

PROJETO DE PESQUISA

CONTRIBUIÇÕES DA CIÊNCIA PARA EVOLUÇÃO DO SISTEMA ANTIDOPAGEM BRASILEIRO

RELATÓRIO FINAL DE ATIVIDADES

**LABORATÓRIO BRASILEIRO DE CONTROLE DE DOPAGEM
LBCD – LADETEC / IQ – UFRJ**

JULHO DE 2023

1 – INTRODUÇÃO GERAL

O presente documento relata os resultados e conclusões do projeto intitulado “Contribuições da ciência para evolução do Sistema Antidopagem Brasileiro”.

Como apresentado no projeto original, a proposta se dividiu em dez (10) subprojetos, com objetivos específicos que, sinergicamente, visam a evolução das atividades antidopagem no Brasil, bem como a contribuição para a Ciência Antidopagem no sentido amplo.

Como nos relatórios parciais anteriormente apresentados, os resultados e conclusões de cada subprojeto serão apresentadas independentemente, na forma de capítulos.

Ainda como apresentado nos relatórios parciais, os subprojetos abordam diferentes aspectos da Ciência Antidopagem, uma área notadamente multidisciplinar.

Como consequência, observar-se-á abordagens metodológicas e formas de apresentação dos resultados respeitando as particularidades de cada área, bem como as perspectivas dos Coordenadores Executivos, sendo estes nomeados ao longo do texto.

Para o melhor entendimento de cada subprojeto, e possibilidade de rastreabilidade de informações, as referências relevantes para cada subprojeto são apresentadas separadamente, no final de cada capítulo.

Seguindo o formato previamente proposto, o Coordenador Geral comenta as os avanços alcançados, conclusões, e possíveis desdobramentos, visando novos avanços científicos na área da antidopagem.

I – SUBPROJETOS

SUBPROJETO 1. Dopagem sanguínea – I. Aprimoramentos na detecção de transfusões homólogas

Coordenação executiva: Profa. Dra. Mariana Renovato

Dr. Pedro Castelo

1.a. Introdução

A capacidade carreadora de oxigênio de um organismo é um limitador de desempenho de atletas em esportes de resistência e uma das metas de atletas de resistência é aumentar sua capacidade de captar/transportar oxigênio (Ashenden, 2002), para melhor oxigenação da musculatura e utilização do oxigênio nas vias metabólicas para produção de energia.

A absorção de oxigênio pode ser naturalmente aumentada através de treinamentos de resistência intensos e frequentes, entretanto essas adaptações fisiológicas são adquiridas de forma lenta, ao longo de vários meses (Harrison e col., 2014). Assim, na busca por resultados mais rápidos, atletas podem optar por métodos proibidos, que consistem no aumento da massa de eritrócitos, como a transfusão sanguínea.

A transfusão sanguínea pode ser realizada de duas maneiras distintas: transfusão homóloga ou autóloga (Nelson e col., 2003; Voss e col., 2003). Na transfusão autóloga o atleta faz uso de seu próprio sangue, já na transfusão homóloga o atleta recebe sangue de um doador compatível para os sistemas ABO e Rh (WADA, 2019).

A melhora no rendimento dos atletas é considerável, por exemplo, a reinfusão de três unidades de sangue por transfusão sanguínea leva a um aumento de 13% dos níveis de hemoglobina em um período de aproximadamente 12 horas, conduzindo a um aumento de 9% na captação de oxigênio e de 23% no desempenho (Legih-Smith, 2004).

Atualmente, a transfusão homóloga pelo controle antidopagem pode ser detectada utilizando a técnica de citometria de fluxo, a qual consiste na identificação de populações mistas de hemácias no atleta, identificando diferenças nas populações de

antígenos minoritários dos grupos sanguíneos, podendo chegar, em alguns casos até 0,07% de sensibilidade. Como há uma grande quantidade de antígenos minoritários sanguíneos, a técnica se baseia na improbabilidade que esses antígenos sejam perfeitamente compatíveis entre o sangue do atleta (recipiente) e do doador (Nelson e col, 2002; Nelson e col, 2003; Voss e col., 2007).

Por outro lado, ainda não há métodos capazes de determinar a dopagem sanguínea por transfusão autóloga, logo, especula-se que atletas de esportes de resistência façam uso desta técnica de dopagem. Sendo assim, a busca por métodos analíticos que determinem tal prática constitui um dos principais desafios atuais da agência mundial antidopagem (Salamin e col., 2016; Donati e col., 2018).

1.a.1. Transfusão homóloga

A detecção de transfusão homóloga se baseia na análise da população de eritrócitos por citometria de fluxo, utilizando-se anticorpos primários combinados com anticorpos secundários conjugados (IgG ou IgM) a fluoróforos.

A utilização da técnica de citometria de fluxo faz parte do escopo de análises do LBCD desde 2016. Vale ressaltar que somos um dos seis laboratórios de controle de dopagem no mundo que realizam esta técnica atualmente.

Desde seu desenvolvimento, por Nelson e colaboradores (Nelson e col., 2002), o painel de antígenos avaliados, bem como as estratégias para aquisição das hemácias já foram revisitadas por outros grupos de pesquisa (Voss e col., 2007; Giraud e col, 2008). Diferentes autores e laboratórios de controle de dopagem usam diferentes painéis de antígenos eritrocitários para a detecção de populações de hemácias. O painel de antígenos avaliados pelo nosso laboratório, contempla 10 antígenos: C,c, E, JKa, JKb, K, Fya, Fyb, S e s. Vale ressaltar, que alguns autores pontuam que a probabilidade teórica de combinação de fenótipos idênticos entre um recipiente e doador alcança 0,093% (Nelson e col., 2002; Nelson e col., 2003), entretanto, Krotov e colaboradores demonstraram que em uma população de 535 atletas, a análise de 10 antígenos resultou na detecção de fenótipos idênticos entre doador e recipiente 5 vezes maior que a probabilidade teórica (Krotov e col., 2014). Sendo assim, o aumento do número de

antígenos analisados constitui-se em uma boa estratégia para ampliar as chances de detecção de possíveis transfusões sanguíneas.

O método atual empregado em nosso laboratório consiste na utilização do anticorpo glicoforina (CD235) para a estratégia de “gating” das células, bem como para a exclusão de agregados de hemácias. Além disso, um mix de anticorpos secundários IgG e IgM conjugados ao fluoróforo como controle negativo. Todo o procedimento de marcação se dá após a estabilização das hemácias com o reagente ID-CellStab (BioRad).

Durante a validação da técnica, fatores como sensibilidade, especificidade, reprodutibilidade e arraste são estabelecidos. Entretanto, dados sobre a robustez da técnica, isto é, variações capazes alterar os resultados, como tempo de manipulação de bancada, tempos de incubação, velocidade de centrifugação, número de células analisadas não estão disponíveis. Dados sobre a estabilidade da amostra em diferentes condições de armazenamento, informação fundamental para tomada de decisões quanto a análises de antidopagem, também não estão disponíveis.

Sendo assim, faz-se imprescindível o aprimoramento da técnica de citometria de fluxo para análise transfusão homóloga, com o aumento do painel de antígenos analisados, bem como a determinação de sua robustez e da estabilidade de amostras a serem testadas.

1.b. Objetivos

O objetivo da presente proposta é ampliar o painel de antígenos utilizados e avaliar a robustez da técnica de citometria de fluxo, bem como testar a estabilidade das amostras de sangue a serem analisadas para detecção de transfusão homóloga.

1.b.1. Objetivos específicos

- Aumento do número de antígenos avaliados
- Determinação do tempo máximo de viabilidade das hemácias após a retirada de sangue;
- Otimização do número de células utilizado para marcação;
- Otimização dos tempos de incubação;

- Marcação dupla das células para o antígeno de interesse e CD235-a, ambos conjugados a fluoróforos diferentes (FITC X PE);
- Determinação dos parâmetros de compensação do citômetro para a marcação da mesma amostra com dois fluoróforos;
- Determinação do tempo máximo de bancada para garantir menos de 10% de agregados celulares.

1.c. Materiais e Métodos

Nesse estudo foram utilizados glóbulos vermelhos adquiridos comercialmente (DiaCell, Diamed BioRad), no qual se conhece previamente a fenotipagem de cada grupo celular utilizado. 10 voluntários saudáveis e que não realizaram transfusão sanguínea no último ano doaram sangue em tubo EDTA. Anticorpos primários e antisoros foram obtidos da Diamed (GmbH, Cressier Switzerland): IgM monoclonal anti big C, small c, big E, small e, Jka, Jkb, big K, P1 e soro IgG anti Fya, Fyb, small s, big S e small k (Griffols). Todos os anticorpos foram diluídos com a intenção de serem usados nas concentrações ótimas de marcação. Foram utilizados anticorpos secundários anti-IgM humano conjugado a PE e anti-IgG humano conjugado a PE. As amostras foram analisadas em citômetro de fluxo FC500 Beckman Coulter.

1.d. Resultados

A fim de ampliar o painel antigênico, e diminuir o risco de encontrar um resultado falso-negativo, o antígeno P1, small e small k presentes também na superfície da hemácia, foram testados em diferentes concentrações. Células com e sem antígenos foram misturadas na proporção de 97% sem e 3% com e 3% sem e 97% com, e incubadas com os respectivos anticorpos anti-P1, anti-e e anti-k, nas seguintes concentrações: puro, 1:2, 1:4, 1:10, 1:20, 1:40. Em nenhuma das concentrações testadas foi possível observar a separação das duas populações de células, que contém e não contém P1, ocorrendo apenas um pequeno “ombro” a mais em relação

a população que não contém P1. Isso demonstra que o anticorpo anti-P1 não foi capaz de se ligar ao antígeno P1 de forma eficaz, utilizando este protocolo, o que não possibilitou o aumento do painel antigênico do método de detecção de transfusão de sangue homóloga com este antígeno (Figura 1.1). Já o anticorpo contra o antígeno small e apresentou excelente marcação até a última diluição testada. Porém, a diluição de uso escolhida foi a de 1:2, pois a diluição seguinte ainda separa bem as duas populações de células para o caso de uma confirmação (Figura 1.2). Assim como o anti-e, o anticorpo contra o antígeno small k, também demonstrou excelente marcação até a última diluição testada, e a diluição de uso escolhida foi a de 1:20, pois além de separar bem as duas populações, a diluição seguinte também consegue uma boa separação para casos de confirmação (Figura 1.3).

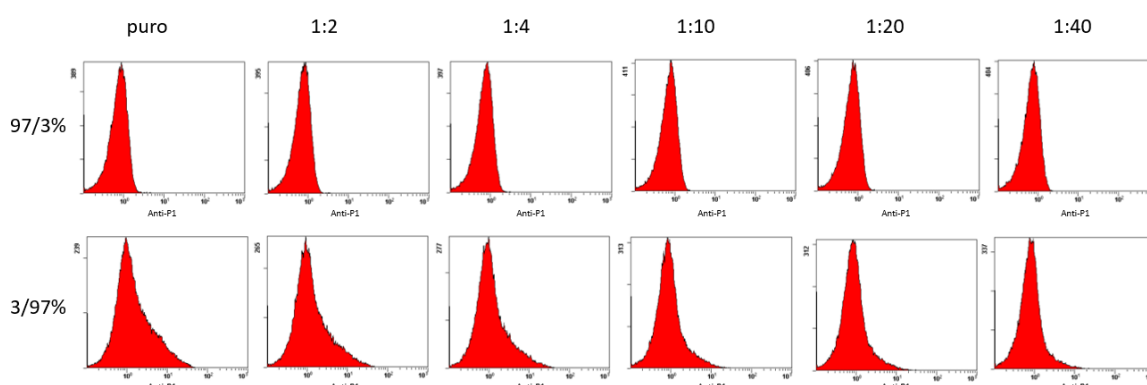


Figura 1.1. Titulação do anticorpo anti-P1. 97% da população majoritária e 3% da população minoritária. Anti-P1 não foi capaz de marcar as células positivas pra P1.

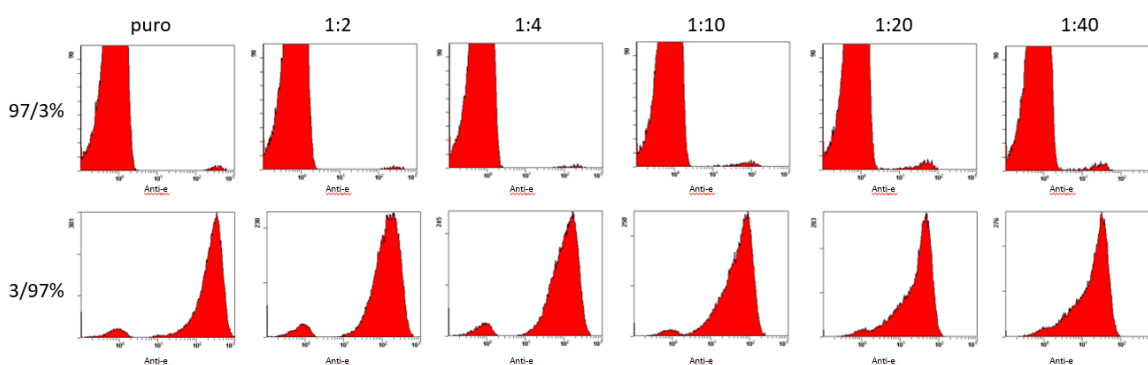


Figura 1.2. Titulação do anticorpo anti-e. 97% da população majoritária e 3% da população minoritária. Diluição ideal é de 1:2.

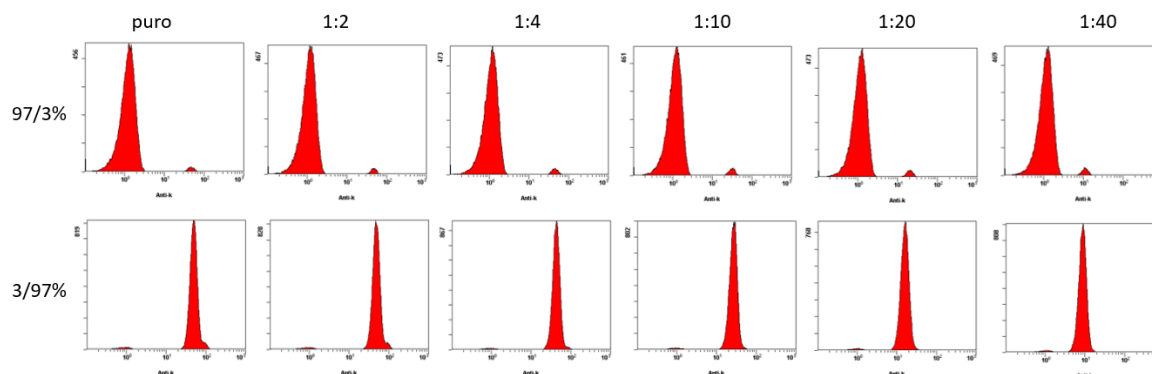


Figura 1.3. Titulação do anticorpo anti-k. 97% da população majoritária e 3% da população minoritária. Diluição ideal é de 1:20.

Objetivando-se testar a sensibilidade dos anticorpos anti-e e anti-k, e determinar seus respectivos limites de detecção (LODs), células sem e com os respectivos antígenos foram misturadas nas proporções de 95/5%, 97/3%, 98,5/1,5%, 99,5/0,5% e 5/95%, 3/97%, 1,5/98,5%, 0,5/99,5% (célula sem antígeno/célula com antígeno). Foi possível observar que o anticorpo contra o antígeno small e foi capaz de marcar as células positivas até a proporção de 0,5/99,5%, porém, não foi possível observar marcação na proporção de 99,5/0,5%. Sendo assim, o LOD estabelecido para o anti-e foi de 98,5/1,5%, ou seja, 1,5% de população minoritária/doador (Figura 1.4). Já o anticorpo contra o antígeno small k mostrou-se capaz de marcar todas as populações minoritárias testadas, ou seja, até as proporções de 99,5/0,5% e 0,5/99,5%. Sendo assim o LOD estabelecido para o anti-k foi de 0,5% de população minoritária/doador (Figura 1.5).

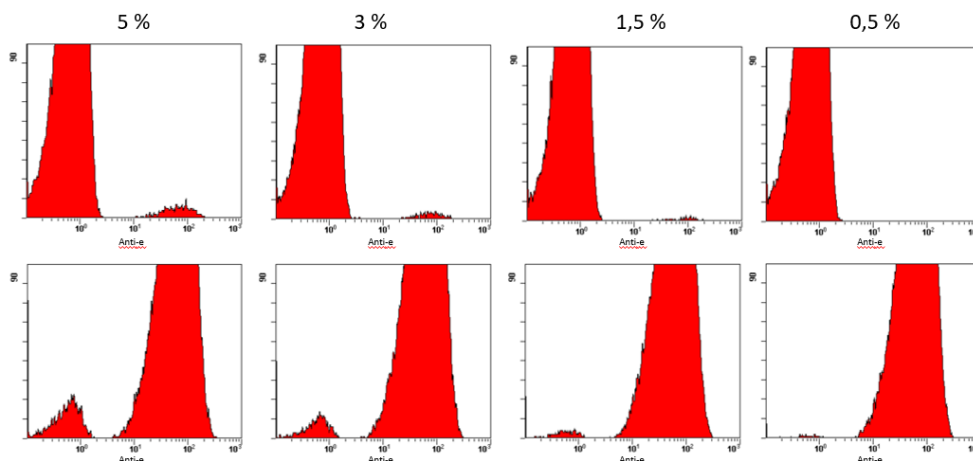


Figura 1.4. Sensibilidade do anticorpo anti-e. Populações minoritárias de 5%, 3%, 1,5% e 0,5%. O limite de detecção (LOD) foi de 1,5%.

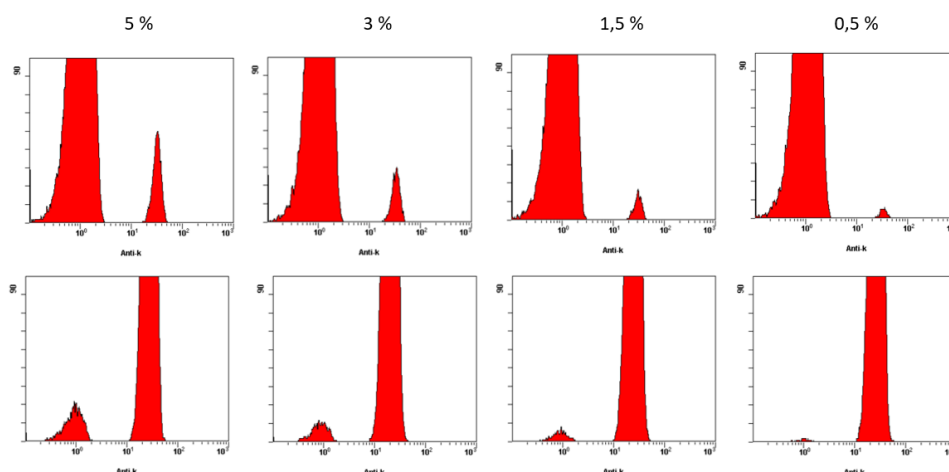


Figura 1.5. Sensibilidade do anticorpo anti-k. Populações minoritárias de 5%, 3%, 1,5% e 0,5%. O limite de detecção (LOD) foi de 0,5%.

Para observar a distribuição dos antígenos small e e small k na população, 10 voluntários foram selecionados. Foi possível observar que todos os voluntários testados apresentaram expressão dos antígenos small e e small k na superfície de suas hemácias, o que corrobora dados da literatura que indicam que grande parte da população expressa esses dois antígenos em suas células vermelhas (Figuras 1.6 e 1.7).

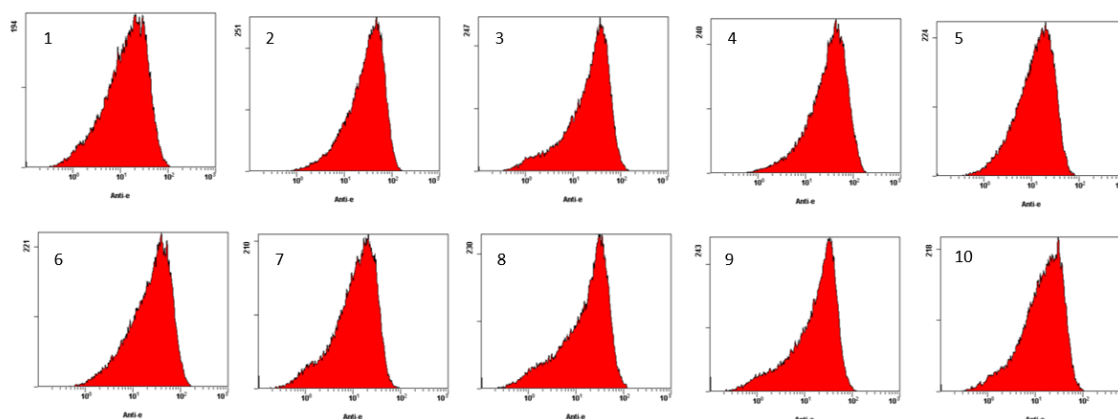


Figura 1.6. Expressão do antígeno anti-e em voluntários. 100% dos voluntários testados expressam o antígeno anti-e.

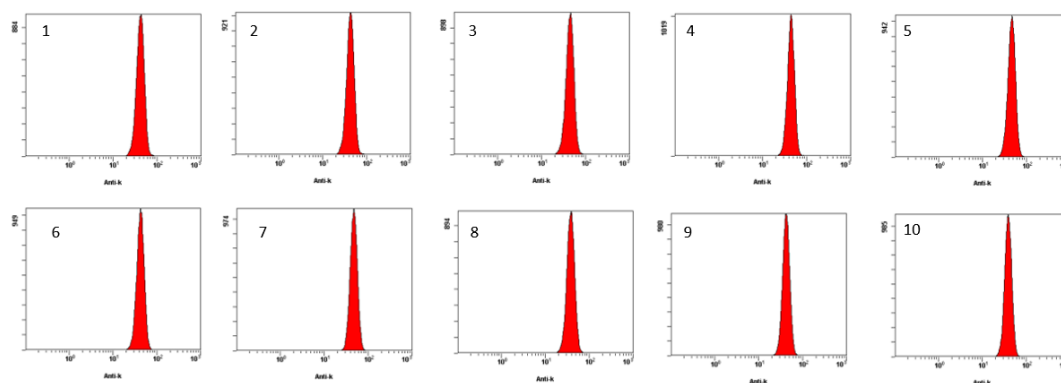


Figura 1.7. Expressão do antígeno anti-k em voluntários. 100% dos voluntários testados expressam o antígeno anti-k.

1.e. Conclusão

Com o objetivo de aumentar o painel antigênico a ser avaliado pelo método de detecção de transfusão sanguínea homóloga, anticorpos contra os antígenos de superfície de hemácias P1, small e e small k foram testados. Os ensaios realizados, com diversas concentrações desses anticorpos, demonstraram que o anticorpo anti-P1 não foi capaz de marcar as células que continham o antígeno P1, o que sugere que esse antígeno não serve para compor o painel antigênico de detecção de transfusão sanguínea homóloga. Por outro lado, os anticorpos anti-e e anti-k foram capazes de marcar, de forma excelente, os antígenos small e e small k, separando muito bem as

populações que continha e que não continham esses antígenos. Os ensaios de titulação revelaram que as diluições ideais de trabalho são 1:2 e 1:20, para os anticorpos anti-e e anti-k, respectivamente. Já os ensaios de sensibilidade estabeleceram os LODs em 1,5% e 0,5% de população minoritária, respectivamente. E por fim, os dados demonstraram que todos os 10 voluntários testados contêm os antígenos small e e small k na superfície de suas hemácias, o que o corrobora dados da literatura, que dizem que a maioria da população expressa esses dois antígenos (Mirotti, L.C. e col., 2023).

1.f. Referências Bibliográficas

- Ashenden M., A strategy to deter blood doping in port. *Haematologica*. 2002; 87:225–34.
- Donati F., et al. Detecting autologous blood trabsfusion in dopin control: Biomarkers of blood aging and storage measured by flow cytofluorimetry. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 2018; 19: 124-135
- García-Roa M, et al. Red blood cell storage time and transfusion: current practice, concerns and future perspectives. *Blood Transfus*. 2017;15(3):222-231.
- Giraud S, et al. Scientific and forensic standards for homologous blood transfusion anti-doping analyses. *Forensis Sci Int*. 2008. 179(1):23-33.
- Harrison, C. R. et al. Towards the identification of autologous blood transfusions through capillary electrophoresis Anti-doping Analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 406, n. 3, p. 679–686, 2014.
- Krotov G., et al. Possible cause of lack of positive samples on homologous blood transfusion. *Drug Test Anal*. 201. 6(11-12)1160-2.
- Leigh-Smith, S. Blood boosting. *British Journal of Sports Medicine*, v. 38, n. 1, p. 99–101, 2004.
- Mirotti, L.C. et al. Minor red blood cell antigen phenotyping of athletes sampled in international competitions. *Drug Test Anal*. 2023;15:292–298
- Mørkeberg, J. Detection of Autologous Blood Transfusions in Athletes: A Historical Perspective. *Transfusion Medicine Reviews*, v. 26, n. 3, p. 199–208, 2012.
- Mørkeberg. Blood manipulation: current challenges from an anti-doping perspective. *J Hematology Am Soc Hematol Educ*

Program. 2013;2013:627-31.

- Nelson, M. et al. Detection of homologous blood transfusion by flow cytometry: A deterrent against blood doping [1]. *Haematologica*, v. 87, n. 8, p. 881–882, 2002.
- Nelson, M. et al. Proof of homologous blood transfusion through quantification of blood group antigens. *Haematologica* v. 88, n. 11, p. 1284–1295, 2003.
- Salamin O et al. Autologous blood trasnfusion in spors: emerging biomarkers. *Transfusion Medicine Reviews*. 2016. 30(3):109-115
- Voss, S. C. et al. Detection of homologous blood transfusion. *International Journal of Sports Medicine*, v. 28, n. 8, p. 633–637, 2007.

SUBPROJETO 2. Dopagem sanguínea – II. Desenvolvimento de estratégia para detecção de Transfusão autóloga

Coordenação executiva: Profa. Dra. Mariana Renovato.

Dra. Ana Carolina Carneiro

2.a Introdução

Como introduzido no Relatório Parcial 02, devido à capacidade aeróbica dos atletas estar diretamente relacionada à massa total de hemoglobina, há relatos do uso de substâncias ou métodos proibidos para o aumento da concentração de hemoglobina no sangue. Dentre esses métodos podemos destacar o uso de carreadores sintéticos de oxigênio, dopagem genética para aumento da expressão de eritropoietina endógena, uso de eritropoietina humana recombinante e transfusões sanguíneas (JELKMANN et al, 2011).

A transfusão sanguínea consiste na transferência de sangue, ou de produtos processados a partir deste, para a circulação sanguínea de uma pessoa. A transfusão é dita homóloga quando uma pessoa é transfundida com o sangue oriundo de um doador compatível para os grupos AB0 e RH. Por outro lado, a transfusão autóloga é realizada através da coleta do sangue de um indivíduo, posteriormente esse sangue é armazenado e futuramente reinfundido no mesmo (GIRAUD et al, 2010).

Para que se alcance uma melhora no desempenho é necessário um aumento superior a 5% nos níveis de hemoglobina circulante (GLEDHILL et al, 1982). Assumindo-se que um adulto tem 4-5 litros de sangue no corpo, a transfusão de uma unidade de sangue corresponderia a 10% da população celular sendo de origem doadora (NELSON et al, 2002); a reinfusão de três unidades de sangue por transfusão autóloga leva a um aumento de 13% dos níveis de hemoglobina em um período de aproximadamente 12 horas, conduzindo a um aumento de 9% na captação de oxigênio e de 23% no desempenho (MØRKEBERG, 2012).

2.a.1. Transfusão autóloga

Especula-se que a transfusão autóloga (TA) seja utilizada pelos atletas como doping há mais de 40 anos e ainda não há nenhuma metodologia direta para sua identificação nos laboratórios antidopagem. Algumas metodologias indiretas já foram propostas, porém com limitações (Morkeberg, 2012)

Ao contrário do que ocorre na transfusão homóloga, na qual o atleta pode reinfundir o sangue fresco logo antes da competição, na transfusão autóloga é necessário que o sangue coletado fique armazenado por um tempo antes da sua reinfusão (até, aproximadamente, 50 dias) para que haja tempo de o atleta recuperar sua massa de hemoglobina inicial e assim garantir uma melhor performance com as bolsas adicionais (MØRKEBERG et al, 2012).

Já foi proposta a identificação de metabólitos do plastificante dietilexilftalato (DEHP) na urina como um possível marcador da TA, uma vez que o armazenamento do sangue acontece em bolsas de plásticos específicas. Entretanto, como esse plastificante é utilizado em uma grande quantidade de produtos, não só nas bolsas de sangue, seus níveis de metabólitos podem estar aumentados na urina em várias situações. Dessa forma, a utilização desse biomarcador não se mostrou robusta devido à possibilidade de falso-positivo; vale ressaltar nem todas as bolsas sanguíneas possuem DEHP em sua composição (Morkeberg, 2013; Voss e col., 2017).

2.a.2. Lesões por armazenamento sanguíneo

O armazenamento de sangue coletado para transfusão deve ser feito em recipiente apropriado, exclusivo para tal fim, sob refrigeração entre 1 a 6°C (FDA, 2018). Entretanto, mesmo com a utilização de agentes conservantes, as hemácias armazenadas apresentam alterações físicas (danos às proteínas, oxidação dos lipídeos presentes na membrana, perda da integridade da membrana, alterações associadas na forma das hemácias e apoptose) e metabólicas (declínio do pH, concentrações reduzidas de adenosina trifosfato (ATP) e 2,3-bifosfoglicerato (2,3-BPG) e acumulação de potássio extracelular) (HESS et al, 2010). Outra grande alteração é a hemólise que é

caracterizada pela liberação de hemoglobina e sua dissociação em heme livre e cadeias de globinas (HULT et al, 2013).

2.a.3. Heme oxigenase e SpiC

Durante a coleta e armazenamento de sangue, a lesão mais comum é a hemólise que consiste na ruptura dos eritrócitos com a liberação de hemoglobina, heme livre e vesículas extracelulares (AMORIM et al., 2022). A liberação de tais substâncias pode levar a lesões redox no endotélio, tecidos subjacentes ou no túbulo proximal no rim (HESS et al, 2009). No corpo, o heme circulante é metabolizado no interior de macrófagos através da ação da enzima heme-oxigenase 1 (GOZZELINO et al., 2010), que no estado basal, apresenta níveis quase indetectáveis, mas que aumentam com o acúmulo de heme (MAINES et al, 1977).

A presença de heme livre também induz a expressão do fator de transcrição SpiC em monócitos, os quais tornam-se macrófagos capazes de reciclar o ferro (os chamados macrófagos da polpa vermelha) (HALDAR et al, 2014). Basicamente, o heme livre funciona como sinalizador para ativação deste fator de transcrição. Em excesso na corrente sanguínea, a molécula de heme induz a expressão de Spi-C, e consequentemente este atua estimulando a diferenciação dos monócitos em macrófagos de polpa vermelha para que as hemácias senescentes possam ser fagocitadas no baço, garantindo a degradação do heme, bem como a homeostase dos outros produtos resultantes da hemólise (HALDAR et al, 2014; García-Roa e col., 2017).

2.a.4. Monócitos

Os monócitos constituem cerca de 5-10% dos leucócitos circulantes que se originam na medula óssea a partir do precursor comum de monócitos, macrófagos e células dendríticas (MDP) (GEISSMANN et al, 2010). Estas células são capazes de migrar da corrente sanguínea para os tecidos, dando origem a macrófagos e células dendríticas além de atuarem nos processos inflamatórios de vasos como sequestradores e efetores e na remoção de células apoptóticas e componentes tóxicos (AUFFRAY et al, 2009; FRANC et al, 1996; WILLIAMS, 2007). Apesar de compartilharem uma aparência similar

global, os monócitos são divididos em três subpopulações com funções distintas: monócitos clássicos, que apresentam elevada expressão de CD14 e ausência de CD16, monócitos intermediários, que apresentam elevada expressão de CD14 e baixa expressão de CD16 (e monócitos não clássicos, que apresentam expressão elevada de CD16 e baixa expressão de CD14 (WONG et al, 2011).

Nosso grupo vem trabalhando com a hipótese de que monócitos/macrófagos que entram em contato com o sangue hemolisado sofrem alterações em suas vias de sinalização redox bem como em vias relacionadas a processos inflamatórios. A partir de um protocolo de simulação da transfusão autóloga, *ex vivo*, nossos resultados vêm demonstrando, em monócitos/macrófagos um aumento de 10 vezes nos níveis de RNA mensageiro para o fator de transcrição SpiC, acompanhado por um aumento dos níveis proteico e aumento na expressão dos níveis de RNAm e proteicos de ferritina. Além disso, nossos resultados demonstraram que após o contato com o sangue hemolisado, os monócitos/macrófagos apresentam um padrão “M2-like”, ou seja, anti-inflamatório, caracterizado pela expressão de RNA mensageiro para CX3CR1 e CD206 (Amorim et al., 2022). Até agora, demonstramos que monócitos são bons alvos na busca de indicadores que caracterizem a transfusão autóloga. Entretanto, análises posteriores ainda são necessárias para determinar se de fato, a detecção de alterações no perfil de monócitos poderia se constituir em uma abordagem eficiente no controle de dopagem.

2.b. Objetivos

O objetivo da presente proposta é aprofundar a caracterização de monócitos que entraram em contato com sangue armazenado/hemolisado.

2.b.1. Objetivos específicos

- Realizar microarranjo para detectar o perfil de RNA mensageiro dos monócitos após co-cultura com sangue armazenado.
- Caracterizar o conteúdo proteico (através da técnica de proteômica) dos monócitos após co-cultura com sangue armazenado.
- Escolher genes e proteínas candidatas e validá-las através da técnica de western blotting e citometria de fluxo.

- Determinar o tempo de expressão proteica (janela de detecção).
- Investigação da expressão de SpiC, ferritina e outras proteínas candidatas em monócitos circulantes de indivíduos transfundidos.

2.c. Justificativa

A partir da dificuldade em encontrar um único valor referencial para cada parâmetro sanguíneo foi proposto o rastreamento ao longo da vida do atleta, ou seja, cada indivíduo seria observado de acordo com os seus próprios valores hematológicos. O que foi chamado de Passaporte Biológico do Atleta (ABP) (Voss e col., 2017). No entanto, mesmo apesar do Passaporte Biológico do Atleta se constituir em um grande passo na direção da detecção da transfusão autóloga, não proporciona uma solução final. Desde então várias metodologias vêm sendo elucidadas e testadas, afim de identificar os atletas que realizam este tipo de dopagem (VOSS et al., 2017).

Outras abordagens como alterações nos níveis do hormônio hepcidina de 12 horas a 1 dia após a transfusão já foram demonstrados (Leuenberger e col., 2016). Leunemberger e colaboradores já demonstraram níveis circulantes aumentados de alguns miRNAS por até três dias após a transfusão, entretanto o próprio autor enumera diversas limitações do estudo (Leuenberger e col, 2013).

Apesar do grande empenho por partes dos pesquisadores ainda não há metodologia para detecção de dopagem por transfusão sanguínea autóloga. Por se tratar do sangue próprio do atleta a identificação do sangue reinfundido ao torna-se praticamente impossível, sendo a busca por uma resposta do próprio organismo a essa reinfusão de sangue refrigerado o caminho mais provável de detecção da dopagem. Assim, torna-se crucial a definição de um ou mais biomarcadores cujos níveis sejam significativamente alterados frente a uma reinfusão de sangue previamente refrigerado.

Fatores associados ao microambiente local têm impacto significativo no comportamento de monócitos/ macrófagos, vias de sinalização e função dessas células (ALAM, 2017). Além disso, sabe-se que altos níveis de heme, seus metabólitos ou ferro induzem a expressão do fator de transcrição SpiC em monócitos / macrófagos capazes de realizar a reciclagem de ferro, os chamados macrófagos de polpa vermelha (ALAM, 2017; HALDAR, 2018). Sendo assim, nossa hipótese é de que a hemólise causada pelo

armazenamento de sangue pode, no momento da reinfusão, ativar monócitos circulantes, levando à expressão de SpiC; causar alterações nos marcadores de superfície dessas células; e causar modificações na homeostase redox e alterar as moléculas inflamatórias sintetizadas e/ou liberadas por eles. Tais alterações podem ser exploradas através de técnicas moleculares, conduzindo à implementação de metodologia de detecção de dopagem por transfusão sanguínea autóloga de modo a complementar a metodologia de passaporte biológico sanguíneo do atleta já existente.

2.d. Relevância do estudo

Atualmente não existe um método capaz de detectar eficazmente a TA. Assim, o desenvolvimento de métodos novos e sensíveis para fins de controle de doping é exigido. Acreditamos que a descoberta de padrões moleculares alterados em monócitos expostos à hemácias reinfundidas ou às vesículas extracelulares liberadas por elas poderiam contribuir para o desenvolvimentos de alvos e biomarcadores da transfusão sanguínea autóloga.

Vale ressaltar que apesar da principal limitação deste estudo que é sua realização prioritariamente com um protocolo *ex vivo*, acreditamos que abre caminho para uma melhor compreensão de como o armazenamento de sangue afeta o sistema imunológico inato.

2.e. Metodologia

2.e.1 Eritrócitos

O sangue foi coletado de voluntários saudáveis em tubos vacutainer BD com anticoagulante EDTA. Após isso, os tubos foram mantidos por aproximadamente 20 minutos em agitador tipo rolo (Kasvi, São José dos Pinhais, Brasil) para completa homogeneização. O sangue total (contendo plasma) foi armazenado por 21 dias a 4°C em solução conservante ácido-citrato-dextrose (ACD) na proporção de 1:7 (ACD: sangue total). O sangue do mesmo doador foi coletado no último dia de armazenamento,

submetido à solução preservadora de ACD 1:7 (ACD: sangue total) e analisado a fresco (dia 0). Sangue fresco e refrigerado foram alocados separadamente em tubos Falcon e centrifugados por 10 minutos a 580 g. Após a centrifugação, o plasma foi armazenado para posterior quantificação de heme, hemoglobina e vesículas extracelulares. As hemácias foram contadas em um analisador hematológico (XT2000i™, Sysmex, Kobe, Japão). Protocolo de aprovação comitê de ética CAAE: 64254122.0.0000.5243.

2.e.2. Estimulação ex vivo de TA

Amostras de hemácias (doadores) foram misturadas com amostras de sangue armazenadas por 21 dias (reinfusão), da seguinte forma: 80% de sangue fresco com 20% de sangue armazenado (Mix 1) ou 90% de sangue fresco com 10% de sangue armazenado sangue (Mix 2). Essas proporções foram escolhidas para simular uma reinfusão de uma ou duas bolsas de sangue, respectivamente.

2.e.3. Preparação de monócitos

Amostras de sangue venoso (10 mL) foram coletadas de todos os indivíduos em tubos BD vacutainer e cuidadosamente colocadas em gradientes Ficoll/Hysto-paque) seguido de centrifugação a 770 g por 30 minutos. Para obter a população total de monócitos, células mononucleares isoladas de sangue periférico (PBMCs) foram ressuspensas em RPMI 1640; 10% de soro fetal bovino (SFB), semeado a uma densidade de 4×10^5 células/poço em placas de 24 poços e deixado aderir por 1 hora a 37°C com 5% de CO₂. Em seguida, as células não aderentes foram removidas por aspiração.

2.e.4. Co-Cultura de Monócitos (Mo) com hemácias

Após a adesão dos monócitos à placa, eles foram co-cultivados com hemácias na proporção de 10^3 hemácias/monócito (Mo) através de um inserto de 0,4 μ m por 24 horas, a 37 °C , sob quatro condições experimentais diferentes

- i. RBC 0: Mo co-cultivado com 100% de RBCs frescos (RBC 0)
- ii. RBC 21: Mo co-cultivado com 100% de RBCs armazenados em 21 dias (RBC 21)
- iii. Mistura 1: Mo co-cultivado com 80% de hemácias frescas + 20% de hemácias refrigeradas
- iv. Mistura 2: Mo co-cultivado com 90% de hemácias frescas + 10% de hemácias refrigeradas

- Co-Cultura de Monócitos com Vesículas Extracelulares

Após a adesão dos monócitos à placa, estes foram incubados com EVs por 24 horas a 37°C, sob diferentes condições experimentais.

- i. Mo não tratado (incubado com PBS 20% v/v)
- ii. Mo estimulado com EVs de RBC fresco (RBC 0-EVs; 20% v/v)
- iii. Mo estimulado com EVs de RBC armazenado por 21 dias (RBC 0-EVs; 20% v/v)
- iv. Mo estimulado com MIX-EVs (80% v/v RBC 0-EVs + 20% v/v RBC 21-EVs)

2.e.5. Extração de RNA, transcrição reversa e pré-amplificação de Cdna

O RNA total foi isolado dos subconjuntos de monócitos co-cultivados usando o RNeasyMini Kit (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante, incluindo o tratamento com DNase I. A qualidade e a quantidade de RNA foram analisadas em um fluorímetro Qubit 4 (ThermoFisher,). Amostras com razão A260/A280 entre 1,8 e 2,2 foram consideradas adequadas para qPCR. O RNA foi retrotranscrito em cDNA usando o kit de transcrição reversa de cDNA de alta capacidade (Applied Biosystem) de acordo com as instruções do fabricante.

2.e.6. Reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR)

Amostras de DNA complementares foram amplificadas usando Made-to-Order Low-Density Array System de acordo com as instruções dos fabricantes (Applied Biosystems, ThermoFisher). As matrizes foram realizadas no sistema QuantStudio® 12K Flex-Real-Time PCR (Applied Biosystems, ThermoFisher). O Taqman Low Density Array foi usado para rastrear alterações na expressão gênica de citocinas, quimiocinas, receptores de superfície, heme e metabolismo de Fe e outros. TaqMan LDAs (Applied Biosystems, ThermoFisher) são criados em um cartão microfluídico de 384 poços, que é organizado com ensaios de expressão gênica TaqMan. O desenho experimental envolve uma matriz de 22 genes essenciais e 18S e actina como controles endógenos como segue. ACTB (Hs99999903_m1), 18S (Hs99999901_s1), TFRC (Hs99999911_m1), FTL (Hs00830226_gH), HPRT1 (Hs99999909_m1), ANXA5 (Hs00154054_m1), HMOX1 (Hs01110250_m1), OXSR1 (Hs00178247_m1), NOS2 (Hs01075529_m1), CCL3 (Hs00234142_m1), HIF1A (Hs00936371_m1), CSF1 (Hs00174164_m1), TNF (Hs01113624_g1), MIF (Hs00236988_g1), IL6 (Hs00985639_m1), IL4 (Hs00174122_m1), CD14 (Hs02621496_s1), CXC3R1 (Hs01022583_s1), CCR2 (Hs01560352_m1), CCR5 (Hs00152917_m1), MRC1 (Hs00267207_m1), CCR3 (Hs00266213_s1), MRC1 (Hs00267207_m1), NEF2L2 (Hs00975961_g1). Os ensaios foram pré-concebidos e validados pela Applied Biosystems. A quantificação relativa de cada mRNA do gene alvo em comparação com actina e 18S foi calculada como a média $2^{-\Delta Ct}$ onde $\Delta Ct = Ct - Ct$ (média: actina e 18S). O ciclo limite Ct foi dado automaticamente pela ferramenta online do software Thermocloud dashboard (disponível em <https://apps.thermofisher.com>).

2.e.7. Obtenção de extratos celulares

Após 24 horas de incubação, os poços foram lavados cuidadosamente com tampão salina-fosfato (PBS) previamente aquecido a 37°C. Subsequentemente, o PBS foi removido e as células foram lisadas em tampão de lise RIPA, com inibidor de protease 1:10. As amostras lisadas foram colocadas em tubos de fundo cônico de 500 µL e armazenados em freezer a -30 °C.

2.e.8. Eletroforese e Immunoblotting

O conteúdo de proteína total dos extratos celulares foi determinado pelo método BCA (Abcam, ab102536, Cambridge, EUA). Os lisados celulares (10-20 µg de proteína) foram fracionados por géis de poliacrilamida 12 ou 15% (SDS-PAGE) (1 hora a 150V e 50mA). As proteínas foram transferidas para membranas de difluoreto de polivinilideno em equipamento Trans-Blot® Turbo™ (15V, 328mA e 30 minutos; Transfer System, BioRad). Em seguida, as membranas foram bloqueadas com BSA a 5% em T-TBS a 0,1% e incubadas durante a noite a 4°C na presença dos seguintes anticorpos primários: anti-Spic (coelho - 1: 1000), anti-HO1, anti- Ferritina (coelho - 1: 250) ou anti-β-actina (coelho - 1: 1000). As membranas foram incubadas durante pelo menos uma hora com anticorpo secundário específico anti-coelho conjugado com peroxidase (cabra - 1:10000). As proteínas imunorreativas foram visualizadas pela detecção de sua quimioluminescência por meio da solução de quimioluminescência aprimorada. As membranas foram reveladas e fotografadas usando ImageQuant™ LAS500 (GE Healthcare) e a densitometria foi quantificada usando o software ImageJ (NIH, Bethesda, EUA).

2.e.9. Isolamento e Quantificação de Vesículas Extracelulares (EVs)

EVs foram isoladas do plasma de amostras de sangue fresco ou sangue previamente armazenado a 4°C por 21 dias. Primeiramente, as amostras foram centrifugadas (2.000 g por 10 minutos a 4°C) para remoção de detritos celulares. Em seguida, o sobrenadante obtido foi centrifugado novamente (20.000 g, por 70 minutos, a 4°C). Uma amostra de controle contendo microesferas de 1 µm foi usada para definir com precisão o perfil FSC/SSC contendo os VEs (eventos <1 µm) com precisão adequada no citômetro de fluxo. As amostras foram marcadas com o anticorpo CD235a-FITC (antiglicoforina) na concentração de 1:100 (clone 11E4B-7-6, IM2212U, Beckman Coulter) e microesferas de 1 µm foram marcadas em 1: 100 concentrações com o controle isotópico FITC Mouse IgG1 (clone MOPC 21, BD Biosciences). Um total de 100 µL/amostra foi adquirido no

citômetro Accuri c6™ (BD Biosciences). RBC-EV também foram ressuspensos em PBS estéril e armazenados a -20 °C até o uso.

