UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas

**Estudo da incerteza de medição em análises toxicológicas de
substâncias psicoativas em urina**

Sarah Carobini Werner de Souza Eller

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Dr. Mauricio Yonamine

São Paulo
2014

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

E45e	<p>Eller, Sarah Carobini Werner de Souza</p> <p>Estudo da incerteza de medição em análises toxicológicas de substâncias psicoativas em urina / Sarah Carobini Werner de Souza Eller. -- São Paulo, 2014.</p> <p>152p.</p>
	<p>Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.</p> <p>Orientador: Yonamine, Mauricio</p>
	<p>1. Análises toxicológicas 2. Toxicologia forense 3. Drogas de abuso : Medicina 4. Garantia da qualidade I. T. II. Yonamine, Mauricio, orientador.</p>
	<p>615.907 CDD</p>

Sarah Carobini Werner de Souza Eller

**Estudo da incerteza de medição em análises toxicológicas de
substâncias psicoativas em urina**

Comissão Julgadora da Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Dr. Mauricio Yonamine
Orientador/presidente

1º examinador

2º examinador

São Paulo, _____ de _____.

APOIO FINANCEIRO

CNPq – CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO

AGRADECIMENTOS

À Deus, por sempre iluminar os meus caminhos, pela proteção em todos os momentos da minha vida e por ter me dado a oportunidade de realizar esse trabalho.

Aos meus queridos pais Henrique e Emília, pelo amor incondicional e pelo apoio prestado ao longo de toda a minha vida, que foi fundamental na construção do meu conhecimento e por sempre acreditarem em mim.

À Dimitria e Otto, não somente irmãos, mas verdadeiros amigos, pela força e coragem para alcançar meus objetivos, e pelo conforto nas horas mais difíceis.

Ao Prof. Dr. Mauricio Yonamine pela confiança, paciência, ensinamentos e diretrizes na orientação e condução deste trabalho.

Ao meu amado Tiago, por fazer parte da minha vida e por partilhar da sua vida comigo, pelos ótimos momentos que estamos vivendo e pelos que ainda virão. Muito obrigada pela ajuda na etapa final deste trabalho e pela confecção de todas as ilustrações. Pela paciência que tem comigo e pelo carinho e amor sempre demonstrado, te amo.

Aos meus avós e tios que mesmo longe sempre se mantiveram presentes.

Aos funcionários e amigos do LAT, que sempre colaboraram e deram muita força para eu realizar este trabalho. Que ele sirva de ferramenta e propicie tranquilidade e segurança nas tomadas de decisões.

Ao meu grande amigo Valter, pelo carinho, atenção e incentivo.

Ao Prof. Dr. Felipe Rebelo Lourenço, pela contribuição com suas importantes opiniões, para o meu entendimento sobre incerteza de medição.

A todos os professores e funcionários do Programa de Pós Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas.

A Universidade de São Paulo, a Faculdade de Ciências Farmacêuticas e o Programa de Pós Graduação, pela oportunidade que me foi concedida na busca pelo conhecimento e melhoria contínua pessoal e profissional.

Aos inúmeros amigos, que Deus colocou em meu caminho. Obrigada por toda amizade e companherismo.

A todos aqueles que torceram e que de alguma forma tornaram isso tudo possível.

Muito obrigada!

*“Conhecer e pensar não é chegar a uma
verdade absolutamente certa, mas
dialogar com a incerteza”*

Edgar Morin

RESUMO

ELLER, S. C. W. S. **Estudo da incerteza de medição em análises toxicológicas de substâncias psicoativas em urina.** 2014. 152 f. Dissertação de Mestrado – Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Brasil, 2014.

Nenhuma medição é realizada com perfeição absoluta, uma vez que todos os valores encontrados são aproximações do valor real e todas as medidas, independente de sua finalidade ou qualidade, possuem uma incerteza. A incerteza de medição é um parâmetro associado ao resultado, que caracteriza a dispersão em torno dos seus valores. O conceito de incerteza de medição já é adotado em laboratórios de calibração e também muito aplicado na área de engenharia; no entanto em análises toxicológicas esta abordagem ainda é recente e há poucos relatos na literatura científica. Portanto, este trabalho teve como objetivo o estudo da incerteza de medição em análises toxicológicas confirmatórias de substâncias psicoativas - anfetaminas (anfetamina e metanfetamina), ácido 11-nor- Δ^9 -tetraidrocanabinol carboxílico (THC-COOH) e benzoilecgonina - em urina, detectados pela técnica de cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS). A microextração em fase líquida (LPME) mostrou-se eficaz na determinação de THC-COOH, e após a completa validação, o método desenvolvido foi aplicado na quantificação de amostras de urina de referência provenientes do *National Institute of Standards and Technology* (NIST) dos Estados Unidos da América (SRM1507b – NIST). As principais contribuições para a incerteza do método foram a concentração do analito, a acurácia, seguidos da precisão e do volume de amostra. A incerteza combinada obtida foi equivalente a 8%. A LPME também apresentou-se eficiente para a extração das anfetaminas e a incerteza combinada obtida por este método foi 2,1%. No método de detecção de benzoilecgonina, a principal fonte de incerteza foi a acurácia do método e o resultado da incerteza combinada da análise de uma urina de referência (SRM1508a – NIST) foi 4,8%. Todos os valores de incerteza de medição encontrados em nosso estudo estão de acordo com as normas e referências internacionais e também são condizentes com os valores estipulados pela NIST nos laudos de análise das amostras de referência.

Palavras-chave: Toxicologia analítica, substâncias psicoativas, urina, incerteza de medição, garantia da qualidade.

ABSTRACT

ELLER, S. C. W. S. **Study of the measurement uncertainty in toxicological analysis of psychoactive substances in urine.** 2014. 152 f. Dissertação de Mestrado – Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Brasil, 2014.

Neither measurement is made with absolute perfection, once all the values are approximations of the actual value and all measures, independent of its purpose or quality, have an uncertainty. Measurement uncertainty is a parameter associated with the result, which characterizes the dispersion around their values. The concept of measurement uncertainty is already used in calibration laboratories and also widely applied in engineering, however, in toxicological analysis, this approach is recent and there are few reports in the scientific literature. Therefore, this work aimed to study the measurement uncertainty in confirmatory toxicological analysis of psychoactive drugs - amphetamines (amphetamine and methamphetamine), acid 11-nor- Δ^9 -tetrahydrocannabinol carboxylic acid (THC - COOH) and benzoylecgonine - in urine detected by the technique of gas chromatography-mass spectrometry (GC- MS). The liquid phase microextraction (LPME) was effective in the determination of THC-COOH, and after complete validation, the method was applied to the quantification of urine samples of reference from the National Institute of Standards and Technology (NIST) of United States of America (SRM1507b - NIST). The main contributions to the uncertainty of the method were the analyte concentration, accuracy, followed by the precision and the sample volume. The combined uncertainty obtained was equivalent to 8%. The LPME also presented efficient for the extraction of amphetamine and combined uncertainty obtained by this method was 2.1%. In the method of detection of benzoylecgonine, the main source of uncertainty was the accuracy of the method and the result of the combined uncertainty of the analysis of a urine reference (SRM1508a - NIST) was 4.8%. All values of measurement uncertainty found in our study are in accordance with international standards and references and are also consistent with the values stipulated by certificate of analysis of NIST reference samples.

Keywords: Analytical toxicology, psychoactive substances, urine, measurement uncertainty, quality assurance.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

A	Acurácia
a	Inclinação da curva de calibração
ASCLD/LAB	<i>American Society of Crime Laboratory Directors Laboratory Accreditation Board</i>
ATFA	Anidrido trifluoracético
ATS	Estimulantes do tipo das anfetaminas
b	Intersecção com eixo y, quando $x = 0$
BIPM	<i>Bureau International des Poids et Mesures</i>
BSTFA	N-O-Bis(trimetilsilil)trifluoracetamida
C	Concentração
CA	Controle alto
C_{am}	Valor encontrado da concentração da amostra
CB	Controle baixo
CM	Controle médio
Co	Concentração de THC na amostra teste
C_{ref}	Concentração reportada no certificado da análise da amostra de referência
CV	Coeficiente de variação
DHHS	<i>Department of Health and Human Services</i>
DL	Limite de decisão, do inglês: <i>Decision Limit</i>
IE	Ionização eletrônica

EUA	Estados Unidos da America
<i>f</i>	Função modelo
FDA	<i>Food and Drugs Administration</i>
<i>g</i>	Grama
GC-MS	Cromatógrafo gasoso acoplado ao espectrômetro de massas, do inglês: <i>gas chromatography-mass spectrometry</i>
GUM	<i>Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement</i>
HCl	Ácido clorídrico
HF-LPME	Microextração em fase líquida, do inglês: <i>hollow fiber liquid-phase microextraction</i>)
HP-5MS	<i>Hewlett Packard, 5% fenilmetilpolisiloxano</i>
<i>i(x)</i>	Fontes de entrada
ISO	<i>International Organization for Standardisation</i>
ISO/IEC	<i>International Organization for Standardization; International Eletrotechnical Comission</i>
ISO-GUM	<i>International Organization for Stardartisation - Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement</i>
ISO/TS	<i>International Organization for Standardization; technical specification</i>
IUPAC/ISO/ AOAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry/ International Organization for Standardization/ Association of Official Analytical Chemists</i>
LAT-USP	Laboratório de Análises Toxicológicas- Universidade de São Paulo
LLE	Extração líquido-líquido

LOD	Limite de detecção, do inglês <i>limit of detection</i>
LOQ	Limite de quantificação, do inglês <i>limit of quantification</i>
<i>m</i>	Número de medidas independentes
<i>mL</i>	Mililitro
mmHg	Milímetro de mercúrio
<i>m/z</i>	Massa/carga
<i>n</i>	Número de ensaios
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NIDA	<i>National Institute on Drug Abuse</i>
NIST	<i>National Institute of Standards & Technology</i>
<i>ng</i>	Nanograma
NMKL	<i>Nordic Committee on Food Analysis</i>
NSDUH	<i>National Survey on Drug Use and Health</i>
<i>P</i>	Precisão
<i>p</i>	Número de medidas para determinar Co
PI	Padrão interno
<i>r</i>²	Coeficiente de determinação
RBC	Rede Brasileira de Calibração
RM	Resultado de uma medição
rpm	Rotações por minuto
RSD	Desvio padrão relativo, do inglês: <i>relative standard deviation</i>

S	Desvio padrão residual
s	Desvio padrão
<i>s_{am}</i>	Desvio padrão da concentração da amostra
Sxx	Soma dos quadrados dos resíduos
SPE	Extração em fase sólida, do inglês: <i>solid phase extraction</i>
SIM	<i>Selected ion monitoring</i>
SRM	Material de referência, do inglês: <i>standard reference material</i>
THC	Tetraidrocanabinol
Δ^9-THC	Delta-9-tetraidrocanabinol
11-OH-THC	11-hidroxi- Δ^9 -tetraidrocanabinol
THC-COOH	Ácido 11-nor- Δ^9 -tetraidrocanabinol carboxílico
UNODC	<i>United Nations Office on Drugs and Crime</i>
<i>u</i>	Incerteza padrão
<i>u(x)</i>	Incerteza associada aos dados de entrada
<i>U</i>	Incerteza expandida
<i>uPrec</i>	Incerteza da precisão
<i>urPrec</i>	Incerteza relativa da precisão
<i>uAc</i>	Incerteza da acurácia do método
<i>uDPD</i>	Incerteza da diluição do padrão
<i>uPPD</i>	Incerteza do padrão
<i>uDPI</i>	Incerteza da diluição do padrão interno
<i>uPPI</i>	Incerteza do padrão interno

u_{Cur}	Incerteza da curva de calibração
u_{Curv}	Incerteza relativa da curva de calibração
u_{20}	Incerteza da micropipeta de 20 μL
u_{100}	Incerteza da micropipeta de 100 μL
u_{200}	Incerteza da micropipeta de 200 μL
u_{1000}	Incerteza da micropipeta de 1000 μL
$U_{certificado}$	Incerteza do certificado de calibração do equipamento
u_{ref}	Incerteza reportada no certificado de análise
u_V	Incerteza do volume de urina
u_{rV}	Incerteza relativa do volume de urina
V	Volume de amostra
ν_A	Representa os graus de liberdade do Tipo A
ν_i	Graus de liberdade do fator de incerteza i
VIM	Vocabulário Internacional de Metrologia
x	Concentração obtida através da curva de calibração
x_i	Concentrações da curva de calibração
$\bar{x}$	Médias das concentrações da curva de calibração
X_i	Grandeza de entrada
X_m	Média das medidas em replicatas
y	Resposta medida (absorbância, área do pico)
Y	Valor do mensurando
y_i	Grandeza de saída

WADA	<i>World Anti-Doping Agency</i>
°C	Graus Celsius
$\mu\text{g.L}^{-1}$	Micrograma por litro
μL	Microlitro
μm	Micrômetro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura molecular do Δ^9 -tetraidrocanabinol (A) e do ácido 11-nor- Δ^9 -tetraidrocanabinol carboxílico (B).....	34
Figura 2. Estrutura molecular da anfetamina (A) e metanfetamina (B).	35
Figura 3. Estrutura molecular da cocaína (A) e da benzoilecgonina (B).	36
Figura 4. Etapas envolvidas na extração em fase sólida (SPE).....	41
Figura 5. Comprimento da fibra de polipropileno utilizada na LPME.....	42
Figura 6. Esquema da LPME no sistema de 2 fases (A) e 3 fases (B). No sistema A, o solvente que é impregnado na fibra é o mesmo utilizado como fase aceptora. Já no sistema B, um solvente é impregnado na fibra, e como fase aceptora é utilizada uma solução aquosa.	43
Figura 7. Ilustração do sistema de LPME trifásico utilizado para determinação de THC-COOH em urina.....	57
Figura 8. Diagrama de Ishikawa.....	66
Figura 9. Avaliação da eficiência dos solventes na extração de THC-COOH por LPME.	73
Figura 10. Condições e tempo de agitação para extração de THC-COOH.....	74
Figura 11. Linearidade do método de detecção de THC-COOH (faixa de concentração: 2 a 170 ng.mL ⁻¹).	76
Figura 12. Resultados do estudo de estabilidade a curto prazo do THC-COOH. Valor médio da concentração (n = 3) obtida durante 7 dias de armazenamento a 37 °C.....	79
Figura 13. Cromatogramas obtidos com a aplicação do método de LPME/GC-MS em amostras de urina. SRM1507b-0 (controle negativo); Controle positivo (referente a uma urina adicionada com 15 ng.mL ⁻¹ de THC-COOH);	

SRM1507b-1 (urina de referência contendo $13,2 \text{ ng.mL}^{-1}$); SRM1507b-2 (urina de referência contendo $24,8 \text{ ng.mL}^{-1}$). Em todas as amostras foram adicionados padrão interno na concentração de 15 ng.mL^{-1} 80

Figura 14. Espectro de massas do THC-COOH derivatizado com BSTFA. Íon quantificador do THC-COOH (371); Íons qualificadores (473,488). Íon quantificador do THC-COOH-d3 (374); Íons qualificadores (476,491).....81

Figura 15. Diagrama de Ishikawa expandido, onde foram inseridas as principais fontes que contribuem para a incerteza do método de determinação de THC-COOH em urina. Co (concentração de THC-COOH).82

Figura 16. Contribuição de diferentes fontes de entrada no cálculo da incerteza padrão combinada para o método de detecção de THC-COOH em urina.....90

Figura 17. Avaliação do tipo de solvente utilizado no condicionamento da fibra utilizada na extração das anfetaminas pela técnica de LPME.92

Figura 18. Análise de superfície para otimização do método de extração da anfetamina (A) e metanfetamina (B) pela técnica de LPME/GC-MS.93

Figura 19. Estudo da linearidade da anfetamina em urina ($y=0,0018x + 0,1653$; $r^2 = 0,9975$).95

Figura 20. Estudo da linearidade da metanfetamina em urina ($y=0,02x - 0,0564$; $r^2 = 0,9949$).95

Figura 21. Cromatogramas obtidos com a aplicação do método de LPME/GC-MS para determinação de anfetaminas em amostras de urina. Controle negativo; Controle positivo (referente a uma urina adicionada com 500 ng.mL^{-1} de anfetamina); Amostra 01 (amostra de urina contendo $666,4 \text{ ng.mL}^{-1}$); Amostra 02 (amostra de urina contendo $1286,9,4 \text{ ng.mL}^{-1}$); Em todas as amostras foram adicionados padrão interno na concentração de 500 ng.mL^{-1} .100

Figura 22. Cromatogramas obtidos com a aplicação do método de LPME/GC-MS para determinação de metanfetamina em amostras de urina. Controle

positivo (referente a uma urina adicionada com 500 ng.mL^{-1} de metanfetamina); Controle negativo (urina isenta do analito). Em todas as amostras foram adicionados padrão interno na concentração de 500 ng.mL^{-1} 101

Figura 23. Espectro de massas da anfetamina derivatizada com ATFA. Íons utilizados na identificação do analito: Íon quantificador da anfetamina (118); Íons qualificadores (91, 140). Íon quantificador da anfetamina-d5 (123), Íons qualificadores (96,140). 102

Figura 24. Espectro de massas da metanfetamina derivatizada com ATFA. Íons utilizados na identificação do analito: Íon quantificador da metanfetamina (154); Íons qualificadores (110, 118). Íon quantificador da metanfetamina-d5 (158), Íon qualificador (122). 102

Figura 25. Diagrama de Ishikawa expandido, onde são inseridas as principais fontes que contribuem para a incerteza do método de determinação de anfetamina em urina. Co (concentração de anfetamina). 103

Figura 26. Contribuição de diferentes fontes de entrada no cálculo da incerteza padrão combinada para o método de detecção de anfetamina em urina. 108

Figura 27. Linearidade do método para determinação de benzoilecgonina em urina por SPE/GC-MS..... 111

Figura 28. Resultados do estudo de estabilidade a curto prazo da benzoilecgonina. Valor médio da concentração ($n = 3$), obtida durante 7 dias de armazenamento a 37°C 114

Figura 29. Cromatogramas obtidos com a análise por SPE/GC-MS de amostras de urina. Controle negativo (amostra isenta do analito); Controle positivo (referente a uma urina adicionada com 150 ng.mL^{-1} de benzoilecgonina); SRM1508a-1 (urina de referência contendo $72,9 \text{ ng.mL}^{-1}$); SRM1508a-2 (urina de referência contendo $164,3 \text{ ng.mL}^{-1}$); SRM1508a-3 (urina de referência contendo $312,8 \text{ ng.mL}^{-1}$). Em todas as amostras foram adicionados padrão interno na concentração de 150 ng.mL^{-1} 116

Figura 30. Espectro de massas da benzoilecgonina derivatizada. Íon quantificador da benzoilecgonina (240); Íons qualificadores da benzoilecgonina (82-361); Íon quantificador da benzoilecgonina-d3 (243); Íons qualificadores da benzoilecgonina-d3 (85-364).117

Figura 31. Diagrama de Ishikawa expandido, onde foram inseridas as principais fontes que contribuem para a incerteza do método de determinação de benzoilecgonina em urina. Co (concentração de benzoilecgonina).117

Figura 32. Contribuição de diferentes fontes de entrada no cálculo da incerteza padrão combinada para o método de detecção de benzoilecgonina em urina123

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores de cut off para substâncias psicoativas em amostras de urina de acordo com o DHHS (<i>Department of Health and Human Services</i>).....	39
Tabela 2. Resultados da eficiência da hidrólise de THC-COOH.	72
Tabela 3. Estudo da intensidade de rotação durante a extração de THC-COOH por LPME.....	74
Tabela 4. Valores de limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) com a aplicação do método proposto para determinação de THC-COOH em urina.....	75
Tabela 5. Coeficientes de variação (CV%) correspondente às precisões intra e inter-ensaio obtidos com a aplicação do método proposto para determinação de THC-COOH em urina.....	77
Tabela 6. Exatidão do método proposto para determinação de THC-COOH em urina.....	77
Tabela 7. Valores da recuperação do método de determinação de THC-COOH.	78
Tabela 8. Resumo dos resultados da precisão do método para o cálculo da incerteza de medição de THC-COOH.....	84
Tabela 9. Coeficiente de variação (CV%) correspondente às precisões intra e inter-ensaio obtidos com a aplicação do método proposto para determinação de anfetaminas em urina.	96
Tabela 10. Exatidão do método proposto para determinação de anfetaminas em urina.....	97
Tabela 11. Valores da recuperação obtidos com o método proposto para determinação de anfetaminas em urina.....	97

Tabela 12. Resultados do cálculo da incerteza de medição em amostras de urina contendo anfetaminas.....	109
Tabela 13. Valores de limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) para o método de extração de benzoilecgonina.	111
Tabela 14. Coeficientes de variação (CV%) correspondente às precisões intra e inter-ensaio para o método proposto para determinação de benzoilecgonina em urina.....	112
Tabela 15. Exatidão do método proposto para determinação de benzoilecgonina em urina.	113
Tabela 16. Valores da recuperação do método de extração de benzoilecgonina em urina.....	113

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	iii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS.....	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	29
2. REVISÃO DE LITERATURA	33
2.1 Substâncias psicoativas.....	33
2.1.1 Canabinóides	33
2.1.2 Anfetaminas	34
2.1.3 Cocaína.....	35
2.2 Análises toxicológicas de substâncias psicoativas	36
2.3 Matrizes biológicas utilizadas para verificar a exposição à substâncias psicoativas	37
2.4 Aspectos analíticos	39
2.4.1 Extração em fase sólida.....	40
2.4.2 Microextração em fase líquida	41
2.5 Validação	43
2.6 Incerteza de medição.....	44
2.6.1 Guias para determinação da incerteza de medição	46
2.6.2 Tipos de incerteza.....	47

2.6.3 Fontes de incerteza	48
2.6.4 Incerteza padrão	49
2.6.5 Incerteza padrão combinada.....	49
2.6.6 Incerteza expandida.....	50
3. OBJETIVO.....	52
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	54
4.1 Material	54
4.1.1 Equipamentos e acessórios.....	54
4.1.2 Reagentes	55
4.1.3 Padrões	55
4.1.4 Amostras.....	55
4.2 Métodos	56
4.2.1 Determinação de THC-COOH em urina	56
4.2.1.1 Método de extração	56
4.2.1.2 Otimização do método	58
4.2.1.3 Condições cromatográficas	58
4.2.2 Determinação de anfetaminas em urina	59
4.2.2.1 Método de extração	59
4.2.2.2 Otimização do método	59
4.2.2.3 Condições cromatográficas	60
4.2.3 Determinação de benzoilecgonina em urina	60

4.2.3.1 Método de extração	60
4.2.3.2 Condições cromatográficas	61
4.2.4 Validação dos Métodos.....	62
4.2.4.1 Limites de detecção e quantificação	62
4.2.4.2 Linearidade	63
4.2.4.3 Precisão intra e inter-ensaio	63
4.2.4.4 Exatidão	64
4.2.4.5 Recuperação.....	65
4.2.4.6 Estabilidade do analito na matriz	65
4.2.5 Estudo da incerteza	66
4.2.5.1 Identificação das fontes de incerteza.....	66
4.2.5.2 Quantificação das incertezas	66
4.2.5.2.1 Expressão da função matemática das grandezas de entrada	67
4.2.5.2.2 Determinação do valor de cada uma das grandezas de entrada (X_i)	67
4.2.5.2.3 Avaliação da incerteza padrão (u) de cada estimativa de entrada.....	67
4.2.5.2.4 Determinação da Incerteza padrão combinada uc	68
4.2.5.2.5 Determinação da incerteza expandida (U).....	68
4.2.5.2.6 Relato do resultado da medição juntamente com a uc ou U :.....	69
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	71
5.1 Resultados das análises de THC-COOH em urina	71
5.1.1 Método de extração	71

5.1.2 Resultado da otimização do método.....	71
5.1.3 Resultados da validação do método	74
5.1.3.1 Limites de detecção e quantificação	74
5.1.3.2 Linearidade	75
5.1.3.3 Precisão intra e inter-ensaio	76
5.1.3.4 Exatidão	77
5.1.3.5 Recuperação absoluta	78
5.1.3.6 Estudo da estabilidade do analito na matriz	78
5.1.4 Cálculo da incerteza de medição	79
5.1.4.1 Identificação das fontes de incerteza	81
5.1.4.2 Expressão da função matemática das grandezas de entrada	82
5.1.4.3 Avaliação da incerteza padrão (u) de cada estimativa de entrada.....	83
5.1.4.4 Determinação da incerteza padrão combinada u_c	89
5.1.4.5 Cálculo dos graus de liberdade efetivo (V_{eff})	89
5.1.4.6 Determinação da incerteza expandida (U).....	89
5.2 Resultados das análises de anfetaminas em urina.....	91
5.2.1 Método de extração	91
5.2.2 Resultados da otimização do método	92
5.2.3 Resultados da validação do método	94
5.2.3.1 Limites de detecção e quantificação	94
5.2.3.2 Linearidade	94

5.2.3.3 Precisão intra e inter-ensaio	95
5.2.3.4 Exatidão	96
5.2.3.5 Recuperação absoluta	97
5.2.3.6 Estudo da estabilidade do analito na matriz	98
5.2.3.7 Validação da diluição das amostras.....	98
5.2.4 Cálculo da incerteza de medição	99
5.2.4.1 Identificação das fontes de incerteza	103
5.2.4.2 Expressão da função matemática das grandezas de entrada	103
5.2.4.3 Avaliação da incerteza padrão (u) de cada estimativa de entrada.....	104
5.2.4.4 Determinação da incerteza padrão combinada u_c	107
5.2.4.5 Determinação da incerteza expandida (U).....	107
5.3 Resultados das análises de benzoilecgonina em urina	110
5.3.1 Método de extração	110
5.3.2 Resultados da validação do método	110
5.3.2.1 Limites de detecção e quantificação	110
5.3.2.2 Linearidade	111
5.3.2.3 Precisão intra e inter-ensaio	112
5.3.2.4 Exatidão	112
5.3.2.5 Recuperação.....	113
5.3.2.6 Estabilidade do analito na matriz	114
5.3.2.7 Validação da diluição das amostras.....	115

5.3.3 Cálculo da incerteza de medição	115
5.3.3.1 Identificação das fontes de incerteza	117
5.3.3.2 Expressão da função matemática das grandezas de entrada	118
5.3.3.3 Avaliação da incerteza padrão (u) de cada estimativa de entrada.....	118
5.3.3.4 Determinação da incerteza padrão combinada u_c	122
5.3.3.5 Determinação da incerteza expandida (U).....	122
6. CONCLUSÃO	125
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	126
ANEXO 1	140
Protocolo nº 3001 aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa	140
ANEXO 2	143
Ficha do Aluno	143
ANEXO 3	146
Curriculum Vitae	146

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O consumo de drogas ilícitas é um dos problemas de saúde pública mais relevante e de preocupação mundial. O *United Nations Office on Drugs and Crime* (UNODC) estima que cerca de 230 milhões de pessoas utilizam uma droga ilegal ao menos uma vez por ano, isso representa cerca de um em cada 20 indivíduos entre 15 e 64 anos. Ainda de acordo com o levantamento feito pelo UNODC em 2010, cerca de 153 milhões de pessoas na faixa etária de 15-64 anos de idade tinham usado uma substância ilícita pelo menos uma vez no ano anterior. As evidências mostram que as quatro classes de substâncias psicoativas - opiáceos, anfetaminas, cocaína e canabinóides - são usadas na maioria dos países, mas as estimativas quantitativas de tal uso são escassas, principalmente em relação à dependência destas substâncias. A maioria dos dados é proveniente de países desenvolvidos como os países da Europa, América do Norte e Oceania (DEGENHARDT, 2012; RACAMONDE et al., 2012; UNODC, 2012).

