**Brazilian Journal of Forensic Sciences,
Medical Law and Bioethics**

Journal homepage: www.ipebj.com.br/forensicjournal

**Estimativa da Incerteza de Medição em Análises de
Benzoilecgonina em Urina por GC-MS**

**Estimation of Measurement Uncertainty in Benzoylecgonine
Analysis in Urine by GC-MS**

Sarah C. W. S. E. Franco de Oliveira^{1*}, Lígia Yuki Takai¹, Tiago Franco de Oliveira¹,
Mauricio Yonamine¹

¹ *Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas,
Universidade de São Paulo.*

** Corresponding author: Av. Professor Lineu Prestes, 580, Bloco 13B. CEP: 05508-000, São Paulo,
SP, Brazil. Fone: +55 11 3091 2194; Fax: +55 11 30319055. E-mail: sarahcarobini@usp.br*

Received

Abstract: Epidemiological studies indicate that the consumption of illegal substances is associated with a serious public health problem. To sum up, the present situation demands an immediate action, with major focus on reliable analytical methods which can be capable of detecting such compounds in biological fluids. Furthermore, the application of drug analysis in urine has increased significantly and for this reason, forensic toxicologists are being asked to determine and report their measurement uncertainty (MU) in drug analysis. The purpose of this study was to estimate the MU of confirmatory toxicological analysis of benzoylecgonine in urine by GC-MS. The limit of detection was 5.0 ng.ml⁻¹. The calibration curves were linear over the specified range (7.5 – 3200 ng.ml⁻¹; r^2 0.99). The effect of the accuracy on the overall combined uncertainty was most significant. The developed method was successfully applied to a human urine standard reference material. The obtained relative combined uncertainty was 4.8 %. The MU obtained is in accordance with the acceptable values and are also consistent with the values stipulated by certificate of analysis of NIST reference samples. Therefore, this method is relevant and the obtained result has reliability and quality.

Keywords: Measurement uncertainty; Cocaine; Urine; GC-MS.

Resumo. Estudos epidemiológicos indicam que o consumo de substâncias ilegais está associada a um sério problema de saúde pública. Em suma, a situação atual exige uma ação imediata, com grande foco em métodos analíticos confiáveis e capazes de detectar estes compostos em matrizes biológicas. Além disso, a aplicação da análise de drogas em urina tem aumentado significativamente e, por essa razão, toxicologistas forenses estão sendo solicitados a estimar e reportar a incerteza de medição (MU) em análises toxicológicas. O objetivo deste estudo foi estimar a MU das análises toxicológicas confirmatórias de benzoilecgonina em urina por GC-MS. O limite de detecção foi de 5,0 ng.mL⁻¹. As curvas de calibração foram lineares para o intervalo especificado (7,5-3200 ng.mL⁻¹; r^2 0,99). O efeito da precisão na incerteza global combinada foi mais significativa. O método desenvolvido foi aplicado com sucesso em amostras de urina de referência (NIST), e a incerteza combinada relativa obtida foi de 4,8%. A MU obtida está de acordo com os valores aceitáveis e também são consistentes com os valores estipulados pelo certificado de análise de amostras de referência NIST. Por conseguinte, este método é relevante e o resultado obtido tem confiabilidade e qualidade.

Palavras-chave: Incerteza de medição; Cocaína; Urina; GC-MS.

1. Introdução

O consumo de drogas ilícitas é considerado um grande problema de saúde pública. Segundo o último relatório publicado pelo *United Nations Office on Drugs and Crime* (UNODC), estima-se que no ano de 2012, entre 167 – 315 milhões de pessoas (3,6 – 6,9% da população mundial) utilizaram algum tipo de droga de abuso ao menos uma vez no ano¹. Dentre as principais substâncias psicoativas, destaca-se a cocaína, uma droga altamente viciante considerada um potente estimulante natural, com uma prevalência de consumo que abrange 14 – 21 milhões de pessoas anualmente^{1,2}.

A cocaína é o principal alcalóide obtido a partir das folhas da planta *Erythroxylum coca*, sendo caracterizada como uma droga psicotrópica consumida principalmente, por seus efeitos neurológicos imediatos que incluem a euforia, a redução da fadiga e o aumento da acuidade mental³. Quando consumida, essa substância é rapidamente metabolizada e convertida, quase em sua totalidade, em produtos de biotransformação, sendo 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 seu principal produto de biotransformação, a benzoilecgonina (Figura 1), é usualmente monitorado em amostras de urina para verificar a exposição à cocaína⁴⁻⁶. A urina, por sua vez, é considerada a matriz biológica de escolha para monitorar o uso de drogas ilícitas, pois apresenta coleta simples, de forma não invasiva, além de possuir uma ampla janela de detecção quando comparada ao sangue, permitindo a análise de substâncias com um intervalo de tempo maior entre a exposição e o procedimento laboratorial⁷⁻⁹.

