir dos valores das áreas do íon 194 para cada concentração considerada foram calculados a média, o desvio-padrão e o coeficiente de variação das vinte repetições de extração e da razão entre os três íons característicos da cafeína (194, 109 e 67), apresentados na Tabela I-3 (Anexo I), que documenta os resultados destas vinte repetições de extração de cada uma das cinco concentrações de cafeína presente na urina. A síntese desses resultados reflete o estudo do fator crítico valor-limite de determinação, como consta da Tabela 12.

- **Correção dos resultados** – Similarmente às validações anteriores, os resultados da cromatografia da cafeína foram corrigidos pelo fator de correção que leva em consideração desvios da média do padrão interno de diazepam (Tabela I-4, Anexo I).
- **Discussão dos experimentos** – A análise das amostras e a apresentação dos resultados referentes ao estudo do valor-limite de determinação possibilitaram calcular (i) o desvio-padrão relativo e (ii) a razão entre íons e incertezas associadas, a seguir discutidos:
 - **Desvio-padrão relativo** – calculado com base (i) nas médias e desvios-padrão das repetições das medições associadas às concentrações preestabelecidas e (ii) nas médias e desvios-padrão das relações entre os íons característicos da cafeína (194/109; 194/67 e 109/67), documentados na Tabela 12, foi possível determinar os respectivos desvios-padrão relativos, que satisfazem ao critério preconizado por Chasin (1994), uma vez que seus valores são iguais ou inferiores a 20%, refletindo a prática dos laboratórios de controle de dopagem.
 - **Razão entre íons e componentes da incerteza associada** – Com base nos dados da Tabela 3 (item 8.2.2 deste capítulo), que documenta o valor das razões entre as áreas dos três íons característicos da cafeína (194/109; 194/67 e 109/67), foi possível calcular os componentes da incerteza associada devido ao desvio padrão dessas razões de área. A partir desses dados foram construídos os gráficos (Figura 25, item 8.2.2) relacionando essas razões às respectivas concentrações de cafeína em urina

³⁷ Parâmetro de integração do cromatógrafo utilizado (HP-5890).

(expressa em ng/mL). A interpretação dos referidos gráficos demonstrou que, para as concentrações estudadas, as razões dos íons exibem um comportamento semelhante entre si, possuindo um mesmo nível de incertezas associadas às medições realizadas.

A síntese desses resultados reflete o estudo do fator crítico valor-limite de determinação, resumidamente caracterizados pelos dados da Tabela 12 (síntese das Tabelas I-3 e I-4, Anexo I).

Tabela 12. Síntese dos resultados das Tabelas I-3 e I-4.

Concentração ng/mL		4	6	8	10	12
CV ($\leq 20\%$) (ÁREA)	Íon 194 (c/correção)	15	19	10	13	11
	Razão 194/109	7	8	12	9	8
	Razão 194/67	15	20	10	15	7
	Razão 109/67	17	12	10	13	8
CV $\leq 2\%$	TR* do Íon 194	0,030	0,031	0,036	0,037	0,038

*TR – tempo de retenção (min).

Conclusão do estudo do fator crítico valor-limite de determinação

O presente estudo, realizado a partir dos cem experimentos caracterizados nas Tabelas I-3 e I-4 (Anexo I), permitiu atribuir o valor de 8ng/mL ao valor-limite de determinação, pois as amostras nessa concentração apresentaram resultados positivos em 50% de suas determinações. O valor-limite de determinação foi proposto como um novo critério para o estabelecimento da faixa de falso-positivo e falso-negativo de cafeína em amostras de urina. A introdução desse novo parâmetro provou-se de interesse uma vez que (i) é um indicador da confiabilidade dos resultados de positividade das amostras realizadas e (ii) fornece informação para tomada de decisão que orienta o analista a evitar repetições desnecessárias de análises, procedimento normalmente oneroso e consumidor de tempo laboratorial.

8.3. Valor-limite de determinação: estimativa da incerteza da medição

Em análises quantitativas é usual a aplicação do conceito tradicionalmente utilizado em Metrologia: “Incerteza da medição”. Segundo o Vocabulário Internacional de Termos Fundamentais e Gerais de Metrologia (VIM) de uma maneira geral, entende-se por incerteza da medição o “parâmetro, associado ao

resultado de uma medição, que caracteriza a dispersão dos valores que podem ser fundamentalmente atribuídos a um mensurando”. Já no tratamento das chamadas análises qualitativas, o conceito de intervalo de incerteza de medição é comumente denominado de “faixa de não-confiança”, expressando faixas de concentração – regiões de “falso-positivos” e “falso-negativos” – indicativas dos erros associados, úteis para orientar a emissão de laudos e relatórios de ensaios, assim evitando interpretações incorretas.