A análise de substâncias psicoativas e seus produtos de biotransformação em amostras biológicas é cada vez mais importante, devido à necessidade de compreender os efeitos tóxicos destas substâncias, sendo fundamental na rotina em toxicologia clínica e forense, no controle de dopagem nos esportes e em teste de drogas no ambiente de trabalho. Este último tem aplicação bem estabelecida da toxicologia forense onde seu objetivo é reduzir os acidentes de trabalho causados por funcionários que estão sob a influência de drogas ou álcool. Várias substâncias psicoativas podem estar envolvidas, incluindo álcool, anfetaminas, canabinóides, cocaína, opiáceos e fármacos de prescrição, tais como os benzodiazepínicos. A urina é considerada a amostra de escolha na maioria dos casos, pois grandes volumes podem ser facilmente coletados de forma não invasiva, além de possuir uma ampla janela de detecção comparada ao sangue, permitindo a detecção de substâncias com um intervalo de tempo maior entre a exposição e a análise laboratorial (FREDERICK, 2012; KATAOKA, 2010; PETERS et al., 2009).

A abordagem mais utilizada nas análises de drogas recomendada pelo *National Institute on Drug Abuse* (NIDA) nos Estados Unidos é a associação de análises de triagem, seguida de exames confirmatórios. As análises de triagem

geralmente são baseadas em métodos imunoenzimáticos; no entanto, eles fornecem apenas resultados preliminares. Se um resultado for positivo na análise de triagem, é necessário a sua confirmação. A análise confirmatória é realizada por uma técnica mais específica, como a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. No processo de confirmação da análise, a primeira fase é a extração do composto de interesse da amostra biológica, para excluir possíveis interferências dos constituintes da matriz (DE BRABANTER et al., 2013; OLIVEIRA, et al., 2008; PANTALEAO et al., 2012; PRAGST, 2007; SCHEIDWEILER et al., 2012).

A atual preocupação da ciência da medição química é representada pela incerteza da medição dos resultados obtidos experimentalmente. Na busca da excelência da qualidade de laboratórios analíticos, a incerteza de medição, representada pela dispersão dos valores de um resultado, se tornou uma ferramenta fundamental utilizada no processo de validação. O resultado de uma medição acompanhada da estimativa da incerteza é, na verdade, uma distribuição de probabilidade, com o resultado indicando o centro da distribuição e os limites da incerteza delimitando a proporção da provável localização do valor real. A estimativa da incerteza originou-se nos laboratórios analíticos prestadores de serviços, já que o seu cálculo é exigido como critério para o reconhecimento formal da competência técnica destes laboratórios. A incerteza permite ao indivíduo julgar a qualidade e validade dos resultados da medição. A existência da incerteza não significa que há algo de errado ou inadequado, ela é simplesmente uma medida de confiança que confere qualidade ao resultado da medição, principalmente na aprovação ou reprovação de um produto ou laudo avaliado, e, portanto, é um elemento-chave do sistema de qualidade analítica. Vários fatores contribuíram para este renovado interesse no cálculo da incerteza. Um deles é que agências de acreditação exigem que laboratórios identifiquem e relatem a incerteza de medição como parte de seu protocolo analítico. O programa de acreditação *American Society of Crime Laboratory Directors/ Laboratory Accreditation Board* (ASCLD/LAB), por exemplo, adotou a norma ISO/IEC 17025 que estabelece que “os laboratórios devem ter e aplicar procedimentos para a estimativa de suas incertezas de medição e que estas sejam estimadas para qualquer área de teste ou calibração, onde o cliente faz o pedido ou quando a

jurisdição ou estatuto exige”. Este e outros fatores trouxeram atenção para a necessidade de se estimar a incerteza em análises toxicológicas de substâncias psicoativas em urina (ASCLD/LAB, 2011; ISO/IEC 17025, 2005).

O conceito de incerteza já é adotado há alguns anos por laboratórios de prestação de serviços, contudo, ainda é relativamente recente na descrição de novos métodos de análises toxicológicas, reportadas na literatura científica. A incerteza de medição também apresenta grande utilidade para os laboratórios analíticos, por possibilitar a identificação dos fatores que podem ter influência estatisticamente relevante no resultado do ensaio e, dessa forma, auxiliar na implementação de um controle adequado para reduzir os erros associados à análise, assegurando assim a garantia da qualidade do processo e sua melhoria contínua (ANVISA, 2003; ISO/TS 21748; 2004).

Embora haja um guia para determinar a incerteza, este dita apenas as regras gerais para sua expressão, que pode ser utilizada tanto para medições físicas quanto químicas. Desta forma, a proposta do trabalho foi o desenvolvimento de um procedimento de fácil compreensão e implementação, direcionado para as análises toxicológicas para ser implantado nos laboratórios de análise e pesquisa, garantindo assim a qualidade e confiabilidade do resultado gerado.

REVISÃO DE LITERATURA

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Substâncias psicoativas

2.1.1 Canabinóides

Os produtos da *Cannabis sativa*, tais como a marijuana, haxixe, óleo de haxixe, *sinsemilla* e outros, obtidos a partir de diferentes partes da planta, são considerados as drogas ilícitas mais populares em todo o mundo. Historicamente, estes produtos já foram usados no Império Chinês no tratamento de malária e reumatismo. De acordo com o UNODC a *Cannabis* continua sendo a droga ilícita mais utilizada no mundo. O consumo de canabinóides aumentou durante a década de noventa e início do século XXI e, atualmente, o consumo de *Cannabis* é considerado estável. Estima-se que entre 125 e 203 milhões de pessoas (2,8 - 4,9% da população mundial) consumiram *Cannabis* em 2009 (RACAMONDE et al., 2012; UNODC, 2012).

Mais de 400 diferentes compostos, distribuídos por 18 grupos de produtos, foram detectados nas espécies de plantas *Cannabis*. O grupo mais importante é o dos canabinóides, que são a principal classe de substâncias ilegais presente em toxicologia clínica e forense, controle de doping nos esportes, casos de condução de veículos sob a influência de drogas e nos programas de prevenção do uso de drogas no ambiente de trabalho. Portanto, há uma enorme demanda no desenvolvimento de métodos sensíveis, rápidos e confiáveis para confirmar a presença deste analito em amostras biológicas. A substância Δ^9 -tetraidrocanabinol (Δ^9 -THC), cuja estrutura molecular está representada na **Figura 1**, é o composto mais significativo, devido às suas propriedades psicoativas, ao qual é atribuída a maioria dos efeitos da *Cannabis* (DE BRABANTER et al., 2013; FELLI et al., 2011; HAN et al., 2011; SCHEIDWEILER et al., 2012).

Após a ingestão da *Cannabis*, o Δ^9 -THC é metabolizado no fígado e outros tecidos formando numerosos produtos de biotransformação. O Δ^9 -THC é extensivamente biotransformado pelas enzimas hepáticas, e um dos seus produtos é o 11-hidroxi- Δ^9 -THC. A oxidação deste origina o produto inativo

ácido 11-nor- Δ^9 -tetraidrocanabinol carboxílico (THC-COOH), representado na **Figura 1**. O THC-COOH pode ser conjugado com o ácido glicurônico e excretado na urina, portanto a identificação deste analito na urina é o melhor procedimento de análise para verificar a exposição do indivíduo à droga (LACROIX & SAUSSEREAU, 2012; SCHEIDWEILER, et al., 2012; STEPHANSON et al., 2008).

Figura 1. Estrutura molecular do Δ^9 -tetraidrocanabinol (A) e do ácido 11-nor- Δ^9 -tetraidrocanabinol carboxílico (B).

2.1.2 Anfetaminas

Estimulantes do tipo das anfetaminas (ATS) são uma classe de substâncias de estimulantes sintéticos que inclui o grupo das anfetaminas (anfetamina e metanfetamina) e substâncias do grupo ecstasy (3,4-metilenodioximetanfetamina e seus análogos). De acordo com o UNODC, as anfetaminas são a segunda classe de drogas ilícitas mais utilizadas no mundo. Os ATS são atraentes para os milhões de usuários de drogas em todas as regiões do mundo, porque eles são mais acessíveis comparadas à outras drogas e, muitas vezes, associadas a um estilo de vida moderno e dinâmico. O uso de anfetaminas está aumentando dramaticamente em todo o mundo e constitui um grave problema social, pois esse grupo de substâncias possui um alto potencial de abuso podendo levar ao desenvolvimento da farmacodependência. De acordo com o UNODC, em 2011, 0,7% da população mundial na idade de 15-64 anos (33,8 milhões de pessoas), consumiram alguma das substâncias do grupo das anfetaminas (KIM, et al., 2013; UNODC, 2013).

Esses estimulantes do sistema nervoso central aumentam a vigilância e euforia, a agilidade, competitividade e agressão e também estão associados à psicose, paranoia, violência e aumento do risco de acidente vascular cerebral. Alguns derivados anfetamínicos constituem formulações utilizadas para perda de peso. As anfetaminas são mais comumente ingeridas, injetada ou fumada, mas também podem ser inaladas. A anfetamina é o protótipo desta classe de compostos com atividades estimulantes central e periférica. A metanfetamina (também conhecida no mercado ilícito com os nomes "*crystal meth*" e "*ice*") é o ATS mais fabricado em laboratórios ilegais (CHIA, et al., 2005; CHUNG, et al., 2008; LEYTON, et al., 2000; MARAIS, et al., 2009; PANTALEÃO, et al., 2012). As estruturas moleculares destas substâncias são apresentadas na **Figura 2**.

Figura 2. Estrutura molecular da anfetamina (A) e metanfetamina (B).

2.1.3 Cocaína

A cocaína é o principal alcalóide encontrado nas folhas do arbusto *Erythroxylon coca*, planta originária da zona tropical dos Andes, que cresce principalmente em regiões de clima quente e úmido. Seus efeitos estimulantes já eram conhecidos há mais de 4.000 anos na história da humanidade, quando as pessoas mascavam suas folhas. No final do século XIX, o interesse sobre a toxicidade da cocaína aumentou devido aos crescentes casos de intoxicação e mortes relacionadas ao uso da droga (STEVEN & KARCH, 1999; YONAMINE, 2004).

A cocaína é uma substância com grande potencial de causar dependência, devido aos seus efeitos instantâneos sobre o sistema nervoso central. Ela é uma das drogas ilícitas mais utilizadas nos Estados Unidos. Segundo o *National Survey on Drug Use and Health* (NSDUH), em 2006, havia

2,4 milhões de usuários de cocaína com 12 anos ou mais. De acordo com o UNODC, a prevalência de usuários de cocaína em 2011 foi entre 0,3 e 0,5% da população mundial com idade entre 15 e 64 anos (13,9 – 20,7 milhões de pessoas). A cocaína administrada em humanos é metabolizada rapidamente e convertida, quase em sua totalidade, em produtos de biotransformação e eliminada na urina como benzoilecgonina (15 a 50%), ecgonina métil éster (15 a 35%), ecgonina (1 a 8%), norcocaína (2 a 6%) e na forma inalterada (cerca de 3%). O principal produto de biotransformação, benzoilecgonina, apresentado na **Figura 3**, é o composto mais monitorado em amostras de urina para verificar a exposição a esta droga (LU, et al., 2009; PATERSON, et al., 2010; UNODC, 2013; YONAMINE, 2004).

Figura 3. Estrutura molecular da cocaína (A) e da benzoilecgonina (B).

2.2 Análises toxicológicas de substâncias psicoativas

A aplicação de métodos analíticos para identificação de substâncias psicoativas em amostras biológicas constitui um importante instrumento no controle do seu uso, determinando a influência destas substâncias na condução de veículos, em programas antidopagem nos esportes e em programas para prevenir o uso de drogas, aumentando assim a segurança no trabalho. Essas aplicações traduzem a importância do papel das análises toxicológicas na prevenção, diagnóstico e tratamento de usuários (FOLLADOR, et al., 2004; MARIZ & SILVA, 2003; SILVA & YONAMINE, 2004).

O abuso de substâncias psicoativas atinge diversos segmentos da sociedade podendo influenciar também o ambiente de trabalho, pois o uso dessas substâncias tem um efeito adverso sobre a saúde e o bem-estar dos trabalhadores. Além de prejuízos na saúde dos indivíduos, trabalhos científicos

indicam que o uso de drogas no ambiente de trabalho pode impor altos custos às empresas, devido a baixa produtividade, aumento do absenteísmo e mais acidentes de trabalho. Efeitos associados ao uso dessas substâncias, como reação lenta, perda de tempo, de coordenação, sedação e outros efeitos como hiperatividade e impaciência, são inaceitáveis no ambiente de trabalho, e as análises toxicológicas podem ser úteis como adjuvantes em medidas de prevenção, controle e investigação forense, portanto, os testes para sua detecção são empregados para garantir a segurança e produtividade (CARPENTER, et al., 2007; KARCH, et al., 2008; LILLSUNDE et al., 2008; YONAMINE & SILVA, 2002).

Na tentativa de prevenir a ocorrência desses incidentes, alguns países aplicam análises toxicológicas para verificação do consumo de drogas no ambiente de trabalho. A realização destas análises já é bem regulamentada e consolidada nos Estados Unidos da América (EUA), e por esse motivo as consequências legais e éticas são mínimas. Na Europa, essa prática tem aumentado com o passar dos anos, em parte por causa das corporações multinacionais americanas que aplicam estes exames para todos os seus funcionários, mesmo fora dos EUA. Apesar da existência de um grupo, o *European Workplace Drug Testing Group*, responsável por desenvolver a literatura nesta área, treinar pessoal especializado e fornecer informações sobre o tema, não há legislação específica sobre os testes de drogas no ambiente de trabalho na maioria dos países da Europa. Entre os países da América do Sul, apenas o Brasil adota a prática dos testes. Nos demais países, os mesmos só são realizados nas companhias multinacionais americanas (PIERCE, 2008; VERSTRAET & PIERCE, 2001).

2.3 Matrizes biológicas utilizadas para verificar a exposição à substâncias psicoativas

Entre as matrizes alternativas empregadas nas análises toxicológicas estão a saliva, suor, cabelo, unhas e meconio. Já o *humor vítreo*, fluido gástrico, e as amostras de órgãos sólidos são utilizados em exames *post mortem*. Na maioria dos casos, a urina é a amostra biológica de escolha para

verificar a exposição a drogas de abuso e tem sido amplamente empregada em programas de prevenção e controle do uso de drogas no ambiente de trabalho. É um meio relativamente estável e de fácil conservação, além disso, sua coleta é simples e não invasiva, e, constitui-se de 99% de água, contendo poucos compostos endógenos que possam interferir nas análises. As substâncias psicoativas e seus produtos de biotransformação geralmente encontram-se em maiores concentrações na urina do que no sangue, uma vez que as concentrações sanguíneas caem abaixo dos níveis detectáveis dentro de poucas horas após o consumo. O período de detecção da urina é apropriado, permitindo revelação de substâncias e/ou os produtos de biotransformação com um intervalo maior de tempo entre a exposição e a análise laboratorial. Os valores de referência estão bem estabelecidos para interpretação dos resultados, além disso, a maioria dos analitos são estáveis na urina, em caso de congelamento da amostra, o que permite seu armazenamento por um período de tempo maior (BERGO, 2007; PIZZOLATO et al., 2007; VERSTRAET & PEAT, 2011; YONAMINE & SILVA, 2002).

No entanto, uma das limitações do uso da urina é que ela pode ser passível de adulterações por diluição ou por substâncias que interfiram na análise, mascarando um possível resultado positivo. Diferente da interpretação dada aos resultados obtidos das análises sanguíneas, resultados positivos em amostras de urina significam apenas exposição àquela substância, sem correlação direta com os efeitos comportamentais e fisiológicos observados. Contudo, as limitações de sua utilização não superam suas vantagens (PIZZOLATO et al., 2007; SOUBHIA, 1999; YONAMINE, 2004).

As análises toxicológicas de amostras de urina incluem duas etapas: uma análise preliminar de triagem e uma fase de confirmação. A técnica de triagem (*screening test*) deverá ser sensível o bastante para identificar as possíveis amostras positivas e eliminar as negativas. É prática comum nas análises laboratoriais, o estabelecimento de limites de concentração na urina para categorização de resultados como indicativo ou não do consumo de drogas. Esses valores de referência, também conhecidos como *cut off*, são referentes à concentração de uma substância em uma amostra biológica, estabelecidos e recomendados por entidades internacionais. Há disponibilidade de técnicas como os imunoensaios, método aprovado pela *Food and Drug*

Administration (FDA), que possibilitam um menor tempo de análise com grande confiabilidade dos resultados, sendo assim bastante utilizada em laboratórios, podendo variar desde a análise de uma única amostra até métodos automatizados, capazes de realizar centenas de análises por dia. Os valores de *cut off*, determinados por programas de regulamentação nos Estados Unidos da América, para algumas das substâncias psicoativas em urina são apresentados na **Tabela 1**.

Tabela 1. Valores de *cut off* para substâncias psicoativas em amostras de urina de acordo com o DHHS (*Department of Health and Human Services*).

TRIAGEM		CONFIRMAÇÃO	
Substância	Concentração ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Substância	Concentração ($\mu\text{g.L}^{-1}$)
Anfetaminas	1000	Anfetamina	500
		Metanfetamina	500
Canabinóides	50	THC-COOH	15
Cocaína	300	Benzoilecgonina	150

Fonte. [adaptado de Moffat (2011)].

Resultados positivos obtidos nos ensaios imunológicos de triagem devem ser confirmados por técnicas mais específicas. Atualmente, a maioria dos métodos confirmatórios é baseada em cromatografia gasosa ou líquida acoplada à espectrometria de massas (BERGO, 2007; LI et al., 2013; VERSTRAET & PEAT, 2011).

2.4 Aspectos analíticos

O primeiro passo do processo analítico de confirmação envolve a extração do composto de interesse da matriz em que está contido. Tratando-se de amostras biológicas, que são muito complexas, contendo muitas vezes

proteínas, sais, ácidos, bases, e numerosos compostos orgânicos com propriedades químicas semelhantes as dos analitos de interesse, este processo de separação é importante a fim de excluir interferentes, que poderiam inviabilizar a subsequente análise cromatográfica (KATAOKA, 2010; PRAGST, 2007).

As técnicas mais comumente utilizadas para extração e/ou pré-concentração de compostos presentes em fluidos biológicos são a extração líquido - líquido (LLE) e a extração em fase sólida (SPE). Contudo, as tendências atuais apontam para utilização de menores quantidades de amostras, até mesmo para análises de traços; obtenção de maior seletividade e especificidade na extração e o desenvolvimento de métodos menos agressivos ao meio ambiente, com menor desperdício e o uso de quantidade mínima de solventes orgânicos. Assim, técnicas de microextração, que utilizam quantidades mínimas de solventes orgânicos e menos etapas na preparação das amostras vêm sendo desenvolvidas (HYÖTYLÄINEN & RIEKKOLA, 2008; KATAOKA, 2010; OLIVEIRA, et al., 2008; PANTALEÃO et al., 2012; PRAGST, 2007).

2.4.1 Extração em fase sólida

A extração em fase sólida é uma técnica de separação e pré-concentração de substâncias em matrizes complexas e baseia-se nas interações entre essas substâncias e a fase sólida (sorbente) presente no dispositivo de extração. Este se constitui, geralmente, de cartuchos plásticos que contém o material sorbente e por onde a amostra é aspirada, com opção de vácuo, interagindo com a fase sólida. Dependendo da polaridade e dos grupos funcionais das moléculas de interesse, diferentes tipos de materiais sorbentes podem ser utilizados, incluindo fases apolares, com grupos para troca catiônica ou aniônica (polares), e uma mistura de ambos no mesmo cartucho (mistas). Como demonstrado na **Figura 4**, o cartucho deve ser condicionado às condições da análise, e passos de lavagem prévia à eluição são necessários para retirar os contaminantes.

Figura 4. Etapas envolvidas na extração em fase sólida (SPE).

2.4.2 Microextração em fase líquida

Recentemente, na procura por novas técnicas de preparação de amostras, surgiu a miniaturização da técnica de extração líquido-líquido, com o objetivo de reduzir a razão volumétrica entre a fase aquosa e a fase orgânica e favorecer a transferência dos analitos da primeira para a segunda fase. Pedersen-Bjergaard e Rasmussen (1999) introduziram a microextração em fase líquida com fibra oca, (HF-LPME - *hollow fiber liquid-phase microextraction*) ou simplesmente LPME, que pode ser considerada uma evolução dos métodos de microextração com solventes. Esta técnica é baseada no uso de uma membrana cilíndrica feita de polipropileno, simples, descartável, de baixo custo e porosa. A fibra tem porosidade de 70%, o tamanho do poro de 0,2 μm , espessura da parede da fibra de 200 μm e diâmetro interno de 600 μm (OLIVEIRA, et al., 2008; PEDERSEN-BJERGAARD & RASMUSSEN, 2008).

O volume da amostra aquosa empregado na LPME é na faixa de 0,1 a 4,0 mL dependendo da aplicação, e o comprimento da fibra é normalmente de 1,5 a 10 cm, como mostrado na **Figura 5**. Antes da extração, a membrana deve ser imersa em um solvente orgânico para imobilizá-lo nos poros, o excesso do solvente deve ser removido em água e o lúmen da fibra é preenchido com microlitros de uma fase aceitadora. O solvente orgânico deve ser imiscível em água para garantir sua permanência dentro dos poros durante

a extração, sem vazamento para a amostra aquosa. O volume do solvente imobilizado é aproximadamente de 5 a 30 μL e o volume do solvente presente no lúmen da fibra varia de 2 a 30 μL (RASMUSSEN & PEDERSEN-BJERGAARD, 2004).

Figura 5. Comprimento da fibra de polipropileno utilizada na LPME.

A LPME pode ser utilizada no modo de duas ou três fases, de acordo com as características da substância em questão. Os dois tipos de utilização estão demonstrados na **Figura 6**. No sistema de duas fases, os produtos de interesse são extraídos da amostra aquosa (fase doadora) para um solvente orgânico (fase aceptora), sendo imobilizado nos poros da membrana. Neste modo, a fase orgânica é diretamente compatível na análise por cromatografia em fase gasosa. Para obtenção de resultados favoráveis neste modo de extração, o analito deverá ser moderado ou altamente hidrofóbico, podendo conter grupos ionizáveis ácidos ou básicos. No sistema de três fases, a fase aceptora é outra solução aquosa (solução ácida ou alcalina), sendo que os analitos são extraídos da amostra (fase doadora), por meio de um solvente orgânico imobilizado nos poros da fibra oca, para a fase aceptora presente dentro do lúmen da fibra. Diferentes parâmetros devem ser otimizados durante o desenvolvimento do método de LPME, tais como: ajuste do pH da amostra, volume da fase doadora e aceptora, tipo de solvente orgânico, tempo de extração e agitação do sistema (DADFARNIA & SHABANI, 2010; FLANAGAN et al., 2006; HYÖTYLÄINEN & RIEKKOLA, 2008; LEE et al., 2008; PSILLAKIS & KALOGERAKIS, 2003).

Figura 6. Esquema da LPME no sistema de 2 fases (A) e 3 fases (B). No sistema A, o solvente que é impregnado na fibra é o mesmo utilizado como fase aceitadora. Já no sistema B, um solvente é impregnado na fibra, e como fase aceitadora é utilizada uma solução aquosa.

2.5 Validação

O desenvolvimento de um método analítico envolve um processo que avalie e determine sua eficiência na rotina do laboratório. Esse processo, denominado validação, é essencial para confirmar se os métodos são apropriados para o uso pretendido, a fim de se obter resultados confiáveis que possam ser satisfatoriamente interpretados, possibilitando o conhecimento das limitações e da confiabilidade nas medidas realizadas nas análises. Os parâmetros de validação de métodos analíticos incluem: intervalo de trabalho, linearidade, sensibilidade, exatidão, precisão, limite de detecção, limite de quantificação, recuperação e incerteza de medição. A validação, a estimativa de incerteza, o controle estatístico do método e a qualificação de equipamentos analíticos fazem parte dos sistemas de qualidade de laboratórios analíticos (ANVISA, 2003; BUCHMANN & SARKIS, 2002; EURACHEM/CITAC, 2000; INMETRO, 2007; LEBEAU, 2011; PETERS & MAURER, 2002; UNODC, 2009).

2.6 Incerteza de medição

A implementação de um programa de garantia da qualidade em laboratórios de análises torna-se mais um requisito fundamental para a oferta de serviços especializados com qualidade comprovada. A incerteza de medição, que é definida como o parâmetro que caracteriza a dispersão dos valores atribuídos a um mensurando é, atualmente, um dos elementos mais importantes do sistema de garantia da qualidade. Em geral, o resultado de uma medição é somente uma aproximação ou estimativa do valor do mensurando, que é a grandeza específica submetida a uma medição. Portanto, só é completo quando acompanhado pela declaração da incerteza. Esta é melhor descrita por um intervalo simétrico em torno do resultado, no qual se encontra o valor real. Assim, a incerteza de uma medição é uma indicativa de qualidade, de forma que aqueles que a utilizam possam avaliar o nível de confiança do laboratório em uma dada medição, fornecer informações essenciais para a interpretação dos resultados de medição, além de identificar as fontes significativas de incerteza e auxiliar na sua redução (BUCHMANN & SARKIS, 2002; EURACHEM/CITAC, 2000; GULLBERG, 2012; LEE, et al., 2010; SKLEROV & COUPER, 2011).