Figura 1. Estrutura molecular da cocaína (A) e da benzoilecgonina (B)

A correta análise de substâncias psicoativas torna-se importante para a compreensão dos resultados emitidos por serviços que envolvem a toxicologia clínica e forense, o controle de dopagem nos esportes e a monitorização do consumo de drogas no ambiente de trabalho^{7,8,10}. Segundo a definição do *Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement* (GUM) publicado em 1993, a incerteza de medição (MU) é o parâmetro, associado ao resultado de uma medição, que caracteriza a dispersão dos valores que podem ser razoavelmente atribuídos ao mensurando¹¹. Com base neste conceito outros guias relatando a MU foram elaborados e desde a publicação da norma ISO 17025, que estabelece que os laboratórios devem ter e aplicar procedimentos para a estimativa da MU, o interesse por métodos de determinação da incerteza tem crescido consideravelmente. A estimativa da MU é uma ferramenta utilizada para avaliar a qualidade dos resultados fornecendo informações para a avaliação de conformidade de um produto ou laudo e possibilita também a identificação dos fatores que podem ter influência estatisticamente relevante no resultado do ensaio. As consequências de erros no campo analítico carregam um grande peso, pois podem servir de base para a admissão, análise e interpretação errônea de uma evidência, dessa forma, a MU auxilia na implementação de um controle adequado para reduzir os erros associados à análise, assegurando a garantia da qualidade do processo e sua melhoria contínua¹²⁻¹⁷.

Embora a determinação da incerteza já seja aplicada há algum tempo em diversos serviços como requisito da garantia de qualidade, há poucos relatos na literatura científica abordando a sua estimativa nas análises toxicológicas. Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo estimar a MU em análises de benzoilecgonina em amostras de urina pela técnica de cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS).

2. Material e métodos

2.1 Reagentes e materiais

Todas as substâncias empregadas neste trabalho são do mais alto grau de pureza disponível comercialmente. Os padrões de benzoilecgonina (1 mg.mL^{-1}) e benzoilecgonina- d_3 ($100 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$) em conjunto com os relatórios de análise, indicando o grau de pureza e as incertezas da análise, foram obtidos da empresa Cerilliant Corporation (Round Rock, EUA). As soluções de trabalho, nas concentrações de 10 e $100 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$, foram preparadas através de sucessivas diluições do padrão comercial com metanol, sendo posteriormente armazenadas sob refrigeração ($2-8 \text{ }^{\circ}\text{C}$). Todos os outros reagentes utilizados foram adquiridos da empresa Merck (Darmstadt, Alemanha). Para a extração em fase sólida (SPE), foram utilizados cartuchos fornecidos pela empresa Agilent Technologies Inc. (Wilmington, EUA). A água utilizada foi deionizada em um sistema Milli-Q da empresa Millipore (Bedford, EUA). A vidraria e os equipamentos foram calibrados em empresas acreditadas pela RBC (Rede Brasileira de Calibração), e seus laudos foram emitidos com valores de incerteza expandida e fator de abrangência.

2.2 Análise instrumental e aquisição de dados

As análises foram realizadas em um equipamento de cromatografia gasosa modelo Focus GC acoplado a espectrômetro de massas do tipo *Ion Trap* modelo Focus Polaris Q ambos da empresa Thermo Fischer Scientific (Bremen, Alemanha). O cromatógrafo gasoso foi equipado com a coluna capilar de sílica fundida HP-5MS ($30 \text{ m} \times 0,25 \text{ }\mu\text{m} \times 0,1 \text{ }\mu\text{m}$) (Agilent Technologies Inc.; Wilmington, EUA), utilizando hélio como gás de arraste a um fluxo constante de $0,6 \text{ mL.min}^{-1}$. As temperaturas do injetor e da linha de transferência foram selecionadas a $250 \text{ }^{\circ}\text{C}$. A programação da temperatura do forno foi $150 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (1 min), $10 \text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até $270 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (4 min), com um tempo total de corrida de 17 minutos. Injeções com o volume de $1,0 \text{ }\mu\text{L}$ foram feitas