No presente estudo, a expressão das incertezas associadas às medições foi realizada para uma análise qualitativa. A partir da definição do valor “limite de determinação”, abordado no item 8.2.8 do presente capítulo, foi calculada a faixa de concentração caracterizada como a “faixa de não-confiança”, explicitando os erros associados, nem sempre detectáveis pela avaliação humana, que em determinadas avaliações não consegue distinguir entre uma resposta negativa ou positiva.

Com o “valor-limite de determinação” definido em 8 ng/mL (item 8.2.8), as outras quatro concentrações (item 8.2.8) foram distribuídas uniformemente no eixo de x, acima e abaixo do “valor limite de determinação”, para a construção do gráfico de probabilidade *versus* concentração, ilustrado pela Figura 33. O valor da probabilidade associada a cada concentração foi obtida pela avaliação do analista responsável com enfoque na resposta binária SIM/NÃO, demonstrado na Tabela 13. No gráfico ilustrado pela Figura 33 foram estabelecidos os valores limites superior e inferior C_0 e C_1 que permitem determinar a “faixa de não-confiança”.

Tabela 13. Concentrações e probabilidades associadas a cada concentração.

Concentração de cafeína em urina (ng / mL)	Probabilidade associada a cada concentração (%)
4	25
6	30
8	50
10	90
12	100

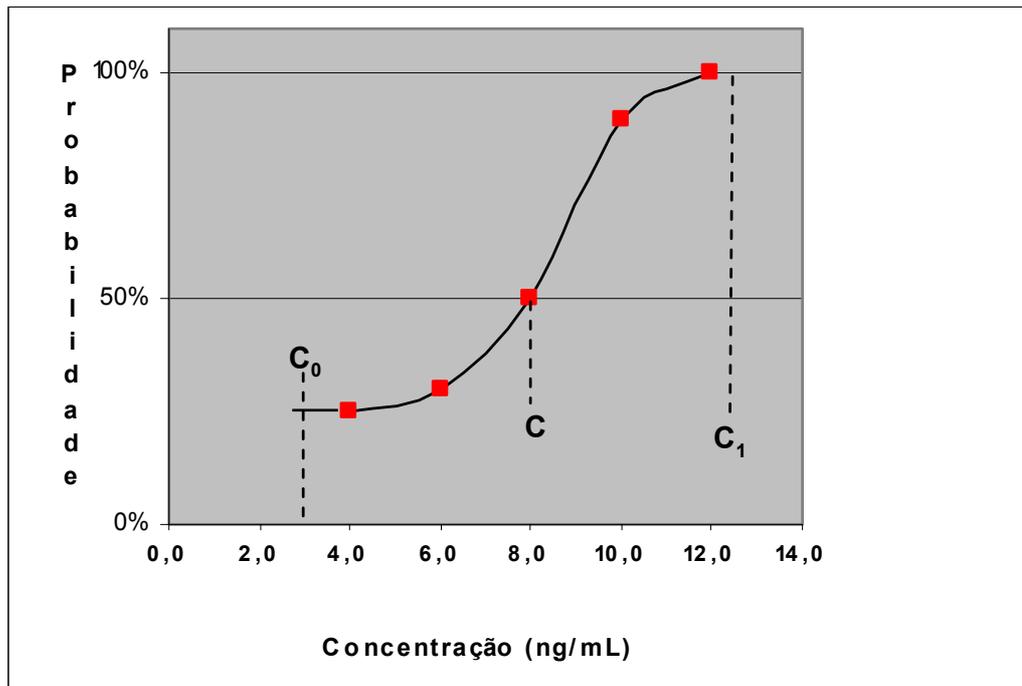


Figura 33. Probabilidade *versus* Concentração de cafeína (ng/mL) em urina de cavalo puro-sangue inglês.

A partir da determinação da “faixa de não-confiança” foi possível definir:

- (i) a zona de probabilidade de se encontrar “falso-positivos” de cafeína no intervalo de concentração entre C_0 e C .
- (ii) a zona de probabilidade de se encontrar “falso-negativos” de cafeína no intervalo de concentração entre C e C_1 .