A estimativa da incerteza tem ainda extrema importância na tomada de decisões. Muitas medições químicas são feitas para determinar se um resultado concorda ou não com uma especificação que geralmente é expressa em termos de quantidade mensurável, no qual o mensurando deve estar acima, abaixo ou entre limites especificados. Ao compararmos o resultado de uma análise frente a um limite legal, tomar a decisão de aprovar o resultado ou rejeitá-lo, implica sempre em uma análise de risco, pois a decisão incorreta pode levar a prejuízos irreparáveis. Se a medição mais a sua incerteza estiverem inteiramente dentro ou fora do limite de conformidade, a decisão é facilmente tomada. A complexidade do problema aumenta se existir uma incerteza no limite (limites de especificação) que deva ser considerada junto com a incerteza do resultado de medição. A literatura propõe uma metodologia passional e tendenciosa ao definir que a região de sobreposição parcial conta sempre contra o reivindicante – parte que tenta demonstrar a conformidade ou não conformidade. Portanto, quanto menor a incerteza da análise, menor será

o risco de uma decisão errada e maior será a confiabilidade da medição (EURACHEM/CITAC, 2000; ISO Guide 99, 1993; ISO 14253, 1998; ISO/IEC 17025, 2005; ISO/TS 21748, 2004; OLIVEIRA, et al., 2008; SILVA, 2010).

O conceito de estimativa da incerteza de medição foi inicialmente desenvolvido para as medições físicas, sendo publicado no *Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement* (GUM), elaborado pela *International Organization for Standardisation* (ISO), conhecido então como ISO-GUM e, atualmente, seu conceito vem sendo empregado também nas medições químicas. Contudo, estimar a incerteza de medição para os resultados de análises químicas é muito mais complexo do que sua aplicação nas medições físicas, já que uma medição química geralmente depende de uma combinação de medições físicas, da separação química do composto de interesse e da seleção apropriada da porção do material retirado para medição (amostragem). A indústria farmacêutica, em especial, a produção de fármacos, é uma área que utiliza a incerteza como ferramenta para o controle de seus produtos e processos, devido à importância de seus resultados e a necessidade de que os mesmos sejam extremamente confiáveis. Embora a determinação da incerteza de medição já seja aplicada há algum tempo em diversos laboratórios como requisito da garantia de qualidade, há poucos relatos na literatura científica de estimativa de incerteza associada às análises toxicológicas (DE LA CRUZ et al., 2010; EURACHEM/CITAC, 2000; ISO/TS 21748, 2004).

Em uma pesquisa no banco de dados do PubMed, realizada em outubro de 2013, com as palavras “*uncertainty measurement and toxicology*” foram encontrados poucos artigos, e a maioria recentes, que têm adotado os conceitos de incerteza de medição em toxicologia. Com isso surge a necessidade de se estabelecer metodologias simples e confiáveis e que forneçam uma adequada análise da incerteza na verificação da conformidade das análises toxicológicas (GULLBERG, 2012; LEE et al., 2009, LEE et al., 2010; SKLEROV & COUPER, 2011).

2.6.1 Guias para determinação da incerteza de medição

Atualmente, existe um grande esforço para a uniformização de uma metodologia para a expressão da incerteza da medição. De acordo com o *Bureau International des Poids et Mesures* - BIPM (2008), o ISO-GUM, é a referência que estabelece critérios e regras gerais, harmonizando e padronizando métodos e procedimentos relacionados à expressão de incertezas associadas ao processo de medição, visando assim a interação entre mercados nas análises para garantia da qualidade. A norma ISO-GUM é mundialmente reconhecida como base para o tratamento de incertezas e consiste em tratar todas as suas componentes do mesmo modo, independente da natureza dos erros, sejam eles aleatórios ou sistemáticos no momento da medição (EURACHEM/CITAC, 2000).

Há diferentes abordagens da estimativa de incerteza de medição na literatura: O guia preparado pelo *Nordic Committee on Food Analysis* (NMKL), baseia-se na determinação da estimativa de incerteza pelo intervalo de confiança, através da medida de precisão intermediária e a média obtida nas repetições. O guia *International Organization for Standardization; Technical Specification* (ISO/TS) 21748 (2004), baseia-se na utilização de dados de estudos colaborativos, através da reprodutibilidade.

O *International Organization for Standardization/International Electrotechnical Commission* (ISO/IEC) 17025 (2005) apresenta a avaliação de incerteza usando dados obtidos de experimentos de precisão. O guia EURACHEM/CITAC, 2000, é o documento orientativo mais completo de incerteza na área de ensaios químicos e físico-químicos. Ele foi publicado no sentido de detalhar os princípios de aplicação do GUM no ambiente da química analítica, e a partir deste documento dois outros foram elaborados. Um deles descreve um guia de incerteza específico para o processo de amostragem (EURACHEM/CITAC, 2007a) e o outro aborda a interpretação dos resultados da incerteza de medição na avaliação de conformidade frente a limites estipulados (EURACHEM/CITAC, 2007b).

O guia EURACHEM/CITAC (2000) recomenda o uso de desvio-padrão de ensaios de repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade de estudos inter-laboratoriais para o cálculo da incerteza de medição. Fica claro

neste guia, que o objetivo dos atuais cálculos de incerteza não é meramente de explicação, mas de verificação de conformidade, ou seja, utilizar o resultado dos cálculos para decidir se ele indica conformidade ou não com uma especificação (ELLISON & WILLIAMS, 2007).

Duas abordagens para a estimativa da incerteza de medição são bastante comuns: a *top-down*, baseada em estudos interlaboratoriais ou estudos de validação e a *bottom-up* (método clássico), preconizada pelo GUM. De maneira geral, a norma ISO/IEC 17025 que define os requisitos para a acreditação de laboratórios, faz referência às duas abordagens, pois, na seção sobre incerteza, cita o conhecimento do método e os parâmetros de validação. O processo de estimativa da incerteza de medição utilizando a abordagem *bottom-up* envolve quatro etapas: especificação do mensurando, identificação das fontes de incerteza baseado na elaboração de um diagrama de causa e efeito (diagrama de Ishikawa), quantificação dos componentes de incerteza e cálculo da incerteza padrão combinada (BUCHMANN & SARKIS, 2002; DE LA CRUZ et al., 2010; EURACHEM/CITAC, 2000; INMETRO, 1998; LEE et al., 2009; ROZET et al., 2011).

2.6.2 Tipos de incerteza

A finalidade de classificar as incertezas em Tipo A e Tipo B é indicar duas maneiras diferentes de avaliar os componentes da incerteza e serve apenas para discussão; a classificação não se propõe a indicar que haja qualquer diferença na natureza dos componentes resultantes dos dois tipos de avaliação. Ambos os tipos de avaliação são baseados em distribuições de probabilidade e os componentes de incerteza resultantes de cada tipo são quantificados por variâncias ou desvios-padrão (BIPM, 2008).

A avaliação tipo A da incerteza padrão é intrínseca ao processo de medição e é estimada por métodos estatísticos de análise de uma série de replicatas. A avaliação tipo B é aquela determinada por meios não-estatísticos. Um exemplo de incerteza tipo A é a variância obtida a partir de uma série de experimentos em replicata, sendo sua estimativa quantificada em termos do desvio padrão dos valores medidos. O método de avaliação é considerado tipo

B quando essa avaliação é realizada através de um julgamento científico das medições, baseado em todas as informações possíveis sobre a variabilidade da grandeza medida. Um exemplo de tipo B é a incerteza que aparece nos relatórios de calibração de equipamentos utilizados na preparação da amostra. Incertezas do tipo B são determinadas a partir de informações acessórias e externas ao processo de medição, tais como resultados de medições similares anteriores, experiência e conhecimento do comportamento do instrumento, dados do fabricante, dados do certificado de calibração e manuais de instrução (EURACHEM/CITAC, 2000; INMETRO, 2012; SKLEROV & COUPER, 2011).

2.6.3 Fontes de incerteza

As incertezas podem ser advindas de muitas fontes possíveis, tais como: amostragem, homogeneização, pipetagem, injeção, extração, derivatização, curva de calibração, efeitos de matriz e interferências, condições ambientais, incertezas de massas e de equipamentos, aproximações e suposições incorporadas ao método e ao procedimento de medição. Para que se tenha uma estimativa completa e confiável da incerteza é necessário que a contribuição quantitativa de cada uma destas fontes seja determinada. Sem essa indicação, os valores não podem ser comparados, seja entre eles mesmos ou com valores de referência fornecidos numa especificação ou norma, bem como as transferências de métodos e as comparações e estudos interlaboratoriais (DE LA CRUZ et al., 2010; EURACHEM/CITAC, 2007; INMETRO, 2009; LEE et al., 2009; ROZET et al., 2011; UNODC, 2009).

As possíveis fontes de incerteza de medição devem ser identificadas e analisadas de forma detalhada e estruturada, procurando dessa forma, evitar o uso duplicado ou a desconsideração de algum fator que possa influenciar no seu processo de medição. Para se alcançar esse objetivo, pode-se utilizar o diagrama causa-efeito, também conhecido como diagrama de Ishikawa, onde são identificadas todas as fontes de incerteza que definem a incerteza do mensurando. (EURACHEM/CITAC, 2000; GULLBERG, 2012; INMETRO, 2012; WALLACE, 2010).

2.6.4 Incerteza padrão

É a incerteza associada aos dados de entrada $u(x)$ relativos ao resultado de medição e é equivalente a um desvio padrão. Esta estimativa deve expressar todas as componentes da incerteza, seja do tipo A ou B, correspondentes a um desvio padrão, e é obtida dividindo-se o valor de cada contribuição de incerteza pelo seu respectivo divisor correspondente à distribuição de probabilidade assumida ou atribuída. Utiliza-se a distribuição *t de Student* quando a incerteza é expressa como incerteza expandida, com informações do nível de confiança e fator de segurança k . Para obter a incerteza padrão (u), deve-se dividir a incerteza expandida U pelo fator de abrangência k . Quando a probabilidade de distribuição é igual em um intervalo, ela é considerada uma distribuição retangular e o seu divisor é $\sqrt{3}$. São exemplos deste tipo de distribuição os gradientes de temperatura, a resolução da indicação de um instrumento digital e a linearidade das massas de uma balança. Quando a distribuição de probabilidade for maior na parte central, em um determinado intervalo, e decair linearmente nas extremidades, esta será uma distribuição triangular e o seu divisor será $\sqrt{6}$. São exemplos deste tipo de distribuição a resolução de um indicador analógico e a leitura de volume de uma bureta (EURACHEM/CITAC, 2000; MENDES & ROSÁRIO, 2005; MEYER, 2007).

2.6.5 Incerteza padrão combinada

A estimativa da incerteza padrão combinada (u_c) é obtida a partir da combinação das incertezas padrão, $u(x)$, do tipo A ou do tipo B, de cada uma das fontes de entrada (i). É definida matematicamente como a raiz quadrada positiva de uma soma de termos, que constituem as variâncias ou covariâncias destas outras grandezas, ponderadas de acordo com o quanto o resultado da medição varia com mudanças nestas grandezas. Em geral, a u_c é utilizada para expressar a incerteza em um resultado de medição, mas em algumas aplicações comerciais, industriais, regulamentares e quando a segurança e a

saúde estão em foco, é às vezes necessário se dar uma incerteza que defina um intervalo em torno do resultado de medição. Neste caso espera-se que este intervalo englobe uma grande porção da distribuição de valores que podem ser razoavelmente ser atribuídos ao mensurado e então é denominada de incerteza expandida (U).

2.6.6 Incerteza expandida

A incerteza expandida (U) é a grandeza que define um intervalo em torno do resultado de uma medição, com o qual se espera abranger uma grande fração da distribuição dos valores que podem ser razoavelmente atribuídos ao mensurando. A incerteza expandida é obtida quando a incerteza padrão combinada é multiplicada por uma constante k , denominada fator de abrangência, que depende do nível de confiança e o resultado de medição é expresso por $y \pm U$, onde o y corresponde ao mensurando. Para um nível de confiança aproximado de 95%, k é igual a 2. Quando os cálculos de incerteza são realizados corretamente, eles permitem ao analista dizer, com um determinado nível de confiança, que o valor do resultado tem grande probabilidade de se encontrar dentro do intervalo calculado.

Diante do exposto, este trabalho teve a finalidade de estudar a incerteza de medição das análises toxicológicas confirmatórias de substâncias psicoativas em urina pela técnica de cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS). Os métodos foram desenvolvidos (otimizados e validados) e suas fontes de incerteza identificadas e mensuradas. Portanto, o desenvolvimento e implantação de um procedimento que expresse essa incerteza fornecem às análises toxicológicas maior confiabilidade e qualidade nos seus resultados, podendo servir de referência para as demais instituições de pesquisa no país na aplicação de recursos de estatística no controle de erros associados à medição.

OBJETIVO

3. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de métodos analíticos para determinação de substâncias psicoativas – anfetaminas (anfetamina e metanfetamina), ácido 11-nor- Δ^9 -tetraidrocanabinol carboxílico (principal produto de biotransformação do tetraidrocanabinol – THC) e benzoilecgonina (principal produto de biotransformação da cocaína) em urina, aplicando-se os conceitos de incerteza de medição. Os analitos foram submetidos à detecção por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS).

MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 Equipamentos e acessórios

Para determinação de canabinóides e benzoilecgonina foi utilizado o equipamento de cromatografia gasosa modelo *Focus GC* acoplado a espectrômetro de massas do tipo *Ion Trap* modelo *Focus Polaris Q* ambos da marca Thermo Fischer Scientific (Bremen, Alemanha). O cromatógrafo gasoso foi equipado com coluna capilar de sílica fundida HP-5MS com as seguintes dimensões: 30 metros, 0,25 μm de diâmetro e 0,1 μm de filme.

Para a determinação de anfetaminas utilizou-se o equipamento de cromatografia gasosa modelo 6850 acoplado ao espectrômetro de massas do tipo quadrupolo modelo 5875 da marca Agilent Technologies (California, EUA). O cromatógrafo gasoso foi equipado com coluna capilar de sílica fundida HP-5MS com as seguintes dimensões: 30 metros, 0,25 μm de diâmetro e 0,1 μm de filme.

Para a confecção dos cromatogramas e espectros de massas, os dados brutos foram extraídos dos softwares de cada equipamento e plotados no programa Microsoft Excel[®] 2010.

A vidraria de precisão do laboratório e os equipamentos foram calibrados em empresas acreditadas pela RBC (Rede Brasileira de Calibração), e seus laudos emitidos com valores de incerteza expandida e fator de abrangência.

Para a extração em fase sólida foram utilizados cartuchos de extração de fase mista, Bond Elut Certify 130MG/3ML (CX 50) (173gr) – Agilent. Para a microextração em fase líquida, utilizou-se uma fibra oca de polipropileno modelo Q3/2 Accurel[®] KM com tamanho do poro de 0,2 μm , espessura da parede da fibra de 200 μm e diâmetro interno de 600 μm . A fibra foi obtida da Membrana[®] (Wuppertal, Alemanha).

4.1.2 Reagentes

Os reagentes (solventes, sais) foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha).

4.1.3 Padrões

Soluções-padrão de compostos anfetamínicos (anfetamina e metanfetamina), ácido 11-nor- Δ^9 -tetraidocanabinol carboxílico (principal produto de biotransformação do Δ^9 -THC), ácido 11-nor- Δ^9 -tetraidocanabinol carboxílico glicurônico e benzoilecgonina (principal produto de biotransformação da cocaína) e os respectivos deuterados (anfetamina-d5, metanfetamina-d5, 11-nor- Δ^9 -tetraidocanabinol carboxílico-d3 e benzoilecgonina-d3) utilizados como padrão interno, na concentração de 1 mg.mL⁻¹ e 100 µg.mL⁻¹ em metanol, foram obtidas da Cerilliant Corporation (Round Rock, Texas, EUA). Os padrões foram fornecidos juntamente com seus relatórios de análise indicando o grau de pureza do mesmo e as incertezas da análise.

A partir dessas soluções, foram preparadas soluções de trabalho utilizando o mesmo solvente de origem (metanol) para fazer as diluições.

4.1.4 Amostras

O cálculo de incerteza foi realizado para as amostras de urina obtidas do *National Institute of Standards & Technology* (NIST). Para determinação da incerteza das análises de canabinóides, foi utilizada a amostra de referência SRM 1507b que consiste em três frascos de urina liofilizada. Dois frascos contém em cada, concentrações diferentes de THC-COOH, e o terceiro uma urina sem analito, e são identificados como 1507b-1, 1507b-2 e 1507b-0 respectivamente. Depois da reconstituição com 20 mL de água grau HPLC, a concentração da amostra 1507b-1 foi de $11,7 \pm 1,4$ ng.mL⁻¹ de THC-COOH, e a 1507b-2 de $24,1 \pm 1,3$ ng.mL⁻¹ de THC-COOH.

Para determinação de benzoilecgonina utilizou-se as amostras SRM1508a - NIST, que consiste em quatro frascos de urina liofilizada. Três frascos contém em cada, concentrações diferentes de benzoilecgonina, e o quarto uma urina sem analito, e são identificados como 1508a-1 ($78, 1 \pm 4 \text{ ng.mL}^{-1}$), 1508a-2 ($161 \pm 6,8 \text{ ng.mL}^{-1}$), 1508a-3 ($315 \pm 15 \text{ ng.mL}^{-1}$) e 1508a-0 respectivamente. Cada amostra estava acompanhada do seu laudo de análise onde continha a concentração e incerteza da análise e o método pelo qual foi realizado a determinação do analito na urina.

Para determinação de anfetaminas, como não havia disponibilidade de aquisição de amostras de urina de referência (NIST) contendo anfetaminas, para aplicação do método, foram obtidas as amostras de urina do Laboratório de Análises Toxicológicas da Universidade de São Paulo (LAT-USP), que recebe amostras provenientes de empresas que fazem parte do “Programa de prevenção e controle do uso de drogas no ambiente de trabalho”. As amostras que obtiveram resultado positivo no teste de triagem pelo método imunoenzimático foram selecionadas para o teste de confirmação pela técnica desenvolvida em nosso trabalho. A incerteza de medição foi calculada para estas amostras (n=10).

Este trabalho foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (protocolo número 3001) e o parecer de aprovação encontra-se no **Anexo 1**.

4.2 Métodos

4.2.1 Determinação de THC-COOH em urina

4.2.1.1 Método de extração

Foram realizados ensaios utilizando como técnica de separação a microextração em fase líquida, método descrito por Pedersen-Bjergaard & Rasmussen (1999), onde uma pequena fibra porosa oca é mantida em contato direto com a amostra liquefeita. Os poros da fibra são preenchidos com solvente orgânico imiscível em água enquanto no interior da fibra é colocado o

líquido acceptor. Em seguida as amostras foram injetadas automaticamente no GC-MS.

Foi adicionado 1,0 mL da amostra de urina em um tubo de centrífuga de 15,0 mL, e acrescentados 15,0 μL de padrão interno deuterado (11-nor- Δ^9 -tetraidrocanabinol carboxílico-d3) de 1,0 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$. Para a análise, a amostra foi submetida a uma digestão alcalina utilizando 100 μL hidróxido de sódio 2,0 $\text{mol}.\text{L}^{-1}$, a 60 °C por 15 minutos. Posteriormente, o pH da solução foi ajustado entre 2-3, adicionando-se 200 μL de HCl 3,0 $\text{mol}.\text{L}^{-1}$, o meio da amostra é mantido ácido para manter o analito na forma não-ionizada.

O volume foi transferido para o *ependorf*, contendo aproximadamente 10,0 mg de NaCl, para se obter o efeito *salting out*, que consiste na diminuição da solubilidade dos compostos polares na fase doadora pelo aumento da força iônica. Para cada extração foram utilizadas duas fibras em cada *ependorf*. O condicionamento das fibras foi realizado utilizando-se como solvente o éter diexílico. Após o condicionamento, as fibras foram preenchidas com fase acceptora, utilizou-se NaOH 0,1 $\text{mol}.\text{L}^{-1}$. As fibras foram então colocadas em contato com a urina (**Figura 7**), e manteve-se sobre agitação por 30 minutos a 1200 rpm.

Figura 7. Ilustração do sistema de LPME trifásico utilizado para determinação de THC-COOH em urina.

Finalizado o tempo, o líquido acceptor foi retirado, transferido para um *vial* de 2,0 mL, evaporado sobre fluxo de nitrogênio a 40 °C, ressuspendido com 25,0 μL de N,O-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) (com 1% de triclorometilsilano) e 25,0 μL de acetato de etila e derivatizado a 90 °C por 15

minutos. Terminado esse procedimento 1 μL do extrato foi injetado no equipamento de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas.

4.2.1.2 Otimização do método

Antes de realizar os ensaios para validação do método, foram feitos testes para encontrar a condição ótima para cada etapa que compõem o método. Todos os parâmetros foram avaliados em triplicata, considerando a área absoluta encontrada nos cromatogramas obtidos no GC-MS. Foram avaliados quatro tipos de solventes para a extração de THC-COOH: Éter diexílico, nonanol, octano e undecano. Avaliou-se a eficiência da rotação: 800, 1000 e 1200 rpm. Testaram-se diferentes condições de agitação, utilizando sonicador e agitador orbital, nos seguintes tempos: 5, 15, 30 e 60 minutos e ainda a eficiência da hidrólise.

4.2.1.3 Condições cromatográficas

- Modo de injeção: *splitless*
- Gás de arraste: Hélio a um fluxo constante de $0,6 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$
- Temperatura do injetor: 250°C
- Programação da temperatura do forno: 150°C (1 min), $15^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ até 270°C (5 min). Tempo total de corrida: 19 minutos.
- Temperatura da linha de transferência: 250°C

Espectrômetro de massas

- Modo de ionização: ionização eletrônica (IE)
- Modo de operação: *full scan*, com seleção de massas de 50 a 550
- Temperatura da fonte de ionização: 220°C

Os íons selecionados para identificação do analito foram:

THC-COOH (371, 473, 488)

THC-COOH-d3 (374, 476, 491)

Os íons sublinhados corresponde ao íon quantificador do analito.

4.2.2 Determinação de anfetaminas em urina

4.2.2.1 Método de extração

Ensaio para determinação de anfetaminas foram baseados na técnica de Pantaleão e colaboradores (2012), com adaptações. Foi adicionado 1,0 mL da amostra de urina em um tubo de centrífuga de 15,0 mL, e acrescentados 50 µL de padrão interno deuterado (anfetamina-d5 e metanfetamina-d5) de 10,0 µg.mL⁻¹. Em seguida o pH da solução foi ajustado para 12, adicionando-se 200 µL de hidróxido de sódio (NaOH) 1,0 mol.L⁻¹. O meio da amostra é mantido alcalino para manter os analitos na forma não-ionizada. O volume foi transferido para o *eppendorf*, contendo aproximadamente 10,0 mg de cloreto de sódio, para se obter o efeito *salting out*. O condicionamento da fibra foi realizado utilizando-se éter diexílico. Após o condicionamento, a fibra foi preenchida com fase aceptora, ácido clorídrico (HCl) 0,01 mol.L⁻¹. A fibra foi então colocada em contato com a urina, e manteve-se sobre agitação por 60 minutos a 1200 rpm. Finalizado o tempo, o líquido acceptor foi retirado, transferido para um *vial* de 2,0 mL, evaporado sobre fluxo de nitrogênio à temperatura ambiente, ressuspendido com 50,0 µL de anidrido trifluoracético (ATFA) e 50 µL de acetato de etila e derivatizado a 70 °C por 15 minutos. Após a derivatização, a amostra foi evaporada novamente sobre fluxo de nitrogênio a 40 °C e ressuspendida com 50,0 µL de acetato de etila. Terminado esse procedimento, 1,0 µL do extrato foi injetado no equipamento de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas.

4.2.2.2 Otimização do método

Foi realizado o planejamento fatorial utilizando o delineamento Box-Behnken, através do programa Design Expert® 8.0. Avaliaram-se três variáveis, sendo elas, molaridade da fase doadora (NaOH 1,0 e 2,0 mol.L⁻¹), tempo de agitação (30 e 60 minutos) e molaridade da fase aceptora (HCl 0,01 e 0,1 mol.L⁻¹). As respostas foram obtidas analisando a área absoluta dos analitos.

4.2.2.3 Condições cromatográficas

- Modo de injeção: *splitless*
- Gás de arraste: Hélio a um fluxo constante de 0,7 mL.min⁻¹
- Temperatura do injetor: 220 °C
- Programação da temperatura do forno: 80 °C (2 min), 20 °C.min⁻¹ até 200 °C. Em seguida aumenta 25 °C.min⁻¹ até 275 °C (1 min). Tempo total de corrida: 12 minutos.
- Temperatura da linha de transferência: 250 °C

Espectrômetro de massas

- Modo de ionização: ionização eletrônica (EI)
- Modo de operação: *SIM (Selected ion monitoring)*
- Temperatura da fonte de ionização: 220 °C

Os íons selecionados para identificação do analito foram:

- Anfetamina (91, 118, 140)
- Anfetamina-d5 (96, 123, 140)
- Metanfetamina (110, 118, 154)
- Metanfetamina-d5 (122, 158)

Os íons sublinhados correspondem ao íon quantificador do analito.

4.2.3 Determinação de benzoilecgonina em urina

4.2.3.1 Método de extração

A determinação de benzoilecgonina, produto de biotransformação da cocaína, foi realizada através da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS), de acordo com o método proposto por Yonamine (2004) com adaptações. Para a extração do analito a técnica utilizada foi a separação em fase sólida (SPE), utilizando cartuchos de extração de fase mista, Bond Elut Certify 130MG/3ML (CX 50) (173gr) – Agilent.

Em um tubo de centrífuga de 15,0 mL, adicionaram-se 2,5 mL da amostra urina, 37,5 μL de benzoilecgonina-d3 10,0 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ Cerilliant® e 2,0 mL de água destilada. O pH das amostras foi ajustado entre 6,0 e 7,0. Em seguida foram adicionados 2,0 mL de tampão fosfato de sódio 0,1 $\text{mol}.\text{L}^{-1}$ pH 6,0.