no modo *splitless*. O espectrômetro de massas foi operado com ionização por elétrons em uma voltagem de 70 eV, no modo *full scan*, com seleção de massas no intervalo de m/z 50 - 550. Os íons m/z 361/240/82 e m/z 364/243/85 foram escolhidos para a quantificação e qualificação da benzoilecgonina e seu respectivo padrão interno. Os dados foram processados utilizando-se o *software* Xcalibur™ (Thermo Fischer Scientific, Bremen, Alemanha). A confecção dos cromatogramas e dos espectros de massas foi realizada através da plotagem dos dados brutos no programa Microsoft Excel® 2010.

2.3 Amostras

O cálculo da incerteza foi realizado com a análise de amostras obtidas do *National Institute of Standards & Technology* (NIST). Foi utilizado o material de referência SRM1508a - NIST, contendo: três frascos de urina liofilizada com diferentes concentrações de benzoilecgonina e uma urina isenta do analito, sendo respectivamente identificadas como amostras 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. Cada amostra estava acompanhada do laudo da análise emitido previamente pela NIST com a indicação da concentração, da incerteza da análise e do método pelo qual foi realizada a quantificação do analito na urina.

2.4 Preparo da amostra

A extração da benzoilecgonina foi realizada conforme o método proposto por Yonamine⁶, com adaptações. Para a realização deste procedimento foram utilizados cartuchos de SPE contendo fase mista, Bond Elut Certify 130MG/3ML, condicionados previamente com 2 mL de metanol e 2 mL de tampão fosfato de sódio 0,1% pH 6,0. Após o condicionamento inicial, foram transferidas para os cartuchos soluções contendo 2,5 mL de urina, 2 mL de água destilada e 37,5 µL de padrão interno (benzoilecgonina-*d*3, 100 µg.mL^{-1}). Os cartuchos foram lavados com 6 mL de água destilada, 3 mL de HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e 3 mL de metanol, sucessivamente. A eluição do analito foi realizada com 3,0 mL de uma solução contendo diclorometano/isopropanol/hidróxido de sódio (12:3:0,3 mL), recém preparada. O eluato foi evaporado a 40 °C sob fluxo de nitrogênio. O extrato seco foi derivatizado com 25 µL de N,O-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) (com 1% de

triclorometilsilano) e 25 µL de acetato de etila. A derivatização ocorreu por 15 minutos no bloco de aquecimento a 90 °C. O volume residual final foi transferido para um vial e 1 µL foi injetado no sistema analítico.

2.5 Validação do método

O método foi validado, estabelecendo-se os parâmetros de limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), linearidade, exatidão, precisão intra e inter-dia e recuperação de acordo com guias nacionais e internacionais^{13,18-23}.

2.6 Estimativa da MU

A estimativa da MU foi realizada de acordo com o Guia EURACHEM / CITAC e o "Guia para a expressão da incerteza de medição"^{13,24}. Resumidamente, para calcular a incerteza expandida (*UE*), possíveis fontes de incerteza (volume de amostra, concentração de benzoilecgonina na amostra e precisão do método) foram identificadas utilizando o diagrama de Ishikawa, também conhecido como diagrama causa e efeito. A incerteza padrão (*u*) de cada estimativa de entrada foi determinada e, em seguida, calculou-se a incerteza combinada (*uc*), que consiste na soma quadrática das diversas incertezas padrão apresentadas. Finalmente, a incerteza expandida (*UE*) foi determinada pela multiplicação da *uc* por um fator de abrangência apropriado (*k*) obtido a partir da tabela de distribuição *t-Student*.

3. Resultados e discussão

3.1 Validação do método

Os limites (LOD/LOQ) foram verificados através do método empírico, que por sua vez, é constituído pela análise sistemática de amostras de urina reconhecidamente negativas fortificadas com concentrações conhecidas do analito (n=6). O LOD se manteve em 5 ng.mL⁻¹ (CV%; 15,4) enquanto o limite de quantificação medido foi de 7,5 ng.mL⁻¹ (CV%; 11,7). 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) recomendado pelo *Department of Health and Human Services* para análises confirmatórias em urina²⁵. A curva de calibração manteve-se linear no intervalo de concentração estudado. A equação da regressão linear e o coeficiente de determinação foram: $y = 0,0045x + 0,0985$ e $r^2 = 0,9916$.