2.e.10. Ensaio da captação de EVs por monócitos

Monócitos ($1,2 \times 10^6$ células/mL) foram plaqueados em placas de 24 poços e foram incubados com EVs por 30 minutos (20% v/v). Após o tratamento, as células foram lisadas em tampão de ensaio de radioimunoprecipitação contendo SIGMAFAST™ Protease Inhibitor Cocktail Tablet, EDTA-Free (Sigma-Aldrich) em gelo por 20 minutos. Heme e hemoglobina foram em 398 nm e 540 nm usando o equipamento Envision™ (PerkinElmer). Os resultados foram obtidos em absorbância e calculados em μM .

2.e.11. Análise de Produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS)

Os monócitos ($2,5 \times 10^5$ células/mL) foram suspensos em solução salina balanceada de Hank (HBSS) sem vermelho de fenol. Para detectar a produção de ROS intracelular, as células foram carregadas com uma sonda CellROX de 5 μM por 30 minutos antes do tratamento. O meio com sonda não internalizada foi removido e os monócitos foram incubados com HBSS, RBC 0-EVs (20% v/v), RBC 21-EVs (20% v/v) ou MIX -EVs (80% v/v RBC 0-EVs + 20% v/v RBC 21-EV) por 2 horas. Durante o tratamento, a oxidação da sonda foi monitorada usando um leitor de placas Flexstation™ Multi-label (ThermoFisher), em comprimentos de onda de excitação e emissão de 640 e 665 nm, respectivamente.

2.e.12. Análise estatística

Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média (EP). As comparações de médias com variáveis quantitativas entre os grupos foram realizadas por meio do teste t de Student ou ANOVA one-way, seguido do pós-teste de Bonferroni. Para todas as análises, um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. A avaliação estatística foi realizada usando o software GraphPad Prism™ versão 7.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA).

2.f.Resultdos

2.f.1 Perfil de expressão gênica de monócitos co-cultivados com hemácias armazenadas a frio

Já se sabe que monócitos são sensíveis ao heme livre e VEs passando por reprogramação funcional para manter a homeostase. Portanto, decidimos avaliar o efeito do RBC na expressão de 14 genes candidatos selecionados em monócitos. Os resultados mostraram que o armazenamento de eritrócitos alterou a expressão de genes relacionados ao metabolismo do heme, fenótipo de macrófagos e mediadores inflamatórios (Fig 2.1A). Os níveis de mRNA de Spic e HO-1 induzidos por Mix1 foram 10 vezes e 1,8 vezes aumentados, respectivamente (Fig. 2.1B e 2.1C). No entanto, os níveis de mRNA de ferritina aumentaram quando os monócitos foram co-cultivados com Mix2 (Fig. 2.1D). Em relação ao fenótipo de monócitos/macrófagos, os níveis de CX3CR1 foram 15 vezes aumentados por Mix1 (Fig. 2.1E), e os níveis de mRNA de CD206 foram 3 vezes aumentados por Mix1 e Mix2 (Fig.2.1F). Mix1 e Mix2 representam níveis moderados de heme livre (13 a 18 μ M), enquanto RBC21 representa níveis muito altos (60 μ M), induzindo um aumento de 13 vezes na expressão de mRNA de IL-6 (Fig. 2.1 G) característica da resposta pró-inflamatória.

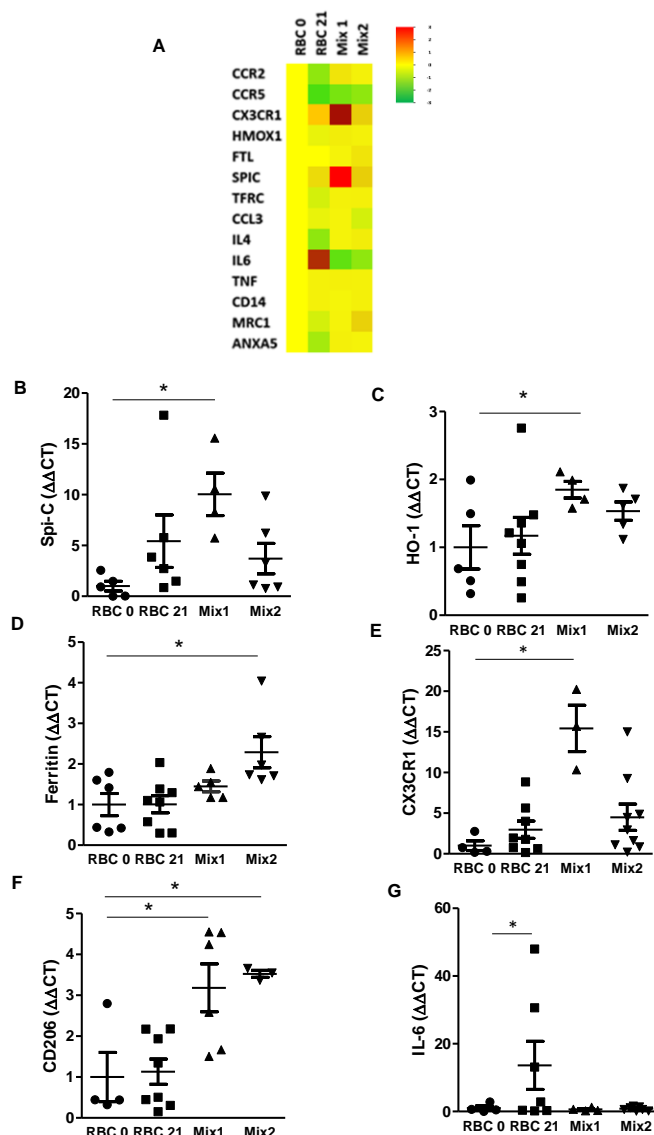


Figura 2.1. Comparação de genes diferencialmente expressos entre monócitos. (A) mRNA foi purificado a partir de monócitos co-cultivados em quatro condições diferentes: RBC 0: MØ + 100% RBC fresco; RBC 21: MØ + 100% RBC armazenado por 21 dias a 4°; Mix 1: MØ + 80% RBC fresco + 20% RBC armazenado por 21 dias a 4 ° C e Mix 2: MØ + 90% RBC fresco + 10% RBC armazenado por 21 dias a 4 ° C. Os dados são expressos como média expressão genética relativa em unidades arbitrárias. (B) Diagrama de Venn relacionando genes comprometidos com o metabolismo do heme, processos inflamatórios, receptores de quimiocinas e marcadores celulares de monócitos/macrófagos. O diagrama de Venn foi obtido em <https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>. (C) HO-1, (D) Spi-C, (E) ferritina, (F)

CX3CR1, (G) CD206 e (H) a expressão de mRNA de IL-6 em monócitos foi medida por TLDA em quatro condições diferentes: RBC 0: MØ + 100% RBC fresco; RBC 21: MØ + 100% RBC armazenado por 21 dias a 4°; Mix 1: MØ + 80% RBC fresco + 20% RBC armazenado por 21 dias a 4 ° C, e Mix 2: MØ + 90% RBC fresco + 10% RBC armazenado por 21 dias a 4 ° C. Os resultados são expressos como 3 - 6 experiências diferentes. Os dados são expressos como média \pm erro padrão (EP). * Representa $p < 0,05$.

2.f.2. Expressão de proteínas metabolizadoras de heme em monócitos co-cultivados hemácias (RBC)

Nossos resultados demonstraram que hemácias armazenadas a frio sofrem hemólise, o que altera a expressão de mRNA dos monócitos de genes comprometidos com o metabolismo do heme. A este respeito, investigamos ainda os níveis de expressão de proteínas metabolizadoras de heme. Corroborando os dados da análise de mRNA, nossos resultados demonstraram um aumento de 2,6 vezes na HO-1 (Fig. 2.2A) e uma tendência de aumento na expressão da proteína de ferritina (Fig. 2.2B) induzida por Mix I e Mix II, respectivamente. Spic é conhecido como um fator de transcrição que ativa a diferenciação de monócitos quando na presença de heme. Observamos que Mix II induziu um aumento de 2,9 vezes de Spic em monócitos enquanto Mix I não (Fig. 2.2C). Para destacar ainda mais as pistas sobre a expressão de Spic, incubamos monócitos com diferentes concentrações de heme. Nossos resultados demonstraram que 30 μ M de heme aumentou 2,8 vezes os níveis de expressão de Spic, enquanto 10 e 60 μ M não induziram um aumento na expressão da proteína Spic (Fig. 2.2D).

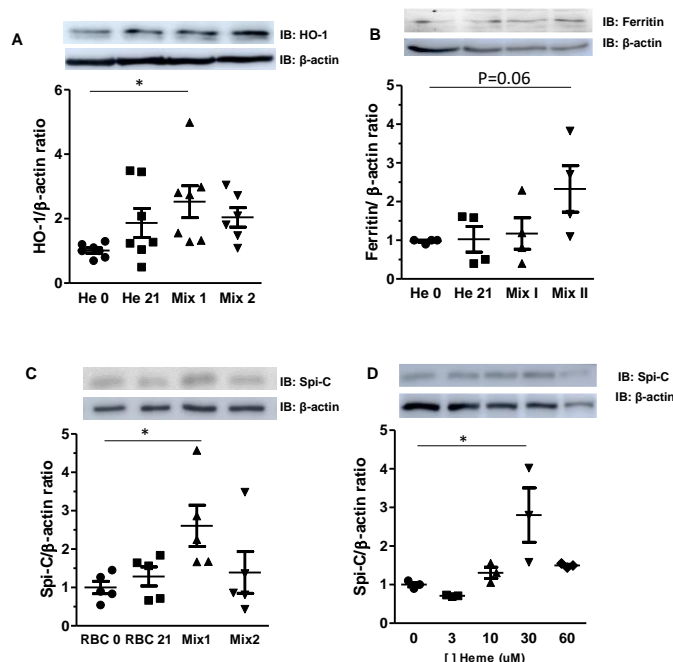


Figura 2.2. Efeito do armazenamento de RBC sobre a expressão de proteínas em monócitos. Monócitos (MØ) foram co-cultivados com RBC por 24 horas em quatro condições diferentes: RBC 0: MØ + 100% RBC fresco; RBC 21: MØ + 100% RBC armazenado por 21 dias a quatro °C; Mix I: MØ + 80% RBC fresco + 20% RBC armazenado por 21 dias a 4 ° C, e Mix II: MØ + 90% RBC fresco + 10% RBC armazenado por 21 dias a 4 ° C. Os extratos protéicos foram submetidos a Western Blotting para quantificação de (A) HO-1, (B) ferritina e (C) expressão Spi-C. Os resultados são representativos de quatro a sete experiências diferentes. (D) Monócitos (MØ) foram incubados com heme em concentrações de 3, 10, 30 e 60 μ m. Os extratos protéicos foram submetidos a Western Blotting para quantificação dos níveis de Spi-C. Os resultados são representativos de três experiências diferentes. Os dados são expressos como média \pm erro padrão (SEM). * Representa $p < 0,05$.

2.f.3. Efeito de VEs liberadas pelas hemácias em monócitos

As EVs carregam a carga das células-mãe, incluindo DNA, mRNA mensageiro, miRNAs, proteínas, lipídios e metabólitos, para células receptoras. Aqui, nosso objetivo é desvendar se o armazenamento refrigerado a longo prazo pode aumentar o heme e a hemoglobina liberados pelas hemácias dentro das EVs. Observamos um aumento de 7,2

vezes no conteúdo de heme dentro de EVs liberados por eritrócitos armazenados a frio (RBC 21-EVs) em comparação com EVs liberados por eritrócitos frescos (RBC 0-EVs) (Fig. 2.3A). Por outro lado, tanto RBC 0-EVs quanto RBC 21-EVs apresentaram o mesmo conteúdo de hemoglobina (2.3B) e metHb (2.3C). Em seguida, investigamos se os RBC-EVs têm como alvo e ativam monócitos. Após a incubação dos monócitos com RBC-EVs e lavagem, o heme foi quantificado. Nossos resultados demonstraram que RBC 21-EVs transferiu um conteúdo de heme 3,6 vezes maior para monócitos em comparação com RBC 0-EVs (Fig. 2.3D). Finalmente, foi avaliado se a transferência de heme de hemácias armazenadas a frio para monócitos via EVs poderia impactar na expressão proteica de Spic e, curiosamente, nossos resultados revelaram uma quantidade mais significativa de Spic em monócitos previamente incubados com RBC 21-EVs do que com RBC 0-EVs ($p < 0,05$) (Fig. 2.3E). Avaliamos ainda se metHb - um DAMP derivado de RBC conhecido - poderia desempenhar um papel na ativação de monócitos acionada por RBC-EVs. Nossos resultados não demonstraram diferenças no conteúdo de Spic entre monócitos não tratados ou tratados com hemoglobina oxidada (Fig. 2.3F).

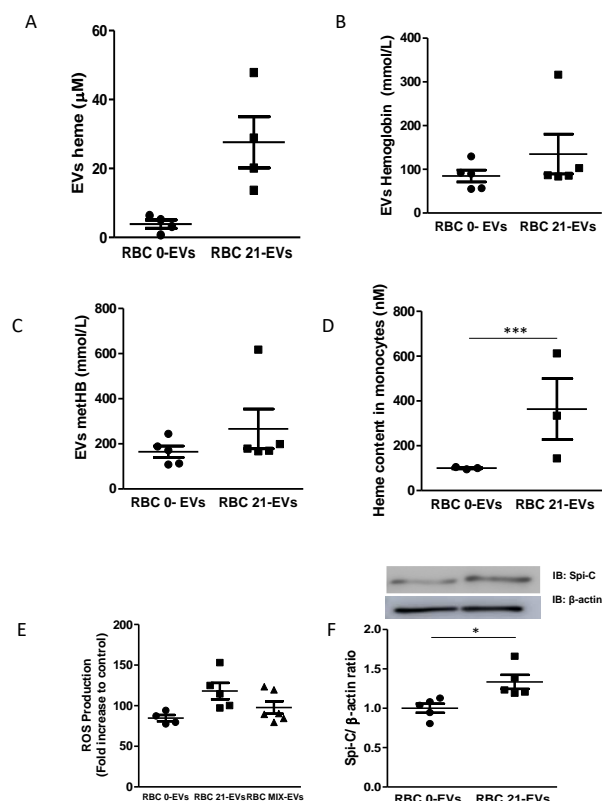


Figura 2.3. Caracterização de RBC-EVs e seus efeitos em monócitos. Os EVs foram isolados de sangue fresco e armazenado por 21 dias por centrifugação a 20.000 x g. (A) Heme e (B) hemoglobina dentro de EVs foram medidos usando um leitor de placas em 398 nm e 540. (C) A hemoglobina oxidada (methHb) foi medida em 541, 576 e 630 nm pela seguinte equação: $[methHb] = 185,77 \times OD_{541} + 171,88 \times OD_{576} + 387,58 \times OD_{630}$. (D) Monócitos isolados foram desafiados com EVs a 20% (v/v) (frescos ou armazenados) por 30 min, lavados e lisados com tampão RIPA em gelo, e o heme capturado foi medido a 398 nm dentro dos monócitos. (E) Monócitos foram tratados por 24h com 20% (v/v) de EVs frescos (RBC 0-EVs) ou armazenados (RBC 21-EVs), e os extratos protéicos foram submetidos a Western Blotting para quantificação da expressão de SpiC. (F) Os monócitos foram tratados por 24 horas com methHb na concentração de 30 μM de heme, e os extratos protéicos foram submetidos a Western Blotting para quantificar a expressão de SpiC. Os resultados são representativos de 3 a 5 experiências diferentes. Os dados são expressos como média ± erro padrão (SEM). * Representa $p < 0,05$.

2.f.4. Caracterização dos mecanismos de ativação desencadeados em monócitos mediante o tratamento com RBC 21-EVs

Nossos resultados demonstraram que o pré-tratamento dos monócitos com hemopexina (Hpx) não teve impacto sob a expressão de Spic desencadeada por EVs de hemácias armazenadas em monócitos (Fig. 2.4A). Sabe-se que o heme pode desencadear vias de sinalização via TLR4 em células imunes. Sendo assim, considerando que a Hpx, um e"scavenger" de heme, não alterou a expressão de Spic em monócitos impulsionada pelo tratamento com as RBC 21-EVs, sugerimos que o heme contido no interior de EVs tenha desencadeado a expressão de Spic em monócitos

Assim, para entender os mecanismos subjacentes à expressão de Spic acionada por EVs em monócitos, avaliamos o papel da via de sinalização de TLR4 nesse cenário. Nossos resultados demonstraram que o pré-tratamento de monócitos com TAK-242 (antagonista de TLR4) não impediu a regulação positiva de Spic por RBC 21-EVs (Fig. 2.4B). Além disso, observamos que os RBC 21-EVs aumentaram a atividade de NF- κ B em monócitos de maneira dependente de TLR4, uma vez que TAK-242 impediu esse efeito (Fig. 2.4C). Nossos resultados também demonstraram que RBC 21-EVs induziram ROS em monócitos em 15 minutos ($p < 0,005$), o que foi parcialmente impedido por TAK-242, sugerindo assim que RBCs 21-EVs induzem ROS tanto de maneira dependente quanto independentemente de TLR4 (Fig. 2.4D). Assim, propomos que RBC-EVs induzem Spic através da degradação de Bach1 mediada por heme, conforme demonstrado anteriormente por Halder e colaboradores.

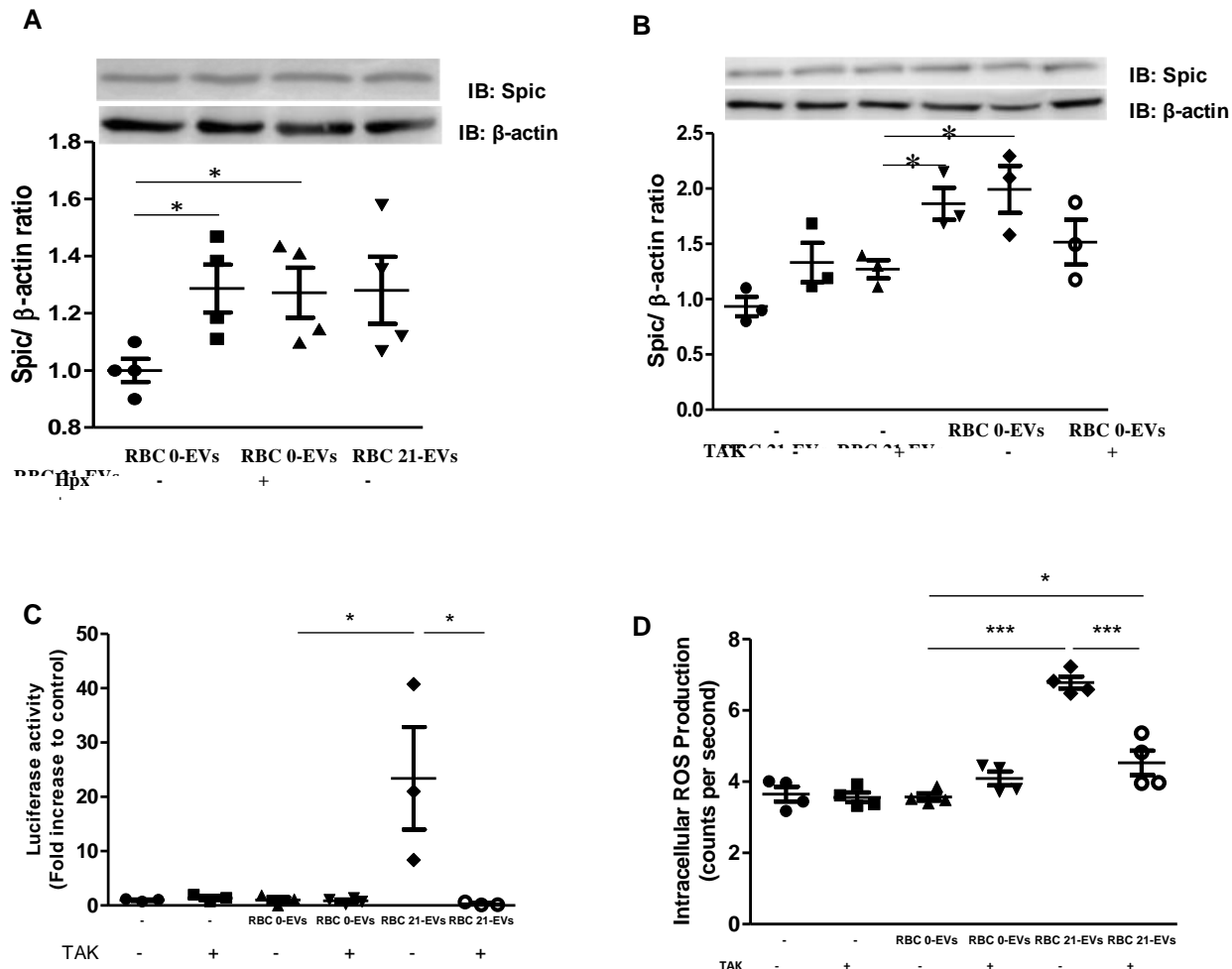


Figura 2.4. Papel do TLR4 na ativação de monócitos desencadeada por RBC-EVs. (A) Os monócitos foram tratados por 24 horas com RBC 0-EVs e RBC 21-EVs previamente incubados ou não com hemopexina (Hpx; 1 μ M por 1 hora), e os extratos proteicos foram submetidos a Western Blotting para quantificação da expressão de Spic. (B, C) Os monócitos foram pré-tratados ou não com TAK-242 (1 μ M) ou DMSO (0,001%) por 15 minutos e depois incubados com RBC 0-EVs ou RBC 21-EVs por 24 horas. Em seguida, (B) os extratos proteicos foram submetidos a Western Blotting para quantificação da expressão de Spic, e (C) a ativação do NF- κ B foi avaliada pela atividade da luciferase. (D) A produção de ROS foi avaliada pela captação de monócitos da sonda CellROX por 30 min. Após esse tempo, as células foram lavadas e pré-incubadas com TAK-242 (1 μ M) ou DMSO (0,001%) por 15 minutos a 37°C. Após o pré-tratamento, as células foram tratadas com RBC 0-EVs, RBC 21-EVs, por 15 minutos e tiveram a excitação e emissão de fluorescência monitoradas, respectivamente, em 640 e 665 nm. Os resultados são

representativos de 3 -4 experimentos diferentes. Os dados são expressos como média \pm erro padrão (SEM). * Representa $p < 0,05$ e *** representa $p < 0,005$.

2.g. Referências Bibliográficas

- AMORIM CS. Extracellular vesicles from stored red blood cells convey heme and induce Spic expression on human monocytes. *Frontiers in Immunology* e18; 13:833286, 2022.
- AUFFRAY, Cedric; SIEWEKE, Michael H.; GEISSMANN, Frederic. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annual review of immunology*, v. 27, 2009.
- FDA-US Food and Drug Administration. Updated, April 2018. <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?CFRPart=640&showFR=1>. Acesso em 05 de março de 2019.
- FRANC, Nathalie C. et al. Croquemort, a novel Drosophila hemocyte/macrophage receptor that recognizes apoptotic cells. *Immunity*, v. 4, n. 5, p. 431-443, 1996.
- GARCIA-ROA, M. et al. Red blood cell storage time and transfusion: current practice, concerns and future perspectives. *Blood Transfus.* 2017;15(3):222-231.
- GEISSMANN, Frederic et al. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science*, v. 327, n. 5966, p. 656-661, 2010.
- GIRAUD, Sylvain et al. Blood transfusion in sports. In: *Doping in Sports: Biochemical Principles, Effects and Analysis*. Springer, Berlin, Heidelberg, 2010. p. 295-304.
- GLEDHILL, Norman. Blood doping and related issues: a brief review. *Med Sci Sports Exerc*, v. 14, n. 3, p. 183-189, 1982.
- GOZZELINO, Raffaella; JENEY, Viktoria; SOARES, Miguel P. Mechanisms of cell protection by heme oxygenase-1. *Annual review of pharmacology and toxicology*, v. 50, p. 323-354, 2010.
- HALDAR, Malay et al. Heme-mediated SPI-C induction promotes monocyte differentiation into iron-recycling macrophages. *Cell*, v. 156, n. 6, p. 1223-1234, 2014.

- HESS, John R. Red cell changes during storage. *Transfusion and Apheresis Science*, v. 43, n. 1, p. 51-59, 2010.
- HULT, Andreas; MALM, Christer; OLDENBORG, Per-Arne. Transfusion of cryopreserved human red blood cells into healthy humans is associated with rapid extravascular hemolysis without a proinflammatory cytokine response. *Transfusion*, v. 53, n. 1, p. 28-33, 2013.
- JELKMANN, Wolfgang; LUNDBY, Carsten. Blood doping and its detection. *Blood*, v. 118, n. 9, p. 2395-2404, 2011. MAINES, Mahin D.; KAPPAS, Attallah. Metals as regulators of heme metabolism. *Science*, v. 198, n. 4323, p. 1215-1221, 1977.
- MØRKEBERG, J. Detection of Autologous Blood Transfusions in Athletes: A Historical Perspective. *Transfusion Medicine Reviews*, v. 26, n. 3, p. 199–208, 2012.
- MØRKEBERG, J Blood manipulation: current challenges from an anti-doping perspective. *J Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2013;2013:627-31.
- NELSON, Margaret et al. Detection of homologous blood transfusion by flow cytometry: a deterrent against blood doping. *haematologica*, v. 87, n. 8, p. 881-882, 2002.
- VOSS, S et al. Analysis of RBC-microparticles in stored whole blood bags - a promising marker to detect blood doping in sports? *Drug Test Anal*. V.9 (11-12) p. 1794-1798
- WILLIAMS, Michael J. *Drosophila* hemopoiesis and cellular immunity. *The Journal of Immunology*, v. 178, n. 8, p. 4711-4716, 2007.
- WONG, Kok Loon et al. Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets. *Blood*, v. 118, n. 5, p. e16-e31, 2011.

SUBPROJETO 3. Amostragem tipo Dried Blood Spot – I. Uma alternativa de amostragem de amostras visando a detecção de dopagem genética

Coordenação executiva: Profa. Dra. Luciana Pizzatti.

3.a Introdução

Como introduzido nos Relatórios Parciais, a estratégia de dopagem genética é uma potencial aplicação ilícita da terapia gênica, com objetivo de obtenção de vantagens no âmbito do esporte competitivo de alto rendimento (Kumar SR et al, 2016; Rogers GL et al, 2017; Artioli GG et al, 2007; Robbins PD et al, 1998; Naso MF et al, 2017; Beiter T et al, 2011; Tozaki T et al, 2018; Kay M.A. GJ. & L. N. 2001; Lee CS, Bishop ES, Zhang R, Yu X, Farina EM, Yan S, et al, 2017; Neuberger EWI, Simon P, 2017).

Desde 2003, A Agência Mundial Antidopagem (WADA) incluiu a utilização da dopagem genética de qualquer gene com potencial ergonogênico em sua lista de substâncias e métodos proibidos para os atletas profissionais.

Essa estratégia ilícita consiste em, através de terapia gênica, injetar sequências gênicas (DNA) responsáveis pela codificação de proteínas com função ergonogênicas.

Os genes envolvidos na síntese e degradação de proteínas musculares, tendões ou ligamentos, vascularização, metabolismo energético, e processos regenerativos são os genes mais importantes para o sucesso da estratégia. Dentre esses potenciais candidatos estão a Eritropoietina humana (EPO), o fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1) e hormônio do crescimento (GH) devido ao papel fisiológico de grande importância que exercem no desempenho esportivo (Kumar SR et al, 2016; Rogers GL et al, 2017; Artioli GG et al, 2007).

Vale lembrar que as respectivas substâncias recombinantes são igualmente proibidas pela WADA.

Poucos grupos ao redor do mundo se dedicam ao desenvolvimento de estratégias e acreditação de métodos para a apropriada detecção da dopagem genética. Até o momento, não existem métodos aprovados e em rotina em nenhum laboratório de controle de dopagem no mundo (Robbins PD et al, 1998; Naso MF et al, 2017; Beiter T et al, 2011; Tozaki T et al, 2018; Kay M.A. GJ. & L. N. 2001; Lee CS, Bishop ES, Zhang R, Yu X, Farina EM, Yan S, et al, 2017).

Desde 2016, Laboratório Brasileiro de Controle de Dopagem, de forma pioneira, se dedica a implementar biologia molecular e desenvolver estratégias de detecção de dopagem genética para o gene da EPO.

Apesar da iniciativa preliminar, o grande gargalo é a qualidade da amostra, o alto custo do método e a impossibilidade de análise retrospectiva de amostras, prática extremamente importante para a área de controle de dopagem. Além disso vale ressaltar que os outros alvos de dopagem genética (IGF-1 e GH entre outros) não foram contemplados ainda com métodos de detecção (Van der Gronde T, de Hon O, Haisma HJ et al, 2013; Navarro E, et al, 2014; Moser DA et al, 2014; Murray JL, et al, 2014; Nagy A et al, 2017).

A qualidade da amostra coletada e as condições que permitem sua estabilidade durante o período de armazenamento são cruciais para o desenvolvimento de métodos confiáveis de detecção de dopagem genética. Amostras de sangue coletadas nos tradicionais tubos EDTA ou SST não são os mais recomendados quando se trata de armazenamento de longa duração para ácidos nucleicos.

Tendo em vista essas questões, recentemente a WADA iniciou um estudo multicêntrico para avaliar a utilização de kits de coleta de sangue em dispositivos de filtro e ou papel, as chamadas manchas de sangue seco ou do inglês *Dried Blood Spots* (DBS), estratégia de coleta semelhante aos dispositivos utilizados para a coleta de sangue de recém-nascidos (teste do pezinho) (Damjanovic I, et al, 2015; Al-Mousa H, et al, 2018; Mortensen Ó, et al, 2019).

Esse tipo de coleta, ou contrário, da coleta em tubos de sangue tradicionais, têm inúmeras vantagens tais como: quantidade coletada e invasividade mínimas; condições simples de coleta; treinamento para os agentes de coleta reduzida; armazenamento e logística transporte facilitados; estabilidade da amostra coletada a temperatura ambiente e sob refrigeração. A tecnologia de coleta DBS tem sido aplicada à triagem diagnóstica de inúmeras doenças e na descoberta de medicamentos, em ambientes não clínicos e clínicos (Walker RM, Murphy L, et al, 2019; Fischer A, et al, 2004; Choi EH, et al, 2014). Portanto é de extrema importância desenvolver métodos de detecção de dopagem genética utilizando como material coletado em DBS para outros genes potencialmente críticos e com sensibilidade maior.

Do ponto de vista da detecção molecular laboratorial, após a reação de polimerase em cadeia em tempo real (qPCR) tradicional, o PCR digital (dPCR) ganhou aceitação entre biólogos moleculares e tem sido usado com sucesso para detecção de genes em amostras com baixa abundância de alvo. A PCR digital baseada em chip é extremamente promissora e sensível. Nesta técnica, cada porção do chip ou cada partição atua como um microrreator realizando uma reação PCR individual onde os alvos contendo as sequências alvo amplificadas são detectadas por fluorescência das sondas Taqman de PCR. A proporção de partições positivas para PCR é suficiente para determinar a concentração da sequência alvo sem a necessidade de calibração (Hui L, et al, 2018; Purcell R V., et al, 2016; Quan PL et al 2018).

O PCR digital é mais sensível do que o qPCR para detecção de baixo número de cópias de alvos, permitindo não apenas a detecção, mas também a quantificação absoluta de cada alvo de interesse. Essa estratégia permite a quantificação com independência de curva padrão ou material de referência para qualquer detecção de doping genético, fornecendo resultados confiáveis para amostras de baixo número de cópias, o cenário mais provável para a rotina de detecção de doping genético.

3.b. Justificativa e relevância do estudo

Durante a preparação para os Jogos Olímpicos Rio 2016, o LBCD utilizou a expertise da biologia molecular do grupo (há mais de 15 anos em pesquisas sobre diagnóstico de câncer e hematologia) e aprimorou antigas estratégias descritas na literatura, além de desenvolver novas estratégias para a detecção de dopagem gênica utilizando técnicas mais sensíveis para detecção de cópias baixas de genes transgênicos.

Os resultados preliminares foram compartilhados com a comunidade científica e em particular com a comunidade de laboratórios de controle de doping credenciados pela WADA. Os resultados dessas melhorias preliminares foram discutidos nos Workshops Manfred Donike na Alemanha em 2017 como uma apresentação de pôster e em 2018 e 2019 como uma conferência e publicação de uma revisão sobre o tema em 2020.

Abordagens mais sensíveis devem ser discutidas; a coleta amostral adequada deve ser analisada e a forma adequada de coleta e armazenamento dessas amostras deve ser avaliada em projetos científicos utilizando amostras coletas em Dried Blood Spots em papel. Os métodos de detecção de dopagem gênica precisam ser sensíveis e específicos o suficiente para que resultados falso positivos e negativos sejam evitados. Apesar dos esforços no desenvolvimento de um método de doping genético ainda não disponível e validado para esse fim e cada vez mais, com os avanços da terapia gênica, é mais provável a utilização de um ou mais transgenes para melhorar o desempenho em competições.

Nosso grupo de pesquisa possui experiência em diversas técnicas de biologia molecular aplicadas ao diagnóstico molecular e análise forense que oferecem diversas possibilidades para abordar o problema da detecção de doping genético para diversos genes. A proposta do método de detecção de qPCR multiplex para EPO, IGH-1 e GH visando duas diferentes junções exon-exon seguidas de confirmação de PCR digital baseada em chip visa detectar mais de um possível transgene na mesma reação com menos tempo, maior sensibilidade e com custos mais baixos.

A abordagem de multiplexação qPCR permite estender as possibilidades de detecção de vários alvos em uma única reação, que no caso da maioria dos sistemas dPCR disponíveis comercialmente é restrita a dois canais de detecção. Em contraste, o aumento da sensibilidade do dPCR serão utilizados com vantagem na confirmação de amostras com baixo número de cópias. A combinação dessas duas técnicas poderosas também permitirá explorar o uso de amostras de sangue coletadas em DBS, plasma.

3.c. Objetivo

Desenvolver um método baseado em PCR quantitativo em tempo real (qPCR) multiplex e PCR digital (dPCR) para detecção simultânea de transgenes IGF-1, GH e EPO em amostras de mancha de sangue seco (Dried Blood Spots) e amostras de plasma.

3.d. Etapas propostas

- Desenvolver método de detecção simultânea por qPCR multiplex para os transgenes: IGF-1; GH; EPO em Dried Blood Spots
- Desenvolver método de confirmação por PCR digital (dPCR) da detecção dos transgenes: IGF-1; GH; EPO em Dried Blood Spots.
- Validação do método em atenção aos critérios estabelecidos pela WADA.

3.e. Metodologia e estratégia de ação

3.e.1. Amostras

Amostras de sangue de 40 doadores saudáveis entre 20-35 anos serão coletadas em tubos BD Vacutainer® com K2 EDTA. Todos os indivíduos estudados deram seu consentimento informado para participar do estudo antes da coleta de sangue de acordo com a Declaração de Helsinque. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade. O plasma será separado usando o protocolo de centrifugação padrão. Amostras de sangue e plasma serão adicionadas, em concentrações distintas de padrões de referência para os transgenes de EPO, IGF-1 e GH (400 cp / μ L; 40 cp / μ L; 4 cp / μ L; 1 cp / μ L; 0,5 cp / μ L e 0,25 cp / μ L). Após o enriquecimento com os padrões de referência para cada transgene, a fração plasmática será extraída usando kits de extração de sangue de DNA, seguindo as instruções do fabricante. Além disso, essas mesmas amostras enriquecidas serão coletadas e aplicadas em dispositivos distintos para coleta de sangue (dispositivos de Dried Blood Spot e ou papel cartão de coleta de sangue) e deixadas para secar em temperatura ambiente durante 1h, 24h, 48h, 72h, 1 semana e 2 a 48 semanas. Após esse tempo, dois ou três punches (2-3 mm de tamanho) serão utilizados para realizar a extração do DNA, conforme sugerido pelos fabricantes.

3.e.2. Clonagem do material de referência padrão e desenho do ensaio de qPCR

Para escolher a abordagem apropriada, o nível de expressão em órgãos e a expressão do sistema anatômico para EPO (ENSG00000130427), IGF-1 (ENSG00000017427) e GH (ENSG00000259384) foi verificado usando o banco de dados Ensembl. As sequências para gerar os materiais de referência foram obtidas do NCBI para clonagem em um vetor de expressão de AAV para EPO (Sequência de Referência NCBI: NM_000799.4), IGF-1 EPO (Sequência de Referência NCBI: NM_000618.5) e GH (Sequência de Referência NCBI: NM_000515.5) genes. Os materiais de referência para esses genes serão sintetizados de forma linearizada e circular e serão adquiridos dos laboratórios GenScript (GenScript, Piscataway, NJ). Será determinado o limite de detecção nas matrizes: plasma; sangue total e dried blood spot. O experimento de PCR terá como alvo para amplificação do sinal, duas regiões de sequência gênica diferentes na junção exon-exon para cada gene e duas qPCRs de multiplexação (PCR simultâneo) realizadas com sondas TaqMan marcadas com sondas fluorescências diferentes. Dois primers e pares de sondas serão gerados para cada gene alvo (IGF-1; GH e EPO). Os pares de primers e sondas serão projetadas usando o software Primer Express [™] e as recomendações do guia de otimização TaqMan Multiplex para projetar primers e sondas TaqMan QSY disponíveis no site da Thermo Fisher Scientific. Cada par de primer e sonda será adicionado em concentração equimolar. Os resultados de quantificação (C_q) mais elevados serão confirmados por dPCR para o alvo positivo correspondente. Para garantir uma eficiência de PCR semelhante, um controle interno baseado em uma sequência sintética não relacionada será incluído no ensaio. O limite de detecção será determinado para qPCR (abordagem de multiplexação e cada alvo separadamente) e dPCR.

3.e.3. Resultados esperados e produtos prospectados

- Desenvolvimento métodos 7 métodos quantitativos para a detecção simultânea de doping genético para os genes IGF-1; GH e EPO por PCR em tempo real (qPCR) e confirmação por PCR digital em amostras de sangue coletas em Dried Blood Spots.

- Avaliação de dispositivos e diferentes tipos de papel cartão para coleta de amostras de sangue (Dried Blood Spots) para aplicações de biologia molecular no âmbito do controle de dopagem brasileiro.
- Desenvolvimento de novos protocolos na fronteira do conhecimento para detectar substâncias projetadas usadas para fins de dopagem em amostras alternativas (Dried Blood Spots).
- Melhoria de métodos analíticos existentes para detectar drogas específicas, ex. GH, IGF-1, EPO.

3.f. Resultados preliminares

3.f.1. Etapa proposta 1

- Foram desenhadas por programas de bioinformática todas as sequências para a síntese dos materiais de referência para os transgenes (IGF-1, GH e EPO) e para as sequencias de iniciadores de DNA para os ensaios multiplex.
- Foram avaliados três diferentes suportes para Dried Blood Spots (Nucleic Acid Cards, Wattman paper e o dispositivo nacional Organicoat) com volumes mínimos de amostras de sangue (20 µL) de voluntários.
- Foram avaliados três diferentes suportes para Dried Blood Spots (Nucleic Acid Cards, Wattman paper e o dispositivo nacional Organicoat) com volume reduzido de 10 µL de sangue de voluntários.
- Foram avaliadas extrações de DNA no ensaio piloto, a partir dos três dispositivos DBS e definido o mais promissor (Nucleid Acid Card – Thermo Fisher) para dar continuidade ao projeto com um número maior de amostras, evitando assim gastos desnecessários.
- O ensaio multiplex foi testado com sucesso para o gene EPO em Dried Blood Spot com o ensaio piloto com número pequeno de amostras.

- O ensaio multiplex foi testado com sucesso para o gene GH e está em fase de otimização em Dried Blood Spot com número reduzido de amostras assim como foi feito para o ensaio para o gene EPO. O equipamento principal aguarda manutenção (prevista para agosto) para que seja possível dar continuidade ao planejamento.

3.f.2. Etapa proposta 2

- Foram desenhadas por programas de bioinformática e clonadas sondas de DNA para análises com PCR digital

- Os ensaios foram analisados preliminarmente por PCR digital, em amostras do ensaio piloto para que os ajustes necessários fossem realizados antes da síntese final do material evitando assim gastos desnecessários da verba prevista.

- Os ensaios para EPO e GH estão em fase de otimização para a aplicação de PCR digital. O equipamento aguarda manutenção (prevista para agosto) para que seja possível dar continuidade ao planejamento.

Resultados compilados na apresentação abaixo para melhor ilustração:

<https://youtu.be/QTiFXiwBRn4>

3.g. Conclusão

Considerando as características já conhecidas de preservação de amostras biológicas em matrizes secas, bem como os resultados promissores de matrizes poliméricas na recuperação de agentes dopantes, o uso da estratégia DBS aplicadas a métodos de dopagem genética apresenta potencial para viabilizar tais métodos em laboratórios antidopagem.

Os resultados obtidos no presente trabalhos reforçam tal tese, com destaque para a possibilidade de aumento da abrangência metodológica, através do ensaio multiplex, testado com sucesso para o gene GH.

Entretanto, impactam fortemente na real avaliação da aplicabilidade de metodologias de dopagem genética, a carência de normativas que, obrigatoriamente, devem vir da Agência Mundial Antidopagem.

Não menos importante é a avaliação de risco e custo-benefício de implementação de tal metodologia no Sistema Antidopagem Brasileiro, sem critérios bem estabelecidos que podem ser alvo de questionamentos em tribunais.

Finalmente, apesar dos resultados indicarem a adequabilidade da matriz polimérica seca na coleta e estabilidade de amostras, o custo por análise torna, hoje, a implementação pouco realística.

Além dos avanços técnicos obtidos no projeto, que certamente servirão de degrau para investigações futuras, a principal conclusão do presente trabalho é o alerta para a implementação de métodos em viés regulatório bem estabelecido, o que pode acarretar desenvolvimentos e investimentos, sem possibilidade concreta de aplicação práticas em amostras de atletas.

3.i. Referências

- Kumar SR, Markusic DM, Biswas M, High KA, Herzog RW. Clinical development of gene therapy: results and lessons from recent successes. *Mol Ther - Methods Clin Dev* [Internet]. 2016;3(December 2015):16034. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2329050116301772>
- Rogers GL, Cannon PM. Gene Therapy Approaches to Human Immunodeficiency Virus and Other Infectious Diseases. *Hematol Oncol Clin North Am* [Internet]. 2017;31(5):883–95. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0889858817301016>
- Artioli GG, Hirata RDC, Lancha AHJ. Gene therapy, genetic doping and sport: fundamentals and implications for the future. *Rev Bras Med Esporte*. 2007;13(5):317–21.
- Robbins PD, Ghivizzani SC. Viral Vectors for Gene Therapy. *Pharmacol Ther*. 1998;80(1):35–47.

- Naso MF, Tomkiewicz B, Perry WL 3rd, Strohl WR. Adeno-Associated Virus (AAV) as a Vector for Gene Therapy. *BioDrugs*. 2017;31(4):317–334. doi:10.1007/s40259-017-0234-5
- Beiter T, Zimmermann M, Fragasso A, Hudemann J, Niess AM, Bitzer M, et al. Direct and long-term detection of gene doping in conventional blood samples. *Gene Ther* [Internet]. 2011;18(3):225–31. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/gt.2010.122>
- Tozaki T, Kikuchi M, Hirota K, Takasu M, Kusano K, Nagata S, et al. Digital PCR detection of plasmid DNA administered to the skeletal muscle of a microminipig: a model case study for gene doping detection. *BMC Res Notes* [Internet]. 2018;11(1). Available from <https://doi.org/10.1186/s13104-018-3815-6>
- Kay M.A. GJ. & L. N. Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nature*. 2001;7(1):33–40.
- Lee CS, Bishop ES, Zhang R, Yu X, Farina EM, Yan S, et al. Adenovirus-mediated gene delivery: Potential applications for gene and cell-based therapies in the new era of personalized medicine. *Genes Dis* [Internet]. 2017;4(2):43–63. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2352304217300272>
- Neuberger EW, Simon P. Gene and Cell Doping: The New Frontier - Beyond Myth or Reality. *Med Sport Sci*. 2017; 62:91–106.
- Van der Griende T, de Hon O, Haisma HJ, Pieters T. Gene doping: an overview and current implications for athletes. *Br J Sports Med* [Internet]. 2013;47(11):670–8. Available from: <http://bjsm.bmj.com/lookup/doi/10.1136/bjsports-2012-091288>
- Navarro E, Serrano-Heras G, Castaño MJ, Solera J. Real-time PCR detection chemistry. *Clin Chim Acta* [Internet]. 2015; 439:231–50. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2014.10.017>
- Moser DA, Braga L, Raso A, Zacchigna S, Giacca M, Simon P. Transgene detection by digital droplet PCR. *PLoS One*. 2014;9(11).
- Murray JL, Hu P, Shafer DA. Seven Novel Probe Systems for Real-Time PCR Provide Absolute Single-Base Discrimination, Higher Signaling, and Generic Components. *J Mol Diagnostics* [Internet]. 2014;16(6):627–38. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmoldx.2014.06.008>

- Nagy A, Vitásková E, Černíková L, Kř V, Jiřincová H, Sedlák K, et al. Evaluation of TaqMan qPCR System Integrating Two Identically Labelled Hydrolysis Probes in Single Assay. 2017;1–10.
- Damjanovic I, Najman S, Stojanovic S, Stojanovic D, Veljkovic A, Kocic H, et al. The dried blood spot sampling method in the laboratory medicine. Bratisl Lek Listy. 2015;116(4):227–32.
- Al-Mousa H, Al-Dakheel G, Jabr A, Elbadaoui F, Abouelhoda M, Baig M, et al. High incidence of severe combined immunodeficiency disease in Saudi Arabia detected through combined T cell receptor excision circle and next generation sequencing of newborn dried blood spots. Front Immunol. 2018;9(APR):1–8.
- Mortensen Ó, Lydersen LN, Apol KD, Andorsdóttir G, Steig B, Gregersen NO. Using dried blood spot samples from a trio for linked-read whole-exome sequencing. Eur J Hum Genet [Internet]. 2019; Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41431-019-0343-3>
- Walker RM, Murphy L, Macgillivray L, Mccafferty S, Wrobel N, Kerr SM, et al. Assessment of dried blood spots for DNA methylation profiling [version 1 ; peer review : 2 approved] Referee Status : 2019;1–16.
- Fischer A, Lejczak C, Lambert C, Servais J, Makombe N, Rusine J, et al. Simple DNA Extraction Method for Dried Blood Spots and Comparison of Two PCR Assays for Diagnosis of Vertical Human Immunodeficiency Virus Type 1 Transmission in Rwanda. J Clin Microbiol. 2004;42(1):16–20.
- Choi EH, Lee SK, Ihm C, Sohn YH. Rapid DNA Extraction from Dried Blood Spots on Filter Paper: Potential Applications in Biobanking. Osong Public Heal Res Perspect [Internet]. 2014;5(6):351–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phrp.2014.09.005>
- Hui L, Beard S, Hannan NJ. Measuring fetal brain and lung transcripts in amniotic fluid supernatant: a comparison of digital PCR and RT-qPCR methods. J Matern Neonatal Med. 2018;31(23):3191–6.
- Purcell R V., Pearson J, Frizelle FA, Keenan JI. Comparison of standard, quantitative and digital PCR in the detection of enterotoxigenic Bacteroides fragilis. Sci Rep [Internet]. 2016;6(September). Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep34554>

- Quan PL, Sauzade M, Brouzes E. DPCR: A technology review. Sensors (Switzerland). 2018;18(4).