Conforme se pode deprender pelos dados da Figura 34, a condição ideal que caracteriza a inexistência de se encontrar zonas de “falso-positivos” e “falso-negativos” de cafeína ou em análises qualitativas dá-se pela probabilidade de 100% associados ou a resultados positivos acima de uma determinada concentração ou a resultados negativos abaixo da mesma. Esta condição de idealidade constitui exceção às análises qualitativas, especialmente quando a identificação é feita pela avaliação humana.

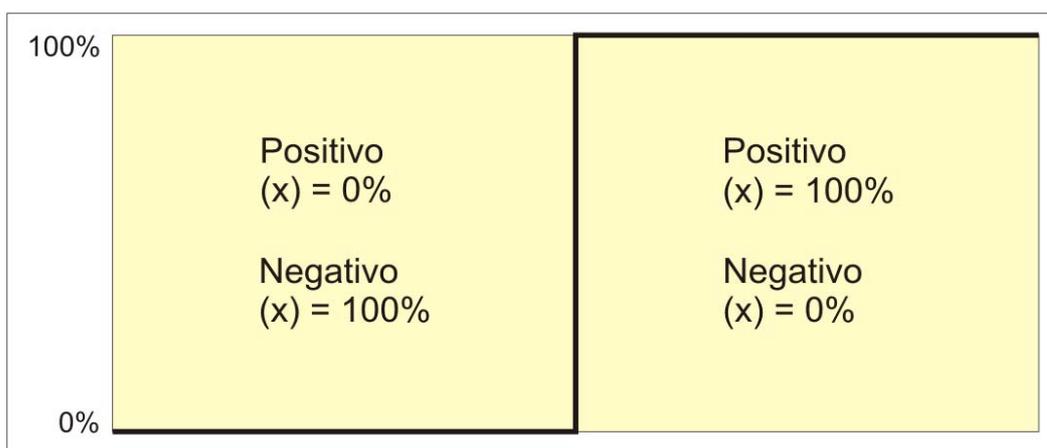


Figura 34. Condição ideal caracterizada pela inexistência de zonas de “falso-positivos” e “falso-negativos” em análises qualitativas.

A Figura 35 apresenta esquematicamente a visualização da “faixa de não-confiança”, explicitando os “falso-positivos” e “falso-negativos” da substância dopante (caféina) estabelecida com base no “valor limite de determinação” e as regiões de confiança para resultados comprovadamente positivos ou negativos da mesma substância. Os valores-limites de determinação foram experimentalmente determinados com base na avaliação da resposta binária SIM/NÃO, cujos dados encontram-se na Tabela 13, ilustrados na Figura 33, tendo conduzido aos valores limites abaixo caracterizados:

$$C_0 \approx 3,0$$

$$C_1 \approx 12,5$$

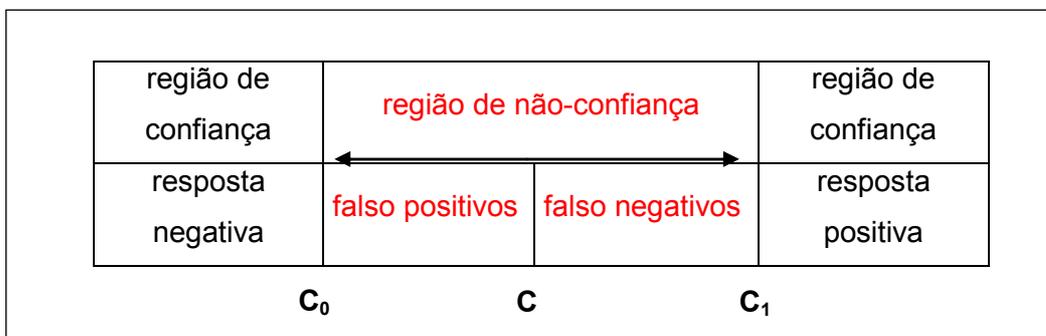


Figura 35. Diferentes regiões que caracterizam a “faixa de não confiança” e as “faixas de confiança” em análises qualitativas.

Essas “faixas de não-confiança” (falso-positivos e falso-negativos) ilustrada na figura acima caracterizam o que se costuma denominar em metrologia por componente da incerteza associada à medição convenientemente expressa pelo valor-limite de determinação.