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 ANVISA¹⁸. Outros parâmetros foram avaliados e estão descritos na **Tabela 1**.

Tabela 1. Validação do método para determinação de benzoilecgonina em amostras de urina. CV% coeficiente de variação, C1 20 ng.ml-1, C2 1290 ng.ml-1, C3 2560 ng.ml-1.

Parâmetros	Resultados	
Precisão intra-dia (CV%)	C1	13,5
	C2	7,6
	C3	8,4
Precisão inter-dia (CV%)	C1	15,6
	C2	5,0
	C3	11,5
Recuperação (%)	C1	84,6
	C2	84,4
	C3	72,7
Exatidão (%)	C1	110
	C2	108
	C3	109,1

3.2 Cálculo da incerteza de medição

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

Na Figura 2 e na Figura 3 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 2. 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 ng.mL⁻¹); SRM1508a-2 (urina de referência contendo 164,3 ng.mL⁻¹); SRM1508a-3 (urina de referência contendo 312,8 ng.mL⁻¹). Em todas as amostras foram adicionados padrão interno na concentração de 150 ng.mL⁻¹

Figura 3. Espectro de massas da benzoilecgonina derivatizada. Íon quantificador da benzoilecgonina (240); Íons qualificadores da benzoilecgonina (82-361); Íon quantificador da benzoilecgonina-d3 (243); Íon qualificadores da benzoilecgonina-d3 (85-364).

Através do Diagrama de Ishikawa (Figura 4) foi possível determinar as variáveis mais significativas para a estimativa da MU, e estas foram expressas na seguinte equação matemática [Eq. (1)]:

$$uC_{benzoilecgonina} = \frac{Co}{V} \times P \times A \text{ (ng.mL}^{-1}\text{)}, \quad (1)$$

onde Co é a concentração de benzoilecgonina na amostra (obtida através da curva de calibração $y = ax + b$), V o volume da amostra, P é a precisão do método e A acurácia do método. Em seguida, cada fonte de incerteza foi calculada separadamente como descrito a seguir.

3.2.1 Incerteza da precisão do método

A incerteza da precisão foi calculada pela razão entre o desvio padrão combinado (sp) e a raiz quadrada do número de medidas independentes (m) [Eq. (2)]:

$$u_{Prec} = \frac{sp}{\sqrt{m}}, \quad (2)$$

sendo sp calculado pela Eq. (3):

Figura 4. Diagrama de causa e efeito (Ishikawa) da análise de benzoilecgonina em urina, indicando as contribuições das principais fontes de incerteza na quantificação do analito.

$$sp = \sqrt{\frac{\sum vi \times si^2}{\sum vi}} = 0,0019, \quad (3)$$

onde 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. O valor de u_{Prec} foi 0,0011. Para calcular ur_{Prec} é calculado por [Eq. (4)]:

$$ur_{Prec} = \frac{u_{Prec}}{\text{Concentração do controle}} = \frac{0,0011}{20} = 0,0001 \quad (4)$$

3.2.2 Incerteza da concentração

De acordo com o diagrama, a incerteza da concentração ($u_{Concentração}$) foi calculada como descrito a seguir [Eq. (5)]:

$$u_{Concentração} = \sqrt{u^2_{PD} + u^2_{PI} + u^2_{Cur}} , \quad (5)$$

onde uPD é a incerteza da diluição do padrão, uPI a incerteza da diluição do padrão interno e $uCurv$ a incerteza da curva de calibração. Os cálculos de uPD e uPI estão detalhados na Tabela 2.

Tabela 2. Sumário do cálculo da incerteza da diluição do padrão (uPD) e da incerteza da diluição do padrão interno (uPI) para benzoilecgonina em urina.

1. Incerteza da diluição do padrão (uPD)
$(uPD) = \sqrt{\left(\frac{uPD}{pureza}\right)^2 + \left(\frac{u200}{volume}\right)^2 + \left(\frac{u1000}{volume}\right)^2}$ $= \sqrt{\left(\frac{0,0030}{0,997}\right)^2 + \left(\frac{0,0002}{200}\right)^2 + \left(\frac{0,001}{1000}\right)^2} = 0,0030$
2. Incerteza da diluição do padrão interno (uPI)
$(uPI) = \sqrt{\left(\frac{uPI}{pureza}\right)^2 + \left(\frac{u100}{volume}\right)^2 + \left(\frac{u1000}{volume}\right)^2}$ $= \sqrt{\left(\frac{0,0030}{0,994}\right)^2 + \left(\frac{0,0005}{100}\right)^2 + \left(\frac{0,001}{1000}\right)^2} = 0,0030$
3. Incerteza da pureza dos padrões, pipeta de 200 μ L, 100 μ L e de 1000 μ L.
$u(PD) = 0,006/2 = 0,0030$
$u(PI) = 0,006/2 = 0,0030$
$u(pipeta200) = 0,0004/2 = 0,0002$
$u(pipeta100) = 0,001/2,15 = 0,0005$
$u(pipeta1000) = 0,002/2 = 0,0010$