Para o condicionamento dos cartuchos foram adicionados 2,0 mL de metanol e esperou-se que todo o volume passasse pelo cartucho, em seguida o compressor foi desligado e adicionaram-se 2,0 mL de tampão fosfato de sódio 0,1% pH 6,0. O compressor foi ligado novamente até um fluxo de aproximadamente uma gota por segundo. Com o auxílio de uma pipeta *Pasteur*, adicionou-se a amostra de urina. O volume do tubo, presente dentro da cuba de vácuo, foi desprezado no descarte apropriado.

Para lavagem utilizaram-se 6,0 mL de destilada, e em seguida 3,0 mL de HCl 0,1 $\text{mol}.\text{L}^{-1}$. Após passar todo o HCl pelo cartucho, o compressor permaneceu ligado por 7 minutos com fluxo de 15 mmHg, em seguida, adicionaram-se 3,0 mL de metanol.

A eluição foi realizada com 3,0 mL de solução de diclorometano/ isopropanol/ hidróxido de amônio (12: 3: 0,3 mL), recém-preparado.

Evaporou-se a alíquota a 40 °C sob fluxo de nitrogênio, e em seguida adicionaram-se 25,0 μL de BSTFA e 25 μL de acetato de etila. A derivatização ocorreu por 15 minutos no bloco de aquecimento a 90 °C. Após esse tempo o volume foi transferido para um vial de 2,0 mL com *insert* e levado para análise no equipamento de cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas.

4.2.3.2 Condições cromatográficas

O método cromatográfico desenvolvido teve as seguintes condições selecionadas:

Modo de injeção: *splitless*

-Gás de arraste: Hélio a um fluxo constante de 0,6 $\text{mL}.\text{min}^{-1}$

-Temperatura do injetor: 270 °C

-Programação da temperatura do forno: 150 °C (1 min), 10 °C. min^{-1} até 270 °C (4 min). Tempo total de corrida: 17 minutos.

-Temperatura da linha de transferência: 280 °C

O espectrômetro de massas foi operado nas seguintes condições:

- Modo de ionização: ionização eletrônica (EI)
- Modo de operação: *full scan*, com seleção de massas de 50 a 550
- Temperatura da fonte de ionização: 220 °C

Os íons selecionados para identificação do analito foram:

Benzoilecgonina (82, 240, 361)

Benzoilecgonina-d3 (85, 243, 364)

Os íons sublinhados corresponde ao íon quantificador do analito.

4.2.4 Validação dos Métodos

Os métodos foram validados, estabelecendo-se os parâmetros de limite de detecção, limite de quantificação, linearidade, exatidão, precisão, recuperação e estabilidade dos analitos na matriz. O método foi validado de acordo com guias nacionais e internacionais de validação de métodos (ANVISA, 2003; BUCHMANN & SARKIS, 2002; EURACHEM/CITAC, 2000; INMETRO, 2007; PETERS & MAURER, 2002; LEBEAU, 2011; UNODC, 2009).

4.2.4.1 Limites de detecção e quantificação

Limite de detecção (LOD) é a menor concentração do analito em uma amostra, que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, em determinadas condições experimentais (UNODC, 2009). Este parâmetro é avaliado em sextuplicata e o coeficiente de variação entre as replicatas não deve ser maior que 20%.

O limite de quantificação (LOQ) representa a menor concentração do analito, que pode ser determinada com precisão e exatidão, aceitáveis, utilizando um determinado procedimento experimental. Entre as diversas abordagens para determinar o LOQ, esta é a primeira e provavelmente mais prática. A determinação do LOQ representa um compromisso entre a

concentração, a precisão e a exatidão exigidas, isso significa que, quando decresce o nível de concentração do LOQ, a medição torna-se menos precisa. O limite de quantificação foi determinado pelo método empírico que consiste em analisar uma série de amostras de urina fortificada com quantidades decrescentes dos analitos. O limite foi avaliado em sextuplicata e o coeficiente de variação entre as replicatas não deve ser maior que 15% (ANVISA 2003; INMETRO, 2007; PETERS et al., 2007; PETERS & MAURER, 2002; CASSIANO et al., 2009).

4.2.4.2 Linearidade

A linearidade refere-se à capacidade do método de gerar resultados linearmente proporcionais à concentração da substância pesquisada, enquadrados em uma faixa analítica específica. A relação matemática entre a resposta medida e a concentração do analito nestes casos pode ser descrita pela equação da reta:

$$y = ax + b$$

Onde:

y = resposta medida (absorbância, área do pico, etc)

x = concentração

a = inclinação da curva de calibração

b = intersecção com eixo y, quando x = 0.

A correlação é, normalmente, calculada por intermédio do coeficiente *r* de *Pearson* ou pelo coeficiente de determinação r^2 (ANVISA, 2003; STÖCKL et al., 2009).

4.2.4.3 Precisão intra e inter-ensaio

Precisão é o termo geral para avaliar a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras

semelhantes ou padrões em condições definidas (INMETRO, 2007). A precisão é geralmente expressa em termos de repetitividade e precisão intermediária. A precisão intermediária (precisão inter-dia) define a habilidade do método em fornecer os mesmos resultados quando as análises são conduzidas no mesmo laboratório, mas em diferentes dias, por diferentes analistas e diferentes equipamentos. Para a determinação da precisão intermediária, recomenda-se um mínimo de dois dias diferentes (ANVISA, 2003). Um dos valores numéricos utilizados para expressar a precisão é a estimativa do desvio padrão relativo (RSD), do inglês *relative standard deviation*, também conhecido como coeficiente de variação (CV), dada como:

$$RSD (\%) \text{ ou } CV (\%) = \frac{s}{x_m} .100$$

s = desvio padrão absoluto
 x_m = média das medidas em replicatas

São considerados satisfatórios os valores de coeficiente de variação entre as replicatas menores que 20% para as amostras na concentração mais baixa e de 15% para as concentrações mais elevadas (UNODC, 2009).

4.2.4.4 Exatidão

A exatidão do método analítico é o grau de concordância entre o valor médio obtido de uma série de resultados e o valor de referência aceito como convencionalmente verdadeiro. A exatidão é expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente. O ensaio de exatidão é realizado utilizando três diferentes concentrações, baixa, média e alta, contemplando a faixa de variação do procedimento, realizando-se, no mínimo, 5 (cinco) determinações por concentração em três dias consecutivos. Todos os resultados devem estar entre $\pm 20\%$ do valor previsto para as concentrações mais baixas e $\pm 15\%$ em concentrações superiores (ANVISA, 2003; INMETRO, 2007; LANÇAS, 2004; UNODC, 2009).

4.2.4.5 Recuperação

A recuperação (ou fator de recuperação), R , é definida como a proporção da quantidade da substância de interesse, presente ou adicionada na porção analítica do material teste, que é extraída e passível de ser quantificada. Pode ser estimada como a porcentagem do analito depois do processamento da amostra comparada com a de uma solução contendo o analito numa concentração correspondente a 100%. A recuperação é então calculada por comparação da razão entre a área do pico do analito e do padrão interno para as amostras extraídas e não extraídas (ANVISA 2003; INMETRO, 2007; PETERS & MAURER, 2002; RIBANI, et al., 2004, UNODC, 2009).

4.2.4.6 Estabilidade do analito na matriz

A estabilidade de acordo com a ANVISA (2003) é o parâmetro que visa determinar se um analito mantém-se quimicamente inalterado numa dada matriz sob condições específicas, em determinados intervalos de tempo. As condições de realização dos ensaios de estabilidade devem reproduzir as reais condições de manuseio e análise das amostras. Deve ser avaliada a estabilidade do analito durante a coleta e manuseio da amostra, após armazenagem de longa duração (congelamento) e curta duração (à temperatura ambiente), após ciclos de congelamento e descongelamento e nas condições de análise. Para verificação da estabilidade utilizam-se, no mínimo, três amostras das concentrações baixa e alta determinadas na validação do método analítico. As concentrações de todas as amostras de estabilidade devem ser comparadas com a média dos valores anteriormente calculados para as amostras do primeiro dia do teste (ANVISA, 2003; PETERS, 2007).

Para o estudo de estabilidade a curto prazo foi realizada uma comparação de uma urina adicionada com o analito a ser detectado e armazenada a 37 °C, por 7 dias consecutivos, com uma urina recém preparada com o mesmo analito, sendo esta, considerada com uma concentração do analito de 100%. Para o estudo, foi preparada uma solução mãe de urina negativa, adicionada com solução padrão do analito. A amostra de urina

utilizada consiste em urina de voluntário que não faz uso da droga e que foi enriquecida com o analito de interesse. A solução estoque mãe foi armazenada em estufa a 37 °C durante 7 dias. A cada dia foram analisadas três alíquotas (triplicatas) desta solução mãe, além de uma curva de calibração para quantificar as amostras.

4.2.5 Estudo da incerteza

4.2.5.1 Identificação das fontes de incerteza

Para identificar as fontes de incerteza foi elaborado um diagrama de Ishikawa (**Figura 8**). Nos ramos principais (X_1 , X_2 e X_3) foram colocadas as grandezas de entrada da equação que representa o mensurando. Nos ramos secundários, foram especificadas as fontes de incerteza associadas direta ou indiretamente a essas grandezas.

Figura 8. Diagrama de Ishikawa.

4.2.5.2 Quantificação das incertezas

Uma vez identificadas e analisadas as principais fontes de incerteza torna-se necessária a quantificação dessas incertezas. De forma geral, o método proposto pelo ISO-GUM (INMETRO, 1998) é definido nas etapas a seguir.

4.2.5.2.1 Expressão da função matemática das grandezas de entrada

Todas as grandezas de entrada (uX_i) que possam influenciar na incerteza de uma medição (Y_i) devem ser expressas na equação principal.

$$Y_i = f \{u(X_i)n\}$$

Onde Y_i : Grandeza de saída

f : função modelo

X_i : Grandezas de entrada

4.2.5.2.2 Determinação do valor de cada uma das grandezas de entrada (X_i)

Cada grandeza de entrada deve ser calculada separadamente.

$$X_i (i = 1, 2, 3, \dots, X_n)$$

4.2.5.2.3 Avaliação da incerteza padrão (u) de cada estimativa de entrada

Conhecidas as grandezas de entrada, elas devem ser classificadas em incertezas do Tipo A e do Tipo B, e então calcular seus valores.

$$u = \frac{S}{\sqrt{n}}$$

Onde, u = incerteza padrão; s = desvio padrão; n = números total de medidas

Ao se relacionar a dúvida relativa a um processo com seu divisor respectivo, é possível transformar a grandeza de entrada em um desvio padrão. Cada dúvida está associada à fonte de incerteza, onde: a repetitividade terá uma dúvida definida pelo desvio padrão médio, a resolução de um equipamento definido pelo seu R ou pelos valores máximos obtidos ($R/2$), a deriva dos padrões, a pureza mínima dos compostos e os valores empíricos definidos pelos limites dos seus resultados, e assim todas as fontes de incertezas serão definidas. Cada unidade de entrada terá um divisor, que é

definido pelo tipo de distribuição, podendo ser normal, *t-student*, triangular ou retangular.

4.2.5.2.4 Determinação da Incerteza padrão combinada (u_c)

A incerteza padrão combinada consiste na soma quadrática das diversas incertezas de medição apresentadas por um instrumento qualquer, ou seja:

$$u_c = \sqrt{\sum_{i=1}^n c_i^2 u^2(Y_i)}$$

4.2.5.2.5 Determinação da incerteza expandida (U)

Para que se possa estimar o valor da incerteza expandida é necessário determinar o número de graus de liberdade efetivo ($veff$) (EA-4/02). A norma ISO-GUM recomenda a utilização da equação de *Welch-Satterthwaite* para calcular o grau de liberdade, onde vi é o grau de liberdade de cada uma das fontes de incerteza e ui é a incerteza de cada uma das fontes consideradas:

$$V_{eff} = \frac{u_c^4}{\sum_{i=1}^n \frac{u_i^4}{v_i}} = \frac{u_c^4}{u^4 A / v_A}$$

Onde, vi representa os graus de liberdade do fator de incerteza i e v_A representam os graus de liberdade do Tipo A. Para contribuições da incerteza Tipo A, consideramos como graus de liberdade o número de leitura menos uma vez o número de pontos de calibração. Para os graus de liberdade referente a contribuições da incerteza Tipo B, vamos considerar vi igual a infinito.

Com a determinação de $veff$ e com a definição do nível de confiança desejado, obtido a partir da tabela de coeficiente de *Student*, é possível determinar o valor de k (EA-4/02). Quando o valor de $veff$ for acima que 100 recomenda-se que o fator k seja igual a 2 para calcular a incerteza expandida. Este valor corresponde a aproximadamente 95% de confiança. Entretanto, se

as contribuições para a incerteza relativa a repetitividade for grande comparadas com as outras distribuições e o número de repetições for pequeno, existe uma possibilidade de que a distribuição de probabilidade normal não seja adequada. Neste caso, o fator $k = 2$ não garante um nível de confiança menor que 95%. Assim, devemos utilizar a distribuição *t-Student* para encontrar o valor do fator k que garante 95%. Sendo *t-Student* com $n - 1$ graus de liberdade.

Assim, a incerteza expandida é dada pela equação seguinte:

$$U = k \times u_c$$

Onde k é o fator de abrangência para o nível de confiança desejado e u_c é a incerteza combinada (determinada anteriormente).

A incerteza expandida deve ser calculada com, no mínimo, um nível de confiança de 95%, o valor do mensurando (Y) e a incerteza expandida, devem ser escritos da seguinte forma:

$$Y \pm U$$

e acompanhados da seguinte declaração de confiança do tipo:

“O valor da incerteza está baseado na incerteza padrão combinada, multiplicada por um fator de abrangência $k = 2$, resultando um nível da confiança de proximadamente 95%”.

4.2.5.2.6 Relato do resultado da medição juntamente com a U

O resultado final de uma medição é então expresso associado com sua incerteza expandida, como descrito na equação a seguir.

$$RM = Y \pm U$$

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Resultados das análises de THC-COOH em urina

5.1.1 Método de extração

O preparo da amostra é a parte mais complexa de um método analítico e que gera mais resíduos devido ao grande volume de solvente utilizado (DE BRABANTER, et al., 2013). Grande parte dos trabalhos publicados que relatam a determinação de canabinóides em urina utilizam as técnicas de extração líquido-líquido (LLE) ou a extração em fase sólida (SPE) na etapa de preparo da amostra (DE BRABANTER, et al., 2013; BREINDAHL & ANDREASEN, 1999; HAN, et al., 2011; MINOLI, et al., 2013). Essas técnicas convencionais requerem uso de grande quantidade de solvente, que devem ser evaporados ou descartados, o que pode gerar danos ao ambiente. A tendência nos últimos anos é a utilização de procedimentos que não agredem o meio ambiente, e neste contexto surgiram as técnicas miniaturizadas como a microextração em fase sólida e a microextração em fase líquida, que são procedimentos simples, rápidos e consomem baixa quantidade de solventes orgânicos (BARROSO, et al., 2012; XIONG, et al., 2010). No presente trabalho, foi aplicado o método de LPME para a extração de THC-COOH em amostras de urina e os resultados da eficiência deste procedimento foram satisfatórios. Em nosso conhecimento, esta é a primeira demonstração da utilidade desta técnica para a análise de THC-COOH em urina.

5.1.2 Resultado da otimização do método

O THC-COOH é eliminado mais de 80% conjugado com o ácido glicurônico na urina. Então, para a determinação do analito, o glicuronídeo deve ser removido pelo processo de hidrólise, podendo ser realizada através de métodos enzimáticos, utilizando a enzima beta-glucuronidase (ABRAHAM, et al., 2007; FELLI, et al., 2011; MOON, et al., 2008) ou hidrólise alcalina (BREINDAHL & ANDREASEN, 1999; DE BRABANTER, et al., 2013; FU &

LEWIS, 2008; HAN, et al., 2011; WEINMANN, et al., 2001; MINOLI, et al., 2013; JAGERDEO, et al., 2010). Em um estudo realizado por Abraham e colaboradores (2007), demonstrou-se que a hidrólise enzimática é mais eficiente para o 11-hidroxi- Δ^9 -tetraidrocanabinol (11-OH-THC), enquanto a hidrólise alcalina é mais eficaz na hidrólise do THC-COOH.

Descartou-se a opção de utilizar hidrólise enzimática pelo fato da mesma ser demorada e de alto custo, e ainda poder ser substituída pela hidrólise alcalina sem comprometer significativamente a detecção do analito.

Encontrou-se grande dificuldade na etapa de hidrólise alcalina, pois havia perda de analito durante a mesma. Weinmann e colaboradores (2001), utilizaram 250 μL de NaOH 2 mol.L⁻¹ para hidrolisar 2 mL de amostra à 60 °C por 15 minutos, já Fernandes e colaboradores (2009), hidrolisaram 500 μL de urina contendo canabinóides conjugados, com 50 μL de KOH 10 mol.L⁻¹ à 60 °C por 15 minutos. Kim e colaboradores (2013) e Minoli e colaboradores (2013), utilizaram NaOH 1M para realizar a hidrólise do THC-COOH conjugado. Com o intuito de obter uma melhor eficiência da hidrólise foi realizada a otimização da hidrólise do THC-COOH em três replicatas e os resultados de sua eficiência encontram-se descritos na **Tabela 2**. Os melhores resultados encontrados foram com as seguintes condições: 100 μL de NaOH 2 mol.L⁻¹; temperatura do banho de aquecimento à 60 °C, tempo de hidrólise de 15 minutos. Nessas condições obtivemos uma média de 72% na eficiência de hidrólise.

Tabela 2. Resultados da eficiência da hidrólise de THC-COOH.

Controles	Eficiência da hidrólise %	CV%
CB ¹	62,7	7,9
CM ²	78,2	10,7
CA ³	74,2	6,9

¹Controle Baixo (6 ng.mL⁻¹); ²Controle Médio (71 ng.mL⁻¹); ³Controle Alto (136 ng.mL⁻¹)

Para a otimização da extração, as amostras de urinas foram submetidas ao método descrito em **4.2.1.1**, variando-se o tipo de solvente utilizado no condicionamento das fibras, o tipo de agitação e o tempo de extração do analito. Toda a etapa de otimização do método foi realizada em três replicatas. Como fase aceptora utilizou-se hidróxido de sódio $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, já que esta solução vem sendo impregada para extração de compostos ácidos (OLIVEIRA, et al., 2008; PEDERSEN-BJERGAARD & RASMUSSEN, 1999). Na **Figura 9** está representada a eficiência dos solventes no condicionamento da fibra. O éter diexílico mostrou-se mais eficiente, dentre os testados, na extração do analito.

Figura 9. Avaliação da eficiência dos solventes na extração de THC-COOH por LPME.

Como a LPME é baseada na partição dos analitos entre diferentes fases líquidas, o tempo de extração está relacionado com o tempo de equilíbrio entre as fases e este equilíbrio depende da velocidade de agitação, portanto avaliaram-se diversos agitadores e tempo de agitação, além de diferentes velocidades de rotação a fim de verificar sua influência sobre o processo de extração. Os resultados apresentados na **Figura 10** e na **Tabela 3** mostram que o equilíbrio entre as fases seja atingido provavelmente em 30 minutos de agitação com agitador orbital a 1200 rpm, o que é verificado por uma melhor eficiência extrativa nestas condições.

Figura 10. Condições e tempo de agitação para extração de THC-COOH.

Tabela 3. Estudo da intensidade de rotação durante a extração de THC-COOH por LPME.

Condição (rpm)	Média da área absoluta do analito	CV (%)
800	12376,5	0,92
1000	28253,0	0,23
1200	28563,5	0,26

5.1.3 Resultados da validação do método

5.1.3.1 Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção e de quantificação obtidos são coerentes com o método pretendido, uma vez que se encontram significativamente abaixo do valor de *cut off* recomendados pelo *Department of Health and Human Services* para confirmação de THC-COOH em urina (15 ng.mL^{-1}) (MOFFAT, et al., 2011). Os valores referentes aos limites podem ser encontrados na **Tabela 4**.

Tabela 4. Valores de limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) com a aplicação do método proposto para determinação de THC-COOH em urina.

	ng.mL ⁻¹	CV%
LOD	1,5	19,9%
LOQ	2,0	12,2%

Os limites de quantificação e detecção determinados em nosso trabalho estão de acordo com os valores reportados em publicações recentes que utilizam as técnicas de GC-MS e LC-MS (ABRAHAM, et al., 2007; KIM, et al., 2013; KRAMER, et al., 2001; FELLI, et al., 2011; JAGERDEO, et al., 2010; SHEIDWEILER, et al., 2012; WEINMANN, et al., 2001)

5.1.3.2 Linearidade

A linearidade foi determinada utilizando amostras de urina negativas adicionadas de padrão em 6 diferentes concentrações, dentro da faixa de trabalho de 2,0 a 170,0 ng.mL⁻¹ (**Figura 11**). A análise foi realizada em 6 replicatas para cada concentração. Foi obtido um valor de coeficiente de determinação (r^2) de 0,9976 e a equação da reta obtida foi $y = 0,0492x + 0,0562$. O método foi considerado linear e os parâmetros avaliados estavam de acordo com os critérios de aceitação da ANVISA (2003), que estipula um desvio menor ou igual a 20% em relação a concentração para o LOQ, desvio menor ou igual a 15% em relação às outras concentrações da curva de calibração e o coeficiente de correlação linear igual ou superior a 0,98.

Figura 11. Linearidade do método de detecção de THC-COOH (faixa de concentração: 2 a 170 ng.mL⁻¹).

Na faixa de concentração da curva de calibração (2 a 170 ng.mL⁻¹), foi apresentado o fenômeno de heteroscedasticidade, provavelmente devido à ampla faixa de concentração considerada no estudo da linearidade. Portanto, os métodos de regressão linear dos mínimos quadrados comuns poderiam resultar em grandes erros no cálculo das concentrações, especialmente em valores menores. Usando os mínimos quadrados ponderados de regressão linear, a soma do percentual de erro relativo ao longo de todo o intervalo indicado de "melhor ajuste", na avaliação da eficácia do factor de ponderação utilizada é $1/x^2$ e assim a equação da regressão linear foi $y = 0,0329x + 0,0298$ e $r^2 = 0,9993$.

5.1.3.3 Precisão intra e inter-ensaio

As precisões intra e inter-ensaio foram avaliadas por meio da determinação do coeficiente de variação (CV%) das áreas relativas (razão entre área absoluta do analito e a área absoluta do padrão interno) exibido entre as replicatas (n=6) preparadas a uma mesma concentração em três dias. Os resultados de precisão intra e inter-ensaio do método foram satisfatórios, uma vez que nas concentrações baixas os coeficientes de variação foram

menores que 20% e nas concentrações médias e altas mantiveram-se abaixo de 15%. Os resultados estão apresentados na **Tabela 5**.

Tabela 5. Coeficientes de variação (CV%) correspondente às precisões intra e inter-ensaio obtidos com a aplicação do método proposto para determinação de THC-COOH em urina.

Controles	Precisão intra-ensaio	Precisão inter-ensaio
CB ¹	9,3%	7,1%
CM ²	8,2%	7,6%
CA ³	5,2%	12,9%

¹Controle Baixo (6 ng.mL⁻¹); ²Controle Médio (71 ng.mL⁻¹); ³Controle Alto (136 ng.mL⁻¹)

5.1.3.4 Exatidão

O ensaio de exatidão foi realizado utilizando três diferentes concentrações, baixa, média e alta, com 6 determinações por concentração em em três dias consecutivos. Os resultados estão apresentados na **Tabela 6**.

Tabela 6. Exatidão do método proposto para determinação de THC-COOH em urina.

	1º DIA	2º DIA	3º DIA
CB ¹	84,5%	81,1%	82,2%
CM ²	92,2%	96,0%	99,4%
CA ³	92,0%	91,1%	102,9%

¹Controle Baixo (6 ng.mL⁻¹); ²Controle Médio (71 ng.mL⁻¹); ³Controle Alto (136 ng.mL⁻¹)

5.1.3.5 Recuperação absoluta

O estudo da recuperação do método foi realizada em 5 replicatas para cada concentração. Os valores encontrados estão detalhados na **Tabela 7**.

Tabela 7. Valores da recuperação do método de determinação de THC-COOH.

ANALITO	Recuperação %		
	CB ¹	CM ²	CA ³
THC-COOH	57,9	64,7	77,2

¹Controle Baixo (6 ng.mL⁻¹); ²Controle Médio (71 ng.mL⁻¹); ³Controle Alto (136 ng.mL⁻¹)

O método de extração apresentou uma recuperação média e os índices mantiveram-se entre 57 e 77%. De acordo com a UNODC (2009), a recuperação do método não precisa ser 100%. Admitem-se valores menores desde que o método seja preciso e exato, e os limites de detecção e quantificação sejam apropriados para o objetivo proposto. De acordo com os itens 5.1.3.1, 5.1.3.3 e 5.1.3.4, os limites são coerentes e o método é preciso e exato.

5.1.3.6 Estudo da estabilidade do analito na matriz

O estudo de estabilidade do THC-COOH em urina foi realizado a curto prazo (7 dias) à 37 °C, condições que podem ser encontrados em algumas situações extremas de transporte da amostra. Em cada dia foi realizada a análise em 3 replicatas da urina que estava armazenada à 37 °C, e o valor da concentração do analito foi comparado com o resultado da análise de uma amostra de urina com o mesmo analito armazenada à -20 °C, considerada com uma concentração do analito de 100%.

Foram encontradas variações estatisticamente significativas na concentração do analito na urina durante o período de armazenamento. O comportamento do analito na amostra ao longo do tempo estudado está demonstrado na **Figura 12**. De acordo com estes resultados, verificou-se uma diminuição significativa na concentração do analito após o 5º dia de estocagem (maior que 25%), portanto o ensaio de amostras de urina para análise de canabinóides que está armazenada a mais de 5 dias pode não reportar resultados confiáveis.

Figura 12. Resultados do estudo de estabilidade a curto prazo do THC-COOH. Valor médio da concentração ($n = 3$) obtida durante 7 dias de armazenamento a 37 °C.