SUBPROJETO 4. Amostragem tipo Dried Blood Spot - II - Detecção de agentes dopantes proibidos em competição

Coordenação executiva: Dra. Carina Anselmo.

4.a. Introdução

4.a.1. DBS no Contexto do Controle de Dopagem

A avaliação da existência de dopagem no esporte é usualmente realizada pela análise de fluidos dos atletas a fim de detectar a presença das substâncias ou de seus metabólitos (LUIZ *et al.*, 2019). No âmbito esportivo, essa prática é bastante difundida em diversos níveis de competição e em vários países, cada um com sua preferência por substâncias utilizadas.

Com a crescente utilização de substâncias dopantes pelos atletas, a criação da Agência Mundial Antidopagem, do inglês *World Anti-Doping Agency* (WADA), foi um marco importante na história do controle antidopagem. Uma das missões da WADA é normalizar uma regulação de controle de dopagem que possa ser aplicada em todo o mundo, promovendo assim o jogo limpo e a segurança dos atletas (LIPPI *et al.*, 2008). No contexto do controle de dopagem no esporte, a WADA é a organização responsável por determinar regulações, métodos, creditações de laboratórios de dopagem e, principalmente, por estabelecer anualmente a lista de substâncias e métodos proibidos, denominada *The Prohibited List* (WADA, 2022). Este documento que determina quais substâncias e métodos são proibidos para os atletas e em qual intervalo de tempo e, portanto, devem ser monitoradas pelos laboratórios acreditados pela WADA para realizar as análises de controle antidopagem (LUIZ *et al.*, 2019).

A lista de substâncias proibidas da WADA é organizada por classes de acordo com a similaridade farmacológica. Dentro das classificações existem ainda as substâncias que são proibidas em competição, ou seja, cujo uso é vedado no intervalo que compreende a partir das vinte e três e cinquenta e nove (23:59) horas do dia anterior à competição até a coleta. Ou as substâncias proibidas permanentemente, cujo uso é vedado todo o tempo, antes ou após as competições (WADA, 2021).

A WADA também determina em seus documentos parâmetros, classificações e condições de análise sob as quais substâncias proibidas devem ser monitoradas e quando estas levam aos chamados Resultados Analíticos Adversos (RAA). Uma destas classificações são as de substâncias *threshold* e *non-threshold*.

Substâncias *threshold* são substâncias que precisam passar por um método de análise quantitativo, e cuja concentração medida será um fator de decisão para determinar se sua presença se classifica como um Resultado Analítico Adverso (RAA). Já substâncias *non-threshold* são substâncias cuja análise é feita de forma qualitativa, e não é necessária a determinação de sua concentração por um método quantitativo. Substâncias *non-threshold* são ainda separadas em substâncias com *Minimum Reporting Levels* (MRL) e sem MRL. O MRL é a concentração de uma substância avaliada qualitativamente abaixo da qual os laboratórios não precisam reportar um RAA. Logo, substâncias que não possuem MRL devem ser reportadas sempre que identificadas, independente da sua concentração, desde que atendam aos requisitos presentes nos documentos técnicos da WADA.

Para assegurar que todos os laboratórios acreditados consigam detectar e reportar a presença de substâncias *non-threshold* a WADA estabelece o *Minimum Required Performance Levels* (MRPL), que é a concentração mínima que os laboratórios precisam ser capazes de detectar por métodos cromatográficos acoplados a espectrometria de massas. O MRL, quando existente, poderá ser igual ou maior que o MRPL, porém nunca menor (WADA, 2022).

É importante notar que o avanço dos métodos de dopagem e a intrínseca diferença entre cada técnica de amostragem, bem como o tempo de transporte, a composição das amostras dos atletas e os parâmetros analíticos têm papel fundamental na confiabilidade dos resultados, sendo necessário então normalização rigorosa dessas condições (LIPPI *et al.*, 2008).

4.a.2. Tipos de amostragem no Controle de Dopagem

A forma com que uma amostra é coletada e manejada é um dos fatores importantes do processo de amostragem. Seguindo padrões internacionais determinados pela WADA e pelo Comitê Olímpico Internacional (COI), as amostras

coletadas devem ser separadas de forma duplicada, denominadas amostras A e B, que serão encaminhadas simultaneamente para os laboratórios acreditados pela WADA.

Essa dupla amostragem é realizada para que em casos de Resultados Analíticos Adversos (RAA), uma amostra intacta (Amostra B) possa ser usada em um procedimento de contraprova que pode ser solicitado pelo atleta como confirmação da suspeita de dopagem.

O controle de dopagem pode ter várias fontes de material biológico do atleta, tais como sangue, saliva, cabelo e urina, porém a escolha da forma de amostragem deve ser baseada em quais substâncias há interesse de detecção (TROUT e KAZLAUSKAS, 2004). Um outro parâmetro a ser considerado é quais serão os alvos analíticos monitorados, já que algumas substâncias podem ser excretadas como foram ingeridas e outras são metabolizadas, o que deve ser considerado para a detecção da dopagem no esporte (TROUT e KAZLAUSKAS, 2004).

No geral, a urina é a matriz mais comumente utilizada na análise de controle de dopagem. Essa escolha ocorre por vários motivos, sendo os principais a vasta diversidade de substâncias e metabólitos presentes em altas concentrações nessa matriz em comparação com o sangue, por exemplo (TROUT e KAZLAUSKAS, 2004). Além disso, sua forma de amostragem menos invasiva, a grande quantidade de material coletado e o fato de possuir janelas de detecção relativamente longas (CAO *et al.*, 2015) tornaram esse tipo de amostragem uma prática comum ao longo dos anos.

Uma outra forma de amostragem utilizada é a coleta de sangue total, geralmente utilizada nas análises que têm por objetivo detectar o uso de substâncias ou técnicas que aumentem o transporte de oxigênio para os músculos visando melhorar o desempenho dos atletas, principalmente em esportes que exijam ampla capacidade aeróbica (DE OLIVEIRA *et al.*, 2014).

Algumas práticas de dopagem detectáveis na amostragem utilizando sangue são: a transfusão de sangue, substitutos sintéticos de sangue e manipuladores genéticos (DE OLIVEIRA *et al.*, 2014). Para essa coleta são utilizados kits de amostragem com tubos também separados em amostra A e B, de forma semelhante a amostragem de urina. A amostra coletada é então armazenada em dispositivos de transporte à temperatura controlada, seguindo para o laboratório acreditado pela WADA.

4.a.3 Dried Blood Spot (DBS)

Dried blood spot (DBS), ou mancha de sangue seco, é uma forma de micro-amostragem existente há mais de 50 anos, cuja utilização em análises de dopagem vem recentemente sendo estudada (KOJIMA *et al.*, 2015; TRETZEL *et al.*, 2014). O DBS é um tipo de *dried matrix spot* (DMS), técnica de amostragem onde uma pequena quantidade de amostra biológica é aplicada a um papel específico (TRETZEL *et al.*, 2014). Por ser necessária uma pequena quantidade de amostra, as DMSs em geral possuem vantagens quanto sua estocagem, transporte e coleta (MICHELY *et al.*, 2017).

A amostragem por DBS é utilizada para o monitoramento de glicose em coelhos há mais de um século, e seu uso em exames clínicos para identificar doenças e condições genéticas é corriqueiro. Pode-se citar o popular teste de Guthrie (teste do pezinho) em recém-nascidos, que é utilizado para identificar a doença fenilcetonúria, utilizando a abordagem do DBS (SADONES *et al.*, 2014).

Em geral, o uso de DBS oferece uma série de vantagens sobre as outras formas de amostragem rotineiramente utilizadas, tais como urina e sangue total. Dentre as vantagens do DBS podem-se citar: procedimento simples; demanda condições de transporte mais econômicas; não necessita de refrigeração; menor invasividade na coleta de amostra e mitigação do risco de infecções aos pacientes (TRETZEL *et al.*, 2015). Além disso, possui maior estabilidade quando comparado a outras matrizes que podem sofrer degradação enzimática, tais como urina e sangue total (THOMAS *et al.*, 2011).

No âmbito do controle de dopagem é importante que a estabilidade das amostras seja preservada para evitar falsos resultados causados por degradação das substâncias nas matrizes. Essa degradação, no caso da urina, pode ainda ser agravada quando as amostras não são submetidas a condições apropriadas de transporte e estocagem, principalmente em locais de altas temperaturas (TSIVOU, 2011), como o Brasil. Ainda assim, a urina é a matriz mais comumente utilizada no controle de dopagem por conter uma alta concentração de substâncias e metabólitos (LUIZ, 2019).

Desde 2021, a WADA publicou um documento que permite aos laboratórios de dopagem oferecer análises de triagem e confirmação de agentes dopantes, sendo uma

matriz complementar às análises rotineiras de urina, e focada principalmente em substâncias proibidas para atletas dentro e fora de competição (WADA, 2021). O TD propõe ainda harmonização de alguns parâmetros como coleta, análise, transporte e armazenamento. No entanto, o documento técnico de DBS aborda apenas a implementação para substâncias *non-threshold* sem MRL, e não estabelece ainda valor de MRPL para substâncias nessa matriz.

Ademais, a técnica de amostragem por DBS foi utilizada nas Olimpíadas de Beijing em 2022, sua primeira aplicação em eventos oficiais de grande porte. Mostrando a importância das pesquisas na área de DBS dentro do contexto do controle de dopagem visto que existe uma demanda pela implementação da técnica dentro das rotinas dos laboratórios acreditados.

4.a.4. Influência do Hematócrito

Apesar de todas as vantagens do DBS ele também apresenta limitações, sendo uma delas a influência do hematócrito. O hematócrito pode ser definido como a porcentagem de células vermelhas presentes no sangue. Esse parâmetro possui uma faixa de valores de 28 a 67% que pode ser influenciado por diversos fatores, tais como gênero, idade e condição de saúde. Esses valores são diretamente proporcionais a viscosidade do sangue, e, portanto, inversamente proporcionais ao espalhamento da mancha de sangue nos materiais absorventes à base de papel (O'MARA *et al.*, 2011).

Assim, amostras de DBS produzidas em papel a partir de um mesmo volume de sangue podem possuir áreas diferentes dependendo do valor do hematócrito. Quanto maior o hematócrito, mais viscoso será o sangue, consequentemente menor será o seu espalhamento no papel e a área da mancha produzida. Com isso, caso se fixe a área da mancha a ser extraída, possivelmente haverá uma diferença intrínseca na quantidade de matéria submetida à análise e consequentemente do sinal analítico obtido (KUMAR *et al.*, 2019).

Para o desenvolvimento de um método de DBS é importante garantir, através de testes, condições que permitam a diminuição ou ausência da influência do hematócrito, de forma a garantir a confiabilidade do resultado da análise. Assim, novos dispositivos de microamostragem foram utilizados para superar as principais desvantagens do DBS,

o chamado *Volumetric Absorptive Microsampling* (VAMS), que permite a coleta precisa de volumes de sangue pré-definidos para bioanálise (LONDHE & RAJADHYAKSHA, 2020; CHANG *et al.*, 2020). O VAMS proporciona uma vantagem importante na análise complementar da urina para agentes dopantes proibidos em competição (TRETZEL *et al.*, 2015) como estimulantes e glicocorticóides, classes que estão entre as mais comumente encontradas como agentes dopantes no esporte (WADA, 2020).

4.a.5. Análise de moléculas no controle de dopagem atualmente

No controle de dopagem atual para pequenas moléculas, que compreende as substâncias orgânicas de até 800 Da, o monitoramento é feito, frequentemente, por meio da análise destas substâncias na matriz urina. Por se tratar de matriz complexa é necessário um procedimento de pré-tratamento de amostra com finalidade de concentrar os analitos e eliminar possíveis interferentes. No Laboratório Brasileiro de Controle de Dopagem (LBCE) a análise dessas substâncias na etapa de triagem é realizada a partir da extração por fase sólida (SPE) para concentração e limpeza da amostra seguida de análise por CLAE-EMAR (OLIVEIRA, 2021).

Essa técnica empregada na etapa de triagem é bastante abrangente e realiza o monitoramento de mais de 450 substâncias (dentre substâncias proibidas e seus metabólitos) em apenas uma técnica de análise. Esse grupo de substâncias inclui tanto substâncias proibidas em competição quanto proibidas a todo tempo, algumas das quais foram escolhidas para serem monitoradas pela técnica de DBS nesse estudo.

Para implementar essa nova técnica na análise de algumas pequenas moléculas de interesse para o DBS é necessário o desenvolvimento de uma técnica de preparo de amostra considerando as especificidades desta amostragem e as diferenças entre as duas matrizes.

4.a.6. Substâncias proibidas em competição

Como dito anteriormente, as substâncias são classificadas pela lista da WADA como proibidas em competição e proibidas a todo tempo. Esse trabalho aborda algumas das substâncias proibidas em competição, que têm seu uso vedado no intervalo que

compreende a partir das vinte e três e cinquenta e nove (23:59) horas do dia anterior à competição até a coleta. As substâncias em competição que serão abordadas pertencem às classes dos estimulantes e dos glicocorticoides.

Pensando em um viés farmacocinético, o DBS poderia fornecer uma vantagem importante em uma análise complementar com a urina para algumas substâncias proibidas em competição. O uso do DBS para análise seria uma evidência dos níveis sanguíneos farmacologicamente relevantes no momento da competição (TRETZEL, 2015), e consequentemente, uma forma de correlacionar as concentrações dessas substâncias na urina com os efeitos farmacológicos.

Neste trabalho foram abordadas substâncias *non-threshold* com MRL, apesar do documento técnico publicado pela WADA contemplando apenas a análise por DBS de substâncias *non-threshold* sem MRL, até o presente momento (WADA, 2023). Tal escolha das substâncias proibidas em competição para este estudo, em um primeiro momento, deve-se ao fato delas figurarem na lista de resultados analíticos adversos mais frequentemente encontrados no controle de dopagem no esporte (WADA, 2020). Além disso, considerando a análise de DBS como ainda complementar no controle de dopagem, é interessante analisar substâncias proibidas em competição nessas duas matrizes, DBS e urina, buscando uma correlação na literatura entre concentração presente na urina e o efeito baseado na concentração presente no sangue do DBS.

4.a.6.a. Estimulantes

Os estimulantes são uma classe de substâncias capazes de aumentar a agilidade e resistência ao cansaço, podendo ser utilizados durante as competições para aumentar o desempenho dos atletas. Essa classe de substâncias inclui os estimulantes do sistema nervoso central (SNC), estimulantes psicomotores e aminas simpatomiméticas, todas com uso vedado em competição (LU *et al.*, 2010). Todas as substâncias dessa classe abordadas no presente estudo estão representadas na Figura 4.1.

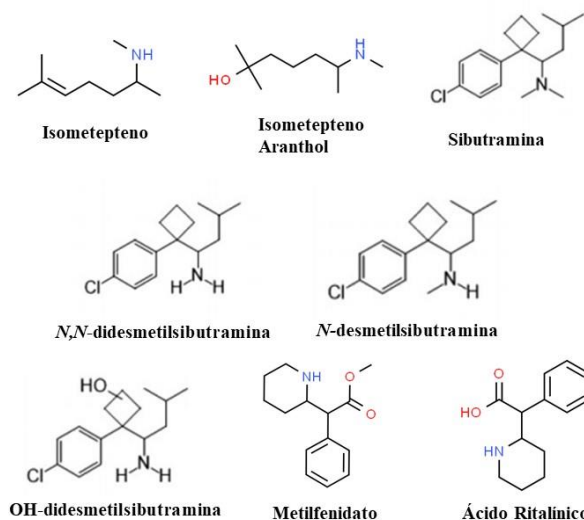


Figura 4.1. Substâncias proibidas em estudo da classe dos estimulantes.

Dentre os estimulantes proibidos em competição pela WADA estão a sibutramina, o metilfenidato e o isometepteno, substâncias que segundo relatório anual da WADA (WADA, 2020) correspondem a parte relevante dos casos de resultados analíticos adversos (RAAs) encontrados para essa classe. A sibutramina é uma substância utilizada no tratamento de obesidade em adultos, causando a perda de peso através da ação de dois metabólitos farmacologicamente ativos: *N*-didesmetil e a *N*-bisdesmetil sibutramina. Esses dois metabólitos suprimem o apetite e potencializam a sensação de saciedade, aumentando a termogênese pela supressão de serotonina e nor-epinefrina (LI e CHEUNG, 2009).

O metilfenidato é um estimulante do SNC amplamente utilizado no tratamento de crianças com TDAH (Transtorno do Déficit de Atenção com Hiperatividade). Entende-se que seu mecanismo de ação envolve estímulo nos receptores alfa e beta-adrenérgicos diretamente, utilizando a liberação de dopamina e noradrenalina indiretamente dos terminais sinápticos. A absorção dessa substância é rápida e o seu pico plasmático costuma ocorrer entre 1 e 3 horas após a sua ingestão (KIMKO *et al.*, 1999; PASTURA e MATTOS, 2004).

O isometepteno mucato é uma amina simpaticomimética com propriedades vasoconstritoras por mecanismos de ação envolvendo adrenoreceptores. Amplamente utilizada no Brasil, promove ação analgésica direta e indiretamente pela potencialização de outros analgésicos, como a dipirona. Seu mecanismo de ação atinge principalmente

músculos lisos e a vasoconstrição do crânio e arteríolas cerebrais para a diminuição das dores de cabeça (DE SOUZA CARVALHO *et al.*, 2012).

4.a.6.b. Glicocorticoides

Os glicocorticoides são uma classe de substâncias proibidas em competição pela WADA quando administradas por via oral, retal, intravenosa e intramuscular, sendo permitida a utilização por vias tópicas de administração (MATABOSCH *et al.*, 2015). A prednisolona e a prednisona são utilizadas como fármacos desde os anos 1950, sendo os primeiros glicocorticoides sintéticos. Ambos são agentes anti-inflamatórios e imunossupressores para diversas enfermidades. A prednisona pode ser ainda classificada tanto como um pró-fármaco quanto como um metabólito do fármaco ativo prednisolona (MATABOSCH *et al.*, 2015).

A prednisona é utilizada clinicamente para tratar de doenças crônicas, como asma, tireoide, artrites entre outros. Essa medicação é inativa até que é convertida a prednisolona no fígado. A prednisolona, assim como outros glicocorticoides, age pela ligação a um receptor de glicocorticoides localizado no citoplasma, causando assim a alteração conformacional do receptor ligado. Uma vez modificado, esse complexo sofre um aprimoramento de sua função gênica promovendo a ação anti-inflamatória (VANDEWALLE *et al.*, 2018). A prednisona, prednisolona e seus metabólitos abordados neste estudo encontram-se representados na Figura 4.2.

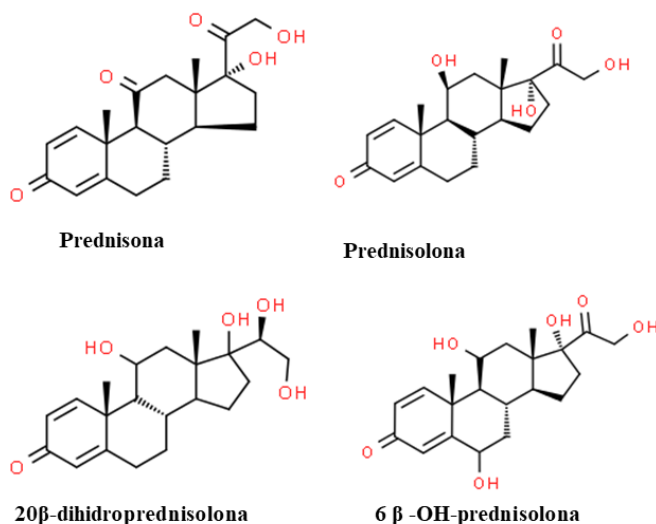


Figura 4.2. Substâncias proibidas em estudo da classe dos Glicocorticóides.

4.a.7. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) é uma técnica analítica de separação de substâncias que se utiliza de uma fase estacionária sólida, empacotada em uma coluna, e de uma fase móvel líquida, que passa pela coluna sob elevadas pressões (AQUINO-NETO, 2003). Os componentes fundamentais de um sistema de CLAE constam na Figura 4.3.

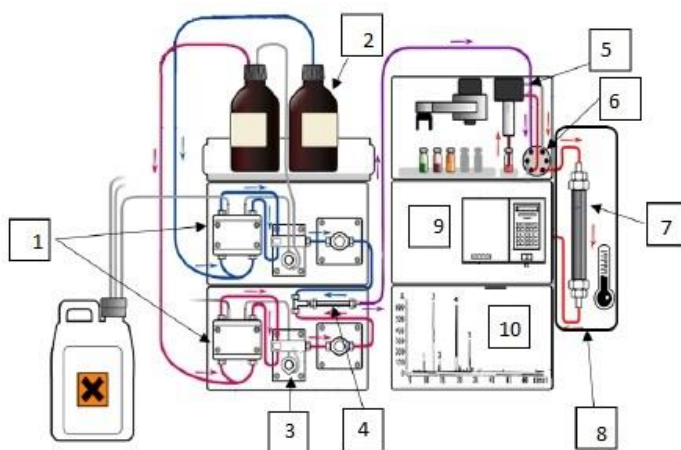


Figura 4.3. Esquema de componentes de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).
(Adaptada de: "Preparative HPLC.svg" de GYassineMrabetTalk)

Dentre os componentes do CLAE, podemos enumerar: Bomba de alta pressão (Figura 4.3 -1), que é o sistema composto pela bomba e controladores de pressão e vazão, os quais são essenciais para que se mantenha o tempo de retenção, reprodutibilidade e sensibilidade entre as análises; Fases móvel (Figura 4.3-2) estão presentes normalmente em reservatórios de vidro com os solventes que constituem a fase móvel; Degaseificador (Figura 4.3-3) é o componente responsável por retirar os gases e impurezas nos líquidos como forma de prevenir um desgaste da coluna e interferir no sinal do detector; Misturador de solventes (Figura 4.3-4) é o homogeneizador da mistura de fases móveis; Sistema de injeção da amostra (Figura 4.3-5 e 4.3-6): um sistema por onde a amostra é introduzida, com volume determinado, a partir de uma válvula de amostragem ou por meio de uma seringa de injeção; Colunas cromatográficas (Figura 4.3.7) são usualmente constituídas de tubos de aço inoxidável, possuindo recheio constituído da fase estacionária empacotada, muitas vezes composta por partículas de sílica de tamanho micrométricos; Forno (Figura 4.3-8) é o responsável por manter a temperatura da coluna constante; e o Detector (Figura 4.3-9) que é utilizado para monitorar a composição da fase móvel que elui da coluna, gerando sinais para os sistemas de dados que assim produzem o cromatograma (Figura 4.3-10).

4.a.8. Espectrometria de Massas de Alta Resolução (EMAR)

A espectrometria de massas de alta resolução (EMAR) é uma técnica que consiste na ionização de um composto e subsequente separação dos íons de acordo com a razão massa/carga (m/z). A quantidade de íons de cada m/z é transcrita como um espectro (SILVERSTEIN *et al.*, 2005). O sistema de ionização por eletrospray (*Electron Spray Ionization*, ESI) foi um avanço que permitiu o acoplamento entre a cromatografia líquida e a espectrometria de massas por meio da sua capacidade de transformação, à pressão atmosférica, de íons em fase condensada para a fase gasosa (FENN *et al.*, 1989).

A fonte de ESI possui três etapas principais de funcionamento, como pode ser verificado na Figura 4.4. A ionização por ESI se inicia com a emissão de um spray de gotículas, resultante da passagem de um fluxo de solução de amostra através de um capilar de aço inox, sendo seguida pela evaporação do solvente, promovida pela corrente coaxial de gás de secagem (N_2) (FENN *et al.*, 1989; HO *et al.*, 2003), que permite então a evaporação progressiva do solvente e eventual aumento da densidade de carga

superficial das gotículas. Posteriormente, ocorre a ejeção de gotículas carregadas as quais ao chegar no limite de Rayleigh sofrem de uma explosão coulombica e produção de gotas-filhas que evaporam (HO *et al.*, 2003). Com o fim dessa cadeia de acontecimentos os íons são dessorvidos para a fase gasosa (FENN *et al.*, 1989).

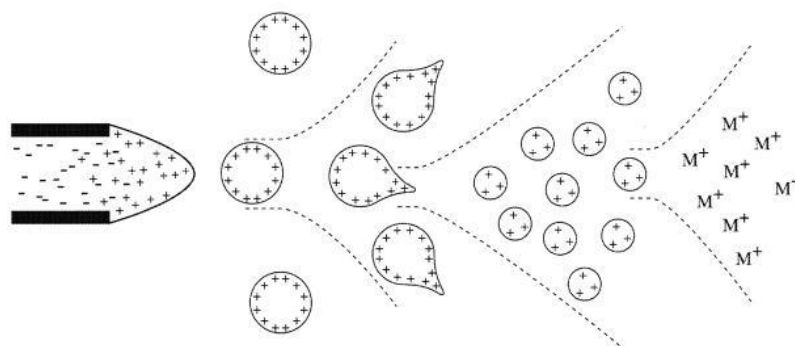


Figura 4.4. Etapas do processo de ionização por eletrospray (ESI) (FENN *et al.*, 1989).

4.a.9. Validação

A validação de um método analítico é um processo que visa garantir comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade dos resultados analíticos obtidos, assegurando que o método é adequado para aplicação rotineira sob as condições determinadas (RIBANI *et al.*, 2004).

De acordo com documento técnico sobre o método de DBS estabelecido pela WADA (WADA, 2023), a seleção e a validação dos procedimentos de análise por DBS devem estar de acordo com as aplicadas para substâncias *non-threshold* sem MRL. Nesse contexto, foram selecionados parâmetros de validação que são definidos no *International Standards for Laboratories (ISL)* pela WADA para substâncias analisadas qualitativamente sem concentração mínima.

Os parâmetros e critérios abordados nesse trabalho são: seletividade, estabilidade de amostra extraída, arraste, rendimento de extração, efeito matriz, precisão intra-ensaio, precisão inter-ensaio e limite de detecção (LOD), parâmetros também comumente abordados na literatura durante a validação do método de DBS (TRETZEL *et al.*, 2014; THOMAS *et al.*, 2011; WAGNER *et al.*, 2016).

4.a.9.a. Seletividade

A seletividade é a capacidade de um método de produzir resultados onde é possível diferenciar o analito de potenciais interferentes presentes na matriz (endógenos), de forma inequívoca. Esse parâmetro avalia ainda o quanto de interferência produtos de degradação, impurezas, excipientes e ingredientes ativos podem realizar caso estejam presentes. A seletividade garante que há separação do analito e de outros componentes e que o pico de resposta é referente a substância de interesse (RIBANI *et al.*, 2004).

4.a.9.b. Estabilidade das amostras extraídas

A estabilidade das amostras extraídas consiste na avaliação do tempo em que as amostras se mantêm em condições de análise após o fim dos procedimentos de bancada. A avaliação desse parâmetro é essencial visto que é comum que amostras extraídas tenham suas corridas cromatográficas realizadas durante a noite ou dia seguinte ao procedimento, o que a submete a diferentes termos de temperatura e tempo, logo é importante essa avaliação para gerar resultados confiáveis e reproduzíveis. Ao se tomar conhecimento da estabilidade de uma amostra é possível realizar as análises antes que ocorra degradação (RIBANI *et al.*, 2004).

4.a.9.c. Arraste

A avaliação do parâmetro de arraste consiste em examinar a possibilidade de que ocorra durante uma análise instrumental a contaminação de uma amostra branca por outra que contenha os analitos (WADA, 2021). A avaliação desse parâmetro é importante para eliminar a possibilidade de falsos positivos causados por arraste.

4.a.9.d. Rendimento de Extração

O rendimento de extração consiste em uma avaliação de quanto de amostra pode ser recuperada quando é submetida pelo procedimento de extração. Esse parâmetro pode ser considerado uma forma de mensurar a eficiência do método analítico e pode ser utilizado para a otimização de variáveis que influenciem na extração.

A informação do rendimento de extração é obtida através da comparação entre o resultado (razão área do analito / área do padrão interno) obtido com uma amostra fortificada que sofre procedimento de extração em relação ao resultado obtido com uma amostra branca em que a mesma quantidade de analito é adicionada após a etapa da extração.

4.a.9.e. Efeito Matriz

Efeito Matriz consiste em potenciais fenômenos de supressão ou ampliação do sinal analítico causados por interferência de elementos que compõem a matriz amostral (no caso, sangue seco). A avaliação do efeito matriz foi realizada através da comparação da resposta (área do analito) obtida em um caso em que foi utilizado o DBS (sangue seco na matriz absorvente) em comparação ao caso em que nem o sangue nem o material absorvente foram utilizados. Em ambos os casos, a mesma quantidade de analito é adicionada após a extração.

4.a.9.f. Precisão Intra e Interensaio

A precisão interensaio ou repetibilidade expressa a variabilidade analítica dentro de um mesmo ensaio, ou seja, nas mesmas condições de trabalho. Enquanto a precisão interensaio ou precisão intermediária é avaliada variando-se as condições experimentais, como o dia do ensaio, o analista, o equipamento, entre outros. Ambas são expressas na forma de desvio padrão relativo (RSD%). A determinação da precisão intra e interensaio foi realizada em três níveis de concentração (100%, 70% e 50% da concentração de trabalho) em dois dias distintos, apenas para o dispositivo VAMS-Mitra®.

4.a.9.g. Limite de Detecção (LOD)

O LOD um parâmetro de validação que determina a menor concentração que uma substância pode ser identificada de maneira inequívoca, mesmo que não de forma quantitativa (RIBANI *et al.*, 2004). O LOD dos analitos foi determinado matematicamente (sigmoid –fit) como a concentração em que o analito será detectado em 95% dos casos.

4.a.10 Avaliação da estabilidade em diferentes condições de temperatura ao longo do tempo

A avaliação da estabilidade dos analitos em estudo (figura 4.1 e 4.2) presentes na amostra de DBS dos dispositivos VAMS- Mitra® foi feita de modo a determinar a influência das condições de transporte e estocagem na detecção de tais analitos. Dessa forma, as amostras de DBS fortificadas foram armazenadas a temperatura ambiente, a 4°C ou a -20°C e a extração foi realizada após 1, 5, 19, 30 ou 60 dias (no caso da temperatura ambiente, apenas 1, 5 e 19 dias). A avaliação da estabilidade foi feita comparando-se a razão Analito/Padrão Interno da amostra estocada com a razão Analito/Padrão Interno de um controle positivo fresco, fortificado no dia da extração.

4.b. Objetivo

O objetivo geral do trabalho é validar um método de análise por DBS utilizando CLAE-EMAR para a detecção de substâncias proibidas para atletas para possível aplicação nas análises de rotina da triagem do LBCE.

4.b.1. Objetivos Específicos

- Otimização e validação de método multiresíduo de triagem em amostras de DBS com análise por CL-EMAR de acordo com os requisitos exigidos pela WADA;
- Verificação da potencial influência do hematócrito nas amostras de DBS coletadas em suporte absorvente não volumétrico.

4.c. Procedimento Experimental

4.c.1. Materiais e Métodos

Todos os solventes utilizados foram de grau HPLC. Ácido fórmico, formiato de amônio, metanol, acetonitrila, terc-butil-metil-éter e o ácido acético foram obtidos da Tedia (Fairfield, EUA). A água ultrapura utilizada foi proveniente do sistema de água Milli-Q-Millipore (18MW cm⁻¹) (Massachusetts, EUA).

Os materiais de referência dos analitos avaliados foram obtidos dos seguintes fornecedores: AtlanChim Pharma (Saint-Herblain, França), Auspep (Victoria, Australia), British Pharmacopoeia (London, UK), Cayman Chemical (Ann Arbor, EUA), Cerilliant (Round Rock, EUA), ChemScene (New Jersey, EUA), Chiron AS (Emeryville, EUA), Enamine Ltd (Kyiv, Ukraine), European Directorate for the Quality of Medicines EDQM (Strasbourg, France), GlaxoSmithKline (Brentford, UK), LGC Standards (Teddington, UK), MedChemExpress MCE (New Jersey, EUA), Medical Isotopes Inc. (Ottawa, Canada), MediChem SA (Barcelona, Spain), National Measurement Institute NMI (Lindfield, Australia), Santa Cruz Biotechnology (Dallas, USA), Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA), Steraloids Inc. (Newport, EUA), Toronto Research Chemicals Inc. TRC (North York, Canada), U.S. Pharmacopeia (North Bethesda, EUA), ou doados de outros laboratórios que realizam controle de dopagem. Os analitos avaliados constam nas Tabela 4.4 e Tabela 4.5. Os padrões internos utilizados foram: 7-propil-teofilina (para analitos S7 e S8), formoterol-D6 (para analitos S3), testosterona-D3 (para analitos S1 e S4), mefrusida-D3 (para analitos S5), cortisona-D8 (para analitos da classe S9) e a efedrina-D3 (para os analitos S6), foram obtidos da *Life Chemicals* (Washington DC, EUA).

Os cartões de aplicação do DBS, Whatman 903TM foram obtidos da Whatman GE (Uppsala, Suécia). O Dispositivo de microamostragem absorptiva volumétrica (*Volumetric Absorptive Microsampling*, VAMS) utilizado foi o Mitra® (Neoteryx, EUA), com capacidade de coletar 30uL.

4.c.2. Procedimento de Extração

Para a realização dos ensaios foi adaptado o procedimento de DBS descrito por Thomas e colaboradores (THOMAS *et al.*, 2011). Foi coletado 4 mL de sangue venoso de voluntários (Certificado de Apresentação para Apreciação Ética - CAAE: 40915120.0.0000.5257) em tubo de coleta com paredes encobertas pelo anticoagulante EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético). Alíquotas são transferidas para microtubos de 1,5 mL, correspondendo aos controles positivos e negativos. Os controles positivos foram preparados pela adição de solução mix padrão dos analitos.

A concentração final dos analitos em sangue total correspondeu ao MRPL (ou valor inferior a este) estabelecido para a matriz urina, já que ainda não existe MRPL estabelecido para o DBS no controle de dopagem. Nas Tabela 4.4 e

Tabela 4.2, pode-se encontrar, respectivamente, a concentração de trabalho dos analitos em cada *spot* de 20 μ L de DBS no Whatman 903TM ou de 30 μ L de DBS no VAMS (Mitra®). Os controles negativos foram preparados pela adição de sangue total, sem os analitos. Em seguida, foram feitos spots desses controles nos cartões, Whatman 903TM, utilizando pipeta automática calibrada com um volume de 20 μ L, bem como o carregamento do sangue nos VAMS conforme instruções do fabricante. Uma gota de 50 μ L do sangue fortificado (controle positivo) ou puro (controle negativo) foi pipetada num parafilme, na qual encostou-se a ponta do material absorvente a 45°C. Dois segundos após a saturação do dispositivo, retirou-se o dispositivo do contato com o sangue. Os cartões e os VAMS foram deixados em repouso a temperatura ambiente para secagem por duas horas. Após secagem, os spots inteiramente recortados com uma tesoura, e os VAMS foram transferidos para microtubos de 1,5 mL, onde foi adicionado 5 μ L de solução de padrão interno (7-propilteofilina, efedrina-D3, cortisona-D8 e mefrusida-D3), e em seguida adicionado 400 μ L da solução de extração de metanol:acetonitrila:ácido acético aquoso 2% (1:1:1). Os tubos foram sonicados por 30 minutos a temperatura inicial de 30°C. Após a retirada do sonificador foram centrifugados a 17.000g por 5 min e o sobrenadante resultante separado e evaporado a 40°C por cerca de 20 min. A reconstituição da amostra foi feita com 50 μ L (Whatman 903TM) ou 100 μ L (VAMS) da fase móvel aquosa/orgânica 80:20 (água/metanol com 0,1% de ácido fórmico e 5mM de formiato de amônio). Esse extrato foi transferido para um vial e injetado em cromatógrafo líquido acoplado a um espectrômetro de massas (LC-MS). Uma representação do procedimento experimental pode ser encontrada na Figura 4.5.

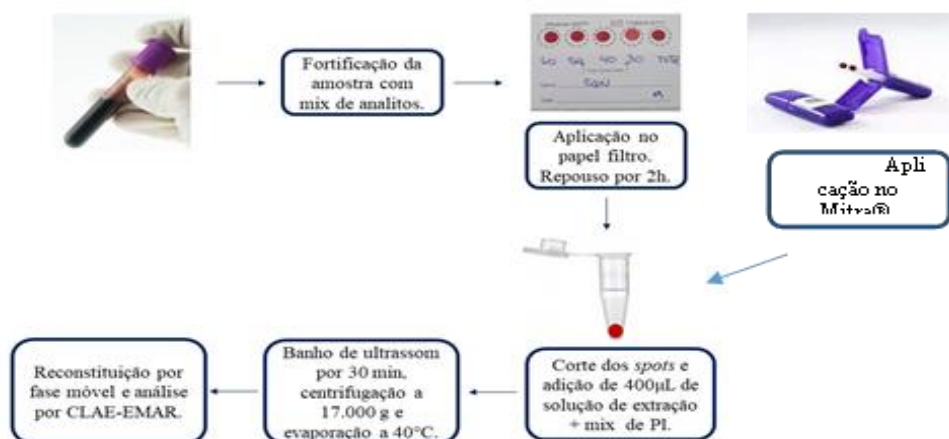


Figura 4.5. Procedimento de extração para método de DBS utilizando Whatman 903™ e VAMS Mitra®.

4.c.3. Análise Instrumental

O método instrumental utilizado para o desenvolvimento do método de triagem por DBS foi o mesmo descrito por Oliveira e colaboradores (OLIVEIRA, 2021) e utilizado em análises rotineiras na triagem de pequenas moléculas do LBCD (Laboratório Brasileiro de Controle de Dopagem). As análises instrumentais foram realizadas utilizando cromatógrafo líquido Dionex 3000 UHPLC (Thermo Scientific) acoplado a um espectrômetro de massas de alta resolução Q-Exactive Plus (Thermo Scientific) com ionização por eletrospray. A coluna cromatográfica utilizada foi uma C18 de fase reversa (1,7 microm, 50x 2,1 mm) na temperatura de 40°C. As fases móveis (FM) foram compostas de: 0,1% de ácido fórmico e 5mM de formiato de amônio em água (A) e de 0,1% ácido fórmico em metanol (B). O gradiente de eluição foi de: 5% de FM B até 0,3 min; 5-10% de 0,3 à 0,5 min; 10-25% de 0,5 à 1 min; 25-90% de 1 a 6 min; 90-100% de 6 a 8 min; 100% de 8 a 9 min; e de 100-5% de 9,1- 12 min. A voltagem do spray de 3,9 kV, a temperatura do capilar de 380 °C e o nível de radiofrequência (RF) da lente S definido para 40 (unidades arbitrárias). O equipamento operou em modo de varredura total na faixa de m/z 100-670.

4.c.4. Avaliação da Influência do Hematócrito

Nesse ensaio foi avaliada a influência do hematócrito em duas formas de corte dos *spots*, uma onde é cortada uma área fixa e outra onde os *spots* eram cortados de forma total. Para isso foi coletada amostra de sangue venoso de voluntário e medido seu

hematócrito por um Analisador Hematológico Automatizado. Essa amostra em seguida passou por procedimento de diluição ou concentração para gerar hematócritos nos valores de 30, 40, 50 e 60%, como descrito na Figura 4.6.

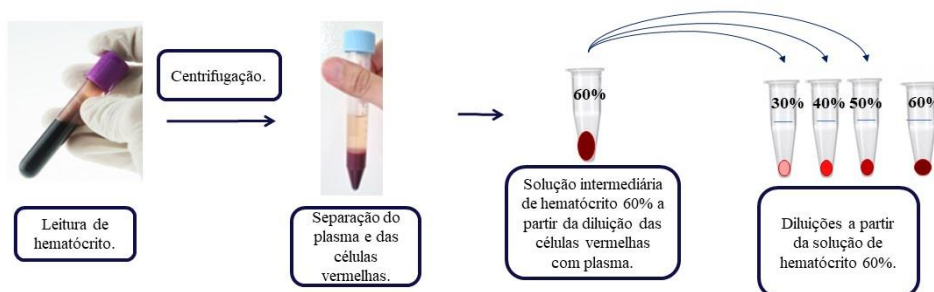


Figura 4.6. Procedimento de mimetização de hematócritos para teste de Influência de Hematócrito.

A avaliação foi realizada entre 30 e 60% de HCT, que engloba a faixa fisiológica de hematócrito de homens e mulheres. Estes valores de hematócrito foram obtidos a partir da diluição de uma amostra de sangue com hematócrito original igual a 45%. Inicialmente, foi retirada uma alíquota do sangue total para preparo dos controles negativo e positivo. Em seguida, 4mL do sangue foram transferidos para um tubo cônico de capacidade de 15mL, o qual foi submetido à centrifugação por 10 min à 1000g. Após a centrifugação, o plasma foi separado em outro tubo, e o material celular foi lavado duas vezes com 4mL com tampão fosfato de sódio (PBS), realizando-se uma nova centrifugação de 4 minutos min à 1000g entre as lavagens. O preparo da solução de HCT 60% ocorreu pela adição de 1,2 mL de plasma ao material celular, após remoção do PBS. O Sangue de HCT 60% foi então separado em alíquotas para adição dos volumes adequados de plasma, de modo a se obter sangues com HCT de 50%, 40% e 30%.

Este procedimento foi realizado apenas para o papel Whatman, e não para os dispositivos Mitra®, que fazem coleta volumétrica, e consequentemente, o efeito de influência do hematócrito se torna desprezível.

4.d. Validação

Os ensaios de validação foram realizados utilizando-se seis a dez amostras de sangue venoso fortificado com solução dos analitos de referência em concentração conhecida.

Para o papel Whatman 903TM, os analitos fortificados e validados foram os estimulantes e glicocorticoides descritos no item 4.a.6, figuras 4.1 e 4.2.

Para o VAMS- Mitra®, os analitos fortificados abrangem as classes M1, S3, S4, S5, S6, S7, S8 e S9, totalizando os mais de 300 analitos presentes na Tabela 4.5. Os padrões internos (PI) utilizados estão descritos no item 4.c.1.

Para a validação do procedimento utilizando-se amostras de DBS nos cartões Whatman 903TM e no VAMS-MITRA, foram avaliados os parâmetros de: seletividade, estabilidade de amostra extraída, arraste, rendimento de extração, e limite de detecção (LOD). Adicionalmente, para o VAMS-MITRA, também se avaliou o efeito matriz, bem como a precisão intra e inter-ensaio. A validação foi baseada na *International Standard for Laboratories* (ISL 2021) da WADA e nos parâmetros comumente abordados na literatura durante as validações de métodos de DBS com o objetivo de garantir resultados adequados ao propósito do controle de dopagem.

4.d.1. Seletividade

Foram analisados dois lotes de 5 amostras de branco de sangue de origem diferentes por analistas distintos. Essas amostras foram fortificadas com solução de mistura dos analitos e com o PI para formar os controles positivos, e apenas com PI para formar os controles negativos.

Todas as amostras foram extraídas e analisadas por CLAE-EMAR. Para verificar a seletividade do método foi verificado a existência de interferentes nos tempos de retenção dos analitos e do PI.

4.d.2. Estabilidade da amostra extraída

O teste de estabilidade de amostra extraída se é realizado pela reinjeção das amostras do lote 24h a 48h após a primeira injeção. O critério utilizado para determinar se há estabilidade da amostra foi o mesmo utilizado pelo LBCD na análise de substâncias qualitativas sem estimativa de concentração mínima permitida. O critério então

determina que é observada estabilidade da amostra extraída quando a substância é identificada em 100% das amostras reinjetadas.

4.d.3. Arraste

O arraste foi avaliado pela injeção de uma amostra fortificada com analitos a 400% da concentração de trabalho correspondente ao MRPL (ou valor inferior a este) precedida por uma amostra de controle negativo e seguida por outra amostra de controle negativo.

4.d.4. Precisão Intra e Interensaio

A precisão intra e a precisão interensaio (avaliada em dois dias diferentes) foram determinadas para o VAMS- Mitra® em dois lotes, cada um contendo três diferentes amostras de DBS fortificadas com os analitos sob investigação em três níveis de concentração: baixa (50% da concentração de trabalho), média (correspondente a 70% de trabalho) e alta (correspondentes a concentração de trabalho). Ambos precisão intra-ensaio e precisão inter-ensaio foram expressas como RSD (%).

4.d.5. Efeito matriz

O efeito matriz do DBS no VAMS foi avaliado pela análise da área do analito de quatro sangues brancos de voluntários diferentes, fortificados após a etapa de extração em comparação com 4 amostras que seguiram procedimento idêntico em paralelo, em que não foi utilizado sangue nem o MITRA (somente, adição da solução de extração e PI), fortificadas após a etapa de extração.