A equação da curva de calibração foi dada por: $y = 0,0057x + 0,2685$. Assim, a incerteza da curva foi calculada de acordo com a Eq. (6):

$$uCurv = \frac{s}{a} \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(Co-\bar{x})^2}{Sxx}} = 1,4664 \quad (6)$$

$$urCurv = \frac{uCurv}{Co} = 1,4664/164,3 = 0,0089 \quad (7)$$

O desvio padrão residual (S) é dado pela Eq. (8) e a soma dos quadrados dos resíduos (S_{xx}) dado pela Eq. (9):

$$S = \sum n \frac{[y - (b + a.x)]^2}{n-2} = 0,0115, \quad (8)$$

$$S_{xx} = \sum n(x_i - \bar{x})^2 = 7151245,0, \quad (9)$$

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 benzoilecgonina na amostra teste, x_i é cada concentração da curva de calibração, $\bar{x}$ é a média das concentrações da curva de calibração e S_{xx} a soma dos quadrados dos resíduos.

A incerteza da concentração é então calculada utilizando a Eq. (5):

$$u_{Concentração} = \sqrt{(0,0030)^2 + (0,0030)^2 + (0,0089)^2} = 0,0099$$

3.2.3 Incerteza do volume de amostra

A única variável significativa na incerteza do volume de urina é a pipeta utilizada. Portanto, o cálculo foi baseado na incerteza desta pipeta, que é dado pelo laudo de calibração, sendo $U_{certificado}$ a incerteza expandida e k o fator de abrangência emitidos no laudo [Eq. (10)].

$$uV = u_{10} = \frac{U_{certificado}}{k} = \frac{0,004}{2,20} = 0,0018$$

A incerteza relativa do volume (urV) é a razão da incerteza padrão pelo volume de urina utilizado [Eq. (10)]:

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

3.2.4 Incerteza da acurácia do método

A incerteza da acurácia foi calculada usando a Eq. (11):

$$uAc = Ac \sqrt{\left(\frac{s_{am}}{C_{am}}\right)^2 + \left(\frac{u_{ref}}{C_{ref}}\right)^2}, \quad (11)$$

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 6,8.

Então, $Ac = 164,3/161,0 = 1,02$ e uAc , de acordo com a Eq. 11, é dada por:

$$uAc = 1,02 \sqrt{\left(\frac{0,074}{164,3}\right)^2 + \left(\frac{6,8}{161,0}\right)^2} = 0,0431.$$

Para avaliar se o erro do método é significativo, calculamos o valor de t [Eq. (12)]:

$$t = \left| \frac{1-Ac}{uAc} \right| = \left| \frac{1-1,02}{0,0431} \right| = 0,4640. \quad (12)$$

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 0,4640 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.

3.2.5 Incerteza combinada (u_c)

Para determinarmos a incerteza padrão combinada da (u_c) foi utilizada a Eq. (13):

$$\begin{aligned} u_{c,benzolilecgonina} &= C \sqrt{uCo^2 + uPrec^2 + uV^2 + uAc^2} \\ &= 164,3 \sqrt{0,0099^2 + 0,0001^2 + 0,0007^2 + 0,0431^2} = 38,1091 \end{aligned} \quad (13)$$

3.2.6 Incerteza expandida (UE)

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 $4,85 \times 10^9$ pela equação de Welch-Satterthwaite. Então, $k=2$ foi aceito para o cálculo da incerteza expandida, com nível de confiança de 95%.

Portanto, a concentração de benzoilecgonina em uma amostra de urina com sua incerteza expandida foi de $164,3 \pm 14,5 \text{ ng.mL}^{-1}$.

Diferentes fontes de incerteza foram avaliadas no intuito de determinar 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. A acurácia do método foi a fonte de entrada mais significativa na incerteza de medição do método de benzoilecgonina (Figura 5).