5.1.4 Cálculo da incerteza de medição

Após validado, o método para determinação de THC-COOH, descrito no item 4.2.1.1, foi aplicado em uma amostra de urina de referência (SRM1507b - NIST), com dois níveis de concentração 1507b-1 (11,7 ng.mL⁻¹) e 1507b-2 (24,1 ng.mL⁻¹), e o valor da incerteza foi calculado para estas amostras. Os cálculos descritos a seguir são referentes ao nível 1507b-2. A incerteza do nível 1507b-1 foi calculada de forma semelhante.

Na **Figura 13** e **Figura 14** encontram-se, respectivamente, os cromatogramas e espectros de massas obtido com a análise da amostra da urina de referência (SRM1507b - NIST), obtida do *National Institute of Standards & Technology*.

Figura 13. Cromatogramas obtidos com a aplicação do método de LPME/GC-MS em amostras de urina. SRM1507b-0 (controle negativo); Controle positivo (referente a uma urina adicionada com 15 ng.mL^{-1} de THC-COOH); SRM1507b-1 (urina de referência contendo $13,2 \text{ ng.mL}^{-1}$); SRM1507b-2 (urina de referência contendo $24,8 \text{ ng.mL}^{-1}$). Em todas as amostras foram adicionados padrão interno (THC-COOH-d3) na concentração de 15 ng.mL^{-1} .

Figura 14. Espectro de massas do THC-COOH derivatizado com BSTFA. Íon quantificador do THC-COOH (371); Íons qualificadores (473,488). Íon quantificador do THC-COOH-d3 (374); Íons qualificadores (476,491).

5.1.4.1 Identificação das fontes de incerteza

Para melhor visualização das principais fontes de incerteza que influenciam no método de determinação de THC-COOH em urina, foi construído o diagrama de Ishikawa, onde foram inseridas as variáveis mais significativas para a estimativa da incerteza de medição.

Figura 15. Diagrama de Ishikawa expandido, onde foram inseridas as principais fontes que contribuem para a incerteza do método de determinação de THC-COOH em urina. Co (concentração de THC-COOH).

5.1.4.2 Expressão da função matemática das grandezas de entrada

A expressão da concentração de THC-COOH em uma amostra de urina é:

$$c_{THC-COOH} = \frac{Co}{V} \text{ (ng.mL}^{-1}\text{)}$$

Onde Co é a concentração do analito em uma amostra e V é o volume de amostra. Como a precisão e exatidão são consideradas grandes fontes de incerteza em métodos quantitativos, elas devem entrar na equação expandida descrita a seguir:

$$c_{THC-COOH} = \frac{Co}{V} \times P \times A \text{ (ng.mL}^{-1}\text{)}$$

Onde, Co: Concentração de THC-COOH encontrado na amostra de urina

V: Volume de amostra

P: Precisão do método

A: Acurácia

5.1.4.3 Avaliação da incerteza padrão (*u*) de cada estimativa de entrada

- Incerteza da precisão (*uPrec*)

A incerteza da precisão foi calculada pela razão entre o desvio padrão combinado (*sp*) e a raiz quadrada do número de medidas independentes (*m*):

$$uPrec = \frac{sp}{\sqrt{m}} \quad \text{sendo } sp \text{ calculado por: } sp = \sqrt{\frac{\sum vi \times si^2}{\sum vi}}$$

Onde *vi* é o grau de liberdade de cada análise, e *si* é o desvio padrão de cada análise. Como a concentração de THC-COOH encontrado na amostra de urina de referência foi de 24,8 ng.mL⁻¹, a incerteza da precisão (*uPrec*) foi então calculada usando o desvio padrão do controle baixo encontrado no ensaio de precisão, sendo a concentração de 6 ng.mL⁻¹, que é o controle mais próximo ao resultado da concentração da amostra. Na **Tabela 8** estão os resultados da precisão do método.

$$sp = \sqrt{\frac{2 \cdot (0,0156)^2 + 2 \cdot (0,0175)^2 + 2 \cdot (0,0548)^2}{6}} = 0,0344$$

$$\text{Então, } uPrec = \frac{sp}{\sqrt{m}} = \frac{0,0344}{\sqrt{3}} = 0,0199$$

A incerteza relativa da precisão (*urPrec*) é dada por:

$$urPrec = \frac{uPrec}{\text{Concentração do controle}} = \frac{0,0199}{6} = 0,0033$$

Tabela 8. Resumo dos resultados da precisão do método para o cálculo da incerteza de medição de THC-COOH.

Analito	Concentração do controle – CB ¹ (ng.mL ⁻¹)	Desvio padrão	Graus de liberdade	<i>uPrec</i> *	<i>urPrec</i> **
THC- COOH	6	0,0156	2	0,0199	0,0033
		0,0175	2		
		0,0548	2		

* *uPrec*: Incerteza da precisão; ** *urPrec*: Incerteza relativa da precisão; CB¹ – Controle baixo

• Incerteza da concentração de THC-COOH (*uCo*)

As principais variáveis que influenciam na incerteza da concentração são a incerteza da diluição do padrão e da diluição do padrão interno, a incerteza da curva de calibração e a incerteza da micropipeta de 20 µL, utilizada na curva de calibração, portanto cada uma dessas fontes de entrada foram calculadas separadamente.

$$uCo = \sqrt{u^2DPD + u^2DPI + u^2Cur + u^220}$$

Onde:

uDPD: Incerteza da diluição do padrão

uDPI: Incerteza da diluição do padrão interno

uCur: Incerteza da curva de calibração

u20: Incerteza da micropipeta de 20 µL

- Cálculo da incerteza da diluição do padrão (*uDPD*)

$$uDPD = \sqrt{\left(\frac{uPPD}{pureza}\right)^2 + \left(\frac{u200}{volume}\right)^2 + \left(\frac{u1000}{volume}\right)^2}$$

Sendo:

$uPPD$: incerteza do padrão

$u200$: incerteza da micropipeta de 200 μL

$u1000$: incerteza da micropipeta de 1000 μL

Se,

$$u_{PPD} = \frac{U_{\text{certificado}}}{K} = \frac{0,06}{2} = 0,03 \text{ ng.mL}^{-1}$$

$$u_{200} = \frac{U_{\text{certificado}}}{K} = \frac{0,0004}{2} = 0,0002 \text{ mL}$$

$$u_{1000} = \frac{U_{\text{certificado}}}{K} = \frac{0,002}{2} = 0,001 \text{ mL}$$

Então,

$$u_{DPD} = \sqrt{\left(\frac{0,03}{0,90}\right)^2 + \left(\frac{0,0002}{200}\right)^2 + \left(\frac{0,001}{1000}\right)^2} = 0,0333$$

- Cálculo da incerteza da diluição do padrão interno ($uDPI$)

$$uDPI = \sqrt{\left(\frac{u_{PPI}}{\text{pureza}}\right)^2 + \left(\frac{u_{100}}{\text{volume}}\right)^2 + \left(\frac{u_{1000}}{\text{volume}}\right)^2}$$

Sendo:

$uPPI$: incerteza do padrão interno

$u100$: incerteza da micropipeta de 100 μL

$u1000$: incerteza da micropipeta de 1000 μL

Se:

$$u_{PPI} = \frac{U_{\text{certificado}}}{K} = \frac{0,06}{2} = 0,03 \text{ ng.mL}^{-1}$$

$$u_{100} = \frac{U_{\text{certificado}}}{K} = \frac{0,001}{2,15} = 0,0005 \text{ mL}$$

$$u_{1000} = \frac{U_{\text{certificado}}}{K} = \frac{0,002}{2} = 0,001 \text{ mL}$$

Então,

$$uDPI = \sqrt{\left(\frac{0,03}{0,99}\right)^2 + \left(\frac{0,0005}{100}\right)^2 + \left(\frac{0,001}{1000}\right)^2}$$

$$uDPI = 0,0302$$

- Cálculo da incerteza da curva de calibração ($uCur$)

A equação da curva foi igual a: $y = 0,0599x + 0,0673$

Assim, para se calcular a incerteza da curva temos:

$$uCur = \frac{S}{a} \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(Co - \bar{x})^2}{Sxx}}$$

Onde S é o desvio padrão residual, a é a inclinação da reta, p é o número de medidas para determinar Co , n é o número total de medidas da curva de calibração, Co é a concentração de THC na amostra teste, x_i é cada concentração da curva de calibração, $\bar{x}$ é a média das concentrações da curva de calibração e Sxx a soma dos quadrados dos resíduos.

Com o desvio padrão residual dado por:

$$S = \frac{\sum i [y_i - (b + a \cdot x_i)]^2}{n - 2} = 0,0022$$

E,

$$Sxx = \sum i (x_i - \bar{x})^2 = 1720,00$$

Então,

$$uCur = \frac{S}{a} \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(Co - \bar{x})^2}{Sxx}} = 0,0234 \text{ ng}$$

A incerteza relativa da curva de calibração é calculada por:

$$urCur = \frac{uCurv}{Co} = \frac{0,0234}{24,8} = 0,0009$$

- Cálculo da incerteza da micropipeta de 20 µL ($u20$)

$$u20 = \frac{U \text{ certificado}}{K} = \frac{0,0001}{2} = 0,00005 \text{ mL}$$

Assim, a incerteza da concentração uCo será:

$$uCo = \sqrt{u^2DPD + u^2DPI + ur^2Cur + u^220}$$

$$uCo = \sqrt{(0,0333)^2 + (0,0302)^2 + (0,0009)^2 + (0,00005)^2}$$

$$uCo = 0,0450$$

- **Incerteza do volume de urina (uV)**

A única variável significativa na incerteza do volume de urina é a pipeta utilizada, portanto o cálculo foi baseado na incerteza desta micropipeta, que é dado pelo laudo de calibração, sendo $U \text{ certificado}$ a incerteza expandida e K o fator de abrangência.

$$uV = u \text{ 1000} = \frac{U \text{ certificado}}{K} = \frac{0,002}{2} = 0,001 \text{ mL}$$

A incerteza relativa do volume (urV) é a razão da incerteza padrão pelo volume de urina utilizado.

$$urV = \frac{u \text{ 1000}}{V} = urV = \frac{0,001}{1} = 0,0010$$

- **Incerteza da Acurácia (uAc)**

$$uAc = Ac \sqrt{\left(\frac{S_{am}}{C_{am}}\right)^2 + \left(\frac{u_{ref}}{C_{ref}}\right)^2}$$

Sendo,

$$Ac = C_{am} / C_{ref}$$

Onde, Ac é a acurácia do método, calculada pela razão entre o valor da concentração na amostra (C_{am}) e a concentração reportada no certificado da análise da amostra de referência (C_{ref}). s_{am} é o desvio padrão da concentração da amostra, u_{ref} é a incerteza reportada no certificado de análise, que está na forma de incerteza expandida, para transforma-la em incerteza combinada, o valor do certificado foi dividido pelo fator de abrangência (k), então a u_{ref} foi igual a 0,47.

Assim,

$$Ac = 24,8 / 24,1 = 1,03$$

$$uAc = 1,03 \sqrt{\left(\frac{0,073}{24,8}\right)^2 + \left(\frac{0,47}{24,1}\right)^2}$$

$$uAc = 0,0202$$

Para avaliar se o erro do método é significativo, calculamos o valor de t .

$$t = \left| \frac{1 - Ac}{uAc} \right|$$

$$t = \left| \frac{1 - 1,03}{0,0202} \right| = 1,48$$

Se o valor de t for maior que o fator de abrangência (k) usado para calcular a incerteza expandida, então deve-se assumir que o erro existe e aplicar um fator de correção para os resultados da análise. Em nosso estudo o valor de t encontrado foi 1,48 e o fator de abrangência utilizado foi $k=2$, então não há necessidade de usarmos um fator de correção. No entanto, é necessário incluir a incerteza da acurácia no cálculo da incerteza combinada.

5.1.4.4 Determinação da incerteza padrão combinada (u_c)

$$u_c \text{THC-COOH} = C \sqrt{uCo^2 + uV^2 + uPrec^2 + uAc^2}$$

$$u_c \text{THC-COOH} = 24,8 \sqrt{(0,0450)^2 + (0,0010)^2 + (0,0033)^2 + (0,0202)^2}$$

$$u_c \text{THC-COOH} = 1,23 \text{ ng.mL}^{-1}$$

5.1.4.5 Cálculo dos graus de liberdade efetivo (V_{eff})

De acordo com os guias para expressão da incerteza de medição, é recomendado um fator de abrangência $K=2$ para um nível de confiança de 95% quando os graus de liberdade forem maiores que 100. Em nosso estudo, o grau de liberdade encontrado foi $13,06 \times 10^6$ pela equação de *Welch-Satterthwaite*. Então, $K=2$ foi aceito para o cálculo da incerteza expandida para THC-COOH, com nível de confiança de 95%.

$$V_{eff} = \frac{u_c^4}{\sum_{i=1}^n \frac{u_i(y)^4}{v_i}} = 13,06 \times 10^6$$

5.1.4.6 Determinação da incerteza expandida (U)

$$U = k \times u_c = 2 \times 1,2 = 2,4 \text{ ng.mL}^{-1}$$

Assim, a concentração de THC-COOH na amostra de urina SRM1507b-2 com sua incerteza expandida foi de $24,8 \pm 2,4 \text{ ng.mL}^{-1}$.

Na **Figura 16** estão descritas as contribuições das principais fontes de entrada para a incerteza final do método de detecção de THC-COOH. Entre essas fontes estão a concentração do analito, o volume de urina, a precisão e a

exatidão do método. As fontes de entrada foram determinadas avaliando-se o processo e verificando quais eram os fatores estatisticamente significativos para o cálculo da incerteza. Fontes de entrada como temperatura do banho de aquecimento, temperatura de derivatização e incerteza do equipamento de cromatografia gasosa foram desconsideradas, pois foi realizado testes em três replicatas e de acordo com os desvios padrões encontrados verificou-se que essas fontes não tinham influência significativa para o cálculo da incerteza final.

Figura 16. Contribuição de diferentes fontes de entrada no cálculo da incerteza padrão combinada para o método de detecção de THC-COOH em urina.

O resultado da análise da amostra de urina de referencia (SRM1507b - NIST) com sua incerteza expandida, determinada pelo método proposto neste trabalho foi de $24,8 \pm 2,4 \text{ ng.ml}^{-1}$. Este resultado está de acordo com o certificado da análise desta amostra de referência ($24,1 \pm 1,3 \text{ ng.ml}^{-1}$). Vale ressaltar que, a incerteza de medição é associada a um valor estabelecido quantitativamente através de determinado método. Qualquer modificação deste valor resulta em uma modificação da incerteza associada à medição.

Em um esforço para harmonizar a expressão dos resultados entre os laboratórios de análises toxicológicas, a *World Anti-Doping Agency* (WADA) (2010), tem definido um valor máximo de incertezas combinadas (u_c) para os valores de *cut off* dos compostos e calculado um limite de decisão (DL) que deve ser usado ao se reportar um resultado. Este DL é a soma entre o valor do

cut off e uma margem de erro, que é baseada no valor máximo aceitável de incerteza padrão combinada ($u_c \text{ max}$) multiplicado por um fator de abrangência (K) igual a 2, para um nível de confiança de 95%. No caso do THC-COOH, uma amostra de urina pode ser classificada como "positiva" se a concentração do analito na urina exceder o DL que é 18 ng.mL^{-1} . A WADA estipula ainda um limite máximo de 10% do valor de *cut off* do analito, para a incerteza combinada aceitável em testes anti-doping. Consequentemente, a incerteza combinada (u_c) de qualquer metodologia utilizada deve ser inferior à $u_c \text{ max}$ de $1,5 \text{ ng.mL}^{-1}$. Em nosso estudo a incerteza combinada encontrada foi de $1,2 \text{ ng.mL}^{-1}$, o que representa 8%, valor aceitável de acordo com os parâmetros da WADA. Portanto, o método de LPME desenvolvido para quantificar THC-COOH em urina é adequado e os resultados gerados possuem qualidade e confiabilidade.

O mesmo método proposto para determinação de THC-COOH foi ainda aplicado na amostra de urina de referência (SRM1507b - NIST) com nível de concentração baixa ($11,7 \pm 1,4 \text{ ng.mL}^{-1}$), obtida do *National Institute of Standards & Technology*. A incerteza foi estimada pelo mesmo procedimento descrito anteriormente e o valor encontrado para esta amostra foi $13,2 \pm 1,8 \text{ ng.mL}^{-1}$, que representa uma u_c de 6%, resultado que também está de acordo com os parâmetros adotados.

5.2 Resultados das análises de anfetaminas em urina

5.2.1 Método de extração

A microextração em fase líquida também se mostrou eficiente na extração das anfetaminas. Esta técnica apresenta vantagens em relação à outros métodos utilizados para quantificação de anfetaminas utilizando membranas, pois o baixo custo das unidades de extração (fibras) possibilita o seu uso uma única vez, evitando os problemas de "carry-over". Além disso, nenhum aparato específico é necessário para implantação da LPME.

5.2.2 Resultados da otimização do método

No processo de otimização do método, uma maior eficiência na extração dos três analitos de interesse é alcançada quando se utiliza éter diexílico no condicionamento das fibras como mostrado na **Figura 17**. Este solvente tem mostrado excelentes resultados para inúmeras aplicações, como foi demonstrado também neste trabalho na extração de THC-COOH. Todo o processo de extração foi realizado à temperatura ambiente, evitando assim, formação de bolhas e evaporação do solvente orgânico impregnado nas fibras. A agitação da amostra foi realizada com agitador orbital a 1200 rpm.

Figura 17. Avaliação do tipo de solvente utilizado no condicionamento da fibra utilizada na extração das anfetaminas pela técnica de LPME.

De acordo com o planejamento fatorial utilizando o delineamento Box-Behnken através do programa Design Expert[®] 8.0, foram realizados 17 experimentos com 5 pontos centrais. As variáveis testadas foram a molaridade da fase doadora (NaOH 1,0 e 2,0 mol.L⁻¹), tempo de agitação (30 e 60 minutos) e molaridade da fase aceptora (HCl 0,01 e 0,1 mol.L⁻¹). As respostas foram obtidas analisando a área absoluta dos analitos e de acordo com a análise da superfície de resposta (**Figura 18**) uma melhor condição para a extração dos analitos é obtida quando se utiliza NaOH 1,0 mol.L⁻¹ para basificar a fase doadora (urina) e HCl 0,01 mol.L⁻¹ como fase aceptora e 60 minutos de extração. As análises da superfície de resposta foram geradas mantendo-se

constante 60 minutos de tempo de agitação, visto que este foi o melhor tempo observado nas respostas.

Figura 18. Análise de superfície para otimização do método de extração da anfetamina (A) e da metanfetamina (B) pela técnica de LPME/GC-MS.

5.2.3 Resultados da validação do método

5.2.3.1 Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção e quantificação da anfetamina foram 10 ng.mL^{-1} e 20 ng.mL^{-1} respectivamente. E para a metanfetamina o LOD e LOQ encontrados foi 20 ng.mL^{-1} . Esses valores são adequados com o objetivo pretendido, pois se encontram significativamente abaixo do valor de *cut off* recomendados pelo *Department of Health and Human Services* para confirmação de anfetaminas em urina (500 ng.mL^{-1}) (MOFFAT, et al., 2011).

Os limites de quantificação e detecção determinado em nosso trabalho estão de acordo com os valores reportados em publicações recentes que utilizam as técnicas de GC-MS e LC-MS (PELLEGRINI, et al., 2002, SAITO, et al., 2007; XIONG, et al., 2010; FERNÁNDEZ, et al., 2010).

5.2.3.2 Linearidade

A linearidade foi determinada utilizando amostras de urina negativas adicionadas de padrão em seis diferentes concentrações, dentro da faixa de trabalho de 20 a 1400 ng.mL^{-1} para os dois analitos estudados (**Figura 19** e **Figura 20**). A análise foi realizada em seis replicatas para cada concentração. Foi obtido um valor de coeficiente de determinação (r^2) maior que 0,99, para os dois analitos estudados. O método foi considerado linear e os parâmetros avaliados estavam de acordo com os critérios de aceitação da ANVISA (2003), que estipula um desvio menor ou igual a 20% em relação à concentração para o LOQ, desvio menor ou igual a 15% em relação às outras concentrações da curva de calibração e o coeficiente de correlação linear igual ou superior a 0,98.

Figura 19. Estudo da linearidade da anfetamina em urina ($y=0,0018x + 0,1653$; $r^2 = 0,9975$).

Figura 20. Estudo da linearidade da metanfetamina em urina ($y=0,02x - 0,0564$; $r^2 = 0,9949$).

5.2.3.3 Precisão intra e inter-ensaio

As precisões intra e inter-ensaio foram avaliadas por meio da determinação do coeficiente de variação (CV%) das áreas relativas (razão entre área absoluta do analito e a área absoluta do padrão interno) exibido entre as replicatas (n=6) preparadas a uma mesma concentração em três dias consecutivos. Os resultados estão apresentados na **Tabela 9**.

Tabela 9. Coeficiente de variação (CV%) correspondente às precisões intra e inter-ensaio obtidos com a aplicação do método proposto para determinação de anfetaminas em urina.

	Precisão intra-dia (CV%)			Precisão interdia (CV%)		
	CB ¹	CM ²	CA ³	CB ¹	CM ²	CA ³
Anfetamina	12,3	5,6	3,0	19,2	4,1	1,9
Metanfetamina	10,7	5,0	5,6	8,4	11,4	4,7

¹Controle Baixo (60 ng.mL⁻¹); ²Controle Médio (590 ng.mL⁻¹); ³Controle Alto (1120 ng.mL⁻¹)

Kumazawa et al. (2007) e Chung et al. (2008) reportaram valores de precisão para métodos de determinação de anfetaminas em urina, semelhantes ao encontrados em nosso trabalho. No entanto, a técnica utilizada (SPE) nos estudos citados consomem grande quantidade de solvente, o que não foi verificado na técnica desenvolvida em nosso trabalho.

5.2.3.4 Exatidão

O ensaio de exatidão foi realizado utilizando três diferentes concentrações, baixa, média e alta, com seis replicatas por concentração, em três dias consecutivos. Os valores encontrados estão de acordo com as normas adotadas para validação de métodos (ANVISA, 2003; UNODC, 2009) e com publicações recentes (KUMAZAWA, et al., 2007; HE, et al., 2009; SAITO, et al., 2007; XIONG, et al., 2010; FERNÁNDEZ, et al., 2010). Os resultados da exatidão do método desenvolvido neste trabalho estão apresentados na **Tabela 10**.

Tabela 10. Exatidão do método proposto para determinação de anfetaminas em urina.

		Exatidão (%)	
		Anfetamina	Metanfetamina
1 DIA	CB ¹	93,8	89,6
	CM ²	96,0	103,6
	CA ³	108,2	97,3
2 DIA	CB ¹	81,9	88,9
	CM ²	99,7	92,9
	CA ³	107,6	100,7
3 DIA	CB ¹	105,5	115,6
	CM ²	106,5	93,2
	CA ³	111,2	100,6

¹Controle Baixo (60 ng.mL⁻¹); ²Controle Médio (590 ng.mL⁻¹); ³Controle Alto (1120 ng.mL⁻¹)

5.2.3.5 Recuperação absoluta

O estudo da recuperação do método foi realizada em 5 replicatas para cada concentração. Os valores encontrados estão detalhados na **Tabela 11**.

Tabela 11. Valores da recuperação obtidos com o método proposto para determinação de anfetaminas em urina.

Analito	Recuperação %		
	CB ¹	CM ²	CA ³
Anfetamina	59,9	70,2	61,0
Metanfetamina	50,9	76,0	66,2

¹Controle Baixo (60 ng.mL⁻¹); ²Controle Médio (590 ng.mL⁻¹); ³Controle Alto (1120 ng.mL⁻¹)

O método para extração das anfetaminas apresentou uma recuperação média. No entanto, este resultado pode ser considerado bom porque recuperações superiores a 80% são raros na técnica de LPME (PEDERSEN-BJERGAARD & RASMUSSEN, 2008).

5.2.3.6 Estudo da estabilidade do analito na matriz

A estabilidade dos derivados da anfetamina é bem reportada na literatura, sendo estudada tanto a longo prazo quanto a curto prazo. Com este embasamento científico, não houve a necessidade de se realizar neste trabalho o estudo de estabilidade do analito. Jimenez e colaboradores (2006) estudaram a estabilidade a longo prazo de amostras armazenadas a 4 °C e -20 °C para 1, 2, 3, 6, 9, 12, 18 e 24 meses, e a estabilidade de curto prazo em amostras armazenadas a 37 °C em 3 e 7 dias. A estabilidade dos analitos depois de passar por três ciclos de congelamento (a 20 °C) e descongelamento (à temperatura ambiente) também foi avaliada. Os resultados obtidos para anfetaminas e metanfetaminas em amostras de urina armazenadas a -20 °C no estudo de Jimenez condiz com aqueles de Moody e colaboradores (1999) que não verificaram mudanças significativas na concentração dos analitos por até 17 meses. Hughes e colaboradores (1991) relatou a estabilidade da anfetamina e metanfetamina em amostras de urina armazenadas a 4 °C durante 6 meses. Dugan e colaboradores (1994) estudaram a estabilidade em amostras armazenadas por um ano a 20 °C. Referente ao estudo de estabilidade a curto prazo, os resultados de Jimenez e colaboradores (2006) mostram que todos os analitos estudados são estáveis quando mantidos à 37 °C por 7 dias.

5.2.3.7 Validação da diluição das amostras

Geralmente as concentrações das amostras enviadas para análise encontram-se acima da faixa de concentração definida para o estudo de linearidade, que foi estipulada até 1400 ng.mL⁻¹ devido a necessidade de se economizar padrões analíticos, portanto foi necessário o estudo para validar a

diluição das amostras de urina. O estudo foi realizado analisando-se amostras de urina, em três replicatas, nas concentrações de 3000 e 6000 ng.mL⁻¹, as amostras foram então diluídas dez vezes e quantificada através de uma curva de calibração preparada no mesmo dia que a amostra. Os resultados encontrados foram satisfatórios.

5.2.4 Cálculo da incerteza de medição

Após validado, o método para determinação de anfetaminas foi aplicado em 10 amostras de urinas consideradas positivas para anfetaminas no ensaio imunoenzimático e a incerteza de medição foi estimada para cada amostra. Essas amostras foram obtidas no Laboratório de Análises Toxicológicas da Universidade de São Paulo (LAT-USP).