4.d.6. Rendimento de Extração

Para avaliação do rendimento de extração foram preparadas três (Whatman 903TM) a quatro (VAMS- Mitra®) amostras de sangue provenientes de voluntários distintos, que foram fortificadas antes da aplicação no cartão ou no VAMS. A razão área do Analito/Padrão interno foi então comparada com a razão encontrada para amostras

de DBS proveniente do sangue dos mesmos voluntários que foram fortificadas somente após o procedimento de extração.

4.d.5. Limite de Detecção (LOD)

Para cada nível de concentração avaliado, dez (Whatman 903TM) ou seis (VAMS-Mitra®) brancos de sangue provenientes de voluntários distintos foram separados em dois lotes de cinco (Whatman 903TM) ou três (VAMS-Mitra®) amostras para serem preparados por analistas diferentes ou em dias distintos. Cada lote foi fortificado nas concentrações das substâncias de: 100, 70, 40, 20, 5 e 0,1% do MRPL (Whatman 903TM) ou 100, 70, 50, 30, 10, 1 e 0,1% da concentração de trabalho que consta na

Tabela 4.2 (VAMS-Mitra®). A estimativa do LOD de cada substância é obtida a partir de uma curva de resposta de detecção, que é descrita por uma função sigmoide, considerando 95% de detecção.

4.e. Resultados e Discussão

4.e.1. Teste prévio do Procedimento de Extração

Com o objetivo de avaliar a eficiência do processo de extração realizado em procedimento descrito no artigo de THOMAS e colaboradores foi realizado um teste prévio de extração com DBS no papel Whatman 903TM. Como descrito em artigo (THOMAS *et al.*, 2011) esse procedimento utilizou 10 min de tempo de banho de ultrassom e como solução de extração uma mistura de metanol:acetonitrila:ácido acético aquoso 2% (1:1:1).

Os analitos estudados foram, então, submetidos ao procedimento de preparo de amostra do artigo e o rendimento de extração de cada uma das substâncias consta a Figura 4.7. Em média, a recuperação dos analitos foi de 34% com o método de Thomas e colaboradores. Nenhuma das substâncias estudadas obteve recuperação maior que 50% e a sibutramina foi a que obteve o pior resultado, de 12%.

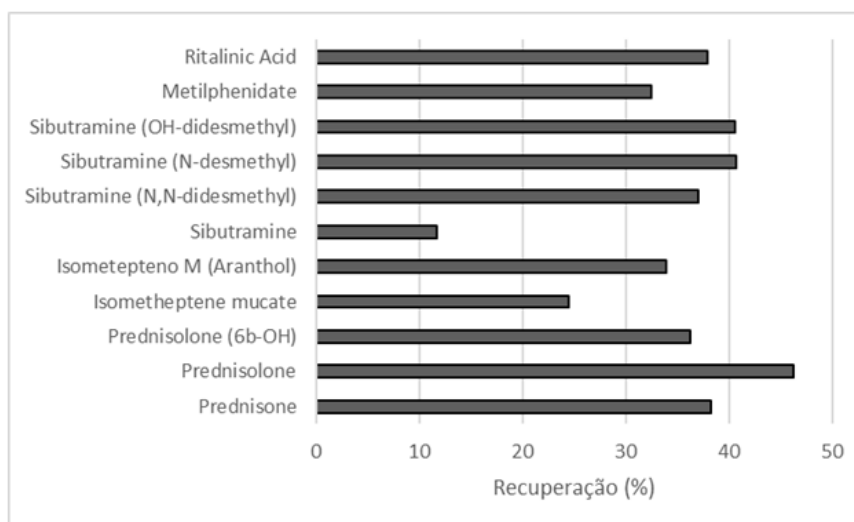


Figura 4.7. Gráfico do ensaio de recuperação prévia.

A fim de alcançar valores maiores de recuperação foram propostos testes de otimização dos parâmetros de maior influência na capacidade de extração do procedimento de preparo de amostra. Os parâmetros escolhidos para serem otimizados foram o tempo do banho de ultrassom e a solução utilizada para extrair as substâncias do papel.

4.e.2. Otimização dos parâmetros

4.e.2.a. Tempo de Banho de Ultrassom

Devido ao baixo rendimento de extração obtido no teste prévio para as substâncias escolhidas no estudo, uma otimização nos parâmetros foi proposta. Utilizando-se o papel Whatman 903TM, o teste de otimização dos parâmetros estudou a alteração do tempo de ultrassom e de solução de extração utilizados por THOMAS e colaboradores. O primeiro parâmetro abordado foi o tempo de banho de ultrassom. Sendo assim, foi realizado experimento similar ao teste prévio de extração modificando apenas esse parâmetro, de forma a comparar os rendimentos de extração com o aumento do tempo do tempo sob o banho de ultrassom. O tempo de banho ultrassônico foi aumentado para 30 min. A recuperação de extração das substâncias em estudo em comparação com as do teste prévio consta na Figura 4.8.

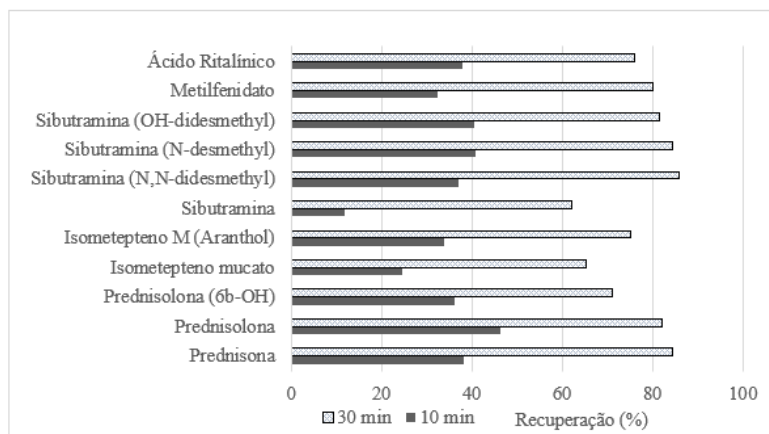


Figura 4.8. Recuperação dos analitos nas condições experimentais utilizadas.

Os resultados descritos na Figura 4.4 mostram que o teste feito com o parâmetro tempo aumentado obteve recuperações de até 86%, sendo o rendimento anterior mais alto de 46%. O resultado de menor recuperação seguiu sendo para a Sibutramina, uma recuperação de 12% com 10 min e 62% para o parâmetro otimizado. Além disso, a média das extrações anterior era de 34% e passou a 77%. Sendo assim, é possível observar uma maior eficiência de extração das substâncias em estudo com 30 min de ultrassom e esse valor foi o utilizado nos testes seguintes.

4.e.2.b. Soluções de Extração

Para a realização dos testes de solução extração foi utilizado tempo de ultrassom de 30 min que demonstrou maior eficiência nos resultados do teste descrito anteriormente. Na avaliação do parâmetro de soluções de extração foi realizado o procedimento de extração com três diferentes soluções: metanol:acetonitrila:ácido acético aquoso 2% (1:1:1); metanol:acetonitrila (1:1); metanol:éter metil terc-butílico (1:1). Os resultados de recuperação da extração para cada uma das substâncias em estudo são apresentados na Figura 4.9.

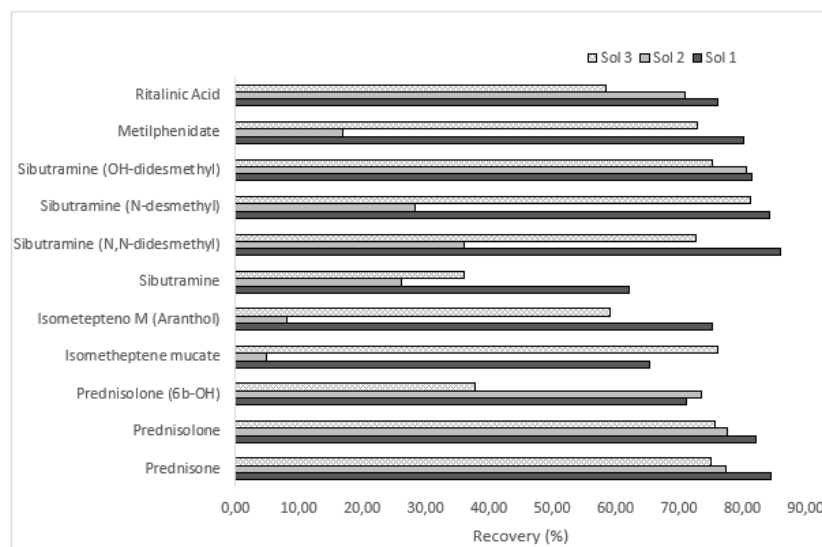


Figura 4.9. Ensaio de recuperação dos analitos no papel Whatman 903TM com soluções de extração: (1) metanol:acetonitrila:ácido acético aquoso 2% (1:1:1); (2) metanol:acetonitrila (1:1) e (3) metanol:éter metil terc-butílico (1:1).

Analisando a Figura 4.9, pode-se observar que houve uma recuperação pela solução 3 com menor rendimento de extração de 38% para a 6 β -OH-prednisolona e melhor rendimento para a *N*-desmetil-sibutramina de 81% com média das recuperações de todas as substâncias de 65%. Já para a solução 2, a média geral dos rendimentos foi a mais baixa entre todas as soluções com 45%. O menor rendimento de 5% ocorreu para o Isometepto Mucato, e o melhor rendimento para a OH-disdesmetil-sibutramina de 81%. A solução 1 apresentou os maiores valores gerais de rendimento com média de 77%. Seu menor rendimento ocorreu com a Sibutramina com 62% e o melhor com a *N,N*-didesmetilsibutramina com 86%.

As recuperações obtidas a partir desse experimento foram submetidas a análise estatística com teste de ANOVA seguido por Teste de Tukey. Foi possível então comparar matematicamente os valores de recuperação de cada substância e foi determinada diferença estatística significativa entre as soluções de extração na recuperação da sibutramina. Com isso, é possível afirmar que de forma geral a solução de extração mais eficiente para o procedimento é a solução metanol:acetonitrila:ácido acético aquoso 2% (1:1:1) que obteve maior recuperação para todas as substâncias.

A melhor recuperação observada por essa solução poderia ser explicada pela presença do ácido acético 2% em meio aquoso, que tornaria a ionização das substâncias

mais efetiva e logo mais solvatáveis. Assumiu-se então como parte do procedimento experimental para os testes seguintes a adaptação do tempo de banho de ultrassom para 30 minutos e a solução de extração metanol:acetonitrila:ácido acético aquoso 2% (1:1:1).

4.e.2.c. Influência do Hematócrito (HCT) e forma de corte dos *spots* de DBS

Conforme já é descrito amplamente na literatura, há uma diferença no espalhamento do sangue no papel Whatman 903™. Quanto mais alto o valor do HCT, menor o espalhamento e consequentemente menor a área do spot, devido à maior viscosidade do sangue. Com esse conhecimento, já seria esperado que o recorte de uma área fixa dos spots resultaria na perda de quantidade do analito para amostras de HCT mais baixo em comparação com amostras de HCT maiores. Entretanto, o recorte parcial dos spots, utilizando-se um furador, por exemplo, agilizaria o processo de análise das amostras. Por isso, foi avaliado impacto na detecção dos analitos que a forma de recortar o spot no papel Whatman 903™ (total, com tesoura ou parcialmente, com o furador) poderia causar em amostras com HCT diferentes.

Com o objetivo de averiguar uma possível influência de hematócrito no método e abordar uma harmonização no padrão de corte dos *spots*, foi realizado o ensaio de influência de hematócrito para as amostras de DBS no papel Whatman 903™.

Segundo literatura para considerar a ausência da influência de hematócrito é necessário que as medições obtenham desvio padrão relativo (DPR) para a substância menor que 15% e que a acurácia da medição pertença a faixa de 85 a 115% (WAGNER *et al.*, 2016). Para o cálculo de acurácia foi também extraída uma amostra de sangue não modificado, cujo resultado serviu como referência para a acurácia das outras substâncias.

É possível notar através dos resultados presentes na Figura 4.11 que o DPR das razões entre as Áreas dos analitos/ Áreas do Padrão Interno das amostras cujos *spots* foram recortados parcialmente (por furador) foi maior do que a dos spots recortados integralmente (por tesoura).

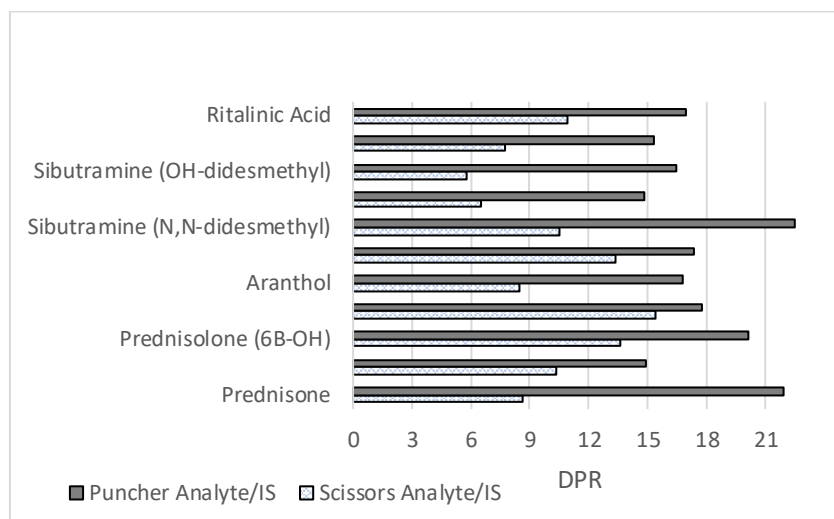


Figura 4.11. Comparação de desvio padrão relativo (DPR) para furador e tesoura.

Considerando-se o critério presente na literatura (WAGNER *et al.*, 2016; O'MARA *et al.*, 2011) de $DPR < 15\%$ e acurácia entre 85-115% para se descartar a influência do hematócrito, considera-se que o método, utilizando-se os *spots* recortados integralmente cumpriu ambos os requisitos, diferentemente do procedimento utilizando-se o recorte parcial. Os valores de acurácia encontrados no caso em que houve recorte integral do *spot*, tomando-se como parâmetro os controles positivos preparados no sangue original (que não foi manipulado pelas etapas de centrifugação, lavagem e diluição) podem ser encontrados na Tabela .

Assim, foi considerado que, desde que se utilize a área total do *spot*, o método que não apresenta influência do hematócrito. Por isso esse foi o procedimento adotado nas etapas de validação do método.

Tabela 4.1: Acurácia do ensaio de influência do hematócrito.

Classe /Analito	Acurácia (%)
S9. Prednisona	89
S9. Prednisolona	95
S9. 6β-OH-prednisolona	94
S6. Isometepteno mucato	85
S6. Isometepteno M1 (Aranthol)	90
S6. Sibutramina	85
S6. <i>N,N</i> -didesmetil-sibutramina	99
S6. <i>N</i> -desmetil-sibutramina	90
S6. OH-didesmetil-sibutramina	87
S6. Metilfenidato	88
S6. Ácido ritalínico	85

4.f. Validação

4.f.1. Seletividade

Tanto para a validação com o papel Whatman 903TM, como para o VAMS- Mitra® não foram observados interferentes no tempo de retenção das substâncias e metabólitos em estudo ou dos padrões internos utilizados (Figura 4.12).

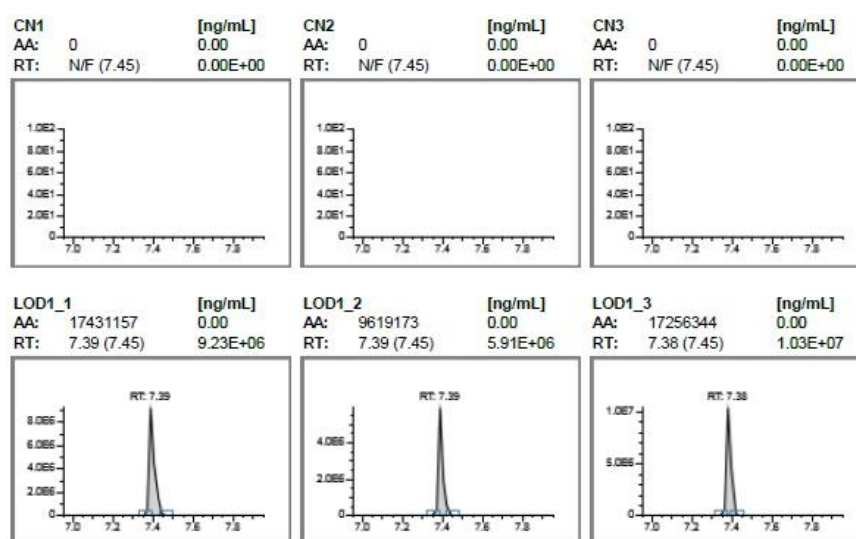


Figura 4.12. Cromatogramas de controle negativo (CN1 à CN3) e controles positivos (LOD1_1 à LOD1_3) da substância *N,N*-didesmetilsibutramina para teste de seletividade utilizando o papel Whatman 903TM.

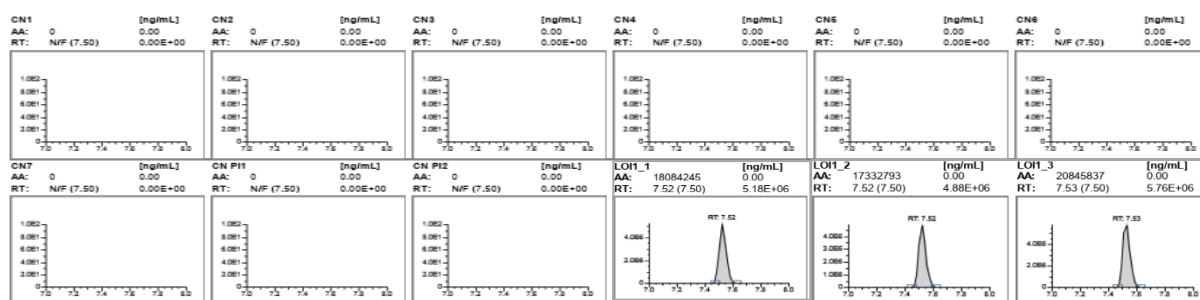


Figura 4.13. Cromatogramas de controles negativos sem (CN1 à CN7) e com (CN PI1 e CN PI2) adição de padrão interno e controles positivos (LOI1_1 à LOI1_3) da substância N,N-didesmetilsibutamina para teste de seletividade utilizando o VAMS- Mitra®.

4.f.2. Estabilidade das amostras extraídas

Tanto para a validação com o papel Whatman 903TM, como para o VAMS- Mitra®, todas as substâncias presentes foram detectadas assim como ocorreu na primeira injeção. Com isso a reinjeção das amostras após 24h (papel Whatman 903TM) ou 48h (VAMS- Mitra®) satisfaz ao critério de substâncias *non-threshold* sem MRL estabelecido pela WADA, determinando a estabilidade das amostras extraídas.

4.f.3. Arraste

Tanto para a validação com o papel Whatman 903TM, como para o VAMS- Mitra®, na injeção de uma amostra de concentração em 400% da concentração de trabalho precedida e seguida por duas amostras de controle negativo, não foi identificado arraste em nenhuma das substâncias ou padrões internos. Exemplos podem ser vistos nas Figuras 4.8 e 4.9.

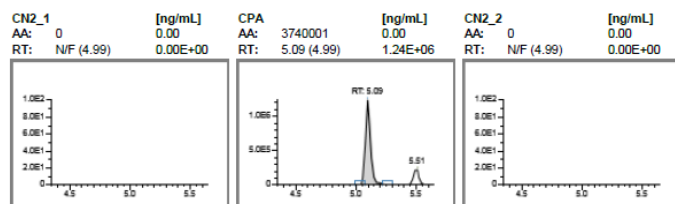


Figura 4.8. Cromatograma da substância 6 β -OH-prednisolona de sequência do parâmetro de arraste, onde: (CPA) amostra fortificada em 400% do MRPL; CN2-1 e CN2-2, controles negativos. Teste realizado com papel Whatman 903TM.

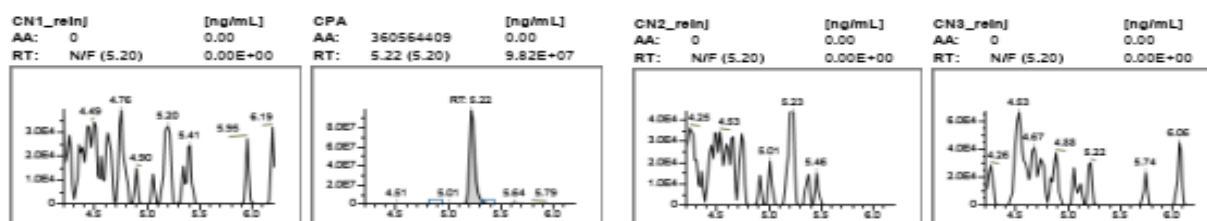


Figura 4.9. Cromatograma da substância ácido ritalínico de sequência do parâmetro de arraste, onde: (CPA) amostra fortificada em 400% do MRPL; CN1_reinj-1 e CN2_reinj e CN3_reinj controles negativos. Teste realizado com VAMS- Mitra®.

4.f.4. Precisão Intra e Interensaio

A precisão intra e a precisão interensaio em três níveis de concentração foram avaliadas na forma de RSD% (Área do analito / Área do Padrão Interno) entre as amostras de DBS (VAMS- Mitra®) fortificadas.

Na

Tabela 4.2 podem ser encontrados os valores de precisão intraensaio e na Tabela 4.3, os valores de precisão interensaio. Os níveis de concentração em que a precisão foi avaliada foram 100%, 70% e 50% da concentração de trabalho exibida nas

Tabela 4.2 e Tabela 4.3. As células com “NA” se referem aos casos em que não foi possível calcular o valor de precisão devido à ausência de sinal analítico em pelo

menos uma das amostras. Os valores acima de 20% ou “NA” estão destacados em vermelho.

Tabela 4.2: Precisão Intraensaio por dia em três níveis de concentração

Classe /Analito	Concentração de Trabalho (ng/mL)	PRECISÃO INTRAENSAIO (%)					
		100% da Concentração de Trabalho		70% da Concentração de Trabalho		50% da Concentração de Trabalho	
		Dia 1	Dia 2	Dia 1	Dia 2	Dia 1	Dia 2
M1. Efaproxiral	10	20,8	17,1	15,4	5,1	16,2	14,8
S1. Eptrembolona	2,5	18,4	7,0	3,6	5,8	9,4	3,3
S1. Estanozolol (16-OH)	1	26,3	10,9	32,0	29,7	NA	22,9
S1. Gestrinona	2,5	18,2	7,3	5,3	4,4	20,8	11,1
S1. Gestrinona (6a-OH)	2,5	17,2	6,5	12,1	10,4	31,3	5,8
S1. Metildienolona MS2 287>159	2,5	5,1	6,8	16,5	5,5	33,6	11,5
S1. Metiltrenolona {ou Metribolona}	2,5	14,0	51,4	10,9	1,2	13,7	12,2
S1. Prostanazol (16-OH)	2,5	25,0	16,2	5,8	12,5	36,0	4,0
S1. SARM Enobosarm (Ostarina)	1	10,0	16,1	6,7	2,8	17,7	17,9
S1. SARM GSK2881078	1	45,6	14,1	47,1	12,8	NA	20,3
S1. SARM LGD4033	1	55,9	22,6	NA	34,2	NA	51,2
S1. SARM RAD-140-Fragment	1	13,0	19,3	17,1	43,7	39,3	46,9
S1. SARM S1	1	4,2	20,0	7,2	20,3	5,1	20,3
S1. SARM S-23 (SB19042)	1	12,7	17,8	25,3	16,7	15,0	12,0
S1. SARM S4 (Andarina)	1	12,5	9,7	17,7	12,0	40,1	7,7
S1. SARM S4 (Andarina-o-defenil)	1	18,7	10,6	7,2	7,6	17,4	1,7
S1. SARM S9	1	15,1	17,2	24,2	15,0	16,1	11,2
S1. Tetrahydrogestrinona	2,5	5,2	10,2	14,2	11,1	9,1	4,0
S1x. 20-hidroxiecdisona	10	49,1	17,3	21,3	45,5	NA	NA
S1x. Cetoconazol	20	11,2	14,2	17,2	9,0	5,9	8,1
S1x. Finasterida (carboxi)	5	34,6	18,3	34,4	4,7	22,5	5,9
S1x. Fluconazol	20	15,9	4,5	14,1	0,8	10,3	5,7
S1x. Flutamida	1	7,5	7,2	12,8	8,9	16,4	8,1
S1x. Flutamida (2-OH)	1	10,4	15,3	8,1	3,1	9,1	15,2
S1x. Miconazol	20	17,6	20,9	20,6	20,2	17,9	3,8
S3. Higenamine	10	7,8	15,7	23,1	16,2	26,7	27,9
S3. Higenamine (Coclaurine)	10	15,1	26,2	15,1	28,7	12,9	11,4
S3. Indacaterol	20	45,2	11,8	68,4	20,5	33,0	17,5
S3. Olodaterol	20	23,5	3,2	18,1	12,2	6,1	12,1
S3. Procaterol	20	5,5	9,9	20,9	14,4	13,3	11,4

S3. Reproterol tetrahydroquinol derivado	20	12,8	4,0	17,3	8,1	10,5	13,2
S3. Ritodrina	20	12,5	5,7	18,3	7,5	4,7	5,0
S3. Salmeterol	10	12,8	4,8	13,3	16,7	15,3	11,3
S3. Tretoquinol {ou Trimetoquinol}	20	63,0	19,7	34,1	30,2	48,2	42,8
S3. Tulobuterol	20	6,8	7,0	12,9	8,3	6,1	10,4
S3. Vilanterol	10	13,9	5,5	15,9	14,4	10,1	10,7

Classe /Analito	Concentração de Trabalho (ng/mL)	PRECISÃO INTRAENSAIO (%)					
		100% da Concentração de Trabalho		70% da Concentração de Trabalho		50% da Concentração de Trabalho	
		Dia 1	Dia 2	Dia 1	Dia 2	Dia 1	Dia 2
S3q. Formoterol	20	15,5	9,5	18,3	7,6	5,9	5,4
S4. Aminoglutetimida (N-acetil)	20	17,6	5,1	6,2	4,6	10,2	11,6
S4. Aminoglutetimida MS2 233>146	20	9,7	21,6	26,5	15,8	23,3	28,2
S4. Anastrozol	20	15,0	5,3	6,7	5,5	12,7	5,6
S4. Androsta-1,4,6-triene-17b-ol-3-ona	20	28,3	4,9	17,7	5,0	17,4	1,2
S4. Androstatrienediona {Androsta-1,4,6-triene-3,17-diona}	20	23,8	9,1	20,2	6,5	10,5	10,2
S4. Bazedoxifeno	20	18,6	11,7	28,1	17,2	21,6	10,4
S4. Clomifeno	20	15,5	3,3	20,5	14,9	13,0	38,3
S4. Clomifeno (desetil)	20	NA	8,3	25,9	13,5	18,8	18,0
S4. Exemestano	20	12,5	4,4	6,6	3,9	14,1	12,2
S4. Exemestano (17b-OH) {ou 17-dihidroexemestano}	20	7,7	6,4	20,5	3,4	11,1	8,2
S4. Fulvestrant	20	12,4	30,0	30,3	13,2	25,3	17,9
S4. Fulvestrant (17-ceto)	20	5,8	25,5	24,7	22,1	20,9	11,9
S4. Mildronato {ou Meldonium}	100	4,5	33,5	9,5	34,2	26,7	9,6
S4. Mildronato {ou Meldonium} [MS2] 147>59	100	15,7	13,4	17,0	13,6	31,3	24,9
S4. Raloxifeno	20	12,8	10,1	11,4	17,7	11,0	8,0
S4. SR9009	10	6,8	20,8	25,4	15,7	17,2	13,2
S4. SR9009 M2	10	15,0	11,9	15,7	8,6	16,9	5,8
S4. SR9009 M6	10	23,2	8,9	10,7	26,7	14,0	15,0
S4. SR9011	10	13,4	19,9	27,6	21,4	27,9	11,1
S4. Tamoxifeno	20	22,8	8,0	20,1	24,4	18,6	38,6
S4. Tamoxifeno (3-OH-4-metoxi)	20	13,4	11,1	15,9	13,5	16,6	17,4
S4. Tamoxifeno (4-OH)	20	4,6	8,3	11,4	19,3	14,0	18,1
S4. Tamoxifeno acido	20	27,1	31,8	34,3	14,3	28,5	5,6
S4. Testolactona	20	8,2	5,6	17,5	17,1	25,5	13,2
S4. Tetrahidrotestolactona	20	29,5	47,4	2,6	33,6	8,4	33,0
S4. Tetrahidrotestolactona* MS2 305>177	20	54,4	22,4	38,6	43,2	81,8	NA
S4. Toremifeno	20	15,5	3,3	20,5	14,9	13,0	38,3

S4. Toremifeno (4-OH)	20	6,1	8,7	11,8	19,3	10,5	15,6
S4. Toremifeno (OH-metoxi- <i>N</i> -desmetil)	20	12,1	8,1	27,5	21,5	16,2	13,6
S4. Trimetazidina Frag AIF>166	10	14,0	7,7	18,6	4,4	49,3	14,5
S4x. Lomerizina	10	12,7	9,5	5,4	7,0	14,3	5,9
S5. ACB (4-amino-6-cloro-1,3-benzenodisulfonamida)	100	4,7	5,7	18,0	8,7	12,2	4,9

Classe /Analito	Concentração de Trabalho (ng/mL)	PRECISÃO INTRAENSAIO (%)					
		100% da Concentração de Trabalho		70% da Concentração de Trabalho		50% da Concentração de Trabalho	
		Dia 1	Dia 2	Dia 1	Dia 2	Dia 1	Dia 2
S5. Acetazolamida	100	8,6	12,9	15,4	42,9	15,2	19,3
S5. Altiazida	100	10,6	3,9	14,7	11,3	14,7	2,0
S5. Amilorida	100	5,1	8,0	3,8	11,1	11,5	8,7
S5. ATFB (4-amino-6-trifluorometil-benzeno-1,3-disulfonamida)	50	12,3	5,1	7,0	11,6	14,9	5,0
S5. Azosemida	100	18,1	15,1	22,4	7,6	7,8	4,9
S5. Bemetizida	100	8,1	3,7	13,6	11,0	13,0	8,5
S5. Bendroflumetiazida	100	34,8	11,1	24,9	33,1	44,3	20,1
S5. Bendroflumetiazida-NH ₄	100	11,1	1,4	17,2	9,4	12,9	5,8
S5. Benzilhidroclorotiazida	100	9,6	5,6	10,2	10,4	13,6	2,2
S5. Benztiiazida	100	15,8	2,4	16,6	6,0	14,7	9,1
S5. Brinzolamida	50	14,1	35,8	9,6	32,7	8,2	24,2
S5. Bumetanida	100	9,7	16,4	12,7	3,9	4,2	4,1
S5. Butiazida (-)	100	10,5	4,3	9,8	9,3	12,4	7,6
S5. Butiazida (+)	100	8,7	11,7	24,8	7,9	20,5	8,5
S5. Ciclopentiazida	100	12,7	3,0	10,6	10,2	13,9	6,5
S5. Ciclotiazida	100	13,4	2,5	15,5	6,0	11,4	3,7
S5. Clopamida	100	7,0	1,0	9,3	7,0	17,3	6,4
S5. Clorazanil	50	11,0	10,3	8,8	11,0	3,3	14,6
S5. Clorotiazida	100	16,5	13,0	12,2	12,5	10,2	20,2
S5. Clortalidona	100	21,5	15,0	16,6	15,2	3,9	5,8
S5. Conivaptan	100	14,5	8,5	14,8	9,2	11,3	9,4
S5. Diclorfenamida	100	10,4	4,7	12,7	5,5	5,7	7,8
S5. Dorzolamida	50	10,7	16,6	5,8	4,3	7,6	5,0
S5. Epitizida	100	10,3	0,8	12,7	6,2	12,1	0,3
S5. Eplerenona	100	10,1	9,0	10,9	5,6	10,9	9,7
S5. Eplerenona (6b-OH)	100	8,7	11,5	8,4	7,6	14,5	12,5
S5. Espironolactona (6b-OH-7a-tiometil)	50	63,8	14,6	35,5	5,1	10,7	4,3
S5. Espironolactona (artefato)	50	6,5	8,0	12,3	2,2	3,8	14,6
S5. Furosemida	100	11,1	11,0	23,0	1,4	1,3	15,8
S5. Hidroclorotiazida	100	4,4	2,6	0,8	8,8	22,0	5,5

S5. Hidroflumetiazida	50	11,2	7,7	12,6	8,3	14,2	12,0
S5. Indapamida	100	32,7	15,0	51,2	31,2	50,2	18,7
S5. Lixivaptan	50	7,8	23,3	20,1	22,1	5,1	17,6
S5. Mebutizida (-)	100	7,4	2,6	12,0	8,4	11,9	4,1
S5. Mefrusida	100	8,7	4,8	7,9	3,8	11,5	4,7

Classe /Analito	Concentração de Trabalho (ng/mL)	PRECISÃO INTRAENSAIO (%)					
		100% da Concentração de Trabalho		70% da Concentração de Trabalho		50% da Concentração de Trabalho	
		Dia 1	Dia 2	Dia 1	Dia 2	Dia 1	Dia 2
S5. Mefrusida (lactona) {ou 5-oxo-mefruside}	100	10,9	5,9	10,8	0,9	16,0	36,0
S5. Metazolamida (+)	100	14,2	20,3	8,4	15,6	12,5	14,6
S5. Meticlotiazida	100	60,9	31,9	56,8	21,2	37,8	27,8
S5. Metolazona	100	11,7	2,5	8,8	6,9	15,7	3,2
S5. Mozavaptan	100	13,2	11,3	11,2	10,6	10,4	14,4
S5. Piretanida	100	10,3	5,9	18,2	11,3	11,7	3,4
S5. Politiazida	50	11,6	3,8	9,1	5,7	11,1	5,8
S5. Probenecida	100	12,8	6,9	12,7	1,8	9,3	12,2
S5. Quinetazona	50	8,5	17,6	9,4	10,8	9,0	2,6
S5. Relcovaptan	100	11,6	9,5	10,9	9,0	10,2	9,0
S5. Tolvaptan	100	19,6	10,5	38,5	13,8	17,5	12,8
S5. Tolvaptan (OH)	100	11,0	10,2	10,4	9,3	11,0	1,9
S5. Torasemida	50	14,2	6,6	18,4	4,8	13,4	5,4
S5. Triantereno	50	9,3	11,1	8,2	9,9	2,9	8,8
S5. Triantereno (p-OH sulfato)	100	13,0	12,6	15,1	14,0	14,2	5,3
S5. Triclorometiazida	100	11,2	7,2	14,6	10,9	15,1	4,7
S5. Xipamida	100	20,7	30,4	30,8	23,6	3,9	6,0
S5x. Proguanil	100	11,5	8,9	4,1	12,8	2,6	9,2
S6q.Catina-Fragment (marcador) AIF	100	12,2	7,2	7,4	13,3	4,6	7,6
S6. 1,1-DMBA/ 1,3-DMBA* {dimetilbutilamina} AIF	100	53,4	57,4	41,6	67,0	71,2	NA
S6. 2,5-dimetoxifenetilamina	25	11,2	18,9	7,5	22,3	13,1	16,7
S6. 2-etilamino-1-fenilbutano {ou N-etil-1-fenil-2-butanamina}	25	9,9	5,7	14,7	10,6	23,2	7,2
S6. 3,3-difenilpropilamina	25	8,3	10,9	12,5	12,7	10,4	12,1
S6. 4-fluoroanfetamina	50	16,4	7,3	12,2	5,1	17,9	7,4
S6. 5-APDB {ou 5-(2-aminopropil)-2,3-diidrobenzofurano}	50	2,9	2,2	15,2	7,4	21,8	4,5
S6. Ac. ritalinico	100	18,3	6,0	18,3	13,9	21,9	4,3
S6. Adrafinil	70	14,0	16,8	13,6	3,5	18,6	4,7

S6. Anfepramona	25	31,5	34,7	27,4	25,2	13,1	47,1
S6. Anfepramona (N-dietilnorpseudoefedrina)	25	7,2	3,1	12,0	5,7	18,2	9,6
S6. Anfepramona (N-etilnorpseudoefedrina)	25	2,3	4,8	8,4	8,7	23,5	9,2
S6. Anfetamina	100	8,1	24,4	24,0	11,3	7,5	8,4
S6. Anfetamina frag 136 > 119	100	28,7	5,9	NA	NA	NA	NA

Classe /Analito	Concentração de Trabalho (ng/mL)	PRECISÃO INTRAENSAIO (%)					
		100% da Concentração de Trabalho		70% da Concentração de Trabalho		50% da Concentração de Trabalho	
		Dia 1	Dia 2	Dia 1	Dia 2	Dia 1	Dia 2
S6. Benfluorex	25	9,7	14,3	16,0	13,6	15,7	2,5
S6. Benzfetamina	25	7,1	1,7	7,8	12,7	12,4	20,5
S6. Benzilpiperazina	12,5	9,8	0,5	15,6	11,5	21,5	15,4
S6. Bromantano	25	14,2	19,9	45,9	22,9	11,4	33,9
S6. Bromantano (6-OH)	25	12,2	19,8	16,7	18,3	10,0	4,7
S6. Carfedon {ou Fonturacetam}	50	9,7	7,5	7,0	21,0	5,5	16,3
S6. Catinona	100	10,2	6,5	12,7	13,9	19,2	9,3
S6. Catinona analogo Alfa-PVP	50	30,5	15,3	15,8	14,7	15,1	23,3
S6. Catinona analogo Metilona	50	4,5	1,5	13,0	5,5	12,4	8,3
S6. Catinona analogo: Metilenodioxipirovalerona (MDPV)	25	13,9	6,3	14,5	13,7	13,8	8,2
S6. Catinona analogo: N-etil heptedrona	25	20,6	1,4	8,1	3,5	12,4	16,3
S6. Catinona -H2O	100	9,4	6,1	17,2	11,5	18,7	6,9
S6. Ciclazodona	25	7,6	11,7	6,6	4,2	6,7	9,1
S6. Clobenzorex	25	11,6	8,0	12,6	12,4	4,7	6,6
S6. Clobenzorex (4-OH)	25	15,8	1,6	13,5	11,1	12,8	5,7
S6. Cropropamida -C2H5NH2	100	9,5	10,7	10,2	5,5	8,6	10,3
S6. Cropropamida-Na	100	17,0	11,1	23,1	4,9	21,6	2,4
S6. Crotetamida -C2H5NH2	100	13,3	12,9	14,3	5,0	8,1	15,1
S6. Crotetamida-Na	100	13,5	3,4	10,7	4,4	3,7	28,3
S6. Dimetilanfetamina	50	18,4	1,7	16,2	5,4	24,7	10,3
S6. Dipentilona	50	8,9	3,4	14,1	9,6	17,2	7,2
S6. Dobutamina	50	22,3	47,3	48,2	23,8	21,3	NA
S6. Estricnina	25	10,6	12,5	15,0	14,0	18,3	9,6
S6. Etamivan	25	14,0	15,8	7,8	9,5	9,7	3,5
S6. Etilanfetamina	50	8,1	8,7	13,8	3,4	13,5	4,8
S6. Etilanfetamina (4-OH)	50	12,0	5,4	14,3	4,6	14,8	5,6
S6. Etilefrina -H2O (TIV)	50	14,1	1,9	12,3	15,7	12,4	7,7
S6. Famprofazona	25	13,5	14,1	17,7	7,5	13,3	0,9
S6. Fembutrazato	25	6,9	11,0	14,0	4,5	5,9	8,7
S6. Femproporex	25	16,3	8,8	14,6	10,1	19,6	10,3

S6. Fencamina	25	15,5	11,9	14,5	14,6	17,2	8,4
S6. Fencanfamina	25	4,2	8,0	10,0	9,7	13,8	5,9
S6. Fendimetrazina	50	7,1	2,7	16,0	5,4	20,8	12,0
S6. Fenetilina	25	13,7	3,5	15,8	9,0	11,2	4,4
S6. Fenfluramina	25	2,9	8,2	9,3	11,6	16,8	12,6
S6. Fenfluramina (nor)	25	7,5	7,4	6,6	13,9	20,3	2,0

Classe /Analito	Concentração de Trabalho (ng/mL)	PRECISÃO INTRAENSAIO (%)					
		100% da Concentração de Trabalho		70% da Concentração de Trabalho		50% da Concentração de Trabalho	
		Dia 1	Dia 2	Dia 1	Dia 2	Dia 1	Dia 2
S6. Fenmetrazina	50	11,4	7,8	16,9	7,8	15,7	9,1
S6. Fentermina	50	15,6	4,9	19,5	9,2	29,1	23,6
S6. Foledrina	50	12,3	4,2	14,4	9,3	11,8	9,2
S6. Furfenorex	25	12,3	5,9	12,1	6,2	11,7	12,8
S6. Heptaminol	100	11,6	9,0	17,7	11,2	17,7	5,7
S6. Hexan-2-amino	100	21,6	4,5	21,6	27,9	17,0	15,8
S6. Isometepteno	20	9,8	8,1	14,4	8,1	16,7	6,5
S6. Isometepteno M1	50	13,3	8,6	14,5	7,1	12,4	4,1
S6. Lisdexanfetamina	50	18,9	13,0	21,6	20,2	21,3	7,1
S6. MDA {ou Tenanfetamina}	50	14,6	8,8	10,8	11,5	11,2	3,9
S6. MDA {ou Tenanfetamina} -NH ₃	50	12,4	2,0	10,8	7,7	13,6	10,2
S6. MDEA	25	10,3	2,5	12,8	8,0	18,0	5,7
S6. MDMA	50	9,5	3,0	12,4	10,8	16,0	12,3
S6. MDMA Metab (HMMA)	50	15,9	5,6	8,1	16,7	9,6	19,6
S6. Meclofenoxato M (4-CPA)	50	30,2	22,1	33,4	11,9	37,4	18,3
S6. Mefedrona	25	2,7	2,2	15,2	7,3	21,6	8,0
S6. Mefedrona (nor)	50	17,8	31,9	17,6	24,3	17,2	18,8
S6. Mefenorex	25	14,4	3,9	13,8	4,0	18,9	2,2
S6. Mefentermina	50	8,1	9,2	13,5	3,6	13,5	2,9
S6. Mesocarb (p-OH)	25	3,1	25,5	18,1	14,9	7,4	5,5
S6. Metanfetamina	25	16,2	3,5	15,0	11,4	21,5	12,4
S6. Metilfenidato	50	9,6	5,3	13,5	8,1	15,7	2,1
S6. Metilhexanoamina	100	8,7	20,8	15,9	9,6	22,4	12,1
S6. Metoxifenamina	25	11,8	3,1	11,9	12,1	10,5	9,3
S6. Modafinil-Fragment	50	10,5	9,9	11,4	2,7	9,4	4,4
S6. Modafinilico Ac-Fragment	100	13,5	13,0	17,4	10,6	15,4	5,6
S6. Modafinil-Na	50	7,1	12,2	10,9	6,3	12,0	3,1
S6. N-etil-4-metoxi-anfetamina {ou PME _A }	25	11,0	5,3	12,6	4,3	20,4	3,6
S6. Niquetamida	25	14,4	6,7	12,5	8,3	17,7	7,2
S6. Niquetamida M (N-Etilnicotinamida)	50	12,9	4,7	14,3	10,8	12,9	8,8

S6. N-metil-N-(1-fenetil)-amina	100	15,1	21,0	11,5	4,2	9,7	11,6
S6. Octan-2-amino	50	6,7	1,8	13,3	3,5	13,1	13,9
S6. Octilamina	50	7,8	10,9	12,0	15,1	12,0	11,2
S6. Ortetamina	50	15,5	17,8	11,9	4,6	13,9	6,1
S6. Oxilofrina -H ₂ O (TIV)	50	7,6	7,6	17,6	3,3	17,2	15,8
S6. Pemolina	100	9,7	16,9	14,6	28,1	18,7	17,8
S6. Pentetrazol	50	15,5	9,7	17,2	13,4	19,4	11,3

Classe /Analito	Concentração de Trabalho (ng/mL)	PRECISÃO INTRAENSAIO (%)					
		100% da Concentração de Trabalho		70% da Concentração de Trabalho		50% da Concentração de Trabalho	
		Dia 1	Dia 2	Dia 1	Dia 2	Dia 1	Dia 2
S6. p-metilanfetamina	50	9,6	24,2	17,2	35,3	25,2	40,6
S6. p-Metoxi-Anfetamina {ou PMA}	100	6,0	57,5	19,5	64,4	29,6	64,8
S6. Prenilamina	25	6,9	11,0	9,2	10,7	5,5	1,6
S6. Prolintano	50	12,5	10,2	0,8	10,5	20,7	14,5
S6. Propilexedrina	50	16,3	1,6	10,5	4,3	11,2	14,1
S6. Selegilina	50	14,8	9,0	16,1	18,9	21,4	30,1
S6. Selegilina (desmetil)	50	5,6	3,3	21,4	2,5	28,4	6,3
S6. Sibutramina	25	11,7	4,7	10,7	15,2	11,4	19,9
S6. Sibutramina (N,N-didemetil) {ou N,N-bisdesmetil}	50	6,8	11,8	7,1	10,8	9,1	3,4
S6. Sibutramina (N-demetil)	25	8,1	12,3	9,6	9,9	7,3	7,4
S6. Sibutramina (OH-didemetil) {ou OH-bisdesmetil}	50	9,5	11,6	10,8	10,3	8,0	7,1
S6. Tuaminoheptano	100	17,5	5,0	13,5	2,6	20,1	17,9
S6a. Coca (benzoilecgonina)	50	16,1	5,4	16,2	13,5	15,3	8,2
S6a. Coca (metilecgonina)	50	3,9	7,6	15,7	3,3	16,8	14,6
S6a. Cocaina	50	10,6	13,5	14,6	12,9	14,4	8,9
S6q. Catina-Fragment	100	12,8	7,2	13,1	14,1	15,3	7,1
S6q. Efedrina	100	6,4	6,7	9,0	3,1	4,4	10,0
S6q. Metilefedrina	50	8,7	3,9	9,9	5,1	19,5	11,7
S6x. Bupropion	10	30,6	11,2	21,7	14,2	9,5	22,8
S6x. Fenilpropanolamina-fragm {ou norefedrina-fragm}	25	12,2	7,9	15,5	12,5	15,4	7,9
S6x. Mebeverine acido	25	15,0	5,9	12,4	11,3	17,1	4,2
S6x. Mebeverine acido (o-desmetil)	25	12,9	1,0	16,6	14,1	14,4	7,3
S6x. Morazona	10	10,9	4,7	19,2	12,8	15,4	3,2
S6x. Nicotina M (cotinina)	25	11,8	1,1	15,3	13,3	15,1	6,8
S6x. Oxetazaina	10	7,8	8,9	9,9	12,4	85,3	13,6
S6x. Pipradrol	10	7,9	9,6	9,6	5,9	14,4	15,7
S7. Cis-Mefentanila {ou 3-metilfentanil}	25	6,6	7,4	20,6	7,2	6,9	8,2
S7. Dextromoramida	25	11,9	13,1	16,7	2,3	15,5	2,1