Figura 5. 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 (uc_{max}) 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.

4. Conclusão

Nesse estudo foi demonstrado o procedimento e resultado para o cálculo da incerteza de medição na determinação de benzoilecgonina na urina. 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%. Este valor de incerteza de medição está de acordo com as normas e referências internacionais e também é condizente com o valor estipulado pela NIST no laudo de análise da amostra de referência, o que confirma que o método é aplicável e o resultado gerado possui confiabilidade e qualidade.

Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq 470829/2012-5, Brasil) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES Pró-Forenses AUXPE 3419/2014).

Referências

1. United Nations Office on Drugs and Crime. World Drug Report 2014. <http://www.unodc.org/wdr2014/>. Acesso em Maio de 2015.
2. Alvear E, Von Baer D, Mardones C, Hitschfeld A.. J. Forensic. Leg. Med. 2014, 23, 37. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jflm.2014.01.003>

3. Goldstein RA, DesLauriers C, Burda A, Johnson-Arbor K, Semin. Diagn. Pathol. 2009, 26, 10. <http://dx.doi.org/10.1053/j.semdp.2008.12.001>
4. Lu Y, O'Donnell RM, Harrington PB. Forensic Sci. Int. 2009, 189, 54. <http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2009.04.007>
5. Paterson S, Lee S, Cordero R. Forensic Sci. Int. 2010, 194, 94. <http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2009.10.018>
6. Yonamine M. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.
7. Frederick DL. Clin. Lab. Med. 2012, 32, 467. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cl.2012.06.009>
8. Peters FT, Drvarov O, Lottner S, Spellmeier A, Rieger K, Haefeli WE, Maurer HH. Anal. Bioanal. Chem. 2009, 393, 735. <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-008-2471-4>
9. Jagerdeo E, Montgomery MA, Karas RP, Sibum M. Anal. Bioanal. Chem. 2010, 398, 329. <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-010-3918-y>
10. Kataoka H.; Anal. Bioanal. Chem. 2010, 396, 339. <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-009-3076-2>
11. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO). Avaliação de dados de medição - Guia para a expressão de incerteza de medição – GUM 2008. http://www.inmetro.gov.br/inovacao/publicacoes/gum_final.pdf. Acesso em Maio de 2015.
12. De La Cruz MHC, Rodrigues JM, Couto PRG, Cunha VS. Quim. Nova 2010, 7 1578. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422010000700027>
13. Eurachem. EURACHEM/CITAC Guide. Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement. 2^a ed. (2010). <http://www.citac.cc/QUAM2000-1.pdf>14. Acesso em Maio de 2015.
14. International Organization for Standardization, ISO/TS 21748; Guidance for the use of repeatability, reproducibility and trueness estimates in measurement uncertainty estimation. Genève, 2004.
15. Associação Brasileira de Normas Técnicas, NBR ISO/IEC 17025; Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração, 2^a ed., Rio de Janeiro, 2005.
16. Lourenco FR, Kaneko TM, Pinto TJA. Braz. J. Pharm. Sci. 2005, 41, 437.
17. Buchmann JH, Sarkis JES. Quim. Nova 2002, 25, 111. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422002000100019>
18. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA; RE nº 899 de 29/05/2003: Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos, Ministério da Saúde: Brasil 2003.
19. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO); Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos, DOQ-CGCRE-008: Rio de Janeiro, Revisões 01, de 03/2003; 02, de 06/2007; 03, de 02/2010.
20. Peters FT, Maurer HH. Accred. Qual. Assur. 2002, 7, 441. <http://dx.doi.org/10.1007/s00769-002-0516-5>

21. Lebeau MA. Clarke's Analysis of Drugs and Poisons. Moffat AC, Osselton MD, Widdop B, Watts J, eds.; Pharmaceutical Press: London, 2011.
22. http://www.unodc.org/documents/scientific/validation_E.pdf. Acesso em Maio de 2015.
23. Cassiano NM, Barreiro JC, Martins LRR, Oliveira RV, Cass QB. Quim. Nova 2009, 32, 1021. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422009000400033>
24. Instituto Nacional de Metrologia. Normatização e Qualidade Industrial (INMETRO); Guia para a expressão da incerteza de medição; ISO GUM, 2a ed., Rio de Janeiro, 2005.
25. Moffat AC, Osselton MD, Widdop, B, Watts, J. Clarke's Analysis of Drugs and Poisons, 4th ed., Pharmaceutical Press: London, 2011.