A incerteza de medição foi calculada baseada nas mesmas equações do cálculo do THC-COOH, com algumas modificações referentes aos valores de validação e padrões utilizados.

Na **Figura 21** e na **Figura 22** são ilustrados os cromatogramas obtidos com a análise de uma amostra de urina contendo anfetamina obtidas do LAT-USP. A amostra analisada apresentou resultado negativo para metanfetamina.

Figura 21. Cromatogramas obtidos com a aplicação do método de LPME/GC-MS para determinação de anfetaminas em amostras de urina. Controle negativo; Controle positivo (referente a uma urina adicionada com 500 ng.mL^{-1} de anfetamina); Amostra 01 (amostra de urina contendo $666,4 \text{ ng.mL}^{-1}$); Amostra 02 (amostra de urina contendo $1286,9 \text{ ng.mL}^{-1}$). Em todas as amostras foi adicionado padrão interno na concentração de 500 ng.mL^{-1} .

Figura 22. Cromatogramas obtidos com a aplicação do método de LPME/GC-MS para determinação de metanfetamina em amostras de urina. Controle positivo (referente a uma urina adicionada com 500 ng.mL^{-1} de metanfetamina); Controle negativo (urina isenta do analito). Em todas as amostras foram adicionados padrão interno na concentração de 500 ng.mL^{-1} .

Na **Figura 23** e na **Figura 24** encontram-se os espectros de massas de cada uma das anfetaminas após a derivatização com ATFA.

Figura 23. Espectro de massas da anfetamina derivatizada com ATFA. Íons utilizados na identificação do analito: Íon quantificador da anfetamina (118); Íons qualificadores (91, 140). Íon quantificador da anfetamina-d5 (123), Íon qualificador (96,140).

Figura 24. Espectro de massas da metanfetamina derivatizada com ATFA. Íons utilizados na identificação do analito: Íon quantificador da metanfetamina (154); Íons qualificadores (110, 118). Íon quantificador da metanfetamina-d5 (158), Íon qualificador (122).

5.2.4.1 Identificação das fontes de incerteza

Figura 25. Diagrama de Ishikawa expandido, onde são inseridas as principais fontes que contribuem para a incerteza do método de determinação de anfetamina em urina. Co (concentração de anfetamina).

5.2.4.2 Expressão da função matemática das grandezas de entrada

$$C = \frac{Co}{V} \times P \times A$$

Onde, C: Incerteza da concentração de anfetamina

Co: Concentração de anfetamina

V: Volume da amostra

P: Precisão

A: Acurácia

5.2.4.3 Avaliação da incerteza padrão (u) de cada estimativa de entrada

- Incerteza da precisão (u_{Prec})

$$u_{Prec} = \frac{sp}{\sqrt{m}}$$

Sendo sp calculado por:

$$sp = \sqrt{\frac{\sum vi \times si^2}{\sum vi}} = 0,0512$$

Onde m é o número de medidas independentes, vi é o grau de liberdade de cada amostra, e si é o desvio padrão de cada amostra. A incerteza da precisão (u_{Prec}) foi calculada usando o desvio padrão do controle médio encontrado no ensaio de precisão, sendo a concentração de 590 ng.mL⁻¹.

$$u_{Prec} = \frac{0,0512}{\sqrt{3}} = 0,0296$$

u_{Prec} é calculado por:

$$u_{Prec} = \frac{u_{Prec}}{\text{Concentração do controle}} = \frac{0,0296}{590} = 0,0001$$

- Incerteza da concentração de metanfetamina (u_{Co})

$$u_{Co} = \sqrt{u^2 DPD + u^2 DPI + u^2 Cur}$$

Onde:

DPD : Diluição do padrão

DPI : Diluição do padrão interno

u_{Cur} : Incerteza da curva de calibração

$$u_{DPD} = \sqrt{\left(\frac{u_{PPD}}{\text{pureza}}\right)^2 + \left(\frac{u_{200}}{\text{volume}}\right)^2 + \left(\frac{u_{1000}}{\text{volume}}\right)^2}$$

Sendo:

PPD: Incerteza do padrão

u200: Incerteza da micropipeta de 200 µL

u1000: Incerteza da micropipeta de 1000 µL

$$uDPD = \sqrt{\left(\frac{0,003}{0,998}\right)^2 + \left(\frac{0,0002}{200}\right)^2 + \left(\frac{0,001}{1000}\right)^2} = 0,0030$$

A Incerteza da preparação da solução de padrão interno (anfetamina d5) 10 µg.mL⁻¹ é calculada a seguir.

$$uDPI = \sqrt{\left(\frac{uPPI}{pureza}\right)^2 + \left(\frac{u100}{volume}\right)^2 + \left(\frac{u1000}{volume}\right)^2}$$

$$uDPI = \sqrt{\left(\frac{0,003}{0,999}\right)^2 + \left(\frac{0,0005}{100}\right)^2 + \left(\frac{0,001}{1000}\right)^2}$$

$$uDPI = 0,0030$$

-Cálculo da incerteza da curva de calibração

A equação da curva foi igual a: $y = 0,0021x - 0,1278$

Assim, para se calcular a incerteza da curva temos:

$$uCur = \frac{S}{a} \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(Co - \bar{x})^2}{Sxx}}$$

Com o desvio padrão residual,

$$S = \sum n \frac{[Y - (b + a.x)]^2}{n - 2} = 0,0202$$

$$Sxx = \sum n (xi - \bar{x})^2 = 900000,0$$

Onde S é o desvio padrão residual, a é a inclinação da reta, p é o número de medidas para determinar Co , n é o número total de medidas da curva de calibração, Co é a concentração de THC na amostra teste, x_i é cada concentração da curva de calibração, $\bar{x}$ é a média das concentrações da curva de calibração e Sxx a soma dos quadrados dos resíduos.

Então,

$$uCur = \frac{S}{a} \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(Co - \bar{x})^2}{Sxx}} = 10,0229$$

E, assim:

$$urCur = \frac{uCurv}{Co} = \frac{10,0229}{666,4} = 0,0150$$

Assim, a incerteza da concentração uCo será:

$$\begin{aligned} uCo &= \sqrt{u^2DPD + u^2DPI + ur^2Cur} \\ uCo &= \sqrt{(0,0030)^2 + (0,0030)^2 + (0,0150)^2} \\ uCo &= 0,0156 \end{aligned}$$

- **Incerteza do volume de urina (uV)**

$$uV = u \ 10000 = \frac{0,002}{2} = 0,001$$

$$urV = \frac{u \ 1000}{V} = urV = \frac{0,001}{1} = 0,001$$

- **Incerteza da Acurácia (uAc)**

De acordo com Barwick e Ellison (2000), há várias possibilidades para estimar a incerteza relativa à acurácia do método, incluindo a análise de

materiais de referência certificados (como demonstrado no cálculo da incerteza do THC-COOH e da anfetamina), fortificação (*spiking*) e comparação com um método de referência. Uma vez que não conseguimos obter urina de referência para quantificar este analito, a uAc foi calculada utilizando a fórmula da fortificação da amostra, como descrito a seguir.

$$uAc = Ac \sqrt{\left(\frac{s_{extraido}^2}{n * C_{extraido}}\right) + \left(\frac{s_{não-extraido}}{C_{não-extraido}}\right)^2}$$

Onde, Ac nesta equação, se refer ao valor da recuperação do método na concentração média (590 ng.mL^{-1}), $s_{extraido}$ e $C_{extraido}$, é o desvio e a concentração obtida do analito que passou pelo processo de extração respectivamente, n é o número de medições realizadas, $s_{não-extraido}$ e $C_{não-extraido}$, é o desvio e a concentração do analito que foi adicionada após a extração. Então,

$$uAc = 0,7025 \sqrt{\left(\frac{0,0372^2}{5 * 414,5}\right) + \left(\frac{0,1442}{590}\right)^2} = 0,0006$$

5.2.4.4 Determinação da incerteza padrão combinada (u_c)

$$u_{canfetamina} = C \sqrt{uCo^2 + uV^2 + uPrec^2 + uAc^2}$$

$$u_{canfetamina} = 666,4 \sqrt{(0,0156)^2 + (0,0010)^2 + (0,0001)^2 + (0,0006)^2}$$

$$u_{canfetamina} = 10,4$$

5.2.4.5 Determinação da incerteza expandida (U)

De acordo com os guias para expressão da incerteza de medição, é recomendado um fator de abrangência $K=2$ para um nível de confiança de 95% quando os graus de liberdade forem maiores que 100. Em nosso estudo, o grau de liberdade encontrado foi $6,78 \times 10^{12}$ pela equação de *Welch*-

Satterthwaite. Então, $K=2$ foi aceito para o cálculo da incerteza expandida para metanfetamina, com nível de confiança de 95%.

$$U = k \times u_c = 2,00 \times 10,4 = 20,8$$

Portanto, a concentração de anfetamina na amostra de urina com sua incerteza expandida foi de $666,4 \pm 20,8 \text{ ng.mL}^{-1}$. A principal fonte de entrada na contribuição de incerteza combinada para este método foi a concentração do analito, como ilustrado na **Figura 26**.

Considerando o *cut off* para confirmação de anfetaminas na urina estipulado pela DHHS (500 ng.mL^{-1}) estipulamos que o valor máximo para a incerteza combinada (u_{cmax}) seja até 10% do *cut off*, assim a incerteza combinada do método deve estar abaixo de 50 ng.mL^{-1} , e a u_c encontrada em nosso estudo para a amostra testada foi de $10,4 \text{ ng.mL}^{-1}$, valor correspondente a 2,1%. Assim, o método para determinação de anfetaminas foi eficaz na extração de anfetaminas na urina e o resultado gerado apresenta confiabilidade e qualidade.

Figura 26. Contribuição de diferentes fontes de entrada no cálculo da incerteza padrão combinada para o método de detecção de anfetamina em urina.

O mesmo método proposto para determinação de anfetamina foi ainda aplicado em outras amostras de urina. A incerteza foi estimada pelo mesmo procedimento descrito anteriormente e o valor encontrado para estas amostras são descritos na **Tabela 12**. Os valores de incerteza combinada encontrados manteve-se entre 2,1% e 5,2%. Esses resultados estão de acordo com os parâmetros adotados.

Tabela 12. Resultados do cálculo da incerteza de medição em amostras de urina contendo anfetaminas.

	Concentração detectada	Incerteza Expandida
Urina 01	666,4	20,8
Urina 02	1286,9	25,2
Urina 03	1309,4	25,5
Urina 04	2006,6	36,6
Urina 05	2303,6	42,2
Urina 06	2474,4	45,6
Urina 07	1777,4	32,6
Urina 08	837,5	21,2
Urina 09	2771,3	51,5
Urina 10	2323	42,6

5.3 Resultados das análises de benzoilecgonina em urina

5.3.1 Método de extração

Nos últimos anos, a extração em fase sólida tem sido a técnica de escolha para a análise de benzoilecgonina. Vários estudos reportam a utilização desta técnica para extração do analito em matrizes como urina, cabelo, placenta e sangue (JOYA, et al., 2010; MARCHEI, et al., 2008; ALVEAR, et al., 2014; MOORE, et al., 2007; IMBERT, et al., 2014). Extratos limpos, boa recuperação e rapidez no processo de detecção foram relatados após o uso de SPE, o que foi confirmado em nosso trabalho.

O volume de urina geralmente utilizado para o método de SPE é de 2,5 mL, tentamos reduzir este volume, mas não obtivemos boas respostas. Decidimos então validar o método e verificar se os resultados seriam coerentes com o objetivo pretendido.

O método para determinação de benzoilecgonina em urina foi validado de acordo com guias nacionais e internacionais de validação de métodos, estabelecendo-se os parâmetros de limite de detecção, limite de quantificação, linearidade, precisão intra e inter-ensaio e estabilidade dos analitos na amostra de interesse (EURACHEM/CITAC, 2000; UNODC, 2009).

5.3.2 Resultados da validação do método

5.3.2.1 Limites de detecção e quantificação

O limite de detecção e quantificação foi determinado pelo método empírico, que consiste na análise de uma série de amostras branco de urina ($n=6$) fortificadas com quantidades decrescentes dos analitos. O LOD se manteve em 5 ng.mL^{-1} enquanto o limite de quantificação medido foi de $7,5 \text{ ng.mL}^{-1}$ (**Tabela 13**). Os limites obtidos são coerentes com o método pretendido, uma vez que se encontram significativamente abaixo do valor de *cut off* para a benzoilecgonina (150 ng.mL^{-1}).

Tabela 13. Valores de limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) para o método de extração de benzoilecgonina.

	ng.mL ⁻¹	CV%
LOD	5	15,4 %
LOQ	7,5	11,7 %

5.3.2.2 Linearidade

A curva de linearidade foi construída utilizando amostras de urina negativas adicionadas de padrão nas concentrações dentro da faixa de trabalho de 7,5 a 3200 ng.mL⁻¹ de urina, como mostrado na **Figura 27**. O ensaio foi realizado em seis replicatas para cada concentração. Obteve-se um valor de coeficiente de determinação (r^2) maior que 0,99, o que nos permite concluir que o resultado é satisfatório, de acordo com a ANVISA (2003).

Figura 27. Linearidade do método para determinação de benzoilecgonina em urina por SPE/GC-MS.

Na faixa de concentração da curva de calibração (7,5 a 3200 ng.mL⁻¹), foi apresentado o fenômeno de heteroscedasticidade (avaliada através da distribuição F), provavelmente devido à ampla faixa de concentração considerada no estudo da linearidade. Portanto, os métodos de regressão

linear dos mínimos quadrados comuns poderiam resultar em grandes erros no cálculo das concentrações, especialmente em valores menores. Usando os mínimos quadrados ponderados de regressão linear, a soma do percentual de erro relativo ao longo de todo o intervalo indicado de "melhor ajuste", na avaliação da eficácia do factor de ponderação utilizada é $1/x^2$ e assim a equação de regressão linear é $Y = 0,0045x + 0,0985$ e $r^2 = 0,9916$.

5.3.2.3 Precisão intra e inter-ensaio

As precisões intra e inter-ensaio foram avaliadas por meio da determinação do coeficiente de variação (CV%) das áreas relativas (razão entre área absoluta do analito e a área absoluta do padrão interno) exibido entre as seis replicatas preparadas a uma mesma concentração, em três dias. Os resultados estão apresentados na **Tabela 14**.

Tabela 14. Coeficientes de variação (CV%) correspondente às precisões intra e inter-ensaio para o método proposto para determinação de benzoilecgonina em urina.

Controles	Precisão intra-ensaio (%)	Precisão inter-ensaio (%)
CB ¹	13,5	15,6
CM ²	7,6	5,0
CA ³	8,4	11,5

¹Controle Baixo (20 ng.mL⁻¹); ²Controle Médio (1290 ng.mL⁻¹); ³Controle Alto (2560 ng.mL⁻¹)

Os resultados de precisão intra e inter-ensaio do método foram satisfatórios, uma vez que nas concentrações baixas os coeficientes de variação foram menores que 20% e nas concentrações média e alta se mantiveram abaixo que 15%. Os valores de precisão encontrados em nosso estudo são coerentes com publicações que relatam a determinação de

benzoilecgonina em urina (BRUNETTO, et al., 2005; ALVEAR, et al., 2014; BERG, et al.; 2009; UNODC 2009).

5.3.2.4 Exatidão

O ensaio de exatidão foi realizado utilizando três diferentes concentrações, baixa, média e alta, com seis determinações por concentração. Os resultados estão apresentados na **Tabela 15**.

Tabela 15. Exatidão do método proposto para determinação de benzoilecgonina em urina.

	1º DIA	2º DIA	3º DIA
CB ¹	110,0	114,1	118,6
CM ²	108,0	104,1	101,3
CA ³	109,1	97,5	107,1

¹Controle Baixo (20 ng.mL⁻¹); ²Controle Médio (1290 ng.mL⁻¹); ³Controle Alto (2560 ng.mL⁻¹)

5.3.2.5 Recuperação

O estudo da recuperação do método foi realizada em 5 replicatas para cada concentração. Os valores encontrados estão detalhados na **Tabela 16**.

Tabela 16. Valores da recuperação do método de extração de benzoilecgonina em urina.

Analito	Recuperação %		
	CB ¹	CM ²	CA ³
Benzoilecgonina	84,6	84,4	72,7

¹Controle Baixo (20 ng.mL⁻¹); ²Controle Médio (1290 ng.mL⁻¹); ³Controle Alto (2560 ng.mL⁻¹)

5.3.2.6 Estabilidade do analito na matriz

A estabilidade da benzoilecgonina em urina foi avaliada sob condições que são esperadas para acelerar qualquer processo de degradação, ou seja, o armazenamento a curto prazo (7 dias), a 37 °C e que podem ser encontrados em algumas situações extremas de transporte da amostra. Em cada dia foi realizada a análise em três replicatas da urina que estava armazenada à 37 °C, e o valor da concentração do analito foi comparado com o resultado da análise de uma amostra de urina armazenada à -20 °C. Foram encontradas variações estatisticamente significativas na concentração do analito na urina. O comportamento da concentração de analito na amostra ao longo do tempo estudado está demonstrado na **Figura 28**.

Figura 28. Resultados do estudo de estabilidade a curto prazo da benzoilecgonina. Valor médio da concentração ($n = 3$), obtida durante 7 dias de armazenamento a 37 °C.

No estudo de estabilidade realizado por Paul e colaboradores, verificou-se que não houve alteração na concentração de benzoilecgonina na urina armazenada à -11 °C por 45 dias. Já no estudo realizado por Dugan e colaboradores detectaram-se alterações de $\pm 25\%$ da concentração inicial de benzoilecgonina em urina armazenada por um ano à -20 °C. Não é reportado na literatura o estudo da estabilidade do analito em urina armazenada em temperatura ambiente, portanto foi necessário fazer o teste de estabilidade

nestas condições para se definir a viabilidade de análise da amostra que é enviada ao laboratório. De acordo com os resultados obtidos no estudo, há uma perda significativa na concentração do analito após o 4º dia de estocagem, portanto o ensaio de amostras de urina para análise de benzoilecgonina que está armazenada a mais de 4 dias pode não reportar resultados confiáveis.

5.3.2.7 Validação da diluição das amostras

Geralmente as concentrações das amostras enviadas para análise encontram-se acima da faixa de concentração definida para o estudo de linearidade, que foi estipulada até 3200 ng.mL⁻¹ devido a necessidade de se economizar padrões aníticos, portanto foi necessário o estudo para validar a diluição das amostras de urina. O estudo foi realizado analisando-se amostras de urina, em três replicatas, na concentração de 32.000 ng.mL⁻¹, a amostra foi então diluída vinte vezes e quantificada através de uma curva de calibração preparada no mesmo dia que a amostra. Os resultados encontrados foram satisfatórios.

5.3.3 Cálculo da incerteza de medição

Após validado, o método para determinação de benzoilecgonina foi aplicado em uma amostra de urina de referência (SRM1508a - NIST), com concentração e incerteza conhecida (161,0 ± 6,8 ng.mL⁻¹), obtida do *National Institute of Standards & Technology*, e o valor da incerteza foi calculado para esta amostra.

Na **Figura 29** e na **Figura 30** estão ilustrados os cromatogramas e os espectros de massas, respectivamente, característicos da detecção de benzoilecgonina obtido com a análise por SPE/GC-MS de uma amostra de urina de referência (SRM1508a-NIST).

Figura 29. Cromatogramas obtidos com a análise por SPE/GC-MS de amostras de urina. Controle negativo (amostra isenta do analito); Controle positivo (referente a uma urina adicionada com 150 ng.mL^{-1} de benzoilecgonina); SRM1508a-1 (urina de referência contendo $72,9 \text{ ng.mL}^{-1}$); SRM1508a-2 (urina de referência contendo $164,3 \text{ ng.mL}^{-1}$); SRM1508a-3 (urina de referência contendo $312,8 \text{ ng.mL}^{-1}$). Em todas as amostras foram adicionados padrão interno na concentração de 150 ng.mL^{-1} .

Figura 30. Espectro de massas da benzoilecgonina derivatizada. Íon quantificador da benzoilecgonina (240); Íons qualificadores da benzoilecgonina (82-361); Íon quantificador da benzoilecgonina-d3 (243); Íons qualificadores da benzoilecgonina-d3 (85-364).

5.3.3.1 Identificação das fontes de incerteza

Figura 31. Diagrama de Ishikawa expandido, onde foram inseridas as principais fontes que contribuem para a incerteza do método de determinação de benzoilecgonina em urina. Co (concentração de benzoilecgonina).

Uma vez identificadas e analisadas as principais fontes de incerteza torna-se necessária a quantificação dessas incertezas. De forma geral, o

método proposto pelo ISO-GUM (INMETRO, 1998) esta definido nas etapas a seguir.

5.3.3.2 Expressão da função matemática das grandezas de entrada

$$C_{\text{Benzoilecgonina}} = \frac{Co}{V} \times P \times A$$

Onde, C : Incerteza da concentração de benzoilecgonina

Co : Concentração de benzoilecgonina

V : Volume da amostra

P : Precisão

A : Acurácia

5.3.3.3 Avaliação da incerteza padrão (u) de cada estimativa de entrada

- Incerteza da precisão (u_{Prec})

$$u_{\text{Prec}} = \frac{sp}{\sqrt{m}}$$

Sendo sp calculado por:

$$sp = \sqrt{\frac{\sum vi \times si^2}{\sum vi}} = 0,0019$$

Onde m é o número de medidas independentes, vi é o grau de liberdade de cada amostra, e si é o desvio padrão de cada amostra. A incerteza da precisão (u_{Prec}) foi calculada usando o desvio padrão do controle baixo encontrado no ensaio de precisão, sendo a concentração de 20 ng.mL⁻¹.

$$u_{\text{Prec}} = \frac{0,0019}{\sqrt{3}} = 0,0011$$

$urPrec$ é calculado por:

$$urPrec = \frac{uPrec}{\text{Concentração do controle}} = \frac{0,0011}{20} = 0,0001$$

• **Incerteza da concentração de benzoilecgonina (uCo)**

$$uCo = \sqrt{u^2DPD + u^2DPI + u^2Cur}$$

Onde:

DPD : Diluição do padrão

DPI : Diluição do padrão interno

$uCur$: Incerteza da curva de calibração

$$uDPD = \sqrt{\left(\frac{uPPD}{\text{pureza}}\right)^2 + \left(\frac{u200}{\text{volume}}\right)^2 + \left(\frac{u1000}{\text{volume}}\right)^2}$$

Sendo:

PPD : Incerteza do padrão

$u200$: Incerteza da micropipeta de 200 μL

$u1000$: Incerteza da micropipeta de 1000 μL

$$uDPD = \sqrt{\left(\frac{0,0030}{0,997}\right)^2 + \left(\frac{0,0002}{200}\right)^2 + \left(\frac{0,001}{1000}\right)^2} = 0,0030$$

A Incerteza da preparação da solução de padrão interno (Benzoilecgonina-d3) 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ é calculada a seguir.

$$uDPI = \sqrt{\left(\frac{uPPI}{\text{pureza}}\right)^2 + \left(\frac{u100}{\text{volume}}\right)^2 + \left(\frac{u1000}{\text{volume}}\right)^2}$$

$$uDPI = \sqrt{\left(\frac{0,0030}{0,994}\right)^2 + \left(\frac{0,0005}{100}\right)^2 + \left(\frac{0,001}{1000}\right)^2}$$

$$uDPI = 0,0030$$

-Cálculo da incerteza da curva de calibração

A equação da curva foi igual a: $y = 0,0057x + 0,2685$

Assim, para se calcular a incerteza da curva temos:

$$u_{Cur} = \frac{S}{a} \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(Co - \bar{x})^2}{Sxx}}$$

Com o desvio padrão residual,

$$S = \sqrt{\sum n \frac{[Y - (b + a.x)]^2}{n - 2}} = 0,0115$$

$$Sxx = \sum n (xi - \bar{x})^2 = 7151245,0$$

Onde S é o desvio padrão residual, a é a inclinação da reta, p é o número de medidas para determinar Co , n é o número total de medidas da curva de calibração, Co é a concentração de THC na amostra teste, x_i é cada concentração da curva de calibração, $\bar{x}$ é a média das concentrações da curva de calibração e Sxx a soma dos quadrados dos resíduos.

Então,

$$u_{Cur} = \frac{S}{a} \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(Co - \bar{x})^2}{Sxx}} = 1,4664$$

E, assim:

$$ur_{Cur} = \frac{u_{Cur}}{Co} = \frac{1,4664}{164,3} = 0,0089$$

Assim, a incerteza da concentração u_{Co} será:

$$u_{Co} = \sqrt{u^2_{DPD} + u^2_{DPI} + ur^2_{Cur}}$$

$$u_{Co} = \sqrt{(0,0030)^2 + (0,0030)^2 + (0,0089)^2}$$

$$u_{Co} = 0,0099$$

- Incerteza do volume de urina (uV)

$$uV = u_{10} = \frac{0,004}{2,20} = 0,0018 \quad urV = \frac{u_{10}}{V} = urV = \frac{0,0018}{2,5} = 0,0007$$

- Incerteza da Acurácia (uAc)

$$uAc = Ac \sqrt{\left(\frac{S_{am}}{C_{am}}\right)^2 + \left(\frac{u_{ref}}{C_{ref}}\right)^2}$$

Sendo,

$$Ac = 164,3/161,0 = 1,02$$

$$uAc = 1,02 \sqrt{\left(\frac{0,074}{164,3}\right)^2 + \left(\frac{6,8}{161,0}\right)^2}$$

$$uAc = 0,0431$$

Para avaliar se o erro do método é significativo, calculamos o valor de t .

$$t = \left| \frac{1 - Ac}{uAc} \right|$$

$$t = \left| \frac{1 - 1,02}{0,0431} \right| = 0,46$$

Se o valor de t for maior que o fator de abrangência (k) usado para calcular a incerteza expandida, então se deve assumir que o erro existe e aplicar um fator de correção para os resultados da análise. Em nosso estudo o valor de t encontrado foi 0,46 e o fator de abrangência utilizado foi $k=2$, então não há necessidade de usarmos um fator de correção. No entanto, é necessário incluir a incerteza da acurácia no cálculo da incerteza combinada.