S7. Fentanil	1	4,5	8,1	10,3	3,1	16,3	18,6
S7. Fentanil (nor)	1	7,9	11,6	4,3	5,1	7,2	8,3
S7. Heroína	25	14,2	38,2	14,8	26,9	13,3	18,0
S7. Heroína (6-MAM)	25	13,3	16,1	16,1	3,8	15,7	8,9
S7. Meperidina (nor) {ou Norpetidina}	25	9,2	13,4	8,9	3,7	9,2	11,9
S7. Meperidina {ou Petidina}	25	7,9	13,0	12,8	4,7	9,8	13,6

Classe /Analito	Concentração de Trabalho (ng/mL)	PRECISÃO INTRAENSAIO (%)					
		100% da Concentração de Trabalho		70% da Concentração de Trabalho		50% da Concentração de Trabalho	
		Dia 1	Dia 2	Dia 1	Dia 2	Dia 1	Dia 2
S7. Metadona	25	9,4	13,0	23,3	8,1	13,8	4,5
S7. Metadona M (EDDP)	25	5,0	9,4	13,5	14,3	12,2	17,2
S7. Oxiconona	25	7,4	13,0	8,5	7,9	13,4	14,7
S7. Oximorfona	12,5	12,3	10,4	11,2	8,2	13,4	18,8
S7. Pentazocina	25	11,9	12,6	34,4	2,9	8,3	5,9
S7. Sufentanil	2,5	7,2	10,4	24,6	3,6	14,7	7,2
S7x. Hidrocodona	25	6,1	11,7	11,1	1,1	7,3	3,1
S7x. N-metilnaltrexona	25	8,5	11,2	12,1	4,7	12,5	7,5
S7x. Tramadol	25	4,1	15,7	7,5	7,7	12,1	7,2
S7x. Tramadol desmetil	25	4,8	13,1	9,3	1,8	8,2	12,5
S8. JWH-018	1	10,2	28,4	50,1	20,4	11,4	47,9
S8. JWH-073	1	7,9	24,2	26,3	36,5	15,5	28,6
S8. JWH-073 (3-hidroxibutil)	1	57,2	24,5	39,7	30,3	6,5	4,3
S8. JWH-073 (4-hidroxi-indol)	1	11,6	16,4	40,3	23,4	33,8	18,1
S8. JWH-073 (ácido N-butanoico)	1	38,5	6,4	21,3	30,8	NA	NA
S8. JWH-073 (ácido N-butanoico)-fragment AIF>155	1	67,2	31,8	NA	50,8	NA	13,1
S9. 20b-OH-prednisona	30	8,4	12,8	26,0	8,0	10,1	8,7
S9. Beclometasona	30	6,2	5,6	5,6	6,3	8,1	6,6
S9. Beclometasona 17-propionato	30	17,3	9,1	11,9	39,7	6,0	20,2
S9. Betametasona	60	6,3	8,6	7,5	3,5	2,1	2,7
S9. Budesonida	30	9,1	11,7	10,7	25,6	15,3	17,8
S9. Budesonida (6b-OH)	45	11,5	4,1	18,5	12,6	34,6	8,0
S9. Budesonida (6b-OH) COOH	45	4,9	5,0	4,5	2,9	7,6	3,3
S9. Ciclesonida	30	18,4	18,4	33,4	26,3	12,0	22,8
S9. Ciclesonida (des-isobutiril)	30	2,8	13,3	9,9	1,8	7,8	2,4
S9. Prednisolona	100	5,7	6,8	8,3	4,8	8,7	3,9
S9. Deflazacort	30	6,9	10,3	13,9	10,1	4,7	8,2
S9. Deflazacort (6b-OH-21-desacetil)	30	3,6	9,5	9,2	12,7	11,7	21,7
S9. Deflazacort (desacetil)	30	2,6	3,1	10,4	4,0	6,4	6,1

S9. Desonida	30	8,4	0,5	11,4	9,9	6,6	4,2
S9. Fludrocortisona	30	4,3	3,6	7,8	9,7	10,2	6,9
S9. Flumetasona	30	16,8	8,1	7,1	20,3	5,2	13,7
S9. Flunisolida	30	10,6	6,2	13,0	9,3	3,0	9,2
S9. Fluocortolona	30	8,4	6,2	4,3	4,2	7,6	3,8
S9. Fluocortolona COOH	30	4,8	9,4	7,6	5,7	4,8	2,4
S9. Fluocortolona pivalato	30	5,4	14,1	55,4	4,3	72,2	8,4

Classe /Analito	Concentração de Trabalho (ng/mL)	PRECISÃO INTRAENSAIO (%)					
		100% da Concentração de Trabalho		70% da Concentração de Trabalho		50% da Concentração de Trabalho	
		Dia 1	Dia 2	Dia 1	Dia 2	Dia 1	Dia 2
S9. Fluorometolona acetato	30	11,8	4,9	12,0	10,4	8,9	7,7
S9. Fluticasona (17b-carboxi)	30	6,3	9,8	14,4	6,9	10,0	1,9
S9. Fluticasona furoato (17b-ac carboxílico)	30	9,8	16,9	21,2	19,5	10,3	6,1
S9. Fluticasona propionato	30	13,2	13,6	10,5	17,4	1,6	26,0
S9. Fluticasona propionato (carboxi)	30	7,5	16,4	10,3	12,8	9,2	7,0
S9. Metilprednisolona (6a-)	30	7,5	1,9	7,0	3,3	3,3	4,8
S9. Mometasona	30	27,2	19,0	NA	39,8	NA	38,4
S9. Mometasona Furoato	30	12,9	29,5	20,9	22,4	12,1	6,0
S9. Mometasona Furoato (6b-OH)	30	16,4	51,9	4,1	34,3	22,0	32,0
S9. Prednisolona (16-OH)	30	13,6	8,2	12,8	13,8	19,3	8,4
S9. Prednisolona (6b-OH)	30	14,8	10,8	9,6	6,4	18,4	33,1
S9. Prednisona	150	6,7	6,3	8,5	6,0	5,2	4,5
S9. Triancinolona	30	7,9	7,7	10,3	23,9	20,5	36,9
S9. Triancinolona acetona	15	4,1	1,3	10,1	7,0	14,5	11,9
S9. Triancinolona acetona (6b-OH)	30	4,9	3,7	14,4	8,8	27,6	3,4

Tabela 4.3: Precisão Interensaio em três níveis de concentração

Classe /Analito	Concentração de Trabalho (ng/mL)	PRECISÃO INTERENSAIO (%)		
		100% da Concentração de Trabalho	70% da Concentração de Trabalho	50% da Concentração de Trabalho
M1. Efavirenz	10	17,9	17,3	15,3
S1. Efavirenz	2,5	12,4	9,8	6,5
S1. Efavirenz (16-OH)	1	28,0	31,6	NA
S1. Efavirenz	2,5	12,7	5,3	14,9
S1. Efavirenz (6a-OH)	2,5	22,5	18,1	22,1
S1. Efavirenz MS2 287>159	2,5	5,4	17,4	23,1
S1. Efavirenz {ou Efavirenz}	2,5	39,6	14,2	13,6
S1. Efavirenz (16-OH)	2,5	22,8	9,3	33,7
S1. Efavirenz (Ostarina)	1	13,4	18,1	16,8
S1. Efavirenz GSK2881078	1	36,9	30,1	NA
S1. Efavirenz LGD4033	1	38,1	NA	NA
S1. Efavirenz RAD-140-Fragment	1	14,9	29,1	40,3
S1. Efavirenz S1	1	16,5	16,7	18,8
S1. Efavirenz S-23 (SB19042)	1	17,1	25,2	16,9
S1. Efavirenz S4 (Andarina)	1	29,2	16,7	30,5
S1. Efavirenz S4 (Andarina-o-defenil)	1	15,2	20,0	14,8
S1. Efavirenz S9	1	18,5	23,4	17,3
S1. Efavirenz Tetrahydrogestrinona	2,5	22,1	23,1	16,5
S1x. 20-hidroxiciclodisona	10	33,8	31,3	NA
S1x. Cetoconazol	20	11,4	14,5	9,3
S1x. Finasterida (carboxi)	5	25,7	22,3	26,7
S1x. Fluconazol	20	18,6	22,0	14,9
S1x. Flutamida	1	12,5	16,0	11,6
S1x. Flutamida (2-OH)	1	16,5	23,1	16,0
S1x. Miconazol	20	17,3	18,3	11,7
S3. Higenamine	10	27,1	18,8	38,1
S3. Higenamine (Coclaurine)	10	19,4	25,5	10,9
S3. Indacaterol	20	34,7	61,8	49,7
S3. Olodaterol	20	15,4	13,8	15,9
S3. Procaterol	20	9,0	16,0	24,5

S3. Reproterol tetrahydroquinol derivado	20	9,6	12,5	17,9
S3. Ritodrina	20	9,1	14,3	4,7
S3. Salmeterol	10	9,6	15,0	16,3

Classe /Analito	Concentração de Trabalho (ng/mL)	PRECISÃO INTERENSAIO (%)		
		100% da Concentração de Trabalho	70% da Concentração de Trabalho	50% da Concentração de Trabalho
S3. Tretoquinol {ou Trimetoquinol}	20	42,4	29,5	41,3
S3. Tulobuterol	20	16,1	17,5	9,8
S3. Vilanterol	10	10,5	13,6	11,5
S3q. Formoterol	20	12,3	12,7	13,2
S4. Aminoglutetimida (N-acetil)	20	11,6	9,2	9,9
S4. Aminoglutetimida MS2 233>146	20	18,0	28,1	41,4
S4. Anastrozol	20	15,7	17,5	12,9
S4. Androsta-1,4,6-triene-17b-ol-3-ona	20	22,7	17,5	12,7
S4. Androstatrienediona {Androsta-1,4,6-triene-3,17-diona}	20	16,0	13,5	12,7
S4. Bazedoxifeno	20	17,9	24,5	37,3
S4. Clomifeno	20	29,0	17,0	35,1
S4. Clomifeno (desetil)	20	NA	21,4	16,6
S4. Exemestano	20	12,4	13,5	11,9
S4. Exemestano (17b-OH) {ou 17-dihidroexemestano}	20	14,9	21,9	20,6
S4. Fulvestrant	20	22,4	21,0	19,6
S4. Fulvestrant (17-ceto)	20	16,8	22,4	15,7
S4. Mildronato {ou Meldonium}	100	29,7	32,2	27,1
S4. Mildronato {ou Meldonium} [MS2] 147>59	100	13,6	16,7	25,5
S4. Raloxifeno	20	10,6	16,7	8,6
S4. SR9009	10	14,3	18,8	14,0
S4. SR9009 M2	10	16,5	19,3	16,6
S4. SR9009 M6	10	15,6	25,5	30,2
S4. SR9011	10	15,7	22,2	19,0
S4. Tamoxifeno	20	29,9	20,1	35,4
S4. Tamoxifeno (3-OH-4-metoxi)	20	11,5	14,6	15,2
S4. Tamoxifeno (4-OH)	20	16,3	14,4	15,3
S4. Tamoxifeno acido	20	27,4	24,6	20,6

S4. Testolactona	20	8,7	23,2	20,3
S4. Tetrahidrotestolactona	20	36,3	32,1	21,5
S4. Tetrahidrotestolactona* MS2 305>177	20	90,0	80,2	NA

Classe /Analito	Concentração de Trabalho (ng/mL)	PRECISÃO INTERENSAIO (%)		
		100% da Concentração de Trabalho	70% da Concentração de Trabalho	50% da Concentração de Trabalho
S4. Toremifeno	20	29,0	17,0	35,1
S4. Toremifeno (4-OH)	20	13,1	16,0	11,9
S4. Toremifeno (OH-metoxi-N-desmetil)	20	10,1	22,6	13,5
S4. Trimetazidina Frag AIF>166	10	10,1	22,4	32,7
S4x. Lomerizina	10	10,2	12,3	11,7
S5. ACB (4-amino-6-cloro-1,3-benzenodisulfonamida)	100	17,9	13,4	15,3
S5. Acetazolamida	100	27,3	42,9	32,8
S5. Altiazida	100	8,5	11,8	10,3
S5. Amilorida	100	13,9	14,8	14,8
S5. ATFB (4-amino-6-trifluorometil-benzeno-1,3-disulfonamida)	50	26,3	37,0	31,8
S5. Azosemida	100	31,6	30,9	30,1
S5. Bemetizida	100	6,1	11,8	10,5
S5. Bendroflumetiazida	100	27,0	30,1	30,7
S5. Bendroflumetiazida-NH4	100	7,1	12,7	10,1
S5. Benzilhidroclorotiazida	100	7,5	9,2	9,0
S5. Benzotiazida	100	10,2	16,7	11,1
S5. Brinzolamida	50	28,0	26,5	18,6
S5. Bumetanida	100	19,3	17,2	6,2
S5. Butiazida (-)	100	7,3	8,7	9,2
S5. Butiazida (+)	100	9,2	16,3	14,6
S5. Ciclopentiazida	100	8,3	10,7	9,7
S5. Ciclotiazida	100	8,7	11,5	8,6
S5. Clopamida	100	4,6	8,6	11,7
S5. Clorazanil	50	13,5	16,0	23,8
S5. Clorotiazida	100	18,3	11,2	21,5
S5. Clortalidona	100	17,1	14,2	10,0
S5. Conivaptan	100	11,0	12,4	9,4
S5. Diclorfenamida	100	8,0	10,1	9,2
S5. Dorzolamida	50	16,7	6,3	6,9

S5. Epitezida	100	8,0	9,4	8,9
S5. Eplerenona	100	8,9	8,3	9,7
S5. Eplerenona (6b-OH)	100	10,5	7,8	12,1
S5. Espironolactona (6b-OH-7a-tiometil)	50	45,7	22,3	14,1

Classe /Analito	Concentração de Trabalho (ng/mL)	PRECISÃO INTERENSAIO (%)		
		100% da Concentração de Trabalho	70% da Concentração de Trabalho	50% da Concentração de Trabalho
S5. Espironolactona (artefato)	50	16,8	13,6	9,8
S5. Furosemida	100	14,0	15,8	18,3
S5. Hidroclorotiazida	100	18,2	10,6	14,7
S5. Hidroflumetiazida	50	19,6	14,2	21,2
S5. Indapamida	100	31,1	59,6	68,7
S5. Lixivaptan	50	33,3	28,0	14,7
S5. Mebutizida (-)	100	5,0	9,9	8,3
S5. Mefrusida	100	6,3	6,8	8,4
S5. Mefrusida (lactona) {ou 5-oxo-mefruside}	100	8,6	9,7	27,0
S5. Metazolamida (+)	100	22,6	21,3	23,2
S5. Meticlotiazida	100	42,5	38,1	30,1
S5. Metolazona	100	8,3	7,6	10,6
S5. Mozavaptan	100	11,6	9,9	11,2
S5. Piretanida	100	7,5	13,6	10,2
S5. Politiazida	50	8,1	9,6	8,3
S5. Probenecida	100	10,4	8,1	13,5
S5. Quinetazona	50	19,4	20,3	14,9
S5. Relcovaptan	100	14,6	11,8	8,7
S5. Tolvaptan	100	22,0	45,9	33,0
S5. Tolvaptan (OH)	100	14,3	12,4	7,7
S5. Torasemida	50	10,5	13,6	9,3
S5. Triantereno	50	14,5	10,9	9,8
S5. Triantereno (p-OH sulfato)	100	20,4	20,0	21,6
S5. Triclorometiazida	100	16,9	12,2	16,7
S5. Xipamida	100	23,2	24,5	9,7
S5x. Proguanil	100	10,7	9,9	6,3
S6q.Catina-Fragment (marcador) AIF	100	9,6	9,6	6,0
S6. 1,1-DMBA/ 1,3-DMBA* {dimetilbutilamina} AIF	100	66,7	49,0	NA
S6. 2,5-dimetoxifenetilamina	25	13,9	14,9	15,6

S6. 2-etilamino-1-fenilbutano {ou N-etil-1-fenil-2-butanamina}	25	11,4	11,8	17,1
S6. 3,3-difenilpropilamina	25	17,7	17,0	26,7
S6. 4-fluoroanfetamina	50	11,8	11,5	12,8

Classe /Analito	Concentração de Trabalho (ng/mL)	PRECISÃO INTERENSAIO (%)		
		100% da Concentração de Trabalho	70% da Concentração de Trabalho	50% da Concentração de Trabalho
S6. 5-APDB {ou 5-(2-aminopropil)-2,3-diidrobenzofurano}	50	2,7	10,7	15,9
S6. Ac. ritalinico	100	14,0	14,8	15,0
S6. Adrafinil	70	14,3	11,9	12,4
S6. Anfepiramona	25	31,9	31,7	30,9
S6. Anfepiramona (N-dietilnorpseudoefedrina)	25	12,2	8,4	14,6
S6. Anfepiramona (N-etilnorpseudoefedrina)	25	12,4	7,7	17,9
S6. Anfetamina	100	26,4	18,9	8,1
S6. Anfetamina frag 136 > 119	100	22,7	NA	NA
S6. Benfluorex	25	12,0	13,8	16,3
S6. Benzfetamina	25	5,2	10,5	15,3
S6. Benzilpiperazina	12,5	14,1	15,7	24,1
S6. Bromantano	25	18,3	35,0	34,2
S6. Bromantano (6-OH)	25	18,9	16,1	16,0
S6. Carfedon {ou Fonturacetam}	50	11,2	20,2	16,9
S6. Catinona	100	13,7	14,1	15,6
S6. Catinona analogo Alfa-PVP	50	21,5	22,6	18,7
S6. Catinona analogo Metilona	50	9,2	9,0	10,2
S6. Catinona analogo: Metilenodioxipirovalerona (MDPV)	25	10,1	14,3	10,5
S6. Catinona analogo: N-etil heptedrona	25	13,0	7,1	13,8
S6. Catinona -H ₂ O	100	14,9	14,8	14,3
S6. Ciclazodona	25	8,8	4,9	12,2
S6. Clobenzorex	25	9,9	11,2	11,6
S6. Clobenzorex (4-OH)	25	13,5	14,5	17,1
S6. Cropropamida -C ₂ H ₅ NH ₂	100	9,4	7,3	13,9
S6. Cropropamida-Na	100	21,8	20,3	37,3
S6. Crotetamida -C ₂ H ₅ NH ₂	100	12,0	10,6	14,0
S6. Crotetamida-Na	100	9,0	12,1	32,2
S6. Dimetilanfetamina	50	13,4	10,8	17,1

S6. Dipentilona	50	8,0	11,6	12,5
S6. Dobutamina	50	33,2	51,8	NA
S6. Estricnina	25	11,3	13,6	14,7
S6. Etamivan	25	13,6	8,6	17,7
S6. Etilanfetamina	50	10,9	13,1	9,0

Classe /Analito	Concentração de Trabalho (ng/mL)	PRECISÃO INTERENSAIO (%)		
		100% da Concentração de Trabalho	70% da Concentração de Trabalho	50% da Concentração de Trabalho
S6. Etilanfetamina (4-OH)	50	9,4	9,6	12,0
S6. Etilefrina -H ₂ O (TIV)	50	11,6	15,5	12,1
S6. Famprofazona	25	14,4	14,5	9,3
S6. Fembutrazato	25	10,6	10,6	19,2
S6. Femproporex	25	15,8	11,4	16,8
S6. Fencamina	25	15,7	18,2	20,0
S6. Fencanfamina	25	5,8	9,4	11,2
S6. Fendimetrazina	50	16,8	14,0	20,2
S6. Fenetilina	25	11,7	13,8	13,6
S6. Fenfluramina	25	5,8	10,2	13,3
S6. Fenfluramina (nor)	25	7,5	10,6	16,8
S6. Fenmetrazina	50	13,4	11,9	14,3
S6. Fentermina	50	20,9	25,6	24,4
S6. Foledrina	50	11,7	12,2	15,7
S6. Furfenorex	25	14,2	10,3	13,4
S6. Heptaminol	100	12,5	14,6	16,5
S6. Hexan-2-amino	100	14,0	22,7	18,1
S6. Isometepteno	20	8,7	10,5	12,9
S6. Isometepteno M1	50	10,1	10,2	9,4
S6. Lisdexanfetamina	50	19,4	22,8	21,9
S6. MDA {ou Tenanfetamina}	50	10,8	10,6	14,3
S6. MDA {ou Tenanfetamina} -NH ₃	50	8,3	8,5	12,8
S6. MDEA	25	6,9	9,5	13,7
S6. MDMA	50	6,4	10,4	13,2
S6. MDMA Metab (HMMA)	50	11,3	23,9	14,2
S6. Meclofenoxato M (4-CPA)	50	25,4	30,7	31,5
S6. Mefedrona	25	2,7	10,6	16,0
S6. Mefedrona (nor)	50	23,4	19,4	17,4
S6. Mefenorex	25	13,5	10,4	12,9
S6. Mefentermina	50	10,2	12,7	8,7
S6. Mesocarb (p-OH)	25	26,0	21,6	31,9
S6. Metanfetamina	25	12,7	14,9	17,2

S6. Metilfenidato	50	7,3	10,2	10,8
S6. Metilhexanoamina	100	29,9	29,9	24,4
S6. Metoxifenamina	25	7,8	10,8	11,0
S6. Modafinil-Fragment	50	9,4	7,5	10,5
S6. Modafinilico Ac-Fragment	100	13,0	14,3	10,4

Classe /Analito	Concentração de Trabalho (ng/mL)	PRECISÃO INTERENSAIO (%)		
		100% da Concentração de Trabalho	70% da Concentração de Trabalho	50% da Concentração de Trabalho
S6. Modafinil-Na	50	36,1	34,4	43,0
S6. N-etil-4-metoxi-anfetamina {ou PMEA}	25	8,9	9,7	13,2
S6. Niquetamida	25	10,4	9,7	12,6
S6. Niquetamida M (N-Etilnicotinamida)	50	9,4	11,4	10,9
S6. N-metil-N-(1-fenetil)-amina	100	26,9	15,8	20,9
S6. Octan-2-amino	50	27,0	19,0	22,1
S6. Octilamina	50	8,7	16,8	10,9
S6. Ortetamina	50	18,6	16,7	14,3
S6. Oxilofrina -H ₂ O (TIV)	50	11,6	11,8	19,5
S6. Pemolina	100	12,4	20,0	16,8
S6. Pentetrazol	50	11,8	13,9	16,0
S6. p-metilanfetamina	50	18,6	26,2	30,1
S6. p-Metoxi-Anfetamina {ou PMA}	100	38,1	46,9	47,7
S6. Prenilamina	25	9,2	9,4	4,5
S6. Prolintano	50	19,6	14,9	17,4
S6. Propilexedrina	50	13,7	11,6	17,3
S6. Selegilina	50	12,9	15,9	27,5
S6. Selegilina (desmetil)	50	18,2	18,3	25,0
S6. Sibutramina	25	8,7	13,2	16,4
S6. Sibutramina (N,N-didemetil) {ou N,N-bisdesmetil}	50	9,4	9,6	9,5
S6. Sibutramina (N-desmetil)	25	9,6	9,2	10,9
S6. Sibutramina (OH-didemetil) {ou OH-bisdesmetil}	50	19,3	17,2	27,8
S6. Tuaminoheptano	100	32,7	34,2	34,1
S6a. Coca (benzoilecgonina)	50	11,8	15,1	14,8
S6a. Coca (metilecgonina)	50	5,6	13,7	14,3
S6a. Cocaina	50	13,1	13,6	13,2
S6q. Catina-Fragment	100	12,7	13,5	14,0

S6q. Efedrina	100	6,0	6,3	9,4
S6q. Metilefedrina	50	10,9	7,4	16,6
S6x. Bupropion	10	20,5	20,5	16,5
S6x. Fenilpropanolamina-fragm {ou norefedrina-fragm}	25	12,8	13,2	14,3
S6x. Mebeverine acido	25	11,4	10,9	12,0

Classe /Analito	Concentração de Trabalho (ng/mL)	PRECISÃO INTERENSAIO (%)		
		100% da Concentração de Trabalho	70% da Concentração de Trabalho	50% da Concentração de Trabalho
S6x. Mebeverine acido (o-desmetil)	25	10,3	14,4	11,8
S6x. Morazona	10	8,0	14,6	10,5
S6x. Nicotina M (cotinina)	25	8,2	13,0	10,8
S6x. Oxetazina	10	11,2	10,1	51,2
S6x. Pipradrol	10	8,6	10,7	13,6
S7. Cis-Mefentanila {ou 3-metilfentanil}	25	6,6	13,8	7,0
S7. Dextromoramide	25	11,3	13,4	10,1
S7. Fentanil	1	6,1	7,6	22,2
S7. Fentanil (nor)	1	8,9	4,2	8,8
S7. Heroína	25	28,3	26,9	27,5
S7. Heroína (6-MAM)	25	13,2	16,0	12,5
S7. Meperidina (nor) {ou Norpetidina}	25	10,3	7,1	11,7
S7. Meperidina {ou Petidina}	25	12,0	16,3	10,8
S7. Metadona	25	10,2	17,0	12,0
S7. Metadona M (EDDP)	25	7,2	13,4	15,1
S7. Oxycodona	25	10,1	7,3	14,6
S7. Oximorfona	12,5	10,3	8,8	20,8
S7. Pentazocina	25	12,4	21,4	10,1
S7. Sufentanil	2,5	12,7	16,7	33,2
S7x. Hidrocodona	25	8,5	12,5	5,2
S7x. N-metilnaltrexona	25	9,3	9,4	9,7
S7x. Tramadol	25	10,5	9,5	8,9
S7x. Tramadol desmetil	25	9,1	12,8	9,5
S8. JWH-018	1	25,3	41,6	64,4
S8. JWH-073	1	18,9	28,5	29,0
S8. JWH-073 (3-hidroxibutil)	1	61,5	74,0	83,1
S8. JWH-073 (4-hidroxi-indol)	1	21,8	33,6	28,5
S8. JWH-073 (acido N-butanoico)	1	29,6	28,2	NA
S8. JWH-073 (acido N-butanoico)-fragment AIF>155	1	70,5	NA	NA

S9. 20b-OH-prednisona	30	11,1	28,1	11,2
S9. Beclometasona	30	5,3	6,2	12,9
S9. Beclometasona 17-propionato	30	36,9	43,3	13,8
S9. Betametasona	60	12,9	16,6	26,4
S9. Budesonida	30	39,4	36,9	19,0

Classe /Analito	Concentração de Trabalho (ng/mL)	PRECISÃO INTERENSAIO (%)		
		100% da Concentração de Trabalho	70% da Concentração de Trabalho	50% da Concentração de Trabalho
S9. Budesonida (6 β -OH)	45	8,7	17,9	22,1
S9. Budesonida (6 β -OH) COOH	45	4,7	4,4	11,1
S9. Ciclesonida	30	22,4	29,7	28,2
S9. Ciclesonida (des-isobutiril)	30	8,7	6,7	8,4
S9. Prednisolona	100	6,1	6,1	11,3
S9. Deflazacort	30	8,2	11,0	7,9
S9. Deflazacort (6 β -OH-21-desacetil)	30	8,1	10,7	18,8
S9. Deflazacort (desacetil)	30	6,0	7,1	14,6
S9. Desonida	30	8,1	11,2	7,9
S9. Fludrocortisona	30	7,2	10,1	19,8
S9. Flumetasona	30	21,9	13,5	9,4
S9. Flunisolida	30	7,9	10,4	12,9
S9. Fluocortolona	30	7,3	6,8	12,8
S9. Fluocortolona COOH	30	8,3	7,7	9,4
S9. Fluocortolona pivalato	30	9,6	33,5	43,5
S9. Fluorometolona acetato	30	9,8	11,7	20,1
S9. Fluticasona (17 β -carboxi)	30	14,7	18,5	18,4
S9. Fluticasona furoato (17 β -ac carboxílico)	30	13,8	18,2	11,1
S9. Fluticasona propionato	30	32,2	27,5	23,9
S9. Fluticasona propionato (carboxi)	30	17,5	14,7	9,4
S9. Metilprednisolona (6 α)	30	5,6	7,4	15,9
S9. Mometasona	30	49,6	NA	NA
S9. Mometasona Furoato	30	31,5	27,1	10,1
S9. Mometasona Furoato (6 β -OH)	30	38,0	30,6	24,8
S9. Prednisolona (16-OH)	30	13,6	15,1	13,5
S9. Prednisolona (6 β -OH)	30	16,8	17,8	24,9
S9. Prednisona	150	7,8	6,7	11,0
S9. Triancinolona	30	8,5	16,4	26,6
S9. Triancinolona acetonida	15	6,5	10,8	23,7

S9. Triancinolona acetonida (6 β -OH)	30	14,2	22,4	31,7
---	----	------	------	------

4.f.4. Efeito Matriz

O efeito matriz foi avaliado comparando-se a análise da área do analito em amostras de DBS fortificadas após a etapa de extração em comparação com amostras que seguiram procedimento idêntico em paralelo, em que não foi utilizado sangue nem o VAMS, fortificadas também após a etapa de extração. O percentual da área do analito das amostras contendo matriz em relação às amostras sem matriz nem VAMS é exibido na Tabela 4.5 (EM). Os valores entre 85% e 125% indicam que o efeito matriz é irrelevante. Valores abaixo de 85% indicam que ocorre influência da matriz no sentido de supressão do sinal, e acima de 125% indicam influência no sentido de aumento do sinal analítico.

4.f.4. Rendimento de Extração

O rendimento de extração (RE) foi calculado utilizando comparação de resultados de extração da matriz fortificada antes e depois da extração. As porcentagens de cada um dos analitos é descrito na Tabela 4.4 (papel Whatman 903TM) e na Tabela 4.5 (VAMS- Mitra®). Para os resultados de rendimento de extração não há critério mínimo estabelecido, porém é comum de ser calculado para fins informativos.

Tabela 4.4: Rendimento de extração (Whatman 903TM)

Classe /Analito	(M+H) ⁺	t _R (min)	CONCENTRAÇÃO (ng/mL)	RE (%)
S9. Prednisona	359,1853	7,0	300	96,4
S9. Prednisolona	361,2010	7,2	100	94,9
S9. 6 β -OH-prednisolona	537,1441	7,8	30	90,9
S6. Isometepteno mucato	142,1590	5,4	50	62,7
S6. Isometepteno M1 (Aranthol)	160,1696	3,5	50	91,2
S6. Sibutramina	280,1827	7,2	50	51,2

S6. <i>N,N</i> -didesmetil-sibutramina	252,1514	7,5	50	82,5
S6. <i>N</i> -desmetil-sibutramina	266,1670	7,3	50	107,1
S6. OH-didesmetil-sibutramina	268,1463	6,5	50	86
S6. Metilfenidato	234,1489	4,9	50	85,5
S6. Ácido ritalínico	220,1332	5,2	50	70,1

Tabela 4.5: Rendimento de extração (RE%) e Efeito Matriz (EM%) (VAMS- Mitra®)

Classe /Analito	(M+H) ⁺	t _R (min)	Concentração (ng/mL)	RE (%)	EM (%)
M1. Efavirenz	340,1554	8,1	10	79,5	148,6
S1. Efavirenz	271,1693	7,9	2,5	85,6	88,7
S1. Efavirenz (16-OH)	345,2537	8,1	1	70,5	61,2
S1. Efavirenz	309,1849	8,1	2,5	78,9	74,7
S1. Efavirenz (6a-OH)	325,1798	6,8	2,5	67,9	81,5
S1. Metildienolona MS2 287>159	159,0810	8,1	2,5	78,8	86,1
S1. Metiltienolona {ou Metribolona}	285,1849	8,0	2,5	119,5	87,0
S1. Prostanolol (16-OH)	329,2229	7,4	2,5	61,8	62,1
S1. SARM Enobosarm (Ostarina)	388,0915	7,8	1	100,3	124,9
S1. SARM GSK2881078	331,0723	7,2	1	74,0	69,6
S1. SARM LGD4033	339,0927	8,2	1	54,2	68,5
S1. SARM RAD-140-Fragment	348,0658	7,7	1	67,6	159,6
S1. SARM S1	401,0766	8,5	1	101,2	54,9
S1. SARM S-23 (SB19042)	415,0478	8,7	1	107,6	76,2
S1. SARM S4 (Andarina)	440,1075	7,6	1	87,0	275,2
S1. SARM S4 (Andarina-o-defenil)	307,0536	7,0	1	101,0	213,8
S1. SARM S9	417,0471	8,7	1	106,8	73,3
S1. Tetrahydrogestrinona	313,2162	8,8	2,5	98,9	46,6
S1x. 20-hidroxicidona	481,3160	6,3	10	89,5	68,4
S1x. Cetoconazol	531,1565	7,3	20	54,0	325,4
S1x. Finasterida (carboxi)	403,2591	7,3	5	69,8	87,5
S1x. Fluconazol	307,1119	5,7	20	102,9	103,2
S1x. Flutamida	275,0638	8,0	1	102,9	101,0
S1x. Flutamida (2-OH)	291,0587	7,6	1	101,1	125,2
S1x. Miconazol	416,9909	8,6	20	68,6	23,3
S3. Higenamine	272,1272	4,2	10	9,3	136,3
S3. Higenamine (Coclaurine)	286,1438	4,8	10	63,5	92,8
S3. Indacaterol	393,2173	7,0	20	34,7	69,9
S3. Olodaterol	387,1915	5,7	20	54,6	74,1
S3. Procaterol	291,1703	4,3	20	23,8	118,4
S3. Reproterol tetrahydroquinol derivado	402,1772	4,3	20	54,6	106,5
S3. Ritodrina	288,1594	4,4	20	78,2	107,6

S3. Salmeterol	416,2795	7,4	10	70,1	83,3
S3. Tretoquinol {ou Trimetoquinol}	346,1649	5,0	20	8,5	118,7
S3. Tulobuterol	228,1150	5,5	20	90,4	85,6
S3. Vilanterol	486,1809	7,2	10	76,1	86,7
S3q. Formoterol	345,1809	5,3	20	59,4	87,7
S4. Aminoglutetimida (N-acetil)	275,1390	6,0	20	111,4	82,3

Classe /Analito	(M+H) ⁺	t _R (min)	Concentração (ng/mL)	RE (%)	EM (%)
S4. Aminoglutetimida MS2 233>146	146,0964	4,8	20	80,5	113,0
S4. Anastrozol	294,1713	6,5	20	103,7	94,1
S4. Androsta-1,4,6-triene-17b-ol-3-ona	285,1849	7,8	20	68,7	77,0
S4. Androstatrienediona {Androsta-1,4,6-triene-3,17-diona}	283,1693	7,6	20	60,5	86,0
S4. Bazedoxifeno	471,2642	6,7	20	40,3	110,2
S4. Clomifeno	406,1932	8,1	20	74,9	205,1
S4. Clomifeno (desetil)	378,1619	6,0	20		94,9
S4. Exemestano	297,1849	8,0	20	78,7	89,3
S4. Exemestano (17b-OH) {ou 17-dihidroexemestano}	299,2006	8,3	20	72,6	77,3
S4. Fulvestrant	607,3239	9,5	20	78,2	322,9
S4. Fulvestrant (17-ceto)	605,3082	9,7	20	78,3	344,2
S4. Mildronato {ou Meldonium}	147,1128	0,5	100	119,0	18,9
S4. Mildronato {ou Meldonium} [MS2] 147>59	59,0735	0,5	100	103,6	19,5
S4. Raloxifeno	474,1734	6,4	20	68,6	84,2
S4. SR9009	438,1249	9,7	10	84,6	68,4
S4. SR9009 M2	314,1169	5,2	10	82,1	94,4
S4. SR9009 M6	283,0303	6,0	10	79,8	57,0
S4. SR9011	479,1878	9,7	10	80,7	101,9
S4. Tamoxifeno	372,2322	8,3	20	69,5	209,2
S4. Tamoxifeno (3-OH-4-metoxi)	418,2377	7,8	20	68,3	120,5
S4. Tamoxifeno (4-OH)	388,2271	7,6	20	79,7	85,2
S4. Tamoxifeno acido	357,1496	9,6	20	41,5	288,2
S4. Testolactona	301,1798	6,8	20	113,8	130,7
S4. Tetrahidrotestolactona	305,2111	7,7	20	146,2	96,2
S4. Tetrahidrotestolactona* MS2 305>177	177,1274	7,7	20	499,8	82,7
S4. Toremifeno	406,1932	8,1	20	74,9	205,1
S4. Toremifeno (4-OH)	422,1881	7,5	20	84,9	84,1
S4. Toremifeno (OH-metoxi-N-desmetil)	438,1831	7,5	20	80,7	54,8
S4. Trimetazidina Frag AIF>166	166,0624	4,3	10	81,2	615,9
S4x. Lomerizina	469,2303	7,6	10	80,8	95,9
S5. ACB (4-amino-6-cloro-1,3-benzenodisulfonamida)	283,9572	1,9	100	147,4	142,6

S5. Acetazolamida	220,9809	3,5	100	81,0	128,5
S5. Altiazida	381,9762	6,1	100	74,1	101,1
S5. Amilorida	230,0552	4,2	100	99,9	100,6
S5. ATFB (4-amino-6-trifluorometil-benzeno-1,3-disulfonamida)	317,9825	3,8	50	119,5	122,5
S5. Azosemida	368,9990	7,0	100	47,5	164,7
S5. Bemetizida	400,0187	6,8	100	80,0	98,9

Classe /Analito	(M+H) ⁺	t _R (min)	Concentração (ng/mL)	RE (%)	EM (%)
S5. Bendroflumetiazida	422,0451	6,6	100	97,2	69,1
S5. Bendroflumetiazida-NH ₄	439,0716	6,7	100	76,5	88,7
S5. Benzilhidroclorotiazida	386,0042	6,3	100	81,6	90,2
S5. Benztiiazida	429,9762	6,7	100	72,7	82,8
S5. Brinzolamida	384,0716	4,8	50	127,5	83,6
S5. Bumetanida	365,1166	7,7	100	84,5	98,1
S5. Butiazida (-)	352,0198	6,3	100	82,3	96,1
S5. Butiazida (+)	354,0344	6,3	100	79,8	96,3
S5. Ciclopentiazida	378,0355	7,0	100	81,6	105,4
S5. Ciclotiazida	388,0198	6,7	100	76,3	100,8
S5. Clopamida	344,0841	6,3	100	89,3	108,2
S5. Clorazanil	222,0541	6,7	50	80,6	68,7
S5. Clorotiazida	293,9416	2,9	100	64,6	84,0
S5. Clortalidona	337,0055	5,7	100	90,8	108,3
S5. Conivaptan	499,2129	7,0	100	78,5	90,1
S5. Diclorfenamida	302,9073	5,2	100	84,7	108,6
S5. Dorzolamida	325,0345	2,0	50	104,8	142,9
S5. Epitizida	423,9480	6,1	100	76,6	97,8
S5. Eplerenona	415,2115	6,8	100	90,1	86,1
S5. Eplerenona (6b-OH)	431,2064	6,3	100	91,3	88,0
S5. Espironolactona (6b-OH-7a-tiometil)	405,2094	7,6	50	74,6	67,1
S5. Espironolactona (artefato)	341,2111	8,0	50	78,3	75,1
S5. Furosemida	328,9999	6,5	100	60,6	109,4
S5. Hidroclorotiazida	295,9572	3,3	100	82,1	93,3
S5. Hidroflumetiazida	329,9836	4,3	50	76,6	108,2
S5. Indapamida	364,0528	6,7	100	41,0	55,0
S5. Lixivaptan	474,1379	8,6	50	100,8	51,6
S5. Mebutizida (-)	380,0511	7,1	100	80,6	98,5
S5. Mefrusida	381,0351	6,6	100	91,6	106,7
S5. Mefrusida (lactona) {ou 5-oxo-mefruside}	397,0289	5,8	100	83,1	75,7
S5. Metazolamida (+)	237,0111	4,7	100	111,6	92,3
S5. Meticlotiazida	357,9495	5,7	100	104,8	132,7
S5. Metolazona	364,0528	6,4	100	83,0	106,9

S5. Mozavaptan	428,2333	6,3	100	83,3	88,7
S5. Piretanida	361,0864	7,4	100	63,6	104,3
S5. Politiazida	437,9636	6,7	50	88,1	99,6
S5. Probenecida	284,0962	7,8	100	71,8	149,6
S5. Quinetazona	290,0361	4,8	50	102,4	100,1
S5. Relcovaptan	620,1020	7,8	100	85,7	78,3
S5. Tolvaptan	449,1626	8,3	100	76,9	134,7

Classe /Analito	(M+H) ⁺	t _R (min)	Concentração (ng/mL)	RE (%)	EM (%)
S5. Tolvaptan (OH)	465,1576	7,9	100	90,2	93,5
S5. Torasemida	347,1183	6,6	50	78,5	107,8
S5. Triantereno	254,1149	5,1	50	105,3	86,5
S5. Triantereno (p-OH sulfato)	350,0666	4,4	100	100,1	92,4
S5. Triclorometiazida	379,8920	5,5	100	74,6	120,9
S5. Xipamida	353,0368	7,3	100	51,7	85,6
S5x. Proguanil	254,1167	6,5	100	97,9	86,9
S6q. Catina-Fragment (marcador) AIF	134,0964	3,5	100	72,2	168,8
S6. 1,1-DMBA/ 1,3-DMBA* {dimetilbutilamina} AIF	102,1277	3,8	100	33,2	157,3
S6. 2,5-dimetoxifenetilamina	182,1176	4,9	25	62,5	106,1
S6. 2-etilamino-1-fenilbutano {ou N- etil-1-fenil-2-butanamina}	178,1590	5,3	25	59,4	90,8
S6. 3,3-difenilpropilamina	212,1434	6,4	25	72,6	89,0
S6. 4-fluoroanfetamina	154,1027	4,6	50	72,0	105,9
S6. 5-APDB {ou 5-(2-aminopropil)-2,3- diidrobenzofurano}	178,1226	4,9	50	65,8	116,0
S6. Ac. ritalinico	220,1332	5,2	100	93,0	99,1
S6. Adrafinil	288,0700	6,7	70	87,1	128,2
S6. Anfepirmona	206,1539	4,6	25	22,2	91,2
S6. Anfepirmona (N- dietilnorpseudoefedrina)	208,1696	4,6	25	69,5	101,1
S6. Anfepirmona (N- etilnorpseudoefedrina)	180,1383	4,4	25	80,6	89,6
S6. Anfetamina	136,1121	4,4	100	122,9	166,8
S6. Anfetamina frag 136 > 119	119,0855	4,5	100	64,3	86,6
S6. Benfluorex	352,1519	7,0	25	67,3	61,4
S6. Benzfetamina	240,1747	6,0	25	87,0	75,7
S6. Benzilpiperazina	177,1386	2,2	12,5	49,4	1033,0
S6. Bromantano	306,0852	10,6	25	43,6	45,2
S6. Bromantano (6-OH)	322,0801	8,9	25	70,5	18,9
S6. Carfedon {ou Fonturacetam}	219,1128	5,6	50	81,7	78,4
S6. Catinona	150,0913	3,5	100	53,3	138,7
S6. Catinona analogo Alfa-PVP	232,1696	5,5	50	38,2	96,6
S6. Catinona analogo Metilona	208,0968	4,2	50	72,1	118,2
S6. Catinona analogo: Metilendioxio- pirovalerona (MDPV)	276,1594	5,6	25	63,4	85,8

S6. Catinona analogo: N-etil heptedrona	234,1852	6,5	25	54,5	146,8
S6. Catinona -H ₂ O	132,0808	3,5	100	53,1	135,1
S6. Ciclazodona	217,0972	6,2	25	91,5	83,7
S6. Clonazepam	260,1201	6,4	25	81,7	84,3
S6. Clonazepam (4-OH)	276,1149	5,7	25	68,6	81,8
S6. Cropropamida -C ₂ H ₅ NH ₂	196,1332	7,0	100	91,1	79,5

Classe /Analito	(M+H) ⁺	t _R (min)	Concentração (ng/mL)	RE (%)	EM (%)
S6. Cropropamida-Na	263,1730	7,0	100	81,8	63,7
S6. Crotetamida -C ₂ H ₅ NH ₂	182,1176	6,4	100	93,9	92,2
S6. Crotetamida-Na	249,1573	6,4	100	103,6	70,8
S6. Dimetilanfetamina	164,1434	4,5	50	59,8	84,4
S6. Dipentilona	250,1435	5,5	50	74,8	98,6
S6. Dobutamina	302,1751	4,9	50	2,4	129,2
S6. Estricnina	335,1754	4,8	25	138,4	165,3
S6. Etamivan	224,1281	6,2	25	71,4	90,3
S6. Etilanfetamina	164,1434	5,0	50	76,3	95,4
S6. Etilanfetamina (4-OH)	180,1383	3,5	50	77,0	102,8
S6. Etilefrina -H ₂ O (TIV)	164,1075	1,4	50	72,1	137,4
S6. Famprofazona	378,2540	8,7	25	82,2	45,5
S6. Fembutrazato	368,2220	8,0	25	74,5	55,2
S6. Femproporex	189,1386	4,4	25	88,3	93,2
S6. Fencamina	385,2347	5,3	25	59,1	100,4
S6. Fencanfamina	216,1747	6,1	25	71,8	81,3
S6. Fendimetrazina	192,1383	4,3	50	76,0	89,1
S6. Fenetilina	342,1925	5,5	25	78,7	84,2
S6. Fenfluramina	232,1308	6,0	25	59,1	76,9
S6. Fenfluramina (nor)	204,0995	5,8	25	57,2	74,2
S6. Fenmetrazina	178,1226	4,4	50	79,0	89,0
S6. Fentermina	150,1277	5,0	50	98,6	132,2
S6. Foledrina	166,1226	2,4	50	73,6	108,6
S6. Furfenorex	230,1539	5,5	25	78,5	83,1
S6. Heptaminol	146,1539	3,2	100	91,2	111,5
S6. Hexan-2-amino	102,1277	4,0	100	55,2	104,3
S6. Isometepteno	142,1590	5,4	20	47,0	98,1
S6. Isometepteno M1	160,1696	3,5	50	87,5	102,3
S6. Lisdexanfetamina	264,2070	3,9	50	74,4	326,0
S6. MDA {ou Tenanfetamina}	180,1019	4,6	50	91,9	101,9
S6. MDA {ou Tenanfetamina} -NH ₃	163,0754	4,6	50	77,5	90,2
S6. MDEA	208,1332	4,9	25	77,8	94,6
S6. MDMA	194,1176	4,6	50	71,4	93,8

S6. MDMA Metab (HMMA)	196,1332	3,6	50	32,4	103,5
S6. Meclofenoxato M (4-CPA)	185,0000	6,7	50	74,7	157,8
S6. Mefedrona	178,1226	4,9	25	65,8	116,0
S6. Mefedrona (nor)	164,1070	4,8	50	77,5	102,9
S6. Mefenorex	212,1201	5,5	25	67,8	81,0
S6. Mefentermina	164,1434	5,0	50	76,6	95,2
S6. Mesocarb (p-OH)	339,1452	6,9	25	51,8	38,1

Classe /Analito	(M+H) ⁺	t _R (min)	Concentração (ng/mL)	RE (%)	EM (%)
S6. Metanfetamina	150,1277	4,5	25	85,3	75,4
S6. Metilfenidato	234,1489	4,9	50	80,6	93,2
S6. Metilhexanoamina	116,1434	4,9	100	58,2	121,2
S6. Metoxifenamina	180,1383	5,1	25	79,6	93,4
S6. Modafinil-Fragment	167,0855	6,8	50	81,3	94,8
S6. Modafinilico Ac-Fragment	167,0855	6,9	100	59,9	145,4
S6. Modafinil-Na	296,0716	6,8	50	71,7	83,7
S6. N-etil-4-metoxi-anfetamina {ou PMEA}	194,1539	5,0	25	72,0	87,1
S6. Niquetamida	179,1179	5,2	25	93,9	93,4
S6. Niquetamida M (N-Etilnicotinamida)	151,0866	3,5	50	89,4	105,0
S6. N-metil-N-(1-fenetil)-amina	136,1121	3,9	100	48,5	161,8
S6. Octan-2-amino	130,1590	6,0	50	63,9	90,2
S6. Octilamina	130,1590	6,3	50	22,1	86,5
S6. Ortetamina	150,1277	5,2	50	90,2	107,4
S6. Oxilofrina -H ₂ O (TIV)	164,1075	0,9	50	79,8	74,5
S6. Pemolina	177,0659	4,7	100	94,5	95,1
S6. Pentetrazol	139,0978	4,5	50	94,4	92,0
S6. p-metilanfetamina	150,1277	5,3	50	82,6	100,7
S6. p-Metoxi-Anfetamina {ou PMA}	166,1226	4,7	100	151,4	81,1
S6. Prenilamina	330,2216	7,5	25	75,5	62,5
S6. Prolintano	218,1903	5,8	50	57,1	82,5
S6. Propilexedrina	156,1747	5,9	50	54,5	86,8
S6. Selegilina	188,1434	4,9	50	65,8	78,2
S6. Selegilina (desmetil)	174,1277	5,0	50	71,7	88,6
S6. Sibutramina	280,1827	7,2	25	76,3	65,5
S6. Sibutramina (N,N-didemetil) {ou N,N-bisdesmetil}	252,1514	7,5	50	64,9	67,6
S6. Sibutramina (N-demetil)	266,1670	7,3	25	73,2	70,8
S6. Sibutramina (OH-didemetil) {ou OH-bisdesmetil}	268,1463	6,5	50	78,7	85,5
S6. Tuaminoheptano	116,1434	5,2	100	71,1	115,5
S6a. Coca (benzoilecgonina)	290,1387	5,2	50	82,1	92,1
S6a. Coca (metilecgonina)	200,1281	0,5	50	92,5	33,9

S6a. Cocaina	304,1543	5,4	50	73,0	93,0
S6q. Catina-Fragment	134,0964	3,5	100	91,0	109,7
S6q. Efedrina	166,1226	3,9	100	89,5	80,9
S6q. Metilefedrina	180,1383	4,0	50	66,0	101,4
S6x. Bupropion	240,1150	5,8	10	44,4	80,1
S6x. Fenilpropanolamina-fragm {ou norefedrina-fragm}	134,0964	3,0	25	95,7	103,9
S6x. Mebeverine acido	280,1907	5,2	25	86,1	91,3

Classe /Analito	(M+H) ⁺	t _R (min)	Concentração (ng/mL)	RE (%)	EM (%)
S6x. Mebeverine acido (o-desmetil)	266,1751	4,1	25	76,4	101,5
S6x. Morazona	378,2176	5,6	10	80,9	101,2
S6x. Nicotina M (cotinina)	177,1022	1,4	25	88,5	113,7
S6x. Oxetazina	468,3221	8,1	10	81,6	192,7
S6x. Pipradrol	268,1696	5,9	10	89,9	84,9
S7. Cis-Mefentanila {ou 3-metilfentanil}	351,2431	6,4	25	81,1	92,4
S7. Dextromoramide	393,2537	6,9	25	84,0	96,7
S7. Fentanil	337,2274	6,1	1	78,8	93,3
S7. Fentanil (nor)	233,1648	5,2	1	97,3	90,0
S7. Heroína	370,1649	5,3	25	27,6	90,3
S7. Heroína (6-MAM)	328,1543	4,4	25	51,3	97,8
S7. Meperidina (nor) {ou Norpetidina}	234,1489	5,7	25	83,6	76,1
S7. Meperidina {ou Petidina}	248,1645	5,6	25	82,9	82,2
S7. Metadona	310,2165	7,0	25	69,0	85,0
S7. Metadona M (EDDP)	278,1903	6,3	25	60,9	124,0
S7. Oxiconona	316,1543	4,2	25	83,2	99,8
S7. Oximorfona	302,1387	2,0	12,5	63,4	128,1
S7. Pentazocina	286,2165	5,8	25	82,2	88,3
S7. Sufentanil	387,2101	6,7	2,5	68,4	94,1
S7x. Hidrocodona	300,1594	4,4	25	91,9	99,5
S7x. N-metilnaltrexona	356,1856	4,1	25	78,0	104,0
S7x. Tramadol	264,1958	5,3	25	80,6	89,0
S7x. Tramadol desmetil	250,1802	4,6	25	86,9	94,9
S8. JWH-018	342,1852	9,7	1	69,1	193,8
S8. JWH-073	328,1696	9,4	1	80,9	110,2
S8. JWH-073 (3-hidroxibutil)	344,1645	8,4	1	49,7	49,3
S8. JWH-073 (4-hidroxi-indol)	344,1645	9,5	1	93,9	171,2
S8. JWH-073 (acido N-butanoico)	358,1438	8,2	1	69,2	97,1
S8. JWH-073 (acido N-butanoico)- fragment AIF>155	155,0491	8,3	1	62,2	37,8
S9. 20b-OH-prednisona	361,2010	6,9	30	104,3	88,5
S9. Beclometasona	409,1776	7,7	30	93,2	79,6
S9. Beclometasona 17-propionato	465,2038	8,5	30	94,0	14,3

S9. Betametasona	393,2072	7,6	60	86,5	95,1
S9. Budesonida	431,2428	8,5	30	123,4	13,8
S9. Budesonida (6b-OH)	447,2377	7,5	45	99,2	68,6
S9. Budesonida (6b-OH) COOH	491,2287	7,4	45	87,9	99,6
S9. Ciclesonida	541,3160	10,6	30	58,9	145,6
S9. Ciclesonida (des-isobutiril)	471,2741	9,3	30	77,4	52,4
S9. Prednisolona	361,2010	7,2	100	90,3	85,1
S9. Deflazacort	442,2224	8,0	30	49,3	92,9

Classe /Analito	(M+H) ⁺	t _R (min)	Concentração (ng/mL)	RE (%)	EM (%)
S9. Deflazacort (6b-OH-21-desacetil)	416,2068	5,6	30	77,2	82,2
S9. Deflazacort (desacetil)	400,2119	7,4	30	118,1	89,7
S9. Desonida	417,2272	7,9	30	87,4	73,1
S9. Fludrocortisona	381,2072	7,2	30	79,5	89,9
S9. Flumetasona	411,1978	7,5	30	82,6	86,9
S9. Flunisolida	435,2177	7,8	30	82,6	75,8
S9. Fluocortolona	377,2123	7,9	30	89,2	76,9
S9. Fluocortolona COOH	421,2021	7,9	30	98,0	119,2
S9. Fluocortolona pivalato	461,2698	9,2	30	78,0	94,6
S9. Fluorometolona acetato	419,2228	8,1	30	79,7	76,9
S9. Fluticasona (17b-carboxi)	395,1676	7,7	30	76,0	143,1
S9. Fluticasona furoato (17b-ac carboxilico)	491,1876	8,2	30	62,3	71,0
S9. Fluticasona propionato	501,1917	8,6	30	99,4	24,0
S9. Fluticasona propionato (carboxi)	453,2083	8,2	30	73,7	73,5
S9. Metilprednisolona (6α-)	375,2166	7,7	30	88,1	86,7
S9. Mometasona	427,1437	8,2	30	6,6	68,9
S9. Mometasona Furoato	521,1492	8,6	30	90,6	24,8
S9. Mometasona Furoato (6β-OH)	537,1441	7,8	30	99,7	60,6
S9. Prednisolona (16-OH)	377,1959	6,7	30	89,2	82,5
S9. Prednisolona (6β-OH)	377,1959	5,0	30	114,4	89,8
S9. Prednisona	359,1853	7,0	150	81,9	91,8
S9. Triancinolona	393,1708	6,5	30	92,2	107,4
S9. Triancinolona acetona	435,2177	7,7	15	76,8	68,9
S9. Triancinolona acetona (6β-OH)	451,2127	6,7	30	69,1	89,0

4.f.4. Limite de Detecção (LOD)

As dez amostras utilizadas para cálculo do LOD tiveram plotadas curvas de resposta de detecção, descrita por uma função sigmoide. Sendo assim, os valores de LOD obtidos encontram-se na Tabela 4.6 (papel Whatman 903TM) e nas Tabelas 4.7 a 4.14 (VAMS- Mitra®).

Nos critérios de aceitação determinados do LOD determinados pela WADA para substâncias que sejam analisadas por DBS é necessário que a concentração de limite de detecção seja menor que 50% do valor do MRPL. Logo, pode-se afirmar que os valores de LOD das substâncias alcançaram o padrão mínimo, considerando o valor de MRPL atual disponíveis para essas substâncias em urina.

Tabela 4.6. Limite de Detecção (LOD) (Whatman 903TM).

Classe /Analito	LOD (ng/mL)
S9. Prednisona	13,16
S9. Prednisolona	4,76
S9. 6β-OH-prednisolona	5,55
S6. Isometepteno mucato	2,35
S6. Isometepteno M1 (Aranthol)	2,38
S6. Sibutramina	n/A
S6. <i>N,N</i> -didesmetil-sibutramina	17,5
S6. <i>N</i> -desmetil-sibutramina	2,36
S6. OH-didesmetil-sibutramina	2,36
S6. Metilfenidato	2,38
S6. Ácido ritalínico	2,38

Tabela 4.7: LOD para analitos M1 (Efaproxiral) e S1

Analitos M1 e S1	Concentração de Trabalho (ng/mL)	LOD (ng/mL)
Efaproxiral	10	1,09
20-hidroxiecdisona	10	7,77
Cetoconazol	20	1,65
Finasterida (carboxi)	5	2,57
Fluconazol	20	0,64
Flutamida (2-OH)	1	0,08
Flutamida	1	0,04
Miconazol	20	0,73
Andarina-O-defenil	1	0,08
Andarina	1	0,08
Epitrembolona	2,5	0,29
Estanozolol (16-OH)	1	0,57
Gestrinona (6 α -OH)	2,5	0,29
Gestrinona	2,5	0,29
GSK2881078	1	0,57
LGD-4033	1	0,78
Metildienolona	2,5	0,29
Metiltrienolona	2,5	0,21
Ostarina	1	0,08
Prostanazol (16-OH)	2,5	0,69
Prostanazol (3-OH)	2,5	0,69
Prostanazol (4-OH)	2,5	2,65
RAD-140	1	0,36
SARM S-23	1	0,01
SARM S1	1	0,12
SARM S9	1	0,04
Tetrahydrogestrinona	2,5	0,69
Tetrahydrogestrinona	2,5	4,57

Tabela 4.8: LOD para analitos S3

Analitos S3	Concentração (ng/mL)	LOD (ng/mL)
Formoterol	20	2,75
Higenamina (coclaurina)	10	0,8
Higenamina	10	3,36
Indacaterol	20	8,87
Olodaterol	20	2,35
Procaterol	20	1,65
Reproterol	20	0,22
Ritodrina	20	0,12
Salmeterol	10	0,83
Tetroquinol	20	2,18
Tulobuterol	20	0,12
Vilanterol	10	0,83

Tabela 4.9: LOD para analitos S4

Analitos S4	Concentração de Trabalho (ng/mL)	LOD (ng/mL)
Aminoglutetimida (N-acetil)	20	6,21
Aminoglutetimida	20	9,69
Anastrozol	20	0,12
Androsta-1,4,6-triene-17b-ol-3-ona	20	1,65
Androstatrienediona	20	1,65
Bazedoxifeno	20	2,35
Carboxi tamoxifeno	20	2,37
Clomifeno (desetil)	20	1,65
Clomifeno	20	1,65
Exemestano (17beta-oh)	20	2,18
Exemestano	20	1,65
Fulvestrant (17-ceto)	20	2,18
Fulvestrant	20	2,3
GW0742 (sulfona)	2	2,28
GW0742 (sulfoxido)	2	3,08
Lomerizina	10	0,83
Mildronato	100	10,88
Mildronato {ou Meldonium} [MS2]* 147>59	100	10,88
Raloxifeno	20	3,28
SR9009 m2	10	0,32
SR9009 m6	10	1,18
SR9009	10	0,83
SR9011	10	1,09
Tamoxifeno (3-OH-4-metoxi)	20	0,58
Tamoxifeno (4-OH)	20	1,65
Tamoxifeno	20	0,73
Testolactona	20	5,51
Tetrahidrotestolactona [ms2] 305>177	20	22,21
Tetrahidrotestolactona	20	5,51
Toremifeno (4-OH)	20	2,35
Toremifeno (OH-metoxi-N-desmetil)	20	1,65
Toremifeno	20	2,18
Trimetazidina FRAG AIF	10	1,15

Tabela 4.10: LOD para Analitos S5

Analitos S5	Concentração de Trabalho (ng/mL)	LOD (ng/mL)
6-beta-OH-Eplerenona	100	8,26
ACB	100	13,67
Acetazolamida	100	11,49
Altiazida	100	2,88
Amilorida	100	0,62
ATFB	50	1,16
Azosemida	100	3,63
Bemetizida	100	3,2
Bendroflumetiazida-nh4	100	8,26
Bendroflumetiazida-nh4	100	33,57
Benzilhidroclorotiazida	100	1,64
Benzotiazida	100	0,61
Brinzolamida	50	0,31
Bumetanida	100	8,26
Butiazida (+)	100	11,49
Butiazida (-)	100	0,62
Ciclopentiazida	100	0,62
Ciclotiazida	100	3,63
Clopamida	100	0,62
Clorazanil	50	0,31
Clorotiazida	100	3,63
Clortalidona	100	0,62
Conivaptan	100	0,62
Diclorfenamida	100	0,62
Dorzolamida	50	0,31
Epitizida	100	0,62
Eplerenona	100	2,88
Espironolactona (6b-OH-7a-tiometil)	50	6,84
Espironolactona (artefato)	100	0,62
Felipressina	2,5	0,03
Furosemida	100	8,26
Hidroclorotiazida	100	27,57
Hidroflumetiazida	50	0,31
Indapamida	100	0,62
Lixivaptan	50	0,31
Mebutizida (-)	100	1,64
Mefrusida	100	0,62
Mefrusida (lactona) {ou 5-oxomefruside}	100	8,26

Tabela 4.11: LOD para Analitos S5 (cont.)

Analitos S5	Concentração de Trabalho (ng/mL)	LOD (ng/mL)
Metazolamida	100	1,64
Meticlotiazida	100	0,43
Metolazona	100	0,62
Mozavaptan	100	0,43
Piretanida	100	1,41
Politiazida	50	0,31
Probenecida	100	0,62
Proguanil	100	0,62
Quinetazona	50	0,82
Relcovaptan	100	3,72
Tolvaptan (OH)	100	2,32
Tolvaptan	100	3,2
Torasemida	50	4,13
Triantereno (p-OH sulfato)	100	2,1
Triantereno	50	0,31
Triclorometiazida	100	2,32
Xipamida	100	0,62

Tabela 4.12: LOD para analitos S6

Analitos S6	Concentração de Trabalho (ng/mL)	LOD (ng/ml)
1,1-DMBA/ 1,3-DMBA* {dimetilbutilamina} AIF	100	71,23
1-Aminoheptano	10	11,03
2,5-dimetoxifenetilamina	25	2,07
3,3-difenilpropilamina	25	0,16
2-etilamino-1-fenilbutano	25	0,16
4-fluoroanfetamina	50	4,13
5-(2-aminopropil)-2,3- diidrobenzofurano	50	4,13
Adrafinil	70	8,04
Amifenazol	50	96,78
Anfepramona (N-dietilnorpseudoefedrina)	25	0,16
Anfepramona (N-etilnorpseudoefedrina)	25	2,07
Anfepramona	25	2,07
Anfetamina frag 136 > 119	100	85,58
Anfetamina	100	31,85
Benfluorex	25	2,07
Benzfetamina	25	0,16
Benzilpiperazina	12,5	1,03

Tabela 4.13: LOD para Analitos S5

Analitos S5	Concentração de Trabalho (ng/mL)	LOD (ng/mL)
Bromantano (6-OH)	25	2,07
Bromantano	25	2,96
Bupropion	10	0,83
Carfedon	50	4,13
Catina-Fragment	100	0,62
Catina- Fragment (marcador) AIF	100	44,33
Catinona - H2O	100	8,26
Catinona Análogo - Alfa PVP	50	0,31
Catinona Análogo - Metilenodioxo pirovalerona (MDVP)	25	0,15
Catinona Análogo - Metilona	50	0,31
Catinona Análogo - N-etil heptedrona	25	0,16
Catinona Análogo - PDVP	100	0,62
Catinona	100	8,26
Ciclazodona	25	0,11
Clobenzorex 4-OH	25	0,16
Clobenzorex	25	0,16
Cocaína	50	0,1
Coca (benzoilecgonina)	50	0,31
Coca (Metilecgonina)	50	27,38
Cotina	25	2,07
Cropropamida [-C2H5NH2]	100	0,62
Cropropamida-Na	100	31,05
Crotetamida [-C2H5NH2]	100	0,62
Crotetamida-Na	100	11,83
Dimetilanfetamina	50	0,31
Dipentilona	50	0,22
Dobutamina	50	26,14
Efedrina	100	0,62
Efedrina (marcador)	100	201
Estricnina	25	2,07
Etamivan	25	6,89
Etilanfetamina 4-OH	50	0,31
Etilanfetamina	50	4,13
Etilefrina	50	4,13
Famprofazona	25	0,15
Fembutrazato	25	0,58
Femproporex	25	0,16
Fencamina	25	0,16
Fencanfamina	25	0,16
Fendimetrazina	50	15,2

Tabela 4.14: LOD para Analitos S5 (cont.).

Analitos S5	Concentração de Trabalho (ng/mL)	LOD (ng/mL)
Fenetilina	25	0,11
Fenfluramina (nor)	25	0,58
Fenfluramina	25	0,08
Fenilpropanolamina-fragm	25	0,72
Fenmetrazina	50	0,31
Fentermina	50	17,22
Foledrina	50	4,13
Furfenorex	25	0,16
Heptaminol	100	8,26
Heptan-1-amino	10	11,03
Hexan-1-amino	100	150
Hexan-2-amino	100	69,39
Isometepteno M1	50	0,31
Isometepteno	20	0,09
Lisdexanfetamina	50	4,13
MDA (-NH3)	50	4,13
MDA	50	13,79
MDEA	25	2,07
MDMA Metab (HMMA)	50	13,79
MDMA	50	13,79
Mebeverina acido	25	0,11
Mebeverina acido (o-desmetil)	25	0,1
Meclofenoxato M (4-CPA)	50	17,22
Mefedrona (nor)	50	4,13
Mefedrona	25	2,07
Mefenorex	25	0,16
Mefentermina	50	1,82
Mesocarb (p-OH)	25	3,76
Metanfetamina	25	2,07
Metilefedrina	50	0,31
Metilefedrina (marcador)	50	224,66
Metilfenidato RT1	50	0,31
Metilfenidato RT2	50	0,31
Metilhexanoamina	100	8,26
Metoxifenamina	25	0,16
Modafinil	50	0,31
Modafinil-Fragment	50	0,31
Modafinilico Ac-Fragment	100	8,26
Morazona	10	0,29
N,N-Didesmetisibutramina	50	4,13

Tabela 4.15: LOD para Analitos S5 (cont.).

Analitos S5	Concentração de Trabalho (ng/mL)	LOD (ng/mL)
<i>N</i> -Desmetilsibutramina	25	0,16
<i>N</i> -etil-4-metoxi-anfetamina (PMEA)	25	0,16
<i>N</i> -metil- <i>N</i> -(1-fenetil)-amina	100	48,45
Nicotina	25	0,58
Niquetamida	25	0,16
Niquetamida M (<i>N</i> -Etilnicotinamida)	50	0,31
Octan-2-amino	50	24,23
Octilamina	50	24,23
OH- <i>N</i> -bisdesmetilsibutramina	50	0,82
Ortetamina	50	5,88
Oxetazina	10	0,16
Oxilofrina (-H ₂ O)	50	1,16
<i>p</i> -Metil-Anfetamina	50	4,13
<i>p</i> -Metoxi-Anfetamina	100	10,88
Pemolina	100	1,64
Pentetrazol	50	0,31
Pipradrol	10	0,04
Prenilamina	25	2,07
Prolintano	50	0,15
Propilexedrina	50	0,2
Selegilina	50	0,2
<i>N</i> -Desmetilselegilina	50	0,1
Sibutramina	25	0,16
Tuaminoheptano	100	1,64
Ácido Ritalínico	100	0,62

Tabela 4.16: LOD para analitos S7

Analitos S7	Concentração de trabalho (ng/mL)	LOD (ng/mL)
Cis-Mefentanila	25	2,07
Dextromoramida	25	0,11
Fentanil	1	0,12
Fentanil (nor)	1	0,26
Heroína	25	2,07
Heroína (6-MAM)	25	0,15
Hidrocodona	25	0,11
Meperidina	25	0,16
Meperidina (nor)	25	0,1
Metadona	25	0,91
Metadona M (EDDP)	25	0,16
N-metilnaltrexona	25	0,15
Oxicodona	25	0,15
Oximorfona	12,5	1,03
Pentazocina	25	3,76
Sufentanil	2,5	0,88
Tramadol	25	0,15
Tramadol desmetil	25	0,15

Tabela 4.17: LOD para analitos S8

Analitos S8	Concentração de trabalho (ng/mL)	LOD (ng/mL)
JWH-018	1	0,34
JWH-018 (5-hidroxi-pentil)	1	1,67
JWH-018 (ácido pentanoico)	1	0,97
JWH-073	1	0,43
JWH-073 (3-hidroxibutil)	1	0,52
JWH-073 (4-hidroxi-indol)	1	0,14
JWH-073 (ácido N-butanóico)-fragment AIF>155	1	1,01
JWH-073 (ácido N-butanóico)	1	0,77

Tabela 4.18: LOD para analitos S9

Analitos S9	Concentração de trabalho (ng/mL)	LOD (ng/mL)
Fluticasona (17b-carboxi)	30	0,18
20B-OH-Prednisona	30	2,48
6B-OH-Mometasona Furoato	30	10,33
6B-OH-Triancinolona acetonida	30	3,53
Beclometasona	30	4,12
Beclometasona 17-propionato	30	12,93
Betametasona	60	2,18
Budesonida	30	4,12
Budesonida (6b-OH)	45	5,17
Budesonida (6b-OH) [COOH]	45	3,72
Ciclesonida	30	3,45
Ciclesonida (des-isobutiril)	30	0,09
Deflazacort	30	0,7
6-B-OH-21-Desacetildeflazacort	30	2,48
Desacetildeflazacort	30	0,19
Desonida	30	0,49
Fludrocortisona	30	0,86
Flumetasona	30	2,48
Flunisolida	30	2,48
Fluocortolona	30	2,48
Fluocortolona (COOH)	30	1,09
Fluocortolona pivalato	30	3,26
Fluorometalona acetato	30	2,48
17β-Ác carboxílico de furoato de fluticasona	30	3,26
Fluticasona 17β-Ac Carboxílico	30	0,49
Fluticasona propionato	30	1,09
6α-Metilprednisolona	30	3,53
Mometasona	30	42,96
Mometasona Furoato	30	3,45
Prednisolona	100	8,26
Hidroxiprednisolona-16 alfa	30	3,53
6β-OH-Prednisolona	30	8,27
Prednisona	150	0,93
Triancinolona Acetonida	15	1,63
Triancinolona	30	3,45
Triancinolona acetonida (6β-OH)	30	3,53

4.g. Conclusão

Foi validado o método de extração de amostras de DBS e análise por LC-HRMS para diversos analitos presentes na lista proibida da WADA. A validação foi realizada com os DBS coletado em dois diferentes materiais absorventes: papel Whatman 903TM, feito de celulose, e o VAMS- Mitra®, constituído de um polímero hidrofílico poroso. Para o primeiro, a validação foi realizada com analitos das classes S6 e S9, enquanto para o segundo, foi realizada com analitos das classes M1, S1, S3, S4, S5, S6, S7, S8 e S9. Considera-se que a coleta de sangue com o VAMS-Mitra® é mais prática e permite a uniformização da amostragem, por se tratar de um material volumétrico. Por isso, o investimento na validação utilizando este dispositivo foi maior. Ainda assim, o LBCD está habilitado para realizar os procedimentos de análise a partir de ambos os materiais.

Os parâmetros de validação avaliados (seletividade, arraste, estabilidade da amostra extraída, rendimento da extração, efeito matriz, precisão intra e interensaio e Limite de Detecção) foram considerados satisfatórios, de modo que o protocolo desenvolvido neste trabalho pode ser utilizado na análise qualitativa de substâncias proibidas pela WADA.

Como perspectiva, o método de DBS validado será utilizado para a análise de voluntários que ingerirão algumas substâncias avaliadas nesse estudo, para comparação com a triagem do LBCD das mesmas substâncias em urina humana.

4.h. Referências Bibliográficas

- AQUINO NETO, F. R., **Cromatografia – Princípios básicos e técnicas afins**, Rio de Janeiro, Editora Interciência, 2003.
- CAO, Zheng; KALETA, Erin; WANG, Ping. Simultaneous quantitation of 78 drugs and metabolites in urine with a dilute-and-shoot LC–MS-MS assay. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 39, n. 5, p. 335-346, 2015.
- CHANG, W.C., COWAN, D.A., WALKER, N. WOJEK, A.D., BRAILSFORD. Determination of anabolic steroids in dried blood using microsampling and gas chromatography-tandem mass spectrometry:

- Application to a testosterone gel administration study, **J. Chromatogr. A.** 1628 (2020) 461445. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461445>.
- DE OLIVEIRA, Carolina Dizioli Rodrigues; DE BAIRROS, Andre Valle; YONAMINE, Mauricio. Blood doping: risks to athletes' health and strategies for detection. **Substance Use & Misuse**, v. 49, n. 9, p. 1168-1181, 2014.
 - DE SOUZA CARVALHO, Deusvenir *et al.* Efficacy and tolerability of combined dipyrone, isometheptene and caffeine in the treatment of mild-to-moderate primary headache episodes. **Expert Review of Neurotherapeutics**, v. 12, n. 2, p. 159-167, 2012.
 - FENN, John B. *et al.* Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. **Science**, v. 246, n. 4926, p. 64-71, 1989.
 - HO, Ch S. *et al.* Electrospray ionization mass spectrometry: principles and clinical applications. **The Clinical Biochemist Reviews**, v. 24, n. 1, p. 3, 2003.
 - KIMKO, Hui C.; CROSS, James T.; ABERNETHY, Darrell R. Pharmacokinetics and clinical effectiveness of methylphenidate. **Clinical pharmacokinetics**, v. 37, n. 6, p. 457-470, 1999.
 - KOJIMA, Asami *et al.* Comparison of urine analysis and dried blood spot analysis for the detection of ephedrine and methylephedrine in doping control. **Drug Testing and Analysis**, v. 8, n. 2, p. 189-198, 2016.
 - Londhe, V., Rajadhyaksha, M. Opportunities and obstacles for microsampling techniques in bioanalysis: Special focus on DBS and VAMS, **J. Pharm. Biomed. Anal.**, 182 (2020) 113102. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113102>.
 - LI, Mingfang; CHEUNG, Bernard MY. Pharmacotherapy for obesity. **British journal of clinical pharmacology**, v. 68, n. 6, p. 804-810, 2009.
 - LIPPI, Giuseppe *et al.* New strategies for doping control. **Journal of sports sciences**, v. 26, n. 5, p. 441-445, 2008.

- MATABOSCH, Xavier *et al.* Detection and characterization of prednisolone metabolites in human urine by LC-MS/MS. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 50, n. 3, p. 633-642, 2015.
 - O'MARA, M. *et al.* The effect of hematocrit and punch location on assay bias during quantitative bioanalysis of dried blood spot samples. **Bioanalysis**, v. 3, n. 20, p. 2335-2347, 2011.
 - PASTURA, Giuseppe; MATTOS, Paulo. Efeitos colaterais do metilfenidato. **Archives of Clinical Psychiatry (São Paulo)**, v. 31, p. 100-104, 2004.
 - RIBANI, M. *et al.* VALIDAÇÃO EM MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS E ELETROFORÉTICOS. **Quim. Nova**, São Paulo, v. 7, n. 5, p. 771-780, jun./2004.
 - SARDELA, Vinícius F. *et al.* Identification of sympathomimetic alkylamine agents in urine using liquid chromatography–mass spectrometry and comparison of derivatization methods for confirmation analyses by gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1298, p. 76-85, 2013.
 - SILVERSTEIN, Robert M.; WEBSTER, Francis X.; KIEMLE, David J.. **Spectrometric Identification of Organic Compounds**. 7. ed. Estados Unidos da América: JOHN WILEY & SONS, INC., 2005. p. 1-3.
 - STRANO-ROSSI, Sabina; COLAMONICI, Cristiana; BOTRÈ, Francesco. Parallel analysis of stimulants in saliva and urine by gas chromatography/mass spectrometry: perspectives for “in competition” anti-doping analysis. **Analytica chimica acta**, v. 606, n. 2, p. 217-222, 2008
 - THOMAS, Andreas *et al.* Dried blood spots (DBS) for doping control analysis. **Drug Testing and Analysis**, v. 3, n. 11-12, p. 806-813, 2011.
- CONCLUSÃO
- TRETZEL, Laura *et al.* Use of dried blood spots in doping control analysis of anabolic steroid esters. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 96, p. 21-30, 2014.

- TRETZEL, A. THOMAS, H. GEYER, V. POP, W. SCHANZER, M. THEVIS, Dried blood spots (DBS) in doping controls: a complementary matrix for improved in- and out-of-competition sports drug testing strategies, **Anal. Methods.** 7 (2015) 7596–7605. <https://doi.org/10.1039/c5ay01514f>.
- TROUT, Graham J.; KAZLAUSKAS, Rymantas. Sports drug testing—an analyst's perspective. **Chemical society reviews**, v. 33, n. 1, p. 1-13, 2004.
- VANDEWALLE, Jolien *et al.* Therapeutic mechanisms of glucocorticoids. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 29, n. 1, p. 42-54, 2018.
- VAN DER VELDEN, V. H. J. Glucocorticoids: mechanisms of action and anti-inflammatory potential in asthma. **Mediators of inflammation**, v. 7, n. 4, p. 229-237, 1998.
- LUIZ, Vitor Hugo Marques *et al.* Paper platform for determination of bumetanide in human urine samples to detect doping in sports using digital image analysis. **Microchemical Journal**, v. 147, p. 43-48, 2019.
- MICHELY, Julian A.; MEYER, Markus R.; MAURER, Hans H. Dried urine spots-A novel sampling technique for comprehensive LC-MSn drug screening. **Analytica chimica acta**, v. 982, p. 112-121, 2017.
- WADA, 2020. Anti-Doping Testing Figures, WADA Tech. Doc. 9 (2020) 1–279.
- WADA, 2023. WADA, TD2023DBS: Dried Blood Spots (DBS) for doping control - Dried Blood Spots (DBS) For Doping Control, Requirements and Procedures for Analytical Testing and Storage, WADA Tech. Doc. (2023) 1–5.
- WADA, The Prohibited List. <https://www.wada-ama.org/en/prohibited-list#search-anchor>. 2023.

SUBPROJETO 5. Amostragem tipo Dried Blood Spot - III. Comparação das janelas de detecção entre amostragem do tipo DBS e DPS

Coordenação executiva: Dr. Gustavo Cavalcante.

5.a. Introdução

A detecção da administração de testosterona exógena é alcançada considerando a avaliação longitudinal dos seus marcadores (passaporte biológico) com a posterior confirmação da assinatura isotópica por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas por razão isotópica (*GC-C-IRMS*) [1,2]. No entanto, preparações farmacêuticas contendo testosterona (fonte exógena) com composição isotópica semelhante de origens endógenas (*CIR*: -17‰ e -25‰) inviabiliza a confirmação inequívoca obtida até então pela a razão isotópica [3]. Dessa forma, para tentar reverter esse inconveniente a detecção direta de testosterona inalterada através seus ésteres no sangue torna-se uma abordagem alternativa para detectar inequivocamente o uso indevido de testosterona exógena.

Os ésteres de testosterona são rapidamente hidrolisados no sangue após a administração, resultando em baixos níveis dos ésteres no sangue [4,5]. O *dried blood spot* (*DBS*) é uma técnica de microamostragem de sangue (20-80 µL) que tem demonstrado ser muito atraente uma vez que os requisitos para coleta e transporte de amostras demandam menos variáveis logísticas (por exemplo, transporte em cadeia de frio) em relação à urina e amostras de sangue obtidas por venipuntura. Além disso, esta técnica oferece um procedimento menos invasivo do que a punção venosa convencional permitindo assim escalar o procedimento de coleta de amostra. O *DBS* tornou-se uma abordagem alternativa para detectar agentes de dopagem devido à vantagens mencionadas acima [6], e por razões técnicas específicas onde essa matriz pode oferecer informações complementares para auxiliar tomadas de decisão em casos complexos de resultado analítico adverso [7]. Além disso, os ésteres de testosterona não são excretados pelos rins, logo não é possível detectá-los na urina [8]. Considerando a baixa concentração de ésteres de testosterona no sangue associados à pequena quantidade de amostra coletada por dispositivos de microamostragem o método analítico deve ter alta sensibilidade para alcançar o limite de detecção necessário.

Alguns autores já desenvolveram métodos analíticos baseado na cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em série (*LC-MS/MS*) com sensibilidade adequada para detectar os ésteres de testosterona intactos em sangue ou plasma. Porém, a abordagem de microamostragem de sangue não foi avaliada [3,5]. Por outro lado, Tretzel *et al* e Solheim *et al* já exploraram a estratégia por *DBS* empregando cartões de celulose (Whatman) para detectar concentrações traços dos ésteres de testosterona por *LC-HRMS* e *nanoLC-HRMS*, respectivamente [9,2]. Entretanto, a desejável sensibilidade só foi alcançada em razão da adição da etapa de derivatização (derivados de metiloxima e hidrazona) no procedimento de preparo das amostras. Essas reações de derivatização podem gerar um cromatograma complexo, pois diastereoisômeros (E/Z) podem ser formados a partir dessa transformação, podendo assim prejudicar a detecção apropriada dos ésteres de testosterona.

5.b. Justificativa e objetivos

A extração de ésteres de testosterona a partir dos microamostradores de celulose é uma variável determinante uma vez que ela influencia diretamente no limite de detecção (*LODs*) do método. O baixo rendimento de extração (menos de 20%) dos ésteres de testosterona dos cartões de celulose já foi descrito por alguns autores [2,9]. Além disso, a técnica analítica de escolha até o momento para detectar esses alvos é a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (*LC-MS/MS*). No entanto, o potencial de ionização dos ésteres de testosterona em fontes de ionização a pressão atmosférica (*API*) pode comprometer a sensibilidade de detecção desses alvos. Por essa razão se faz necessário a etapa de derivatização com oxima ou hidrazona (Girard reagent's) antes da injeção no sistema de *LC-MS/MS*, e assim atingir a sensibilidade (limites de detecção) requerida para técnicas de microamostragens. Geralmente, as reações de derivatização empregadas geram diastereoisômeros (E/Z), os quais podem comprometer a qualidade ("peak shape" – assimetria de pico) e/ou a separação cromatográfica.

A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas em série por ionização por elétrons (*GC-EI-MS/MS*) fornece alta sensibilidade e uma seletividade adequada para os derivados OTMS de ésteres de testosterona. Essas vantagens em

relação a esses parâmetros devem-se aos intensos íons moleculares na faixa de alta m/z apresentado por esses derivados. Por essa razão, o *GC-EI-MS/MS* torna-se uma abordagem lógica a ser testada para análise de ésteres de testosterona em microamostradores de sangue com o substrato polimérico hidrofílico (Mitra).

Dessa forma o objetivo desse projeto é comparar e avaliar os dispositivos de microamostragens constituídos de celulose (Whatman 903) e não celulose (Mitra) principalmente com relação à eficiência de extração dos ésteres de testosterona da matriz de celulose e não celulose, e consequentemente avaliar o desempenho referente aos limites de detecção (*LODs*) em ambos os microamostradores empregando técnicas cromatográficas acopladas à espectrometria de massas.

O experimento de eficiência de extração para o alvo acetato de testosterona feito na primeira etapa desse estudo demonstrou que a eficiência de extração desse alvo a partir da matriz polimérica hidrofílica (Mitra) apresentou uma eficiência de extração bem superior quando comparado com o mesmo alvo na matriz de celulose (Whatman). Dessa forma, se optou por adotar apenas o dispositivo de microamostragem (Mitra) para as etapas seguintes do estudo.

5.c Planejamento experimental – Otimização

Os controles positivos e negativos (CQs) foram obtidos através da coleta do sangue venoso e posterior armazenamento em tubos contendo EDTA. Os controles positivos foram fortificados com soluções contendo os materiais de referência propionato, fenilpropionato, cipionato, decanoato e undecanoato de testosterona em concentrações apropriadas considerando o volume final de 300 μL de sangue total. 30 μL de sangue do tubo de EDTA (Vacutainer®) foram transferidos para o substrato poliméricos de acordo com o fabricante.

As amostras fortificadas empregando o Mitra foram extraídas pela extração líquido-líquido com solvente orgânico assistida por ultrassom e posterior agitação. A fração orgânica foi transferida para um outro tubo de ensaio para posterior evaporação. O resíduo foi derivatizado com 30 μL mistura (MSTFA:NH₄I:2-mercaptoetanol) na

proporção 500:3:6 (v:m:v). 5 µL foram injetados no sistema GC-EI-MS/MS no modo de injeção *splitless*.

Os etapas de extração consideradas críticas foram otimizadas: tempo (t) no ultrassom, tempo (t) na agitação e composição da mistura de solventes para extração líquido-líquido (**Tabela 5.1**).

Tabela 5.1: Variáveis (fatores) e níveis testados na triagem do planejamento experimental.

Tempo ultrassom	Tempo agitação	Proporção mistura de solvente
15 min (-)	5 min (-)	90% AcEt + 10% Hexano (-)
60 min (+)	30 min (+)	10% AcEt + 90% Hexano (+)

5.d. Resultados preliminares e discussão – planejamento experimental

Foram avaliadas dois níveis por variável (fator) resultando em uma matriz de experimento 2^3 totalizando uma triagem com 8 experimentos c/ apenas uma repetição cada (Tabela 5.2) para estimar os efeitos. Esse planejamento permitiu estimar 3 efeitos principais, 3 efeitos de segunda ordem e 1 efeito de terceira ordem.

Tabela 5.2: Matriz de experimento 2^3 considerando os 3 fatores: t de ultrassom, t de agitação e solvente de extração.

Experimento	X1	X2	X3	Y
1	-1	-1	-1	Y1
2	1	-1	-1	Y2
3	-1	1	-1	Y3
4	1	1	-1	Y4
5	-1	-1	1	Y5
6	1	-1	1	Y6
7	-1	1	1	Y7
8	1	1	1	Y8

O melhor rendimento de extração para a maioria dos ésteres de testosterona foi a condição em que se empregou o maior tempo de sonicação e agitação em conjunto com a maior proporção de hexano na mistura de extração. Logo, os 3 fatores foram

consideradas relevantes, exceto para o propionato de testosterona onde o fator tempo de sonicação foi considerado irrelevante para a eficiência de extração desse alvo a partir do substrato polimérico (Figura 5.1). É importante mencionar que os rendimentos de extração desses alvos a partir do substrato hidrofílico polimérico foram superiores aos rendimentos desses mesmos alvos do substrato de celulose.

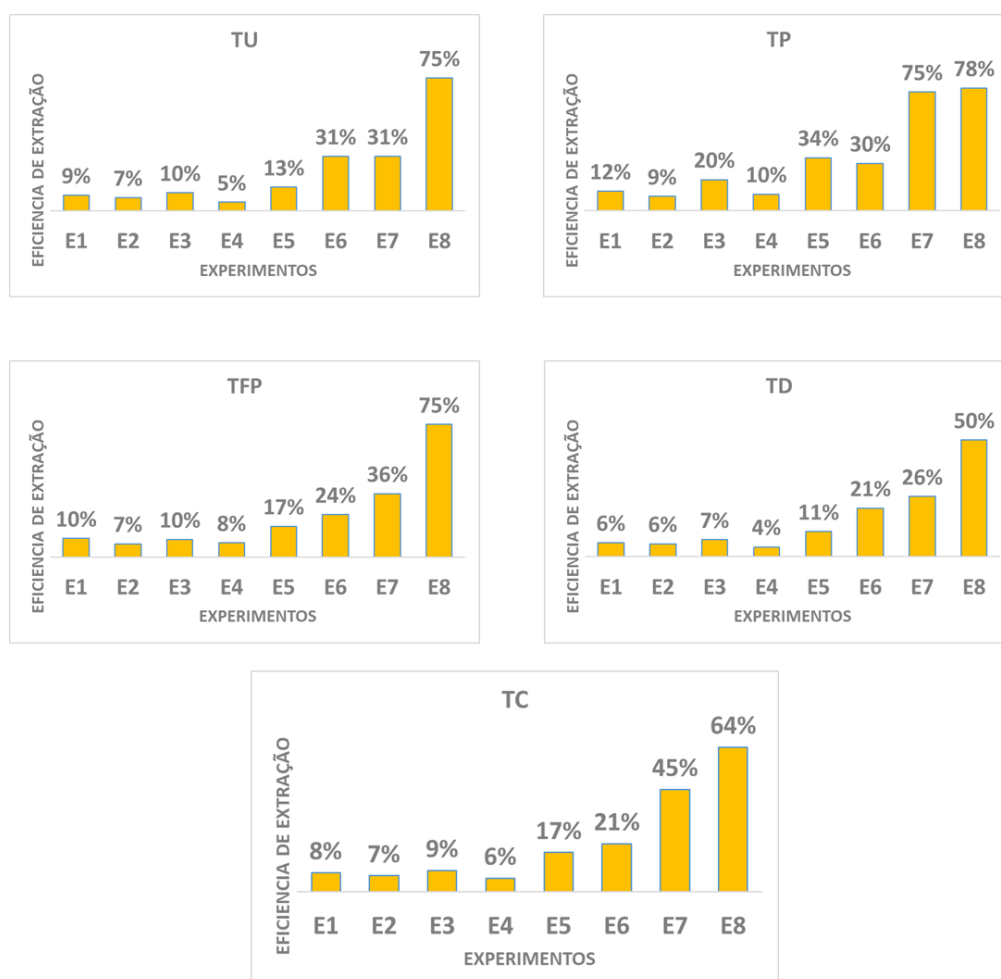


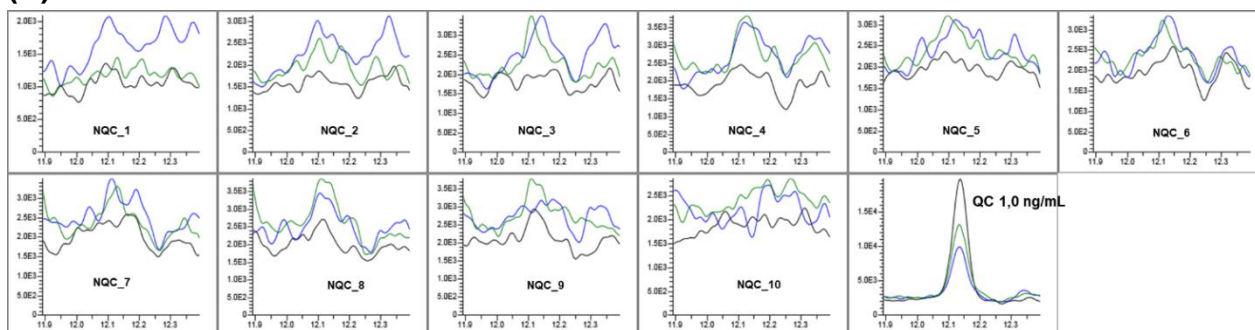
Figura 5.1: Representação gráfica da eficiência de extração dos ésteres de testosterona avaliadas pelo planejamento experimental. TU=undecanoato de testosterona, TP=propionato de testosterona, TFP= fenilpropionato de testosterona, TD=decanoato de testosterona e TC=cipionato de testosterona.