5.3.3.4 Determinação da incerteza padrão combinada (u_c)

$$u_c \text{Benzoilecgonina} = C \sqrt{u_{Co}^2 + u_V^2 + u_{Prec}^2 + u_{Ac}^2}$$

$$u_c \text{Benzoilecgonina} = 164,3 \sqrt{(0,0099)^2 + (0,0007)^2 + (0,0001)^2 + (0,0431)^2}$$

$$u_c \text{Benzoilecgonina} = 7,26$$

5.3.3.5 Determinação da incerteza expandida (U)

De acordo com os guias para expressão da incerteza de medição, é recomendado um fator de abrangência $K=2$ para um nível de confiança de 95% quando os graus de liberdade forem maiores que 1000. Em nosso estudo, o grau de liberdade encontrado foi $4,85 \times 10^3$ pela equação de *Welch-Satterthwaite*. Então, $K=2$ foi aceito para o cálculo da incerteza expandida para THC-COOH, com nível de confiança de 95%.

$$U = k \times u_c = 2,00 \times 7,26 = 14,53$$

Portanto, a concentração de benzoilecgonina em uma amostra de urina com sua incerteza expandida foi de $164,3 \pm 14,5 \text{ ng.ml}^{-1}$. A acurácia do método foi a fonte de entrada mais significativa na incerteza de medição do método de benzoilecgonina (**Figura 32**).

Figura 32. Contribuição de diferentes fontes de entrada no cálculo da incerteza padrão combinada para o método de detecção de benzoilecgonina em urina

Se considerarmos que o *cut off* para confirmação de benzoilecgonina na urina seja 150 ng.mL^{-1} , ressaltando ainda que a liberação de um resultado falso positivo pode causar grandes prejuízos, estipulamos que o valor máximo para a incerteza combinada (u_{cmax}) seja até 10% do *cut off*, assim a incerteza combinada do método deve estar abaixo de 15 ng.mL^{-1} , e a u_c encontrada em nosso estudo para a amostra de referência SRM1508a-2, foi de $7,26 \text{ ng.mL}^{-1}$, valor correspondente a 4,8%. Assim, o método para determinação de benzoilecgonina foi satisfatório e apresenta confiabilidade e qualidade.

O mesmo método proposto para determinação de benzoilecgonina foi ainda aplicado nas amostras de urina de referência (SRM1508a - NIST) com níveis de concentração baixo (SRM1508a-1) e alto (SRM1508a-3) obtidas do *National Institute of Standards & Technology*. A incerteza foi estimada pelo mesmo procedimento descrito anteriormente e o valor encontrado para estas amostras foram $72,9 \pm 7,6 \text{ ng.mL}^{-1}$ e $312,8 \pm 29,8 \text{ ng.mL}^{-1}$ respectivamente, resultados que também estão de acordo com os parâmetros adotados.

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados encontrados podemos concluir que o método LPME/GC-MS é eficaz para a detecção de canabinóides em urina. O método desenvolvido foi aplicado em amostras de referência e obtivemos resultados satisfatórios e a incerteza de medição calculada para estas amostras está de acordo com os parâmetros adotados. Em nosso conhecimento, esta é a primeira descrição da utilização da técnica de LPME para determinação de THC-COOH em urina.

Esta técnica também foi aplicada com sucesso para determinação de anfetaminas em urina. Após a validação o método foi aplicado em amostras reais provenientes do LAT e os resultados encontrados são coerentes.

Nesse estudo foi ainda demonstrado o procedimento e resultados para o cálculo da incerteza de medição na determinação de benzoilecgonina na urina, e concluiu-se que o valor encontrado da incerteza está dentro do limite aceitável o que confirma que o método é aplicável e o resultado gerado possui confiabilidade e qualidade.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, T. T.; LOWE, R. H.; PIRNAY, S. O.; DARWIN, W. D.; HUESTIS, M. A. Simultaneous GC-EI-MS Determination of Δ^9 -Tetrahydrocannabinol1, 1-Hydroxy- Δ^9 -Tetrahydrocannabinol, and 11-nor- Δ^9 -Carboxy- Δ^9 -Tetrahydrocannabinol in Human Urine Following Tandem Enzyme-Alkaline Hydrolysis. **Journal of Analytical Toxicology**, vol. 31, 2007.

ALVEAR, E.; VON BAER, D.; MARDONES, C.; HITSCHFELD, A. Determination of cocaine and its major metabolite benzoylecgonine in several matrices obtained from deceased individuals with presumed drug consumption prior to death. **Journal of Forensic and Legal Medicine**, v. 23, p. 37-43, 2014.

AMERICAN SOCIETY OF CRIME LABORATORY DIRECTORS LABORATORY ACCREDITATION BOARD. ASCLD/LAB. **Guidance on the Estimation of Measurement Uncertainty**, 2011.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. ABNT NBR 14724. **Informação e documentação**, 3 ed, 2011.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. ANVISA. **Resolução – RE nº 899, de 29 de maio de 2003**. Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. 2003.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS; INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION; INTERNATIONAL ELECTROTECHNICAL COMMISSION. **NBR / ISO / IEC 17025: Requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração**. Rio de Janeiro, 2005.

BARROSO, M.; MORENO, I.; FONSECA, B.; QUEIROZ, J. A.; GALLARDO, E. Role of microextraction sampling procedures in forensic toxicology. **Bioanalysis**, v. 4(14), p. 1805–1826, 2012.

BARWICK, V. J.; ELLISON, S. L. R. **VAM Project 3.2.1**, development and harmonisation of measurement uncertainty principles. Part D. protocol for uncertainty evaluation from validation data, version 5.1. Teddington: Vicki Barwick, January 2000.

BERG, T.; LUNDANES, E.; CHRISTOPHERSEN, A.; STRAND, D. H. Determination of opiates and cocaine in urine by high pH mobile phase reversed phase UPLC–MS/MS. **Journal of Chromatography B**, v. 877, p. 421-432, 2009.

BERGO, P. L. S. **Desenvolvimento de um método de screening para anfetaminas em urina empregando ESI-MS com confirmação por GC-MS**. 2007. Dissertação (Química – Química Analítica), Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, 2007.

BREINDAHL, T.; ANDREASEN, K. Validation of urine drug-of-abuse testing methods for ketobemidone using thin-layer chromatography and liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 732, p. 155, 1999.

BRUNETTO, M.R.; CAYAMA, Y. D.; GARCIA, L. G.; GALLIGNANI, M.; OBANDO, M. A. Determination of cocaine and benzoylecgonine by direct injection of human urine into a column-switching liquid chromatography system with diode-array detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 37, p. 115-120, 2005.

BUREAU INTERNATIONAL POIDS MENSURE - BIPM. **Evaluation of measurement data: guide to the expression of uncertainty in measurement**. 2008.

BUCHMANN, J. H.; SARKIS, J. E. S. O conceito de incerteza aplicado aos processos de medição associados à preparação de uma solução de referência para calibração. **Química Nova**, v. 25, n. 1, p. 111-116, 2002.

CARPENTER, S. C. Workplace Drug Testing and Worker Drug Use. **Health Services Research**, Irvine, v. 42, n. 2, p. 795-810, 2007.

CASSIANO, N. M.; BARREIRO, J. C.; MARTINS, L. R. R.; OLIVEIRA, R. V.; CASS, Q. B. Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 1021-1030, 2009.

CHIA, K.; HUANG, S. Simultaneous derivatization and extraction of amphetamine-like drugs in urine with headspace solid-phase microextraction followed by gas chromatography–mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 539, p. 49-54, 2005.

CHUNG, L. W.; LIU, G.J.; LI, Z.G.; CHANG, Y.Z.; LEE M.R. Solvent-enhanced microwave-assisted derivatization following solid-phase extraction combined with gas chromatography-mass spectrometry for determination of amphetamines in urine. **Journal of Chromatography, B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v.874, n.1/2, p.115-118, 2008.

DADFARNIA, S.; SHABANI, A. M. H. Recent development in liquid phase microextraction for determination of trace level concentration of metals - A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 658, p. 107–119, 2010.

DE BRABANTER, N.; GANSBEKE, W. V.; HOOGHE, F.; VAN EENOO, P. Fast quantification of 11-nor-D9-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid (THCA) using microwave-accelerated derivatisation and gas chromatography–triple quadrupole mass spectrometry. **Forensic Science International**, v. 224, p. 90–95, 2013.

DEGENHARDT, L. Extent of illicit drug use and dependence, and their contribution to the global burden of disease. **Wayne Hall**, v. 379, 2012.

DE LA CRUZ, M. H. C.; RODRIGUES, J. M.; COUTO, P. R. G.; CUNHA, V.S. Estimativa da incerteza de medição em análise cromatográfica: abordagem sobre a quantificação de carbamato de etila em cachaça. **Química Nova**, v. 33, n. 7, p. 1578-1584, 2010.

DUGAN, S.; BOGEMA, S.; SCHWARTZ, R.W.; LAPPAS, N.T. Stability of drugs of abuse in urine samples stored at -20 degrees C. **Journal of Analytical Toxicology**, n. 18, v. 7, p. 391-396, 1994.

EUROPEAN COOPERATION FOR ACCREDITATION. **EA-4/02: Expression of uncertainty of measurement in calibration**. Paris, 1999.

ELLISON, S. L. R.; WILLIAMS, A. EURACHEM/CITAC Guide: **Use of uncertainty information in compliance assessment**. Teddington: EURACHEM, p. 15, 2007.

EURACHEM/CITAC. **Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement**. London: Laboratory of the Government Chemist, 2000.

EURACHEM/CITAC. **Measurement uncertainty arising from sampling**. EUROLAB, Nordtest, UK RSC AMC. 1 Edition 2007a.

EURACHEM/CITAC. **Use of uncertainty information in compliance assessment**. EUROLAB, Nordtest, UK RSC AMC. 1 Edition 2007b.

FELLI, M.; MARTELLO, S.; CHIAROTTI, M. LC–MS–MS method for simultaneous determination of THCCOOH and THCCOOH-glucuronide in urine: Application to workplace confirmation tests. **Forensic Science International**, v.204, p. 67–73, 2011.

FERNÁNDEZ, M. M. R.; WILLE, S. M. R.; SAMYN, N., WOOD, M.; LOPES-RIVADULLA, M.; DE BOECK, G. On-line solid-phase extraction combined with chromatography-tandem mass spectrometry for high throughput analysis of 11-nor-9-carboxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol acid in urine. **Journal of Chromatography B**, v. 877, p. 2153-2157, 2009.

FERNÁNDEZ, M. M. R.; WILLW, S. M. R.; FAZIO, V.; GOSSELIN, M.; SAMYN, N. Analysis of amphetamines and metabolites in urine with ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 878, p. 1616–1622, 2010.

FLANAGAN, R. J.; MORGAN, P.E.; SPENCER, E. P.; WHELPTON, R. Microextraction techniques in analytical toxicology: short review. **Biomedical Chromatography**, v. 20, n.6/7, p. 530-538, 2006.

FOLLADOR, M. J. D.; YONAMINE, M.; MOREAU, R. L. M.; SILVA, O. A. Detection of cocaine and cocaethylene in sweat by solid-phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v 811, p. 37-40, 2004.

FREDERICK, D. L. Toxicology Testing in Alternative Specimen Matrices. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 32, p. 467-492, 2012.

FU, S.; LEWIS, J. Novel Automated Extraction Method for Quantitative Analysis of Urinary 11-nor-Ag-Tetrahydrocannabinol-9-Carboxylic Acid (THC-COOH). **Journal of Analytical Toxicology**, v. 32, 2008.

GULLBERG, R. G. Estimating the measurement uncertainty in forensic blood alcohol analysis. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 36, p. 153-161, 2012.

HAN, E.; YANG, W.; LEE, S.; KIM, E.; IN, S.; CHOI, H.; LEE, S.; CHUNG, H.; SONG, J. M. Establishment of the measurement uncertainty of 11-nor-D⁹-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid in hair. **Forensic Science International**, v. 206, p. 85-92, 2011.

HE, Y.; POHL, J.; ENGEL, R.; ROTHMAN, L.; THOMAS, M. Preparation of ionic liquid based solid-phase microextraction fiber and its application to forensic determination of methamphetamine and amphetamine in human urine. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 4824-4830, 2009.

HYÖTYLÄINEN, T.; RIEKKOLA, M. Sorbent and liquid-phase microextraction techniques and membrane-assisted extraction in combination with gas chromatographic analysis: a review. **Analytica Chimica Acta**, v.614, p.27-37, 2008.

HUGHES, R.; HUGHES, A.; LEVINE, B.; SMITH, M. L. Stability of phencyclidine and amphetamines in urine specimens. **Clinical Chemistry**, v. 37, p.2141-2, 1991.

IMBERT, L.; DULAURENT, S.; MERCEROLLE, M.; MORICHON, J.; LACHATRE, G.; GAULIER, J. M. Development and validation of a single LC-MS/MS assay following SPE for simultaneous hair analysis of amphetamines, opiates, cocaine and metabolites **Forensic Science International**, v. 234, p. 132-138, 2014.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO Guide 99: International Vocabulary of Basic and General Terms in Metrology**. Geneva, 1993.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 14253: Geometric product specifications (GPS) Part 1: Decision rules for proving conformance with specifications**, 1998.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO/TS 21748: Guidance for the use of repeatability, reproducibility and trueness estimates in measurement uncertainty estimation**. Genève, 2004. 30 p.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION; INTERNATIONAL ELECTROTECHNICAL COMMISSION. **ISO/IEC 17025: General requirement for the competence of testing and calibration laboratories**. Genève, 2005.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA. INMETRO, **Guia para a expressão da Incerteza de Medição (ISO GUM)**. 2ª edição, Rio de Janeiro, 1998.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA. INMETRO, Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos, DOG-CGCRE-008**. Revisão 2, 2007.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA. INMETRO, **Vocabulário Internacional de Metrologia: conceitos fundamentais e gerais e termos associados (VIM 2008)**. 1ª Edição Brasileira. Rio de Janeiro, 2009.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA. INMETRO, Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **Expressão da Incerteza de Medição por Laboratórios de Calibração**. Norma número NIT-DICLA-021. Revisão 8, 2012.

JAGERDEO, E.; MONTGOMERY, M. A.; KARAS, R. P.; SIBUM, M. A fast method for screening and/or quantitation of tetrahydrocannabinol and metabolites in urine by automated SPE/LC/MS/MS. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 398, p. 329–338, 2010.

JIMENEZ, C.; DE LA TORRE, R.; VENTURA, M.; SEGURA, J.; VENTURA, R. Stability studies of amphetamine and ephedrine derivatives in urine. **Journal of Chromatography B**, v.843, p. 84–93, 2006.

JOYA, X.; PUJADAS, M.; FALCON, M.; CIVIT, E.; GARCIA-ALGAR, O.; VALL, O.; PICHINI, S.; LUNA, A.; DE LA TORRE, R. Gas chromatography–mass spectrometry assay for the simultaneous quantification of drugs of abuse in human placenta at 12th week of gestation. **Forensic Science International**, v. 196, p. 38-42, 2010.

KARCH, S. B. **Workplace Drug Testing**. CRC Press: USA. 2008.

KATAOKA, H. Recent developments and applications of microextraction techniques in drug analysis. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 396, p. 339–364, 2010.

KIM, S. Y.; KIM, J. Y.; KNOW, W.; IN, M. K.; KIM, Y. E.; PAENG, K. Method development for simultaneous determination of amphetamine type stimulants and cannabinoids in urine using GC–MS. **Microchemical Journal**, v. 110, p. 326-333, 2013.

KRAMER, K. E.; ANDREWS, A. R. J. Screening method for 11-nor-D - tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid in urine using hollow fiber membrane solvent microextraction with in-tube derivatization. **Journal of Chromatography B**, v. 760, p. 27–36, 2001.

KUMAZAWA, T.; HASEGAWA, C.; LEE, X.; HARA, K.; SENO, H.; SUZUKI, O.; SATO, K. Simultaneous determination of methamphetamine and amphetamine in human urine using pipette tip solid-phase extraction and gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 44, p. 602-607, 2007.

LACROIX, C.; SAUSSEREAU, E. Fast liquid chromatography/tandem mass spectrometry determination of cannabinoids in micro volume blood samples after dabsyl derivatization. **Journal of Chromatography B**, v. 905, p. 85-95, 2012.

LANÇAS, F.M. **Validação de métodos cromatográficos de análise**. São Carlos: RiMa, 2004. p.9-28. (Métodos cromatográficos de análise, 6).

LEBEAU, M. A. Measurement and Reporting Uncertainty. In: MOFFAT, A. C.; OSSELTON, M. D.; WIDDOP, B.; WATTS, J. **Clarke's Analysis of Drugs and Poisons**, v. 1, ed. 4, London: Pharmaceutical Press, 2011.

LEE, J.; LEE, H. K.; RASMUSSEN, K. E.; PEDERSEN-BJERGAARD, S. Environmental and bioanalytical applications of hollow fiber membrane liquid-phase microextraction: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 624, p. 253-268, 2008.

LEE, S.; PARK, Y.; YANG, W.; HAN, E.; CHOE, S.; LIM, S.; CHUNG, H. Estimation of the measurement uncertainty of methamphetamine and amphetamine in hair analysis. **Forensic Science International**, v. 185, p. 59-66, 2009.

LEE, S.; CHOI, H.; KIM, E.; CHOI, H.; CHUNG, H.; CHUNG, K. H. Estimation of the measurement uncertainty by the bottom-up approach for the determination of methamphetamine and amphetamine in urine. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 34, p. 222-228, 2010.

LEYTON, V.; CARVALHO, D.; JESUS, M.; MUNOZ, D. Uso de anfetamínicos por motoristas profissionais brasileiros: aspectos gerais. **Saúde, Ética e Justiça**, v.5, n. 1, p.36, 2000.

LILLSUNDE, P.; HAAVANLAMMI, K.; PARTINEN, R.; MULAKA, K.; LAMBERG M. Finnish guidelines for workplace drug testing. **Forensic Science International**, v.174, p. 99-102, 2008.

LI, X.; SHEN, B.; JIANG, Z.; HUANG, Y.; ZHUO, X. Rapid screening of drugs of abuse in human urine by high-performance liquid chromatography coupled with high resolution and high mass accuracy hybrid linear ion trap-Orbitrap mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1302, p. 95-104, 2013.

LU, Y.; O'DONNELL, R. M.; HARRINGTON, P. B. Detection of cocaine and its metabolites in urine using solid phase extraction-ion mobility spectrometry with alternating least squares. **Forensic Science International**, v. 189, p. 54–59, 2009.

MARAIS, A. A. S.; LAURENS, J. B. Rapid GC–MS confirmation of amphetamines in urine by extractive acylation. **Forensic Science International**, v. 183, p. 78-86, 2009.

MARCHEI, E.; COLONE, P.; NASTASI, G. G.; CALABRO, C.; PELLEGRINI, M.; PACIFICI, R.; ZUCCARO, P.; PICHINI, S. On-site screening and GC–MS analysis of cocaine and heroin metabolites in body-packers urine. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 48, p. 383-387, 2008.

MARIZ, S. R.; SILVA, O. A identificação de anfetamina em amostras de cabelo por imunofluorescência polarizada. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 39, n. 1, 2003.

MENDES, A.; ROSÁRIO, P. P. **Metrologia & Incerteza de medição**. São Paulo: EPSE, 2005.

MEYER, V. R. Measurement uncertainty. **Journal of Chromatography A**, 1158, p.15-24, 2007.

MINOLI, M.; ANGELI, I.; RAVELLI, A.; GIGLI, F.; LODI, F. Detection and quantification of 11-nor-D9-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid in hair by GC/MS/MS in Negative Chemical Ionization mode (NCI) with a simple and rapid liquid/liquid extraction. **Forensic Science International**, v. 218, p. 49–52, 2012.

MOFFAT, A. C.; OSSELTON, M. D.; WIDDOP, B.; WATTS, J. **Clarke's Analysis of Drugs and Poisons**, v. 1, ed. 4, London: Pharmaceutical Press, 2011.

MOODY, D. E.; MONTI, K. M.; SPANBAUER, A. C. Long-term stability of abused drugs and antiabuse chemotherapeutical agents stored at -20 degrees C. **Journal of Analytical Toxicology**, n. 23, v. 6, p. 535-540, 1999.

MOON, J.; KIM, J. Y.; MOON, M. H.; CHUNG, B. C.; IN, M. K.; CHOI, M. H. Validated gas chromatographic-mass spectrometric analysis of urinary cannabinoids purified with a calcium-hardened cyclodextrin polymer. **Journal of Chromatography A**, v. 1204, p. 87-92, 2008.

MOORE, C.; COULTER, C.; CROMPTON, K. Determination of cocaine, benzoylecgonine, cocaethylene and norcocaine in human hair using solid-phase extraction and liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection. **Journal of Chromatography B**, v. 859, p. 208-212, 2007.

OLIVEIRA, A. R. M.; MAGALHÃES, I. R. S.; DE SANTANA, F. J. M.; BONATO, P. S. Microextração em fase líquida (LPME): fundamentos da técnica e aplicações na análise de fármacos em fluidos biológicos. **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 637-644, 2008.

PANTALEÃO, L. N.; PARANHOS, B. A. P. B.; YONAMINE, M. Hollow-fiber liquid-phase microextraction of amphetamine-type stimulants in human hair samples. **Journal of Chromatography A**, n. 1254, 2012.

PATERSON, S.; LEE, S.; CORDERO, R. Analysis of hair after contamination with blood containing cocaine and blood containing benzoylecgonine. **Forensic Science International**, v. 194, p. 94-96, 2010.

PEDERSEN-BJERGAARD, S.; RASMUSSEN, K. E. Liquid-liquid-liquid microextraction for sample preparation of biological fluids prior to capillary electrophoresis. **Analytical Chemistry**, v. 71, n. 14, p. 2650-2656. 1999.

PEDERSEN-BJERGAARD, S.; RASMUSSEN, K. E. Liquid-phase microextraction with porous hollow fibers, a miniaturized and highly flexible format for liquid-liquid extraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1184, p. 132-142, 2008.

PELLEGRINI, M.; F. ROSATI F.; PACIFICIA, R.; ZUCCAROA, P.; ROMOLO, F. S.; LOPEZ A. Rapid screening method for determination of Ecstasy and amphetamines in urine samples using gas chromatography–chemical ionisation mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 769, p.243–251, 2002.

PETERS, F. T.; MAURER, H. H. Bioanalytical method validation and its implications for forensic and clinical toxicology – A review. **Accreditation and Quality Assurance**, v. 7, p.441–449, 2002.

PETERS, F. T. Stability of analytes in biosamples-an important issue in clinical and forensic toxicology? **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 388, p. 1505–1519, 2007.

PETERS, F. T.; DRUMMER, O. H.; MUSSHOFF, F. Validation of new methods. **Forensic Science International**, v. 165, p. 216–224, 2007.

PETERS, F. T.; DRVAROV, O.; LOTTNER, S.; SPELLMEIER, A.; RIEGER, K.; HAEFELI, W. E.; MAURER, H. H. A systematic comparison of four different workup procedures for systematic toxicological analysis of urine samples using gas chromatography–mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, n. 393, p. 735-745, 2009.

PIERCE, A. Workplace Drug Testing outside the US. In: KARCH, S.B. **Workplace drug testing**. Califórnia, p. 43-54, 2008.

PIZZOLATO, T. M.; ALDA, M. J. L.; BARCELÓ, D. LC based analysis of drugs of abuse and their metabolites in urine. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, n. 7, p. 609-624, 2007.

PRAGST, F. Application of solid-phase microextraction in analytical toxicology **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, n. 388, p. 1393-1414, 2007.

PSILLAKIS, E.; KALOGERAKIS, N. Developments in liquid-phase microextraction. **Trends Analytical Chemistry**, v. 22, p. 565-574, 2003.

RACAMONDE, K. E.; VILLAVERDE-DE-SÁA, E.; RODIL, R.; QUINTANA, J. B.; CELA, R. Reetermination of Δ^9 -tetrahydrocannabinol and 11-nor-9-carboxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol in water samples by solid-phase microextraction with on-fiber derivatization and gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1245, p. 167– 174, 2012.

RASMUSSEN, K. E.; PEDERSEN- BJERGAARD, S. Developments in hollow fibre-based liquid-phase microextraction. **Trends Analytical Chemistry**, v. 23, n. 1, p. 1-11, 2004.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

ROZET, E.; RUDAZ, S.; MARINI, R.D.; ZIÉMONS, E.; BOULANGER, B.; HUBERT, P. H. Models to estimate overall analytical measurements uncertainty: Assumptions, comparisons and applications. **Analytica Chimica Acta**, v. 702, p. 160-171, 2011.

SAITO, T.; MASE, H.; TAKEICHI, S. INOKUCHI, S. Rapid simultaneous determination of ephedrine, amphetamines, cocaine, cocaine metabolites, and opiates in human urine by GC-MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 43, p. 358-366, 2007.

SCHEIDWEILER, K. B.; DESROSIERS, N. A.; HUESTIS, M. A. Simultaneous quantification of free and glucuronidated cannabinoids in human urine by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Clinica Chimica Acta**, v. 413, p. 1839-1847, 2012.

SILVA, O.A.; YONAMINE, M. Uso de drogas entre trabalhadores de regiões do Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v.38, p.552-556, 2004.

SILVA, M. C. **A utilização de ferramentas quimiométricas como alternativa na avaliação das fontes da incerteza de medição**. 2010. Dissertação (Química), Instituto de Química, Universidade do Rio de Janeiro, 2010.

STEVEN, B.; KARCH, MD. Cocaine: history, use, abuse. **Journal of the Royal Society of Medicine**, v. 92, p. 393-397, 1999.

STEPHANSON, N.; JOSEFSSON, M.; KRONSTRAND, R.; BECK, O. Accurate identification and quantification of 11-nor- Δ^9 -tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid in urine drug testing: Evaluation of a direct high efficiency liquid chromatographic-mass spectrometric method. **Journal of Chromatography B**, v. 871, p. 101-108, 2008.

SKLEROV, J. H.; COUPER, F. J. Calculation and verification of blood ethanol measurement uncertainty for headspace gas chromatography. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 35, 2011.

SOUBHIA, P. C. **Período de detecção de canabinoídes urinários por imunofluorescência polarizada em população usuária de Cannabis**. 1999. Dissertação (Farmácia – Toxicologia e Análises Toxicológicas), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 1999.