5.e. Validação parcial

5.e.1 Seletividade

Os parametros de validação avaliado até o momento foram seletividade e limite de detecção (*LOD*). A avaliação da seletividade considerou 10 amostras de sangue de voluntarios diferentes. Os dez brancos foram injetados junto com um controle positivo (CQ) fortificado em 1 ng/mL com os ésteres de testosterona. Os cromatogramas de íons extraídos (*EICs*) referentes à avaliação da seletividade para o undecanoato de testosterona e propionato de testosterona estão apresentados na Figura 5.2 abaixo.

(A)



(B)

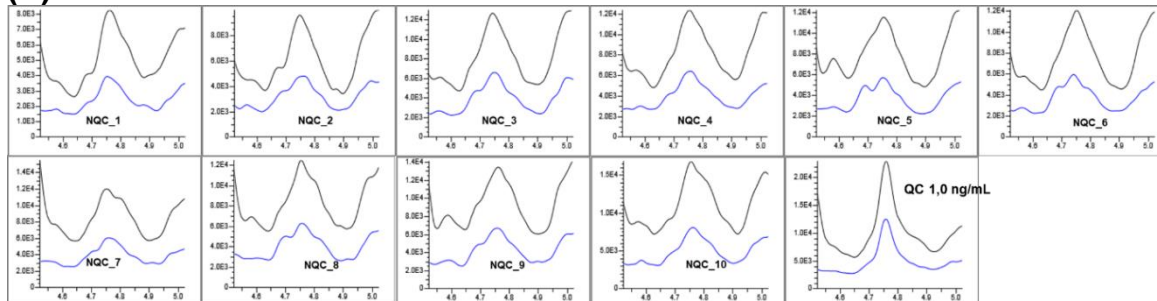


Figura 5.2: *EICs* dos ésteres de testosterona (A) undecanoato de testosterona e (B) propionato de testosterona derivados mono OTMS. Cada alvo tem pelo menos 2 transições (*m/z*). A transição de maior intensidade (“Quant peak”) para todos os ésteres foi o respectivo íon molecular gerando o ion fragmento *m/z* 209. Nos exemplos acima *m/z* 528->209 (TU) e *m/z* 416->209 (TP).

As amostras de branco analisadas ($n=10$) não foram capazes de gerar um resultado presumível (*PAAF*) para os alvos analisados nesse estudo, logo o método foi considerado seletivo. No entanto, a região de eluição do propionato de testosterona (TP) apresentou um elevado ruído de linha de base (*background*) o que pode dificultar a detecção desse alvo em concentrações inferiores à 1,0 ng/mL. Portanto, um teste empregando uma etapa extra de *clean up* no preparo de amostras, como por exemplo, a extração em fase sólida, será avaliada no futuro para avaliar a possível redução do ruído na região do propionato de testosterona.

5.e.2. Limites de detecção (*LODs*)

Os *LODs* foram avaliados através da fortificação de duas amostras de sangue distintas em duplicata contemplando a faixa de concentração entre 0,1 ng/mL – 2,0 ng/mL. Esse parametro foi estimado pela regressão logística onde o limite de detecção considerado a concentração em que se obteve uma taxa de detecção equivalente à 95% de probabilidade. Na figura abaixo se encontra um exemplo do cálculo do LOD pela regressão logística para o undecanoato de testosterona (TU) (Figura 5.3). Enquanto a Figura 5.4 está representando os cromatogramas de íons extraídos (*EICs*) adquiridos no experimento para determinação do LOD para cada alvo. Na Tabela 5.3 estão descritos os valores de LOD estimados pela regressão logística.

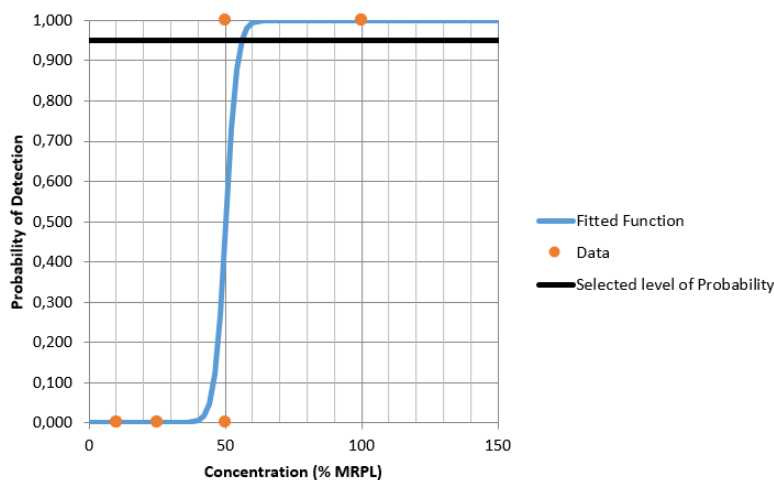


Figura 5.3: Estimativa do LOD do éster undecanoato de testosterona ($LOD = 0,60 \text{ ng/mL}$) pela regressão logística considerando uma taxa de detecção (presença ou ausência) de 95% de probabilidade.

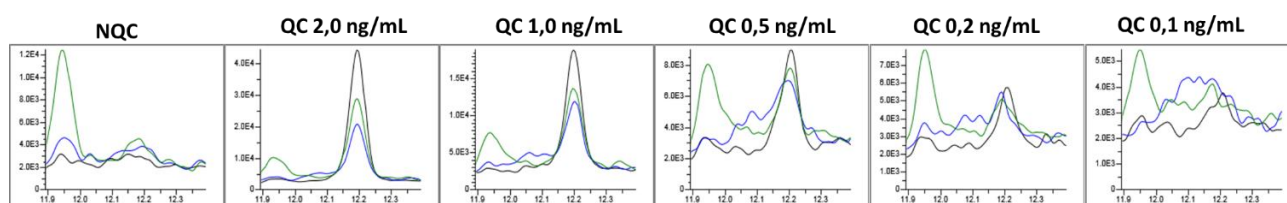


Figura 5.4: EICs do éster undecanoato de testosterona controle negativo (NQC) e os controles positivos fortificados em 5 níveis de concentração (QCs).

Tabela 5.3: Alvos e valores de $LODs$ dos derivados mono OTMS dos ésteres de testosterona.

Alvo (ésteres de testosterona)	LOD (ng/mL)
Propionato de testosterona (TP)	0,29
Cipionato de testosterona (TC)	1,13
Decanoato de testosterona (TD)	0,29
Undecanoato de testosterona (TU)	0,56
Fenilpropionato de testosterona (TPP)	1,64

A farmacocinética dos ésteres de testosterona já foi descrita em alguns estudos [10,11]. Baseando-se nesses dados os *LODs* estimados estão próximos aos valores de concentração esperada (0,25 ng/mL – 1,0 ng/mL) para esses alvos em plasma. No entanto, os métodos analíticos que empregam a abordagem de derivatização com reagentes oxima e hidrazonas para posterior análise por *LC-MS/MS* ou *HRMS* [2,9] obtiveram *LODs* inferiores aos obtidos nesse projeto.

5.f. Prova conceito

Amostras reais foram coletadas após a administração de 2 mL de Sustanon®. Um indivíduo do sexo masculino que faz uso dessa mistura de ésteres de testosterona sob supervisão médica foi voluntário desse estudo. O Sustanon® é composto por uma mistura de 4 ésteres: propionato (30 mg), fenilpropionato (60 mg), decanoato (100 mg) e isocaproato (60 mg). As amostras foram coletadas um dia antes da administração (branco). Após a administração intramuscular do Sustanon® uma amostra pela manhã foi coletada através de um microfuro no dedo anelar com posterior coleta de 30 µL de sangue com o dispositivo Mitra. As amostras pós administração foram coletadas durante 15 dias consecutivos.

Todos os três ésteres (propionato, fenilpropionato e decanoato) foram detectados pelo menos por 2 dias em uma concentração entre 1 a 2 ng/mL após a administração de 2 mL do Sustanon. Após o segundo dia em diante o propionato e o fenilpropionato já não foram mais observados. Uma vez que ésteres de cadeia mais longa são lentamente liberados na circulação sanguínea a detecção desses alvos podem ocorrer por um período de tempo prolongado (maior tempo de meia-vida) em relação aos ésteres de cadeia mais curta. Esse comportamento foi observado para o decanoato, onde foi possível detectá-lo em até 5 dias após a administração em uma concentração estimada próxima à 0,75 ng/mL (Figura 5.5).

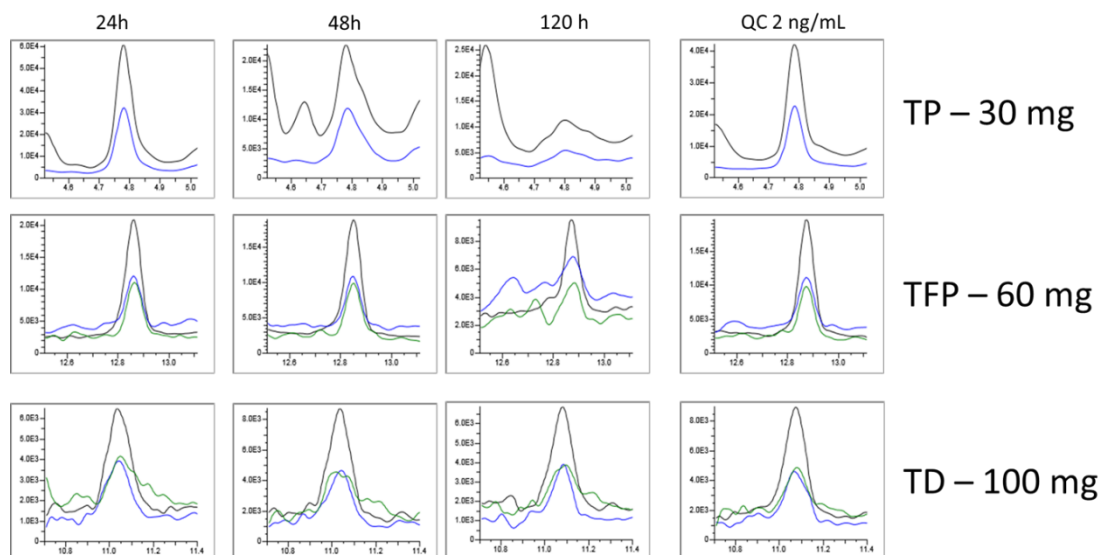


Figura 5.5: *EICs* das amostras reais coletadas após a administração intramuscular de 2 mL de Sustanon e controle positivo (QC) contendo os três ésteres de testosterona: propionato (TP), fenilpropionato (TFP) e decanoato (TD) fortificados em 2 ng/mL.

Esse resultado é considerado promissor já que ele pode ser utilizado em associação com o passaporte esteroidal do atleta para os casos de perfil esteroidal atípico cuja a sensibilidade pode variar entre 5 a 14 dias. Portanto, os resultados preliminares dessa abordagem demonstraram potencial para a detecção inequívoca do uso de testosterona exógena administrada por via intramuscular de 2 mL do Sustanon®. A janela de detecção observada para o decanoato de testosterona está condizente com os resultados prévios reportados [2,4] apesar do baixo volume de amostra. Esse comportamento observado provavelmente pode ser assumido em razão do aumento da estabilidade do éster na matriz de DBS em razão da ausência de umidade, o que reduz a atividade enzimática da esterase plasmática quando comparada a amostras líquidas como sangue/plasma.

5.g. Perspectivas

A rápida coleta e o baixo custo de transporte das amostras de *DBS* quando comparada com as coletas tradicionais de urina e sangue podem proporcionar uma maior frequência de amostragem no controle de dopagem para a análise de ésteres de testosterona. Essa estratégia em conjunto com as informações obtidas pelo passaporte esteroidal potencializam a probabilidade de detectar o abuso de testosterona no âmbito do esporte.

O emprego da abordagem por *LC-MS/MS* com derivatização com o reagente de Girard P será testada com o objetivo de avaliar aumento na sensibilidade de detecção dos ésteres de testosterona. Caso essa abordagem apresente menores concentrações de *LODs*, o laboratório optará por essa estratégia para dar sequência na validação.

5.h. Abordagem pela técnica LC-ESI-HRMS para os derivados hidrazonas com carga permanente

Como mencionado previamente uma abordagem alternativa empregando a técnica analítica com base na cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas de alta resolução (*LC-HRMS*) foi avaliada para detecção dos derivados hidrazonas dos ésteres de testosterona (*T*) Figura 5.6. De fato, no geral essa técnica demonstrou ser mais promissora do que a abordagem anterior por *GC-EI-MS/MS*, uma vez que a sensibilidade demonstrada pela técnica *LC-HRMS* foi superior à abordagem anterior, associada também a uma maior seletividade de análise. Outra vantagem observada foi que nessas condições os diastereoisômeros não foram formados. A seguir estão apresentados os dados de validação obtidos até o momento para análise dos ésteres de *T* por *LC-ESI-HRMS*.

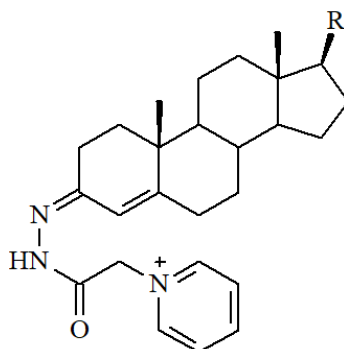


Figura 5.6: Estrutura geral dos ésteres de testosterona obtidos pela derivatização com Girard reagent P.

5.h.1. Seletividade

O sistema de alta resolução dos analisadores de massas Orbitrap oferece uma grande vantagem em relação aos sistemas de detecção de resolução unitária de m/z uma vez que ele é capaz de discriminar ions produtos isobáricos gerados por ions precursores co-isolados no quadrupolo quando se realiza um experimento de Parallel Reaction Monitoring (PRM). Como ilustração, observa-se nas Figuras 5.7 e 5.8 abaixo um ruído para maioria dos controles negativos de sangue na faixa de intensidade de ordem de grandeza $10E^2$ na região de eluição do propionato de testosterona (TP) e fenilpropionato de testosterona (TFP). Observando os cromatogramas de íons extraídos no sistema GC-EI-MS/MS para o propionato de T nota-se um ruído na linha de base muito elevado (Figura 5.2 – B). Esse ruído elevado pode prejudicar a detecção desse alvo em concentrações baixas.

Picos na ordem de grandeza $10E^2$ são irrelevantes nos sistemas de alta resolução. Dessa forma picos detectados com intensidade com uma ordem de grandeza acima foram considerados como a presença do alvo analítico.

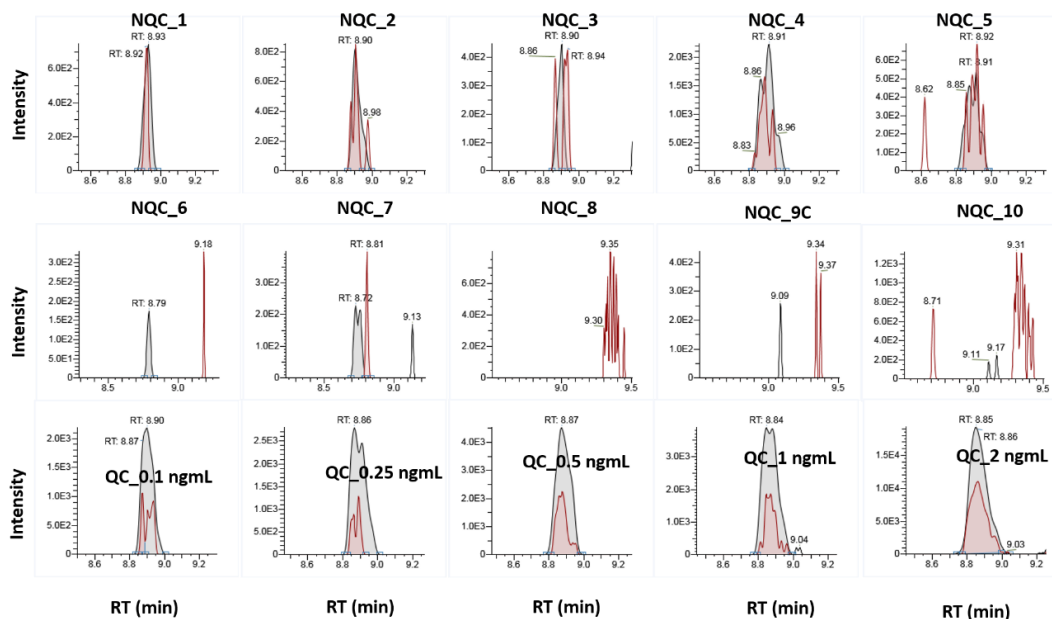


Figura 5.7: Cromatogramas de ions extraídos (m/z 478.3064 \rightarrow 399.26385 “quan”; m/z 478.3064 \rightarrow 371.26899). NQC (brancos de sangue de 10 voluntários); QC (controle positivo fortificado com solução padrão contendo o material de referencia do Propionato de testosterona -TP).

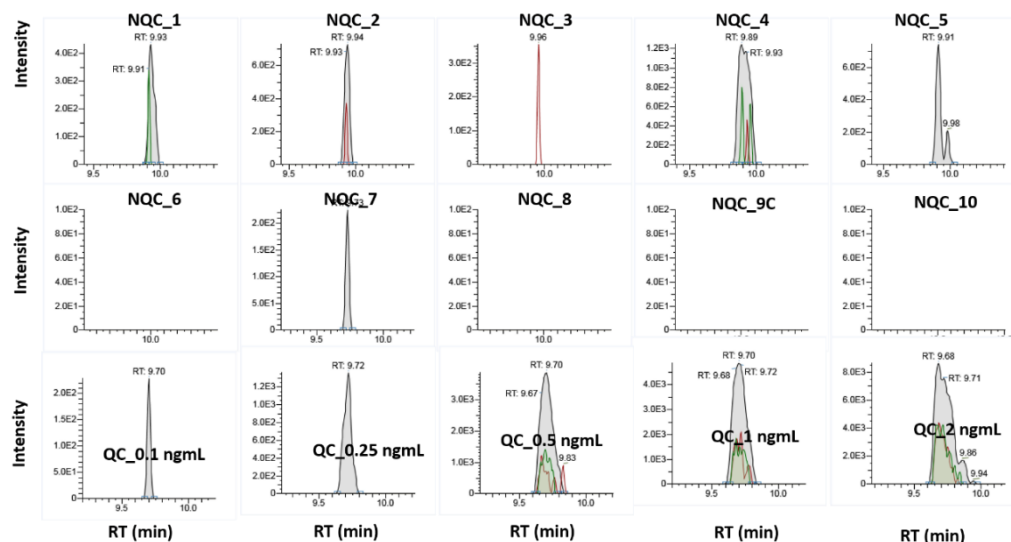


Figura 5.8: Cromatogramas de ions extraídos (m/z 554.3377 \rightarrow 475.2949 “quan”; m/z 554.3377 \rightarrow 163.0864; 554.3377 \rightarrow 151.08647). NQC (brancos de sangue de 10 voluntários); QC (controle positivo fortificado com solução padrão contendo o material de referencia do Fenilpropionato de testosterona -TFP).

5.h.2. Precisão: intra e inter-ensaio

A precisão do método foi determinada em três níveis de concentrações 2, 5 e 10 ng/mL sob condições de repetitividade (intra-ensaio): mesmo analista e mesmo dia. Já a precisão intermediária (inter-ensaio) foi adicionada mais replicatas fortificadas em um segundo dia de análise. Dessa forma a precisão foi avaliada pela desvio padrão relativo dos dois dias obtidos pelo cálculo da razão de área analito – padrão interno. O maior desvio obtido foi de 63% para o Enantato (Tabela 5.4). Alguns fatores podem explicar esses elevados desvios obtidos nesse ensaio: o baixo volume de amostra (30 μ L), a devida correção da resposta cromatográfica pelo padrão interno, já que ele não corrige um eventual problema na extração do analito na matriz polimérica do dispositivo, a simetria do pico já que a coluna cromatográfica não estava nas melhores condições de eficiência de separação. Esse experimento será refeito com uma coluna nova. É importante ressaltar que o uso pretendido do método é qualitativo, ou seja, é determinar a presença ou ausência dos ésteres de testosterona. Logo, a precisão não é considerada crítica para tal finalidade.

5.h.3. Efeito de matriz

O efeito de matriz foi avaliado comparando a análise em triplicata dos controles fortificados em 20 ng/mL. Avaliou-se a média das razões de área analito padrão interno do controle positivo fortificado em água no final da extração em relação ao controle fortificado em matriz após a extração. Nessa concentração notou-se uma pequena intensificação no processo de ionização por electrospray dos alvos analisados. Esse fenômeno de “enhance” variou de 2 -14% (Tabela 5.4).

5.h.4. Limite de detecção - LOD

O LOD foi avaliado através da função logística já descrita no item 2 desse relatório. De fato, no geral os valores de LOD foram inferiores aos observados por GC-EI-MS/MS. Os derivados dos ésteres permanentemente carregados formado após a derivatização

com o Girard P reagent proporcionam um ganho referente à sensibilidade significativo na análise por LC-ESI-HRMS/MS (Tabela 5.4).

5.h.5. Arraste

O arraste foi observado para os ésteres de menor cadeia (acetato e propionato) após a injeção do controle fortificado em 20 ng/mL. Dessa forma, amostras presumíveis na triagem que forem injetadas após supostas amostras com concentrações altas desses ésteres devem ser preparadas para avaliação de possível contaminação por arraste. Não foi observado arraste para os demais ésteres de testosterona.

5.h.6. Estabilidade

A estabilidade foi avaliada a temperatura ambiente através de controles positivos fortificados em 20 ng/mL em triplicata. Utilizou-se como referência amostras fortificadas na mesma concentração e deixou-se armazenadas por duas horas ao abrigo de luz e com sílica gel para evitar a umidade. Para avaliar a estabilidade a amostra de referência foi comparada com a mesma amostra de sangue armazenada sob as mesmas condições porém por um período de 15 dias. As amostras foram preparadas e injetadas no sistema LC-HRMS/MS. Após a injeção das amostras comparou-se as médias das razões de área analito padrão interno. Notou-se uma extensa degradação da amostra contendo os ésteres de testosterona armazenada por um período de 15 dias a temperatura ambiente (Figura 5.9). O enantato de testosterona foi extensamente degradado nessas condições, favorecendo a prevalência do interferente de matriz que dificultou a detecção do éster na amostra que ficou a temperatura ambiente por 15 dias. Não foi possível determinar a partir de qual período os ésteres começam a degradar nessas condições. No futuro um estudo mais completo e detalhado de estabilidade dos ésteres de testosterona na matriz polimérica deve ser feito para avaliar a cinética de degradação. No entanto, esse resultado corrobora os resultados de estabilidade já descritos para outras substâncias [12].

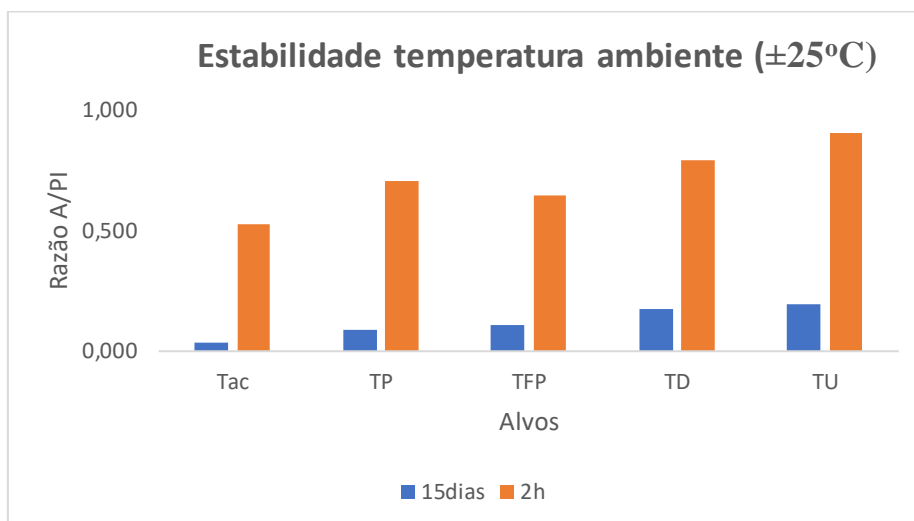


Figura 5.8: Estabilidade dos ésteres de testosterona a temperatura ambiente ($\pm 25^{\circ}\text{C}$) após 15 dias de armazenamento.

Tabela 4: Súmaro dos resultado obtidos da validação por LC-HRMS/MS.

Alvo	LOD (ng/mL)	Prec intra-ensaio			Prec inter-ensaio			Efeito de matriz
		QC_2 ng/mL	QC_5 ng/mL	QC_10 ng/mL	QC_2 ng/mL	QC_5 ng/mL	QC_10 ng/mL	
TAc	0,31	25%	5%	41%	19%	11%	36%	10%
TP	0,35	3%	8%	38%	19%	12%	32%	2%
TE	0,87	18%	6%	26%	44%	29%	63%	7%
TFP	0,47	20%	16%	36%	28%	55%	56%	14%
TD	0,53	26%	14%	15%	35%	35%	37%	6%
TU	0,59	13%	8%	21%	53%	27%	24%	13%

5.1 Conclusão e perspectivas

A técnica LC-HRMS/MS demonstrou ter mais potencial, e com isso mais promissora do que a técnica GC-EI-MS/MS para a análise dos ésteres de testosterona em matriz de DBS já que os limites de detecção (LODs) obtidos foram inferiores aos limites obtidos pela primeira técnica. A análise do cipionato de testosterona não foi reproduzível pelo GC, e a sua detecção pelo LC foi dificultada pela presença de um interferente de matriz. Mais investigações serão feitas para entender com mais detalhes esse problema observado durante a validação. A avaliação de uma amostra real (prova conceito) deve ser feita para demonstrar a aplicabilidade do método por LC-HRMS/MS. No entanto, o procedimento de validação demonstrou que o método desenvolvido está

adequado ao seu uso pretendido para a análise dos demais ésteres de testosterona tendo como base os parâmetros avaliados. Com base nos resultados de estabilidade obtidos até o momento recomenda-se transportar e armazenar as amostras de DBS coletadas por Mitra sob refrigeração. A estabilidade será avaliada em outros dispositivos de microamostragem.

5.J. Referências

- [1] Salamin O., Nicoli R., Xu C., Boccard J., Rudaz S., Pitteloud N., Saugy M., Kuuranne T. Steroid Profiling by UHPLC-MS/MS in dried blood spots collected from healthy women with and without testosterone gel administration. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 204, 2021; 1142-80;
- [2] Solheim SA, Levernaes MCS, Morkeberg J, Juul A, Upners EN, Nordsborg NB, Dehnes Y. Stability and detectability of testosterone esters in dried blood spots after intramuscular injections. *Drug Testing and Analysis* 2021;1-12;
- [3] de La Torre X., Iannone M., Botrè F. Improving the detection of anabolic steroid esters in human serum by LC-MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2021, 194;113807;
- [4] Forsdahl G., Erceg D., Geisendorfer T., Turkalj M., Plavec D., Thevis M., Tretzel L., Gmeiner G. Detection of testosterone esters in blood. *Drug Testing Analysis*. 2015, 7; 983-989;
- [5] Van Renterghem P., Viaene W., Gansbeke WV., Barrabin J., Iannone M., Polet M., T'Sjoen G., Deventer K, Van Eenoo P. Validation of an ultra-sensitive detection method for steroid esters in plasma for doping analysis using positive chemical ionization GC-MS/MS. *J Chromatogr B*. 2020, 15;1141:1220-26;
- [6] WADA Technical Document -TD2021DBS. Dried Blood Spot (DBS) for doping control. Requirements and procedures for collection, transport, analytical testing, and storage;
- [7] Thevis, M.; Kuuranne T., Dib, J., Thomas A., Geyer, H. Do dried blood spot have potential to support result management processes in routine sports drug testing? *Drug Test Anal*. 2020;12: 704-710.

- [8]** Langer, T., Salamin O., Nicoli, R., Grabherr S., Kuuranne T., Musenga A. A comprehensive UHPLC-MS/MS method for the analysis of endogenous and exogenous steroids in serum for antidoping purposes. *Drug Test Anal.* 2022; 14:1904 - 1919.
- [9]** Tretzel, L., Thomas A., Geyer H., Gmeiner G., Forsdahl G, Pop V., Schanzer W., Thevis M. Use of dried blood spots in doping control analysis of anabolic steroid esters. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 2014, 96; 21-30;
- [10]** Schackleton, C.H., Huang H., Kim J., de la Torre X., Segura J. ESI MS of testosterone esters: potential for use in doping control. *Steroids.* 1997, 62(7);523-529;
- [11]** Baba S., Fujioka M., Shinohara Y., Furuta T. Determination of testosterone propionate in human plasma by GC-MS. *J. Chromatogr.* 1985, 337;205-212;
- [12]** Mazzarino M., Di Constanzo L., Comunità F., Stacchini C., de la Torre, X., Botrè F. UHPLC-HRMS method for the simultaneous screening of 235 drugs in capillary blood for doping control purpose: comparative evaluation of volumetric and non-volumetric dried blood spotting devices. *ACS Omega.* 2022, 7, 36, 31845 – 31868.

SUBPROJETO 6. Investigação da possibilidade de dopagem acidental por higenamine como resultado da dieta

Coordenação executiva: Profa. Dra. Monica Padilha

6.a Introdução

Como já discutido e apresentado no Relatório Parcial 2, o controle de dopagem no esporte é um campo da toxicologia forense dedicado a investigar o uso de substâncias proibidas no contexto do esporte.

O resultado de cada análise pode ser discutido no âmbito judicial, e se alguma violação ao controle de dopagem é demonstrada, um atleta pode ser impedido preventivamente de participar de competições por anos, com óbvio impacto em sua vida pessoal. Sendo assim, existe uma preocupação constante sobre a ocorrência de violação, ou seja, casos de dopagem, de forma acidental. Alguns argumentos, usados frequentemente nos tribunais, como tentativa de justificar a presença de substâncias proibidas nas amostras dos atletas, são o uso de medicamento inadvertidamente, de suplementos ou alimentos contaminados com agentes dopantes.

Graviola (*Annona muricata* L.) é uma espécie da família Annonaceae que tem sido muito estudada nas últimas décadas, em função de seu potencial terapêutico. A *annona muricata* ou graviola tem como características seu sabor azedo e ao mesmo tempo doce.

As graviolas são comuns nos trópicos e subtropicais livres de geadas e são encontradas nas Índias Ocidentais, América do Norte e do Sul, planícies da África, ilhas do Pacífico e Sudeste Asiático. Diferentes partes de *A. muricata* são amplamente utilizadas na medicina tradicional de vários países para curar várias doenças. Sucos de frutas e infusões de folhas ou galhos têm sido usados para tratar febre, dor, doenças respiratórias e de pele, parasitas internos e externos, infecções bacterianas, hipertensão, inflamação, diabetes e câncer. Folhas e sementes são os principais órgãos vegetais estudados, provavelmente por serem os mais tradicionalmente utilizados. São necessários mais estudos com extratos e polpas de frutas utilizadas para consumo humano.

Leboeuf et. al. em 1981 isolou a coclaurina, metabólito da higenamina, de *A. muricata*. Coclaurina é um alcalóide natural presente em várias plantas como precursor

na biossíntese de alcalóides benzilisoquinolínicos. A higenamina, também conhecida como norcoclaurina (1-[(4-hidroxifenil)metil]-1,2,3,4 tetrahidroisoquinolina-6,7-diol), foi inicialmente isolada como componente cardiotônico ativo do *Aconitum japonicum* por Kosuge em 1976. Estudos recentes têm revelado várias propriedades farmacológicas e usos médicos, como doenças cardiovasculares, lesões na medula espinhal, artrite, doenças broncoconstritivas e outras. A higenamina foi listada pela Agência Mundial Antidoping (AMA) como agente dopante e, desde dezembro de 2016, um resultado analítico adverso para essa substância deve ser relatado apenas se a concentração estimada na amostra do atleta for superior a 10 ng/mL, ou seja, 50% do Nível de Desempenho Mínimo Requerido (MRPL) estabelecido, pela AMA, para classe dos β 2-agonistas. Essa estratégia foi adotada para evitar a sanção de um atleta devido ao uso de alimentos contendo higenamina.

À luz das regras atuais da AMA, os limites especificados para a higenamina aplicam-se apenas à determinação do composto original em sua forma livre. Portanto, nenhum metabólito de fase II excretado na urina deve ser considerado. Vários estudos foram realizados para avaliar a presença de higenamina em plantas, alimentos, produtos cosméticos, de modo a avaliar sobre a possibilidade de dopagem não intencional. Makoto et. al. investigaram os níveis de higenamina na urina humana após a administração de uma pastilha para a garganta contendo a fruta *Nandina domestica*. *Nandina domestica* é um dos ingredientes da pastilha para a garganta *Nanten-nodo-ame* encontrada no mercado japonês. É um produto farmacêutico de venda livre e fácil de comprar para atletas japoneses. Foi realizado um estudo populacional ($n = 246$) com indivíduos japoneses e um estudo de excreção ($n = 4$) de indivíduos que usaram a pastilha para a garganta. A partir do estudo de excreção, a concentração máxima de higenamina observada na urina estava muito abaixo do critério de positividade estabelecido pela AMA. Curiosamente, nenhuma higenamina pôde ser detectada nos indivíduos japoneses. Yan et.al. avaliaram o risco de resultados analíticos adversos de higenamina após a administração oral de cápsulas de plumula nelumbinis. Plumula nelumbinis é uma parte da semente de lótus, sendo comumente usada como ingrediente em cozinhas, medicamentos fitoterápicos e suplementos nutricionais na China e em outros países do Leste Asiático. Segundo os autores, a concentração de higenamina na urina pode exceder o limite estabelecido pela AMA. Por outro lado, Yen et al. investigou

o mesmo risco usando produtos de extrato de Lotus Plumule. Os autores relataram concentrações de higenamina acima do limite relatado. No entanto, a concentração estimada foi inferida considerando a soma da fração livre e glicoconjugada, o que foge das regras da AMA. Gruza et. al. lidera um estudo de excreção de higenamina após dose oral única de suplemento dietético contaminado.

Os resultados destacaram o potencial impacto dos metabólitos de fase II na interpretação dos resultados em casos de dopagem. Recentemente, a ingestão de suco de graviola foi usada para justificar em tribunal a presença de higenamina acima do limite atual de relato da WADA em uma amostra de urina de atleta. Apesar da abundante quantidade de estudos envolvendo a graviola, também, devido à alta disseminação do fruto pelo mundo, nenhum estudo envolvendo a ingestão de graviola e possíveis impactos no sistema antidoping foi encontrado na literatura. O objetivo do presente trabalho é relatar o achado de um estudo piloto onde foram estimadas as concentrações de higenamina após a ingestão da fruta in natura.

6.b. Justificativa

Em 2019, o LBCD declarou dois resultados analíticos adversos para Higenamina. Em um dos casos, a hipótese para justificar a presença de Higenamina na urina do atleta, foi o consumo de suco de graviola. Diversos laboratórios de controle de dopagem têm conduzido estudos para avaliar a presença de Higenamina em plantas, comida, cosméticos, com o intuito de avaliar se o uso dos mesmos pode acarretar na contaminação não intencional dos atletas. Resultados preliminares, obtidos pelo laboratório, indicam que é possível encontrar Higenamina na forma livre, em concentração inferior a 10 ng/mL, na urina de voluntários que consumiram cerca de 200 gramas de graviola. As análises dos dados obtidos pelo LBCD demonstram que a maior quantidade de Higenamina é eliminada na forma glicoconjugada.

6.c. Objetivos

O objetivo do projeto é investigar a concentração de Higenamina livre e conjugada na urina de voluntários, após o consumo de graviola.

Para isso, procedimentos iniciais de análise e procedimentos de confirmação serão empregados nos experimentos realizados pelo LBCD.

6.d. Experimental

6.d.1. Estudo de excreção

Nove voluntários saudáveis do sexo masculino, entre 25 e 45 anos, com altura compreendida entre 175 e 180 cm e peso entre 70 e 117 kg. Três voluntárias saudáveis do sexo feminino, com idade entre 30 e 35 anos, altura e peso variando entre 155 e 165 cm, 55 e 75 kg, respectivamente.

Nenhum voluntário estava fazendo uso de medicamentos e / ou suplementos nutricionais. Um branco de urina foi coletado, antes da administração de 200 gramas de polpa de graviola.

Todas as amostras de urina foram coletadas até cerca de 80 horas após a ingestão da polpa da fruta. Todas as urinas foram congeladas antes da análise.

6.d.2. Procedimento de preparo de amostra

6.d.2.a. GC-EI-MS/MS (Procedimentos Iniciais de Análise)

O processo de preparo da amostra envolve a hidrólise enzimática e extração líquido-líquido com solvente orgânico. Aliquotas de 2 mL de cada amostra de urina foram fortificadas com 40 µL de solução de padrão interno. O pH é ajustado com 750 µL de tampão fosfato 0,8M e 50 µL de β-glicuronidase de *E. coli*. As amostras foram incubadas por 1 hora, seguindo da adição de 500 µL de tampão K₂CO₃ / KHCO₃ 20% (p/p) e 4 mL de *metil-terc-butil-éter* (MTBE). As amostras foram submetidas a centrifugação a 3000

rpm por 5 min, em seguida, foi realizada a separação de fases e a evaporação da fase orgânica sob fluxo de nitrogênio. Finalmente o resíduo seco é derivatizado com 100 µL da mistura (MSTFA:NH₄I:2-mercaptoetanol) na proporção 500:3:6 (v:m:v) a 60°C por 20 minutos. Alíquotas de 2 µL foram injetadas em cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas com analisador do tipo triplo quadrupolo (CG-TQ).

6.d.2.b. GC-EI-MS/MS (Análise de Confirmação)

As amostras foram preparadas sem hidrólise e utilizou-se a extração por fase sólida para tratamento da amostra. Dois ml de amostra foram aplicadas a cartuchos Strata X-CW, Phenomenex. Os cartuchos foram lavados com água e eluídos com metanol:ácido fórmico 95:5 (v:v). O eluato foi submetido a fluxo de nitrogênio para secagem da amostra e derivatizados conforme descrito anteriormente.

6.d.2.c. LC-HRMS

O preparo de amostra é baseado na extração por fase sólida, com cartuchos Strata X-CW e hidrólise enzimática, a partir de 2,5 mL de urina. Após a extração 10 µL de amostra foi transferida para vials e injetadas em cromatógrafo a líquido acoplado a espectrometria de massas de alta resolução.

6.d.2.d. LC-HRMS (confirmação)

A mesma abordagem da etapa de triagem é usada com exceção da hidrólise enzimática.

6.d.2.e. Condições instrumentais

GC-EI-MS/MS

Coluna: Ultra 1-ms, 100% metilpolisiloxano, 17m X 0,25 mm X 0,11µm

Programa de temperatura do forno: 140°C → 40°C/min → 230°C → 3°C/min → 280°C → 300°C (3min).

Temperatura da linha de transferência: 300°C

Temperatura da fonte: 320°C

Modo de ionização: Ionização eletrônica, 70eV

LC-HRMS

Coluna: Synchronis C18, 2,1 mm X 50 mm X 1,7 µm)

Fase móvel: Água contendo 0,1% de ácido fórmico e 5 mM de formiato de amônia (eluente A) e metanol contendo 0,1% de ácido fórmico (eluente B).

Gradiente: 5% de eluente B até 0,3 minutos, 10% em 0,5 min, 25% em 1min, chegando a 90% em 6 min e 100% em 8 min. Essa condição é mantida até 9,0 minutos. Nos dois minutos finais a concentração retorna para a inicial. Fluxo de 400 µL/min e temperatura da coluna igual a 40°C.

Temperatura do capilar: 380°C

Voltagem do spray: 3,9 KV, modo positivo e 2,9 KV, modo negativo

Tabela 6.1. Íons diagnóstico (m/z) e tempo de retenção (min), triagem.

Triagem: GC-EL-MS/MS com hidrólise				
Alvos	Extração	t _R (min)	Aquisição	Transições
Higenamine	LLE	15,4	MRM	m/z 380 → m/z 308 m/z 380 → m/z 220.
Coclaurine / isococlaurine		14.9 / 15.1	MRM	m/z 322 → m/z 250 m/z 322 → m/z 220
Triagem – LC-HRMS com hidrólise				
Higenamine	SPE + DS	3.8	Full Scan (+) mode	m/z 272.12722
Coclaurine		4.0	Full Scan (+) mode	m/z 286.14377
Higenamine-SO ₄		4.2	Full Scan (-) mode	m/z 350.07038

Tabela 6.2. Íons diagnóstico (m/z) e tempo de retenção (min), confirmação.

Procedimento de confirmação de higenamina – Sem hidrólise				
Equipamento	Estratégia de extração	t_R (min)	Modo de aquisição	Ion diagnóstico
GC-MS-MS	SPE	15.3	MRM	m/z 380 → m/z 308 m/z 380 → m/z 220 m/z 380 → m/z 193
LC-HRMS	SPE + DS	6.5	Full/MS ²	m/z 107.001 m/z 161.001 m/z 143.001

Os dados foram adquiridos usando o TraceFinder™ 3.2.512.0, Thermo Fisher (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

6.f. Resultados e discussão

A estratégia analítica normalmente empregada pelos laboratórios credenciados pela AMA, divide-se em triagem e confirmação. Tal estratégia baseia-se em uma primeira análise usando procedimentos abrangentes cujo objetivo é a minimização de falsos negativos e, posteriormente, procedimentos de confirmação (CP), com o foco na minimização de falsos positivos. O presente relatório avaliou a presença de metabólitos de fase II nas urinas dos voluntários participantes do estudo de excreção.

A abordagem LC permite a detecção de sulfato de higenamina, com um pico de 3,5 ng/mL observado no sujeito 3. O voluntário 5 apresentou 4,0 ng/mL de sulfato de higenamina e o voluntário 10 apresentou 3,2 ng/mL. Devido à falta de material de referência para esses metabólitos de fase II, todas as concentrações foram estimadas usando o pico de higenamina como referência.

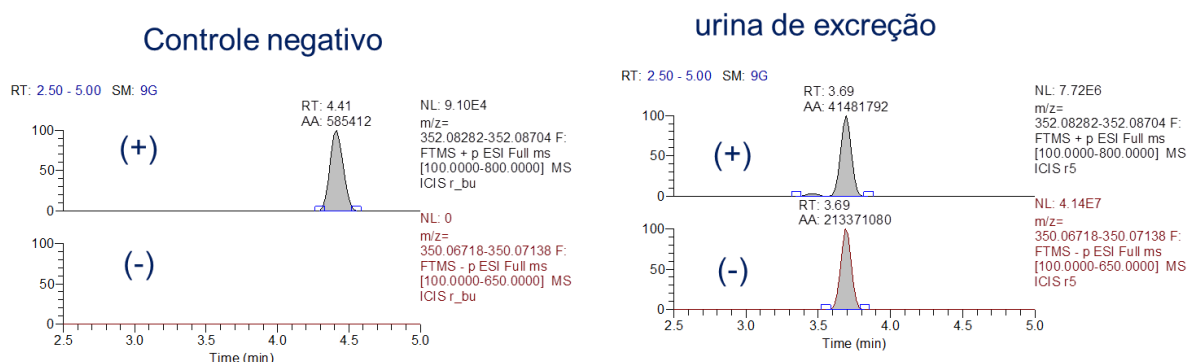


Figura 6.1: Cromatogramas extraídos para Higenamina sulfato no modo de ionização positivo m/z 353,08493 e negativo m/z 350,06928.

Com base nesses resultados, pode-se inferir que a higenamina também está sendo eliminada na forma de sulfoconjugado.

6.g. Conclusão

Com base nos resultados deste estudo piloto, a higenamina é observada na urina após a ingestão de polpa de graviola. No entanto, apenas pequenas quantidades de higenamina não conjugada estão presentes na urina após a ingestão de 200 gramas (média) da fruta. Nenhum voluntário atingiu o limite de notificação estabelecido pela AMA, quando apenas a fração livre de higenamina é medida. Por LC-MS é possível avaliar a presença de metabólitos de fase II no extrato final.

O presente trabalho atingiu o objetivo proposto inicialmente.

6.h. Referencias

- Coria-Téllez, A. V.; Montalvo-Gonzales, E.; Yahia, E. M.; Obledo-Vázquez, E. N. *Annona muricata*: A comprehensive review on its traditional medicinal uses, phytochemicals, pharmacological activities, mechanisms of action and toxicity. *Arabian Journal of Chemistry* (2018) 11, 662-691.
- Feng, Yan-Ru; Wang, Bo; Li, Guo-Jun; Kang, Wei-Jun; Lian, Kao-Qi; Lu, Xin-Li. Determination of higenamine in multi-matrix by gas chromatography-mass spectrometry combined with derivatization technology. *Journal of food and drug analysis* 28 (2020) 124-131.
- Cohen, P.A.; Thavis, J. C.; Keizers, P. H. J.; Boyer, F. E.; Venhius, B. J. The stimulant higenamine in weight loss and sports supplements. *Clin. Toxicol.* 2019, 57, 125-130.
- WADA Technical Document – TD 2019 MRPL. Minimum Required Performance Levels for Detection and Identification of Non-Threshold Substances.