STÖCKL, D.; D'HONDT, H.; THIENPONT, L. M. Method validation across the disciplines-Critical investigation of major validation criteria and associated experimental protocols. **Journal of Chromatography B**, v. 877, p. 2180–2190, 2009.

UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME. UNODC. **Guidance for the Validation of Analytical Methodology and Calibration of Equipment used for Testing of Illicit Drugs in Seized Materials and Biological Specimens**. United Nations: New York. 2009.

UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME. UNODC. **Recent Statistics and Trend Analysis of Illicit Drug Markets**. World Drug Report. 2012.

UNITED NATIONS OFFICE ON DRUGS AND CRIME. UNODC. **World Drug Report**. United Nations publication, Vienna, 2013.

VERSTRAET, A.; PIERCE, A. Workplace drug testing in Europe. **Forensic Science International**, v. 121, p. 2-6, 2001.

VERSTRAET, A.; PEAT, M. Workplace Drug Testing. In: MOFFAT A. C., OSSELTON M. D., WIDDOP B., WATTS J. **Clarke's Analysis of Drugs and Poisons**, v. 1, ed. 4, London: Pharmaceutical Press, 2011.

XIONG, J.; CHEN, J.; HE, M.; HU, B. Simultaneous quantification of amphetamines, caffeine and ketamine in urine by hollow fiber liquid phase microextraction combined with gas chromatography-flame ionization detector. **Talanta**, v. 82, p. 969–975, 2010.

World Anti-Doping Agency. WADA. Technical Document TD2010DL. Decision Limits for the confirmatory quantification of threshold substances. 2010.

WALLACE, J. Tem methods for calculatong the uncertainty of measurement. **Science and Justice**, v. 50, p. 182-186, 2010.

WEINMANN, W.; GOERNER, M.; VOGT, S.; GOERKE, R.; POLLAK, S. Fast confirmation of 11-nor-9-carboxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC-COOH) in urine by LC/MS/MS using negative atmospheric-pressure chemical ionisation (APCI). **Forensic Science International**, v. 121, p. 103-107, 2001.

YONAMINE, M.; SILVA, O. A. Confirmation of cocaine exposure by gas chromatography-mass spectrometry of urine extracts after methylation of benzoylecgonine. **Journal of Chromatography**, v. 773, p. 83-87, 2002.

YONAMINE, M. **Saliva como espécime biológico para monitorar o uso de álcool, anfetamina, metanfetamina, cocaína e maconha por motoristas profissionais**. 2004. Tese (Farmácia – Toxicologia e Análises Toxicológicas), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2004.

ANEXOS

ANEXO 1

Protocolo nº 3001 aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa

PROJETO DE PESQUISA

Título: Estudo da incerteza de medição em análises toxicológicas de substâncias psicoativas em urina
Área Temática:

Pesquisador: Mauricio Yonamine

Versão: 1

Instituição: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo

CAAE: 01659512.6.0000.0067

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Número do Parecer: 30001

Data da Relatoria: 02/04/2012

Apresentação do Projeto:

Na busca da excelência da qualidade de laboratórios analíticos, a incerteza de medição, que é a dispersão dos valores de um resultado, é uma ferramenta de fundamental importância utilizada no processo de validação. De acordo com a ISO 17025, os laboratórios devem ter e aplicar procedimentos para a estimativa de suas incertezas de medição como exigência mínima para sua implantação. Embora seja um conceito adotado há alguns anos por laboratórios de prestação de serviços, o estudo de incerteza de medição ainda é relativamente recente na descrição de novos métodos de análise toxicológica reportadas na literatura científica. Diante do exposto, este projeto tem a finalidade de estudar a incerteza de medição das análises toxicológicas confirmatórias de substâncias psicoativas em urina pela técnica de cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS). Os métodos serão desenvolvidos (otimizados e validados) e suas fontes de incerteza identificadas e mensuradas. Portanto, o desenvolvimento e implantação de um procedimento que expresse essa incerteza fornecerão às análises toxicológicas maior confiabilidade e qualidade nos seus resultados, podendo servir de referência para as demais instituições de pesquisa no país na aplicação de recursos de estatística no controle de erros associados à medição.

Objetivo da Pesquisa:

Este projeto visa o desenvolvimento de métodos analíticos para determinação de substâncias psicoativas - anfetaminas (anfetamina, metanfetamina, femproporex), 11-nor-delta-9-tetraidrocannabinol carboxílico (principal produto de biotransformação do tetraidrocannabinol - THC) e benzoilecgonina (principal produto de biotransformação da cocaína), aplicando-se os conceitos de incerteza de medição.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

A coleta de amostras de urina é considerada não-invasiva e representa risco mínimo para a saúde do doador da amostra. O doador da urina não será identificado. Apenas a empresa tem acesso a identificação do sujeito (funcionário). Não haverá benefício direto ao doador da amostra, mas a adoção, por parte de empresas, de programas de prevenção do uso de drogas no ambiente de trabalho é uma das formas de se tentar minimizar os impactos negativos do uso de drogas, que atinge não só a rentabilidade das empresas, mas gera principalmente danos à saúde dos trabalhadores. Esta pesquisa trará benefícios, a medida que possibilitará obter métodos para medir a incerteza da medição.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de uma pesquisa que vai utilizar amostras de urina proveniente de empresas conveniadas que adotam programas de prevenção e controle do uso de drogas no ambiente de trabalho. Aproximadamente 200 empresas de diferentes ramos de atividades, espalhadas por todo o país, apresentam esse tipo de programa cujas análises toxicológicas (para verificar a presença de anfetaminas, cannabinóides e metabólitos de cocaína) são realizadas no Laboratório do pesquisador responsável na Faculdade de

Ciências Farmacêuticas da USP.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O projeto está apresentado de modo adequado. O pesquisador responsável solicitou a dispensa da utilização do TCLE por ser tratar de pesquisa com drogas ilícitas. Neste tipo de pesquisa, a empresa tem um termo de custódia da amostra, cuja a identificação é um código.

As urinas com características físico-químicas consideradas dentro da normalidade (pH entre 3 e 11 e densidade entre 1.003 e 1.020) e que apresentarem resultado negativo no ensaio imunológico (teste de triagem) para canabinóides, anfetaminas e metabólitos da cocaína serão utilizadas para o processo de validação dos métodos cromatográficos. Para esta etapa está previsto um número de 50 amostras.

Recomendações:

Considero o projeto adequado e sugiro a aprovação do mesmo.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto tem relevância científica, está bem apresentado e não envolve riscos aos participantes.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Protocolo de pesquisa aprovado em reunião de 28 de maio de 2012.

Cabe ao pesquisador responsável, comunicar ao CEP:

Eventuais modificações no projeto aguardando a apreciação e aprovação do CEP;

A interrupção do projeto;

Apresentar relatório parcial e final.

ANEXO 2

Ficha do Aluno

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

FICHA DO ALUNO

9141 - 7844748/1 - Sarah Carobini Werner de Souza Eller

Email: sarahcarobini@usp.br
Data de Nascimento: 17/02/1986
Cédula de Identidade: RG - MG-13301629 - MG
Local de Nascimento: Estado de Minas Gerais
Nacionalidade: Brasileira
Graduação: Farmacêutica - Universidade Estadual da Paraíba - Paraíba - Brasil - 2011

Curso: Mestrado
Programa: Toxicologia e Análises Toxicológicas
Data de Matrícula: 01/02/2012
Início da Contagem de Prazo: 01/02/2012
Data Limite para o Depósito: 01/08/2014
Orientador: Prof(a). Dr(a). Mauricio Yonamine - 01/02/2012 até o presente. E.Mail: yonamine@usp.br
Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 01/02/2012
Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 28/03/2013
Data do Depósito do Trabalho:
Título do Trabalho:
Data Máxima para Aprovação da Banca:
Data de Aprovação da Banca:
Data Máxima para Defesa:
Data da Defesa:
Resultado da Defesa:
Histórico de Ocorrências: Ingressou no Mestrado em 01/02/2012
Matricula de Acompanhamento em 03/02/2014

Aluno matriculado nas normas vigentes a partir de 01/07/2009
 Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 03/02/2014
 Impresso em: 23/02/14 16:32:06

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

FICHA DO ALUNO

9141 - 7844748/1 - Sarah Carobini Werner de Souza Eller

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBC5813-3/1	Aplicações de Cromatografia em Análises Toxicológicas	27/02/2012	04/04/2012	60	4	90	A	N	Concluída
FBC5803-2/1	Sistemas da Garantia da Qualidade em Laboratórios Analíticos	05/03/2012	18/03/2012	30	2	100	A	N	Concluída
EDM5791-5/8	Metodologia do Ensino Superior (Faculdade de Educação - Universidade de São Paulo)	14/03/2012	29/06/2012	120	8	75	A	N	Concluída
FBC5741-6/1	Análise Toxicológica de Fármacos e Drogas que Causam Dependência	25/06/2012	29/07/2012	60	4	100	A	N	Concluída
FBF5805-1/1	Delineamento de Experimentos e Ferramentas Estatísticas Aplicadas às Ciências Farmacêuticas	02/08/2012	05/09/2012	45	3	100	A	N	Concluída
FBC5802-3/1	Tópicos Avançados em Toxicologia I	14/08/2012	26/11/2012	15	1	75	A	N	Concluída
FBC5729-7/1	Fundamentos Básicos da Avaliação do Risco Oferecido por Substâncias Químicas	23/08/2012	19/09/2012	60	4	85	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	10	25	26
Estágios:			
Total:	10	25	26

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

Conceito a partir de 02/01/1997:
A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.
Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 03/02/2014
 Impresso em: 23/02/14 16:32:06

ANEXO 3
Curriculum Vitae

Sarah Carobini Werner de Souza Eller

Curriculum Vitae

Dados pessoais

Nome Sarah Carobini Werner de Souza Eller
Filiação Henrique Werner Dutra e Maria Emilia Souza Dutra
Nascimento 17/02/1986 - Alto Jequitiba/MG - Brasil
Carteira de Identidade
 13301629 ssp - MG - 21/11/2000
CPF 080.648.446-22

Endereço profissional Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas
 Avenida Professor Lineu Prestes 580
 Cidade Universitária - Butantã - São Paulo
 05508-000, SP - Brasil

Endereço eletrônico sarahcarobini@usp.br

Formação acadêmica/titulação

2012 Mestrado em Toxicologia e Análises Toxicológicas.
 Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
 Título: Estudo da incerteza de medição em análises toxicológicas de substâncias psicoativas em urina
 Orientador: Prof. Dr. Maurício Yonamine
 Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

2006 - 2011 Graduação em Farmácia.
 Universidade Estadual da Paraíba, UEPB, Campina Grande, Brasil.
 Título: Avaliação da atividade antimicrobiana interativa de extratos vegetais
 Orientador(a): Profa. Dra. Rayssa Mayer Ramalho Catão

2010 - 2011 Graduação em Ciências Farmacêuticas.
 Universidade de Coimbra, UC, Coimbra, Portugal
 Bolsista do(a): Mobility Network Europe-Southamerica: an Institutional Approach

Formação complementar

2013 - 2013 Curso de curta duração em Method validation in forensic toxicology. XVIII Congresso Brasileiro de Toxicologia, CBTOX, Brasil.

2012 - 2012 Curso de curta duração em Incerteza de Medição. Rede Metrológica do Estado de São Paulo, REMESP, São Paulo, Brasil.

2012 - 2012 Curso de curta duração em Princípios Operacionais no software Statistica. StatSoft South América Comercio de Software Ltda, StatSoft, São Caetano Do Sul, Brasil.

2012 - 2012 Curso de curta duração em Formação de Auditores Internos ISO 19011:2002. Danilo Zanvettor Consultores Associados, HARDBISS ASSESSO, Brasil.

2011 - 2011	Prática Profissionalizante em Toxicologia. Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil.
2011 - 2011	Curso de curta duração em Toxicologia Forense Internacional. Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil.
2010 - 2010	Curso de curta duração em XIX Curso de Verão Prof. Wilson Teixeira Beraldo. Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Belo Horizonte, Brasil.
2007 - 2010	Extensão universitária em Ações Educativas em Saúde: Doenças Crônicas. Universidade Estadual da Paraíba, UEPB, Campina Grande, Brasil.
2010 - 2010	Estágio no Laboratório de Controle de Qualidade. Farmácia com Manipulação Magistral Pharma Face®, PF, Brasil.
2009 - 2010	Extensão universitária em Plantas Med. e Sistemas Orgânicos: Lab. Itinerante. Universidade Estadual da Paraíba, UEPB, Campina Grande, Brasil.
2009 - 2009	Curso de curta duração em Farmácia Clínica e Reações Adversas a Medicamentos. Conselho Regional de Farmácia, CRF, Brasil.
2007 - 2007	Extensão universitária em I Curso de Extensão em Plantas Medicinais. Universidade Estadual da Paraíba, UEPB, Campina Grande, Brasil.

Idiomas

Inglês	Compreende Razoavelmente, Fala Pouco, Escreve Razoavelmente, Lê Razoavelmente.
Espanhol	Compreende Razoavelmente, Fala Pouco, Escreve Razoavelmente, Lê Razoavelmente.

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. **ELLER, S. C. W. S.**, FEITOSA, V. A., ARRUDA, T. A., ANTUNES, R. M. P., CATÃO, R. M. R. Avaliação antimicrobiana de extratos vegetais e possível interação farmacológica *in vitro*. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicável**, In press, 2014.
2. CAVALCANTI, M. T., FLORENCIO, I. M., **ELLER, S. C. W. S.**, FEITOSA, V. A. Obtenção da farinha do fruto do juazeiro (*Ziziphus joazeiro* Mart.) e caracterização físico-química. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v.6, p.220 - 224, 2011.

Artigos completos submetidos

1. **ELLER, S. C. W. S.**, FLAIBAN, L.G., PARANHOS, B.A.P.B, LOURENÇO, F.R., COSTA, J.L, YONAMINE, M. Measurement uncertainty of 11-nor- Δ^9 -tetrahydrocannabinol-carboxylic acid analyzed in urine samples by liquid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, 2014.

Trabalhos publicados em anais de eventos (completo).

1. FEITOSA, V. A., **ELLER, S. C. W. S.**, CAVALCANTI, M. T., FLORENCIO, I. M., PIRES, V. C. F. Caracterização físico-química do fruto desidratado do juazeiro (*Ziziphus joazeiro*) In: V Congresso Latino Americano e XI Congresso Brasileiro de Higienistas de Alimentos, 2011, Salvador. **V Congresso Latino Americano e XI Congresso Brasileiro de Higienistas de Alimentos**, 2011.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. **ELLER, S. C. W. S.**, LOURENCO, F. R., FLAIBAN, L. G., PARANHOS, B. A. P. B., YONAMINE, M. Determination of 11-nor-delta-9-tetrahydrocannabinol-carboxylic acid in urine samples by applying the concepts of measurement uncertainty In: XVIII Congresso Brasileiro de Toxicologia, 2013, Porto Alegre - RS. **XVIII Congresso Brasileiro de Toxicologia**, 2013.

2. **ELLER, S. C. W. S.** Estimation of the measurement uncertainty of 11-nor-delta-9-tetrahydrocannabinol-carboxylic acid in urine In: XVIII Semana Farmacêutica de Ciência e tecnologia, 2013, São Paulo - SP. **XVIII Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia**, 2013.

3. **ELLER, S. C. W. S.**, NUNES, L. E., FERNANDES, A. F. C., RICARDO, B. C., ARRUDA, T. A., CATAO, R. M. R. Atividade antimicrobiana interativa in vitro entre extratos vegetais In: XXI Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 2010, João Pessoa. **XXI Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**, 2010.

4. **ELLER, S. C. W. S.**, FEITOSA, V. A., ARRUDA, T. A., CATAO, R. M. R. Estudo da atividade antimicrobiana interativa in vitro de extratos vegetais In: X Congresso Nacional de Doenças Infecciosas e Microbiologia Clínica / VII Congresso Nacional sobre SIDA, 2010, Coimbra. **X Congresso Nacional de Doenças Infecciosas e Microbiologia Clínica**, 2010.

5. VILAR, M., **ELLER, S. C. W. S.**, FEITOSA, V. A., FIALHO, G. J. D., NUNES, L. E., PACHU, C. O. Avaliação preliminar da utilização empírica de plantas medicinais por dirigentes de sociedades de amigos de bairro da Cidade de Campina Grande In: Encontro Nordestino de Etnoecologia e Etnobiologia, 2009, Campina Grande - PB. **Encontro Nordestino de Etnoecologia e Etnobiologia**, 2009.

6. APOLINÁRIO, A. C., **ELLER, S. C. W. S.**, FEITOSA, V. A., FIALHO, G. J. D., NUNES, L. E., COSTA, M. A. A., BELEM, L. F. Relato de Experiência na Implantação do Componente Curricular Uso Racional de Medicamentos no Curso de Farmácia Generalista da Universidade Estadual da Paraíba UEPB. In: III Congresso Brasileiro sobre o Uso Racional de Medicamentos, Fortaleza - CE. **III Congresso Brasileiro sobre o Uso Racional de Medicamentos**, 2009.

7. **ELLER, S. C. W. S.**, APOLINÁRIO, A. C., FIALHO, G. J. D., NUNES, L. E., PACHU, C. O. Tentativa de controle do tabagismo na cidade de Remígio-PB por acadêmicos do curso de Farmácia através do programa Laboratório Itinerante In: 4ª Semana de Extensão Universitária da Universidade Estadual da Paraíba, 2009, Campina Grande. **Políticas Públicas e Compromisso Social**, 2009.

8. **ELLER, S. C. W. S.**, APOLINÁRIO, A. C., FERNANDES, A. F. C., NUNES, L. E., PACHU, C. O. Trabalhos Educativos em Saúde com jovens do ensino médio de escola pública da cidade de Campina Grande - PB In: 4ª Semana de Extensão Universitária da Universidade Estadual da Paraíba, 2009, Campina Grande. **Políticas Públicas e Compromisso Social**, 2009.

9. **ELLER, S. C. W. S.**, NUNES, L. E., FEITOSA, V. A., APOLINÁRIO, A. C., PACHU, C. O. Álcool e tabaco como agentes causadores do infarto In: XI Simpósio Internacional sobre Tratamento de Tabagismo / VII Simpósio Internacional sobre Álcool e Outras Drogas, 2008, Rio de Janeiro - RJ. **XI Simpósio Internacional sobre Tratamento de Tabagismo / VII Simpósio Internacional sobre Álcool e Outras Drogas**, 2008.

10. **ELLER, S. C. W. S.**, FEITOSA, V. A., FERNANDES, A. F. C., NUNES, L. E., PACHU, C. O. Avaliação do grau de conhecimento de estudantes de uma escola pública em relação ao infarto In: Congresso de Biomedicina e Farmácia - ASCES, 2008, Caruaru - PE. **Congresso de Biomedicina e Farmácia - ASCES**, 2008.
11. NUNES, L. E., **ELLER, S. C. W. S.**, APOLINÁRIO, A. C., FIALHO, G. J. D., Jales, D. F. A., PEQUENO, A. S., Queiroz, M. S. R. Avaliação do Uso de Ácido Acetilsalicílico(AAS) em Portadores de Diabetes Mellitus In: 3º Seminário Multidisciplinar Sobre Diabetes, 2008, Campina Grande - PB. **3º Seminário Multidisciplinar Sobre Diabetes**, 2008.
12. **ELLER, S. C. W. S.**, APOLINÁRIO, A. C., FIALHO, G. J. D., NUNES, L. E., QUEIROZ, M. S. R. Avaliação do Uso de Hipoglicemiantes e Diuréticos em Portadores de Diabetes Mellitus Tipo 2 In: 3º Seminário Multidisciplinar Sobre Diabetes, 2008, Campina Grande. **3º Seminário Multidisciplinar Sobre Diabetes**, 2008.
13. **ELLER, S. C. W. S.**, NUNES, L. E., FERNANDES, A. F. C., FEITOSA, V. A., PACHU, C. O. Infarto: uma abordagem educativa In: IV Seminário Internacional de Atenção Primária/Saúde da Família/III Mostra Nacional de Produção em Saúde da Família, 2008, Brasília. **IV Seminário Internacional de Atenção Primária/Saúde da Família/III Mostra Nacional de Produção em Saúde da Família**, 2008.
14. FERNANDES, A. F. C., NUNES, L. E., **ELLER, S. C. W. S.**, PACHU, C. O. O infarto como tema de discussão em uma escola pública In: 3ª Semana de Extensão da Universidade Estadual da Paraíba, 2008, Campina Grande - PB. **3ª Semana de Extensão da Universidade Estadual da Paraíba. Campina Grande**. Campina Grande: Editora da Universidade Estadual da Paraíba, 2008.
15. **ELLER, S. C. W. S.**, NUNES, L. E., FERNANDES, A. F. C., JUNIOR, E. F. P., PACHU, C. O. Que doença é essa: Infarto In: II Semana de Extensão - Extensão, Cidadania e Diversidade Cultural, 2007, Campina Grande. **II Semana de Extensão - Extensão, Cidadania e Diversidade Cultural**, 2007.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo expandido)

1. **ELLER, S. C. W. S.**, FEITOSA, V. A., CAVALCANTI, M. T., FLORENCIO, I. M., DANTAS, J. P. Caracterização físico-química das brácteas e miolo da macambira (*BROMELIA LACINIOSA*) In: VII Seminário Nacional da Agroindústria (SEMIAGRO) / IV Jornada Nacional da Agroindústria, 2010, Bananeiras - PB. **VII Seminário Nacional da Agroindústria (SEMIAGRO) / IV Jornada Nacional da Agroindústria**, 2010.

Apresentação de trabalho e palestra

1. **ELLER, S. C. W. S.**, LOURENÇO, F. R., PARANHOS, B. A. P. B., FLAIBAN, L. G., YONAMINE, M. **Determination of 11-nor-delta-9-tetrahydrocannabinol-carboxylic acid in urine samples by applying the concepts of measurement uncertainty**, 2013. (Congresso, Apresentação de Trabalho).
2. **ELLER, S. C. W. S.**, APOLINÁRIO, A. C., FIALHO, G. J. D., NUNES, L. E. **Tentativa de controle do tabagismo na cidade de Remígio-PB por acadêmicos do curso de Farmácia através do programa Laboratório Itinerante**, 2009. (Comunicação, Apresentação de Trabalho).
3. **ELLER, S. C. W. S.**, APOLINÁRIO, A. C., FERNANDES, A. F. C., NUNES, L. E., PACHU, C. O. **Trabalhos Educativos em Saúde com jovens do ensino médio de escola pública da cidade de Campina Grande-PB**, 2009. (Outra, Apresentação de Trabalho).
4. **ELLER, S. C. W. S.**, NUNES, L. E., FERNANDES, A. F. C., PACHU, C. O. **Faixa Etária e os Riscos de Infarto**, 2008. (Seminário, Apresentação de Trabalho).

Demais produções bibliográficas

1. **ELLER, S. C. W. S.**

Avaliação da atividade antimicrobiana interativa de extratos vegetais. Monografia. , 2010. (Outra produção bibliográfica)

Produção técnica

Demais produções técnicas

1. **ELLER, S. C. W. S.**

II Escola de Inverno em Toxicologia, 2013. (Extensão, Curso de curta duração ministrado)

Eventos

Participação em eventos

1. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XVIII Congresso Brasileiro de Toxicologia**, 2013. (Congresso) Determination of 11-nor-delta-9-tetrahydrocannabinol-carboxylic acid in urine samples by applying the concepts of measurement uncertainty.

2. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XVIII Semana Farmacêutica de Ciência e tecnologia/ XLVIII Semana Universitária de Farmácia e Bioquímica / 5 Simposio Anual de Pesquisas em Ciências Farmacêuticas**, 2013. (Simpósio) Estimation of the measurement uncertainty of 11-nor-delta-9-tetrahydrocannabinol-carboxylic acid in urine.

3. **Recentes avanços no screening toxicológico e análise anti-doping com técnicas de espectrometria de massa de alta resolução e massa exata**, 2013. (Outra).

4. **Curso de interpretação da norma ABNT NBR NM ISO 15189:2008 - Laboratórios de análises clínicas - Requisitos especiais de qualidade e competência**, 2013. (Outra).

5. **Procedures for the detection of alcohol and/or other drugs in biological matrices from DUI suspected drivers**, 2012. (Outra).

6. **IV Simpósio de Pós Graduação em Análises Clínicas**, 2012. (Simpósio).

7. **Road Show de Consumíveis 2012 da Agilent Technologies Brasil**, 2012. (Outra).

8. **X Simpósio de biossegurança e descartes de produtos químicos perigosos em instituições de ensino e pesquisa**, 2011. (Simpósio).

9. **XLVI Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica**, 2011. (Outra).

10. **Debate Farmacêutico: "Chegas ao fim, e depois?" - Núcleo de Estudantes de Farmácia/ Associação Acadêmica de Coimbra**, 2011. (Outra).

11. **I Jornadas Ibéricas de Toxicologia (Toxicologia Forense) da Universidade de Beira Interior**, 2011. (Outra).

12. **Jornadas em Farmácia: Saúde Reprodutiva e Contracepção - ESTESL**, 2011. (Outra).

13. **Ciclo de Divulgação - Investigação Clínica da Iniciativa do Investigador - AIBILI**, 2011. (Encontro).

14. **II Jornadas do Departamento de Farmácia - ESTESC. Veiculação de Fármacos: da Investigação à Aplicação**, 2011. (Outra).

15. **X Congresso Nacional de Doenças Infecciosas e Microbiologia Clínica e VIII Congresso Nacional sobre SIDA**, 2010. (Congresso).

. 16. **Conferência do Centro de Estudos Farmacêuticos da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra**, 2010. (Encontro).

17. **IV Semana de Extensão da UEPB - Extensão, Políticas Públicas e Compromisso Social**, 2009. (Congresso).

18. **III Semana de Extensão da UEPB - Extensão, Educação e Desenvolvimento Regional**, 2008. (Encontro).

19. **3º Seminário Multidisciplinar Sobre Diabetes - Cuidar da Diabetes Humanizando o Diabético**, 2008. (Seminário).

20. **II Semana de Extensão da UEPB - Extensão, Cidadania e Diversidade Cultural**, 2007. (Encontro).

Organização de evento

1. **ELLER, S. C. W. S., FEITOSA, V. A. Curso de Microbiologia: Uma Abordagem Multidisciplinar**, 2010. (Outro, Organização de evento).

2. **II Escola de Inverno em Toxicologia**, Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP. 2013 (Organização de evento)