SUBPROJETO 7. Estudo de metabolismo de agentes dopantes – Modelo in vivo Zebrafish

Coordenação executiva: Prof. Dr. Henrique Marcelo Gualberto Pereira

Dra. Isabelle Karine da Costa Nunes

Dra. Carina de Souza Anselmo

7.a Introdução

Como introduzido no Relatório Parcial 02, o metabolismo é o principal mecanismo de manutenção da homeostase após a exposição do organismo a uma substância exógena ((KLAASSEN, 2007; KIRCHMAIR *et al.*, 2015). A identificação e caracterização de metabólitos e suas respectivas vias metabólicas tornou-se uma parte indispensável do estudo de metabolismo e da toxicologia, uma vez que esses resultados estabelecem a base científica para a compreensão de mecanismos moleculares de efeitos benéficos ou tóxicos induzidos por agentes químicos (WEN; ZHU, 2015). O uso indevido de medicamentos – sejam novos candidatos ou aqueles já existentes no mercado – pode ser considerado uma das vertentes do controle de dopagem no esporte (THEVIS; SCHÄNZER, 2014).

O uso de substâncias e métodos que melhoram o desempenho atlético tem sido um dos maiores desafios no esporte profissional (MAZZEO; RAIOLA, 2018; THEVIS; KUURANNE; GEYER, 2019). Na análise de controle de dopagem, o estudo do metabolismo de uma substância é uma ferramenta empregada para aumentar a janela de detecção do fármaco, considerando o seu perfil de excreção. Os metabólitos identificados nessa investigação podem ser utilizados como marcadores do abuso da substância, somando evidências ao resultado, mesmo algum tempo depois da administração da mesma (ZVEREVA *et al.*, 2016).

(i) Anabolizantes: Historicamente, os agentes anabolizantes representam a classe de agentes dopantes com maior número de resultados analíticos adversos, sendo responsáveis por 44% dos casos em 2018 (WADA, 2019). Essa alta prevalência, bem como o surgimento de novas substâncias estruturalmente relacionadas, cria a

necessidade da realização de estudos de metabolismo para estas substâncias (HAND et al., 2020). Neste trabalho será avaliado o metabolismo da metiltestosterona. No que tange os dois primeiros, destacam-se as modificações estruturais nos anéis A e D, comum a todos os esteroides. Como regra, o metabolismo de fase I geralmente converte o esteroide através de catálise enzimática (oxidação, redução e hidroxilação, por exemplo) em substâncias mais polares, inativando-as. O aumento da polaridade, consequentemente, facilita a excreção via sistema urinário (SCHÄNZER et al., 1996).

A metiltestosterona (MT) (Figura 7.1) estimula o crescimento muscular, e o desenvolvimento de características sexuais. A MT tem sido utilizada, assim como outros derivados sintéticos da testosterona, como suplementos hormonais. Em homens, o uso tem por objetivo suprir a deficiência de testosterona. Já em mulheres, a MT é usada no tratamento do câncer de mama e nos sintomas da menopausa em associação com estrogênio (MUSHARRAF et al., 2017).

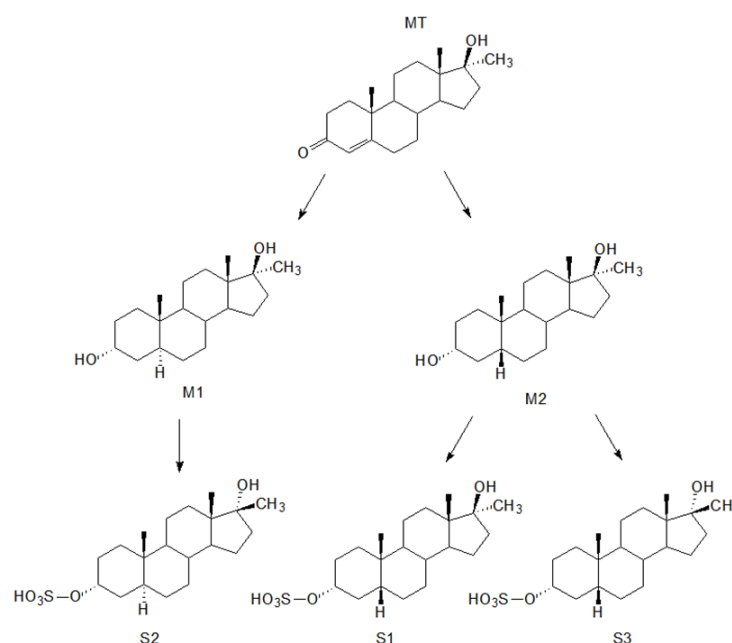


Figura 7.1. Metiltestosterona e seus principais metabólitos monitorados na urina humana (SCHÄNZER et al., 1996 e POZO et al., 2013).

(ii) Moduladores seletivos de receptores de estrogênios: Os moduladores seletivos de receptores de estrogênios (ou do inglês, *Selective Estrogen Receptor Modulators*, SERMs) são uma família de fármacos os quais interagem inibindo ou estimulando seletivamente a ação do estrogênio (SALVADOR et al., 2018). O tamoxifeno (TMX), o

qual possui uma estrutura de trifeniletileno, representa o primeiro fármaco a ser utilizado como um modulador seletivo do receptor de estrogênio e seu uso terapêutico inclui a prevenção e tratamento de câncer de mama, osteoporose pós-menopausa e doenças cardiovasculares em mulheres desde 1973 (LU *et al.*, 2014; SANCHEZ-SPITMAN *et al.*, 2019). No contexto do esporte, o TMX, assim como os outros SERMs, são utilizados, na maioria das vezes por homens, como medicamentos na melhora da performance devido a sua ação antiestrogênica (HACKNEY, 2018). Logo, o abuso do TMX foi proibido “dentro” e “fora” de competição desde 2005 pela WADA, a qual incluiu esta substância na seção S4 (hormônios e moduladores metabólicos) da lista de substâncias proibidas (KWOK *et al.*, 2017). Apesar da inclusão dos SERMs na Lista, o número de atletas com resultados analíticos adversos para esta classe de substâncias triplicou e, para o TMX, dobrou de 2012 à 2019 (WADA, 2012, 2019). O tamoxifeno (TMX) requer uma ativação metabólica complexa para desempenhar sua atividade farmacológica projetada. No início, as enzimas do citocromo P-450 são as principais responsáveis pelo metabolismo do TMX em seus metabólitos primários (Figura 7.2) (SANCHEZ-SPITMAN *et al.*, 2019).

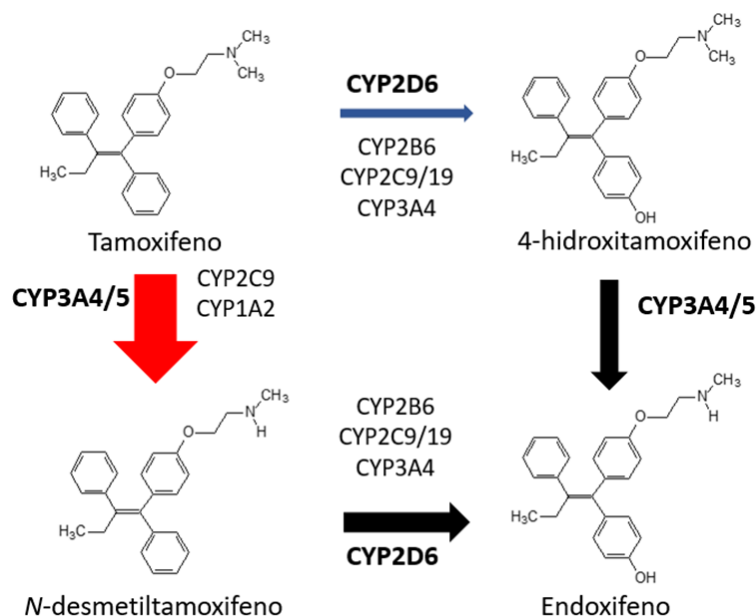


Figura 7.2. Principais vias metabólicas do tamoxifeno. Adaptado de: YONG *et al.*, 2020.

Apesar dos metabólitos apresentados na Figura 7.2 serem considerados os principais formados pelos humanos, o metabolismo do TMX apresenta-se com uma maior complexidade (SANCHEZ-SPITMAN *et al.*, 2019). Diferentes vias metabólicas de

fase I foram descritas para o TMX, incluindo biotransformações como *N*-desmetilação, *N,N*-didesmetilação, hidroxilação, carboxilação, metoxilação, *N*-oxidação, epoxidação e combinações entre elas. Além disso, uma parte dos produtos de fase I são metabolizados pelas enzimas sulfotransferases (SULTs) e uridina-5'-difosfoglucuronosil-transferases (UGTs), formando metabólitos de fase II, sulfo e glico conjugados, respectivamente (KWOK 2017, LU *et al.*, 2014, MAZZARINO *et al.*, 2013).

(iii) Narcóticos: Os narcóticos são substâncias proibidas pela WADA durante as competições. Apesar da etilmorfina ainda não ser uma substância listada, diferente da morfina (WADA, 2021), cerca de 15% desta é metabolizada em morfina (HELLAND *et al.*, 2010), através de uma *O*-deetilação promovida pela enzima CYP2D6 (AASMUNDSTAD *et al.*, 1995; XU *et al.*, 1997). O outro metabólito direto formado, agora por uma *N*-demetilação, é a noretilmorfina, a qual, segundo a literatura, é promovida pelas enzimas CYP3A4 (AASMUNDSTAD *et al.*, 1995; XU *et al.*, 1997). Este último metabólito é um importante marcador utilizado na diferenciação do consumo de morfina, a qual é proibida, e etilmorfina (WADA Technical Letter TL22). As estruturas moleculares da etilmorfina e da morfina são muito semelhantes, diferindo apenas por um grupo etil adicional na posição 3 (HELLAND *et al.*, 2010; COLOMB *et al.*, 2017), Figura 7.3. Apesar da grande semelhança estrutural, a afinidade da etilmorfina corresponde a apenas 1/300 da afinidade da morfina para com seu receptor, portanto acredita-se que grande parte do efeito farmacológico desta seja devido a sua conversão em morfina (HELLAND *et al.*, 2010). A etilmorfina é um potente analgésico narcótico e antitussígeno, usado no tratamento de dores intensas, como em cânceres e lesões ósseas (ELMESHAD *et al.*, 2020).

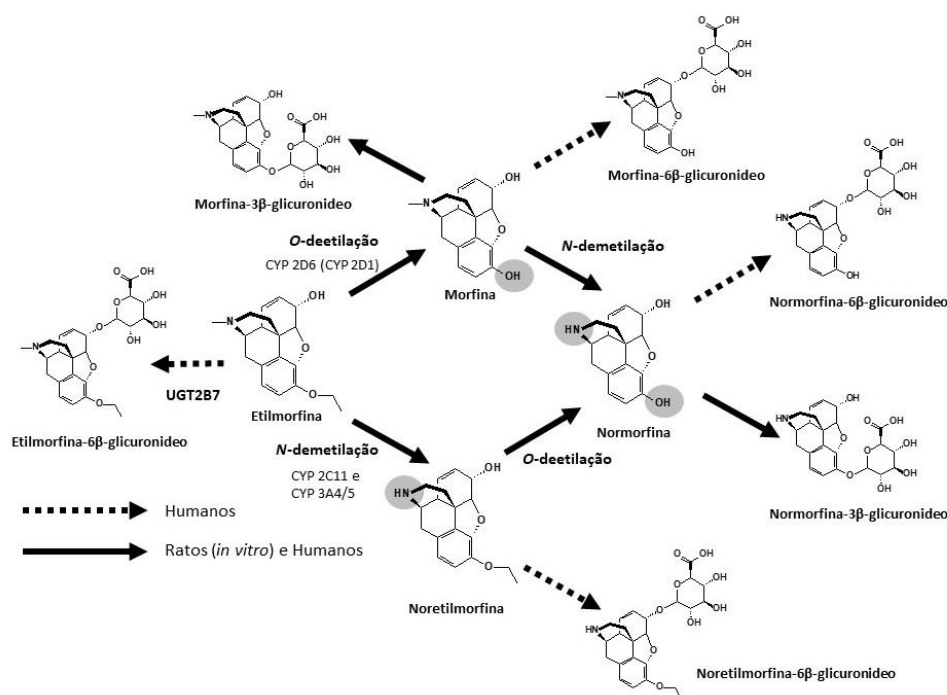


Figura 7.3. Principais vias metabólicas da etilmorfina. Adaptado de: AASMUNDSTAD et al., 1995; HELLAND et al., 2010; COLOMB et al., 2017.

(iv) *Zebrafish*: por ser um organismo vertebrado que apresenta muitos órgãos e tipos celulares similares aos mamíferos, esse pequeno teleosteo é amplamente utilizado em estudos farmacológicos e toxicológicos (RUBINSTEIN, 2003). Além disso, o *zebrafish* compartilha uma quantidade considerável de identidade genética com humanos, com quase 70% de genes humanos em pelo menos um ortólogo (HOWE et al., 2013). Essa espécie de peixe foi utilizada como modelo *in vivo* para estudo do perfil metabólico de sibutramina e demonstrou resultados semelhantes ao publicado para humanos. (ANSELMO et al., 2017). Comparado a outros modelos utilizados para investigação de novos fármacos *in vivo*, como ratos, camundongos, cachorros e porcos, o *zebrafish* vem sendo utilizado por ser um modelo com maior custo-benefício, mais barato e de fácil implementação (ZON et al., 2005).

7.b. Objetivo geral

Estudar o metabolismo de fase I e fase II de diferentes xenobióticos tipicamente empregados como agentes dopantes no contexto esportivo utilizando o modelo Zebrafish Water Tank (ZWT). As substâncias estudadas serão: Etilmorfina, Metiltestosterona, Tamoxifeno.

7.b.1. Objetivos específicos

- Realizar estudos do metabolismo de substâncias dopantes utilizando um modelo *in vivo* não-humano;
- Compreender vantagens e limitações do modelo ZWT frente a diferentes classes de substâncias dopantes;
- Otimizar a produção de metabólitos no modelo ZWT através de desenho experimental, respeitando o bem-estar dos animais;
- Identificar os metabólitos produzidos no modelo ZWT bem como sua correlação com o modelo humano, propondo marcadores do uso dessas substâncias, além de comparar com o próprio sangue dos peixes;
- Obter coleções de referência dos metabólitos encontrados a partir de suas concentrações na água do tanque, para futura utilização em análises do controle de dopagem.

7.c. Justificativa

A Agência Mundial Antidopagem (WADA, do inglês *World Anti-Doping Agency*) tem como um de seus compromissos principais o monitoramento do Código Mundial Antidopagem, o qual traduz-se em um documento central que padroniza as políticas antidopagem em todas as nações. Dentre as violações das regras antidopagem estabelecidas por este documento e que caracterizam a definição de dopagem, há a presença de uma substância proibida na amostra do atleta, assim como seus metabólitos e marcadores (WADA, 2022a). Com isso, a WADA apresenta anualmente uma lista com mais de duzentas substâncias e métodos proibidos dentro e/ou fora de competição.

Neste projeto serão consideradas substâncias citadas nesta lista, incluindo agentes anabolizantes, moduladores de metabolismo e narcóticos (WADA, 2022b).

O *zebrafish* (*Danio rerio*) possui diversos genes ortólogos aos humanos, e por isso, vem se destacando nos últimos anos como um modelo *in vivo* utilizado em vários trabalhos, incluindo estudos do metabolismo de xenobióticos. Na toxicologia o *zebrafish* é utilizado como uma estratégia para contornar a limitação ética da exposição de humanos a agentes potencialmente danosos à saúde (ZHANG et al., 2016; XU et al., 2020; GARCÍA et al., 2020). Por conseguinte, o modelo denominado Zebrafish Water Tank (ZWT) tem demonstrado êxito em reproduzir, qualitativamente, o metabolismo de xenobióticos de diferentes classes de substâncias, inclusive para fins de controle antidopagem, como no estudo de esteróides anabolizantes andrógenos, estimulantes, canabinóides e glicocorticóides (ANSELMO et al., 2017; MATOS et al., 2020; SARDELA et al., 2018; SARDELA et al., 2020; ARAUJO et al., 2021). Como uma vantagem adicional do modelo está o fato de que a água do tanque (ZWT) é uma matriz extremamente limpa quando comparada a aquelas de origem biológica, como a urina ou o sangue, facilitando a identificação de metabólitos (ANSELMO et al., 2017).

7.d. Relevância do estudo

A descoberta de novos metabólitos pode alterar o paradigma de detecção de substâncias proibidas no controle de dopagem no esporte, permitindo uma melhor compreensão dos processos metabólicos de agentes dopantes. Além disso, ao investigar e avaliar as condições experimentais do ZWT, novas ferramentas e características do modelo tornam-se acessíveis aos pesquisadores da área, contribuindo para a consolidação do próprio modelo como uma alternativa àqueles que envolvem mamíferos.

7.e. Procedimentos metodológicos:

7.e.1. Aclimação dos peixes

Os peixes foram adquiridos e ambientados por 5 dias antes do experimento em aquários alojamentos de 4 litros com bombas circulatórias, a uma temperatura de $28 \pm 1^\circ\text{C}$, em fotoperíodo de 12:12 h e alimentação 3 vezes ao dia (PRADO et al., 2020).

7.e.2. Setup experimental

Após esse período de ambientação e, para o estudo do metabolismo (i) e das condições ambientais do modelo (ii), foram realizados experimentos com dois grupos distintos:

(i) Experimento 1: 8 peixes mantidos em um tanque de 200 mL a $32 \pm 1^\circ\text{C}$. A alimentação neste grupo cessou 1 dia antes para o experimento. A duração do experimento variou de 8 a 12h, pois foi avaliada individualmente para cada substância levando em consideração possíveis mudanças comportamentais dos peixes que possam indicar algum tipo de dor ou estresse decorrente do ensaio. Ademais, não foi utilizado um sistema de bombeamento de água, devido a incompatibilidade do tanque com bombas convencionais de aquário e o curto período de experimentação. As substâncias utilizadas foram diluídas para uma concentração final de $1 \mu\text{g/mL}$ nos tanques. Para cada um dos experimentos foram feitos: um controle de estabilidade, que consiste em tanque com presença de substância diluída, mas sem peixe; um controle negativo, que consiste em tanque contendo peixe, mas sem a substância, e o tanque teste, que contém peixe e a substância, esta última foi realizada em triplicata. As alíquotas foram coletadas a cada hora do experimento até o fim deste. Ao final do experimento, a água restante foi coletada e armazenada para obter a coleção de referência. Os animais foram eutanasiados por hipoxia, ou seja, por imersão em água com gelo (0° a 4°C) por 10 min até a perda de movimentos operculares (Resolução Normativa nº 37/2018 – CONCEA). Após garantia da eutanásia dos animais, ao transferi-los para uma água à temperatura ambiente e nenhum movimento ser observado, a retirada do sangue foi executada, seguindo um método adaptado de Babaei *et al.* (2013). Ou seja, foi realizado um corte ao fim do canal anal do peixe, o qual foi transferido para um eppendorf vasado e

centrifugado (à 60 g por 5 min à 11°C). Em seguida, um outro corte, removendo o coágulo formado, e uma nova etapa de centrifugação foram realizados. O sangue coletado de todos os peixes de um tanque em específico foi reunido em um *pool*, adicionado em 9x o volume em metanol e o padrão interno e centrifugado (à 13700g, 15min, 4°C), para separação do plasma. O sobrenadante foi retirado, evaporado em fluxo de N₂ e reconstituído em fase móvel para análise por UHPLC-HRMS.

(ii) Experimento 2: 18 peixes mantidos em aquários de 4 L, com recirculação de água, a 28 ± 2 °C, com um ciclo de luz de 12 h de dia/ 12 h noite e alimentados 1 vez ao dia. O experimento foi realizado em triplicata e as condições ambientais monitoradas consistiram em: temperatura, salinidade, pH, amônia, nitrito e nitrato. O experimento foi desenvolvido sem a adição de substâncias e por um período de 21 dias, tempo máximo avaliado até o momento para o modelo ZWT. A eutanásia dos peixes adultos foi induzida por decapitação, após anestesia por meio da imersão dos peixes em solução de tricáína sulfonato de metano (168 mg.L⁻¹), tamponada em pH 7,0 (Resolução Normativa nº 37/2018 – CONCEA).

7.e.3. Preparo de amostras

7.e.3.a. Metiltestosterona

(i) CG-EM:

Em alíquotas de 3 mL foram adicionados 40 uL de padrão interno (Testosterona-D₃), 750 uL de tampão fosfato de sódio pH 7,0, 30 uL de enzima β -glicuronidase (*E. coli*) e colocados na estufa à 50°C por 1 hora. Após a hidrólise, foram adicionados 500 uL de tampão carbonato de potássio pH 9,0 e 5 mL de éter terc-metil-butílico. As amostras foram misturadas por 5 minutos e levadas a centrífuga a 3000 rpm por, também, 5 minutos. A parte volátil foi transferida para novos tubos e levados a um fluxo de nitrogênio à 40°C até a secura. Após esse procedimento, as amostras foram guardadas na câmara de vácuo por, no mínimo, 30 minutos. Posteriormente, foram derivatizadas com 50 uL de MSTFA:NH₄I:2-mercaptoetanol (500:3:6; v:m:v), à 60°C por 20 minutos. Depois da etapa

de derivatização, as amostras foram transferidas para vials contendo inserts e injetadas no equipamento CG-EM.

(ii) CLUE-EMAR:

Em alíquotas de 3 mL foram adicionados 40 μ L de padrão interno (Testosterona- D_3). Condicionou-se cartuchos C18 com 2 mL de metanol e água ultrapura, adicionou-se as amostras e lavou-se com 2 mL de água ultrapura e 2 mL de uma solução água:metanol (80:20; v:v). As amostras retidas nos cartuchos foram eluídas em novos tubos com 3 mL de uma solução de metanol:ácido fórmico (95:5; v:v), em seguida, foram levadas à secura em um fluxo de nitrogênio à 40°C. A reconstituição das amostras foi feita adicionando 100 μ L de uma solução de fase móvel A:fase móvel B (70:30; v:v), onde a fase móvel consistiu de água ultra pura, 0,1% de ácido fórmico e 0,1% de formiato de amônio, e a fase móvel B consistiu de metanol e 0,1% de ácido fórmico.

7.e.3.b. Tamoxifeno

Em alíquotas de 90 μ L da água do tanque (*Dilute and Shoot*) foram adicionados 10 μ L de uma solução do padrão interno (17 α -metiltestosterona à 1 μ g.mL⁻¹ em metanol com 0,1% de ácido fórmico). Por fim, foi feita a agitação com auxílio de vórtex e a injeção da amostra no equipamento. Em alíquotas de 3 mL da água do tanque, utilizou-se o preparo de amostra de Extração Líquido-Líquido (ELL), adaptado de Mazzarino *et al.* (2013) e foi dividido em três etapas. Na primeira etapa, foram adicionados 1,5 mL de tampão fosfato (pH 7,4) e 50 μ L de padrão interno (solução de 17 α -metiltestosterona com 6 μ g.mL⁻¹ em metanol) à uma alíquota de 3 mL da água do tanque em tubo de vidro de 15 mL. A primeira extração líquido-líquido (ELL) foi feita adicionando 5 mL de éter metil-terc-butílico ou MTBE (do inglês, *methyl tert-butyl ether*), seguido de 6 min no agitador (300 rpm) e 5 min na centrífuga (3000 rpm). A fase orgânica foi separada e transferida para um tubo de vidro de 10 mL, evaporada sob fluxo de N₂ à 40°C por 20 min. À fase aquosa, foram repetidos os passos partindo da ELL, reunindo as duas fases orgânicas retiradas desta etapa no mesmo tubo. Na segunda etapa, foram adicionados 50 μ L da enzima β -glicoronidase (*E. Coli*) e 50 μ L de padrão interno à fase aquosa da

etapa anterior. A amostra foi incubada por 1 h à 55°C e foram realizadas duas ELL assim como na etapa anterior, juntando as fases orgânicas em outro tubo. Finalmente, na terceira etapa, foram adicionados 1 mL de tampão acetato (0,8 M, pH 5,2), 50 µL da enzima β-glicoronidase/arilsulfatase (*H. Pomatia*) e 50 µL de padrão interno à fase aquosa da etapa anterior. A amostra foi incubada por 2 h à 55°C e, após a hidrólise, 2 mL de tampão fosfato foram adicionados e foram realizadas duas ELL assim como na etapa anterior, reunindo as duas fases orgânicas em outro tubo. No final, aos três tubos de 10 mL, após o segundo passo de evaporação, foi feita a reconstituição ao adicionar 100 µL de fase móvel (água ultrapurificada Milli-Q 0,1% em ácido fórmico e formiato: metanol 0,1% ácido fórmico – 70: 30) em cada um dos três tubos obtidos para cada amostra coletada. Após agitação com auxílio de vórtex, as amostras foram transferidas para três *vials*, separadamente, e injetadas no equipamento de CLUE-EMAR.

7.e.3.c. Etilmorfina

Em aliquotas de 90 µL da água do tanque (*Dilute and Shoot*) foram adicionados 10 µL de uma solução do padrão interno (Etilmorfina-D5, Morfina-D3 e Morfina-3β-Glicuronideo-D3 à 50 ng/mL em fase móvel A).

Em alíquotas de 3 mL foram adicionados 150 ng de padrão interno (Etilmorfina-D5, Morfina-D3 e Morfina-3β-Glicuronideo-D3) para uma concentração final de 50 ng/mL. O preparo de amostras foi feito por Extração em Fase Sólida (EFS) inicialmente condicionando-se cartuchos Strata-X-CW com 2 mL de metanol, seguido de 2 mL água ultrapura, lavou-se 1 mL de uma solução água:metanol (1:1; v:v). O conteúdo retido nos cartuchos foram eluídas em novos tubos com 3 mL de uma solução de metanol:ácido fórmico (95:5; v:v), em seguida, foram levadas à secar em um fluxo de nitrogênio à 40°C. A reconstituição das amostras foi feita adicionando 100 µL de uma solução de fase móvel A.

7.f. Análise Instrumental

7.f.a. Metiltestosterona

(i) CG-EM:

As amostras foram analisadas em um cromatógrafo de gás Agilent Technologies 6890 N acoplado a um espectrômetro de massas Agilent Technologies modelo 5973 (Agilent Technologies, Palo Alto, Califórnia, EUA). Uma coluna capilar HP-ULTRA 1 (100% dimetilpolisiloxano, 17 m x 0,22 mm, 0,11 μ m; J&W Scientific, Agilent Technologies Inc., Califórnia, EUA). O modo de injeção consistiu nos seguintes parâmetros: o gás de arraste será o hélio ultra puro com fluxo constante de 1,0 mL/min, o injetor será mantido à 280°C, o volume de injeção será de 3 μ L com split de 1:10, purga do septo 50 psi/0,80 min. O programa de temperatura foi definido como: temperatura do forno começa a 140°C e vai até 180°C (40°C/min), depois de 180°C para 230°C (3°C/min), e de 230°C até 300°C (40°C/min) e mantendo 3 minutos na temperatura final. O espectrômetro de massas foi operado no modo de ionização por impacto de elétrons (IE) a 70 eV, em um modo de varredura total (*full scan*) na faixa de m/z 50 a 700, e em um modo de Monitoramento de Reações Seleccionadas (SRM, do inglês *Selected Reaction Monitoring*) onde as seguintes transições foram monitoradas: 435,3→255,3 (M1); 270,3→199,0 (M2); 435,0→209,2 (PI); 318,0→127,0 (Mestanolona).

(ii) CLUE-EMAR:

Os ensaios foram realizados em um cromatógrafo líquido de ultra eficiência Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) acoplado a um espectrômetro de massas de alta resolução Q-Exactive™ híbrido quadupolo-orbitrap (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), equipado com uma fonte de ionização por electrospray (do inglês, *Electrospray Ionization*, ESI). As condições cromatográficas utilizadas foram: coluna de fase reversa Synchronis Thermo (EUA, C18, 1,7 μ m x 50 mm x 2,1 mm), mantida em um forno a 50°C; fase móvel composta por água com 0,1% de ácido fórmico e 5 mM de formiato de amônio (A) e metanol com 0,1% de ácido fórmico (B), eluídos no modo gradiente. A eluição foi conduzida a um fluxo de 170 μ L/min em 22 minutos de corrida cromatográfica. O

programa de eluição seguirá os seguintes parâmetros: 0 min, 30% B; 0,0-3,0 min, 30-75% B, 3,0-16,0 min, 75-90% B, 16,0-17,0 min, 90-100% B, 17,0-19,0 min, 100% B; 19,0-19,1 min, 100-30% B, 19,1-22,0 min, 30% B (equilíbrio da coluna para a condição inicial); o espectrômetro de massas operou em “*full scan*” de m/z 100 a 800 e resolução de 70.000 na largura a meia altura (do inglês, *full width at half maximum*, FWHM), em modo positivo e negativo. Os metabólitos da metiltestosterona serão fragmentados em uma célula de colisão e analisados em um segundo estágio no Monitoramento de Reações Paralelas (PRM, do inglês *Parallel Reaction Monitoring*) monitorando o m/z 385 no modo negativo, em uma energia de colisão normalizada (NCE) de 50.

7.f.2. Tamoxifeno

As amostras do experimento e o material de referência foram analisados no mesmo equipamento de CLUE-EMAR utilizado para a linha de pesquisa com Metiltestosterona. As condições cromatográficas utilizadas foram retiradas de um método utilizado na rotina do laboratório: coluna de fase reversa (SyncronisThermo, EUA, C18, 1,7 μ m, 50 mm X 2,1 mm), mantida em um forno a 40 °C; fase móvel composta por água com 0,1% de ácido fórmico e 5 mM de formiato de amônio (A) e metanol com 0,1% de ácido fórmico (B). Os solventes foram eluídos no modo gradiente o qual constitui-se em: 0 à 0,3 min, 5% B; 0,3 – 0,5 min, 5% - 10% B; 0,5 à 10 min, 10% - 25% B; 1,0 à 6,0 min, 25% - 90% B; 6,0 à 8,0 min, 90% - 100% B; 8,0 à 9,0 min, 100% B (lavagem da coluna); 9,0 à 9,1 min, 100% - 5% B; 9,1 à 11,0 min, 5% B (para equilibrar a coluna às condições iniciais). A eluição foi conduzida a um fluxo de 400 μ L min⁻¹ em 11 minutos de corrida cromatográfica. O espectrômetro de massas foi operado no modo positivo com uma solução de calibração padrão (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Alemanha). O equipamento foi operado em modo *full scan* de m/z 100 a m/z 800 e resolução de 70.000 na largura a meia altura (do inglês, *Full Width at Half Maximum*, FWHM). Além disso, o fármaco tamoxifeno, assim como seus metabólitos, foram fragmentados em uma célula de colisão e analisados em uma segunda etapa de espectrometria de massa em tandem (Full-Scan/MS²). Os íons precursores para estes experimentos de fragmentação foram selecionados por meio de uma lista de inclusão com suas massas exatas e uma janela de $\pm 1,5$ minutos do tempo de retenção esperado

de acordo com o obtido para o material de referência disponível de cada substância nas mesmas condições cromatográficas. Para essas análises, os parâmetros utilizados foram resolução de 17.500 FWHM, contagem de loops de 5, contagem de multiplexação (MSX) de 1, janela de isolamento de m/z 2,0 e as energias de colisão (NCE) foram adaptadas para cada substância e metabólito. Todos os dados foram avaliados usando o software TraceFinder 3.2.512.0 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA).

7.f.3. Etilmorfina

O CLUE-EMAR utilizado foi o mesmo mencionado para Metiltestosterona. As condições cromatográficas utilizadas foram: coluna de fase reversa Synchronis Thermo (EUA, C18, 1,7 μm x 50 mm x 2,1 mm), mantida em um forno a 40°C; fase móvel composta por água com 1% acetonitrila a 25 mM de ácido fórmico (A) e acetonitrila com 10% de água a 25 mM de ácido fórmico (B), eluídos no modo gradiente. A eluição foi conduzida a um fluxo de 300 $\mu\text{L}/\text{min}$ em 15 minutos de corrida cromatográfica. O programa de eluição segue os seguintes parâmetros: 0 min, 0% B; 0 a 5.0 min, 0%–23% B; 5.0 a 7.0 min, 23%–100% B; 7.0 a 8.0 min, 100% B (etapa de lavagem); 8.0 a 8.1 min, 100%-0% B; 8.1 a 15.1 min, 5% B (etapa de reequilíbrio da coluna); e a fonte de eletronspray operando em modo positivo. O equipamento operou no modo “Full-MS” de m/z 200 a 600 e resolução de 70.000 na largura a meia altura (do inglês, full width at half maximum, FWHM). Os analitos foram fragmentados em uma célula de colisão e analisados em um segundo estágio em 3 diferentes métodos de aquisição: (i) PRM, com resolução de 35,000 FWHM, Isolation window: m/z 4.0 e energia de colisão normalizada de 65 para metabólitos de fase 1 e 35 para metabólitos de fase 2; (ii) DDA; com resolução de 17,700 FWHM, Isolation window: m/z 4.0, Loop count: 5, Multiplexing count: 2 e energia de colisão normalizada de 65 ; (iii) SWATH-type DIA, com os mesmos parâmetros do DDA, diferindo apenas do Isolation window de m/z 100.0.

7.g. Resultados

7.g.1. Metiltestosterona

(i) CG-EM:

As amostras foram analisadas em um cromatógrafo de gás Agilent Technologies 6890 N acoplado a um espectrômetro de massas Agilent Technologies modelo 5973 (Agilent Technologies, Palo Alto, Califórnia, EUA). Uma coluna capilar HP-ULTRA 1 (100% dimetilpolisiloxano, 17 m x 0,22 mm, 0,11 μ m; J&W Scientific, Agilent Technologies Inc., Califórnia, EUA). O modo de injeção consistiu nos seguintes parâmetros: o gás de arraste será o hélio ultra puro com fluxo constante de 1,0 mL/min, o injetor será mantido à 280°C, o volume de injeção será de 3 μ L com split de 1:10, purga do septo 50 psi/0,80 min. O programa de temperatura foi definido como: temperatura do forno começa a 140°C e vai até 180°C (40°C/min), depois de 180°C para 230°C (3°C/min), e de 230°C até 300°C (40°C/min) e mantendo 3 minutos na temperatura final. O espectrômetro de massas foi operado no modo de ionização por impacto de elétrons (IE) a 70 eV, em um modo de varredura total (*full scan*) na faixa de m/z 50 a 700, e em um modo de Monitoramento de Reações Seleccionadas (SRM, do inglês *Selected Reaction Monitoring*) onde as seguintes transições foram monitoradas: 435,3→255,3 (M1); 270,3→199,0 (M2); 435,0→209,2 (PI); 318,0→127,0 (Mestanolona).

(ii) CLUE-EMAR:

Os ensaios foram realizados em um cromatógrafo líquido de ultra eficiência Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) acoplado a um espectrômetro de massas de alta resolução Q-Exactive™ híbrido quadupolo-orbitrap (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), equipado com uma fonte de ionização por electrospray (do inglês, *Electrospray Ionization*, ESI). As condições cromatográficas utilizadas foram: coluna de fase reversa Synchronis Thermo (EUA, C18, 1,7 μ m x 50 mm x 2,1 mm), mantida em um forno a 50°C; fase móvel composta por água com 0,1% de ácido fórmico e 5 mM de formiato de amônio (A) e metanol com 0,1% de ácido fórmico (B), eluídos no modo gradiente. A eluição foi conduzida a um fluxo de 170 μ L/min em 22 minutos de corrida cromatográfica. O

programa de eluição seguirá os seguintes parâmetros: 0 min, 30% B; 0,0-3,0 min, 30-75% B, 3,0-16,0 min, 75-90% B, 16,0-17,0 min, 90-100% B, 17,0-19,0 min, 100% B; 19,0-19,1 min, 100-30% B, 19,1-22,0 min, 30% B (equilíbrio da coluna para a condição inicial); o espectrômetro de massas operou em “*full scan*” de m/z 100 a 800 e resolução de 70.000 na largura a meia altura (do inglês, *full width at half maximum*, FWHM), em modo positivo e negativo. Os metabólitos da metiltestosterona serão fragmentados em uma célula de colisão e analisados em um segundo estágio no Monitoramento de Reações Paralelas (PRM, do inglês *Parallel Reaction Monitoring*) monitorando o m/z 385 no modo negativo, em uma energia de colisão normalizada (NCE) de 50.

7.f.2. Tamoxifeno

As amostras do experimento e o material de referência foram analisados no mesmo equipamento de CLUE-EMAR utilizado para a linha de pesquisa com Metiltestosterona. As condições cromatográficas utilizadas foram retiradas de um método utilizado na rotina do laboratório: coluna de fase reversa (SyncronisThermo, EUA, C18, 1,7 μ m, 50 mm X 2,1 mm), mantida em um forno a 40 °C; fase móvel composta por água com 0,1% de ácido fórmico e 5 mM de formiato de amônio (A) e metanol com 0,1% de ácido fórmico (B). Os solventes foram eluídos no modo gradiente o qual constitui-se em: 0 à 0,3 min, 5% B; 0,3 – 0,5 min, 5% - 10% B; 0,5 à 10 min, 10% - 25% B; 1,0 à 6,0 min, 25% - 90% B; 6,0 à 8,0 min, 90% - 100% B; 8,0 à 9,0 min, 100% B (lavagem da coluna); 9,0 à 9,1 min, 100% - 5% B; 9,1 à 11,0 min, 5% B (para equilibrar a coluna às condições iniciais). A eluição foi conduzida a um fluxo de 400 μ L min⁻¹ em 11 minutos de corrida cromatográfica. O espectrômetro de massas foi operado no modo positivo com uma solução de calibração padrão (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Alemanha). O equipamento foi operado em modo *full scan* de m/z 100 a m/z 800 e resolução de 70.000 na largura a meia altura (do inglês, *Full Width at Half Maximum*, FWHM). Além disso, o fármaco tamoxifeno, assim como seus metabólitos, foram fragmentados em uma célula de colisão e analisados em uma segunda etapa de espectrometria de massa em tandem (Full-Scan/MS²). Os íons precursores para estes experimentos de fragmentação foram selecionados por meio de uma lista de inclusão com suas massas exatas e uma janela de $\pm 1,5$ minutos do tempo de retenção esperado

de acordo com o obtido para o material de referência disponível de cada substância nas mesmas condições cromatográficas. Para essas análises, os parâmetros utilizados foram resolução de 17.500 FWHM, contagem de loops de 5, contagem de multiplexação (MSX) de 1, janela de isolamento de m/z 2,0 e as energias de colisão (NCE) foram adaptadas para cada substância e metabólito. Todos os dados foram avaliados usando o software TraceFinder 3.2.512.0 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA).

7.f.3. Etilmorfina

O CLUE-EMAR utilizado foi o mesmo mencionado para Metiltestoterona. As condições cromatográficas utilizadas foram: coluna de fase reversa Synchronis Thermo (EUA, C18, 1,7 μ m x 50 mm x 2,1 mm), mantida em um forno a 40°C; fase móvel composta por água com 1% acetonitrila a 25 mM de ácido fórmico (A) e acetonitrila com 10% de água a 25 mM de ácido fórmico (B), eluídos no modo gradiente. A eluição foi conduzida a um fluxo de 300 μ L/min em 15 minutos de corrida cromatográfica. O programa de eluição segue os seguintes parâmetros: 0 min, 0% B; 0 a 5.0 min, 0%–23% B; 5.0 a 7.0 min, 23%–100% B; 7.0 a 8.0 min, 100% B (etapa de lavagem); 8.0 a 8.1 min, 100%-0% B; 8.1 a 15.1 min, 5% B (etapa de reequilíbrio da coluna); e a fonte de eletronspray operando em modo positivo. O equipamento operou no modo “Full-MS” de m/z 200 a 600 e resolução de 70.000 na largura a meia altura (do inglês, full width at half maximum, FWHM). Os analitos foram fragmentados em uma célula de colisão e analisados em um segundo estágio em 3 diferentes métodos de aquisição: (i) PRM, com resolução de 35,000 FWHM, Isolation window: m/z 4.0 e energia de colisão normalizada de 65 para metabólitos de fase 1 e 35 para metabólitos de fase 2; (ii) DDA; com resolução de 17,700 FWHM, Isolation window: m/z 4.0, Loop count: 5, Multiplexing count: 2 e energia de colisão normalizada de 65 ; (iii) SWATH-type DIA, com os mesmos parâmetros do DDA, diferindo apenas do Isolation window de m/z 100.0.

7.f.3.a. Testes de rendimento de extração e hidrólise indireta da etilmorfina

7.f.3.a.1. Rendimento de extração

Para a realização do teste de rendimento de extração dois grupos de amostras foram preparados, em triplicata. A extração em fase sólida (SPE) utilizada foi a mesma descrita no item 7.e.3.c. As amostras do grupo A e grupo B foram preparadas usando branco da água de aquário fortificado com um mix dos padrões de referência dos analitos (Etilmorfina, Noretilmorfina, Morfina, Etilmorfina-6 β -Glicuronídeo, Morfina-3 β -Glicuronídeo e Morfina-6 β -Glicuronídeo) para uma concentração final de 50ng/mL. Inicialmente, todas as 6 amostras (grupo A e grupo B) foram fortificadas para uma concentração final de 50 ng/mL de padrão interno (Etilmorfina-D5 e Morfina-3 β -Glicuronídeo-D3) diretamente no branco de água de aquário. Entretanto, as fortificações com os padrões dos analitos se deram em momentos diferentes. As amostras do grupo A foram fortificadas diretamente nos 3 mL de branco de água de aquário, antes de qualquer etapa extração, enquanto o grupo B foi fortificado nos 3 mL da solução de metanol:ácido fórmico (95:5; v:v), ao final de toda a etapa de extração. Dessa forma, a razão área do analito pela área do padrão interno foi obtida para cada uma das amostras e a média das razões do grupo A e grupo B foram determinadas para cada analito. Para obter o rendimento de extração dos analitos, determinou-se a razão do grupo A pelo grupo B.

7.f.3.a.2. Rendimento de hidrólise

Os testes de rendimento de hidrólise foram realizados utilizando dois grupos de amostras em triplicata, para cada um dos procedimentos experimentais. A extração em fase sólida (SPE) utilizada foi a mesma descrita no item 7.e.3.c. As amostras do grupo A e grupo B foram preparadas usando branco da água de aquário fortificado com diferentes mix dos padrões de referência dos analitos para uma concentração final de 50ng/mL. Inicialmente, todas as amostras de todos os procedimentos experimentais foram fortificadas para uma concentração final de 50 ng/mL de padrão interno (Etilmorfina-D5) diretamente no branco de água de aquário. O mix utilizado para as amostras do grupo

A foi composto pelos analitos glicoconjugados (Etilmorfina-6 β -Glicuronídeo e Morfina-3 β -Glicuronídeo), enquanto o mix utilizado para o grupo B foi composto pelos analitos livres (Etilmorfina e Morfina). A condição de hidrólise utilizada para a hidrólise com a enzima de *E. coli* foi a adição de 1125 μ L de tampão fosfato 0,8M, pH 7, 30 μ L de solução β -glicuronidase de *E. coli*, temperatura de 50°C e por um período *overnight*; já as condições para hidrólise com a enzima de *H. pomatia* foi avaliada pela adição de 600 μ L de tampão acetato de sódio 0,2M, pH 5, e 30 μ L de solução β -glucuronidase de *H. pomatia*, a temperatura de 38°C e por um período *overnight*. As áreas referentes a etilmorfina e a morfina, além do padrão interno, foram determinadas para cada uma das amostras de ambos os grupos em cada procedimento experimental. Determinou-se a razão da área do analito pela área do padrão interno para cada uma das amostras, dessa forma sendo possível determinar a razão média de cada um dos analitos para os grupos A e B, consequentemente ao obter a razão entre as razões médias do grupo A pela razão média do grupo B foi possível determinar o rendimento de hidrólise.

7.f.3.a.3. Hidrólise Indireta

Para a avaliação da hidrólise indireta, a extração em fase sólida (SPE) utilizada foi a mesma descrita no item 7.e.3.c. As amostras utilizadas foram alíquotas de ZWT tratado com etilmorfina, em triplicata para cada procedimento experimental. Além disso, para cada procedimento experimental foi preparado uma triplicata de CQP usando branco da água de aquário fortificado com um mix dos padrões de referência dos analitos (Etilmorfina, Noretilmorfina e Morfina) para uma concentração final de 50ng/mL. Inicialmente, todas as amostras foram fortificadas para uma concentração final de 50 ng/mL de padrão interno (Etilmorfina-D5). A condição de hidrólise utilizada no experimento com a enzima de *E. coli* foi estabelecida com a adição de 1125 μ L de tampão fosfato 0,8M, pH 7, 30 μ L de solução β -glucuronidase de *E. coli*, em temperatura de 50° *overnight*. Para os experimentos com de *H. pomatia* as condições de hidrólise estabelecidas com a adição de 600 μ L de tampão acetato de sódio 0,2M, pH 5, 30 μ L de solução β -glicuronidase de *H. pomatia*, a temperatura de 38°C *overnight*. As áreas referentes aos analitos, além do padrão interno, foram determinadas para cada uma das amostras de cada procedimento experimental. Determinou-se a razão área do analito

pela área do padrão interno, dessa forma sendo possível determinar a razão média de cada um dos analitos para as amostras e para os controles positivos, e consequentemente obter a razão média para cada um deles. As concentrações estimadas de cada analito para cada procedimento de hidrólise utilizado, foram obtidas a partir da relação com as razões calculadas para os controles positivos.

7.f.3.b. Metabolômica targeted e untargeted da etilmorfina

Os dados de LC-HRMS adquiridos para amostras tratadas com ZWT e CQN foram analisados usando o programa MS-DIAL versão 4.70 disponível gratuitamente no site da RIKEN PRIME. Os arquivos de MS brutos foram convertidos em ABF (formato de arquivo de base de análise) usando o conversor de arquivos gratuito Reifycs. Os arquivos foram importados para o MS-DIAL com as seguintes condições: tolerância de precisão de massa = 0,001 Da para MS1 e 0,025 Da para MS2; início do tempo de retenção = 0,5 min; fim do tempo de retenção = 8 min; início da faixa de massa = 200 Da; final da faixa de massa = 600 Da; altura mínima do pico = 10000; largura da fração de massa = 0,05 Da; método de suavização = média móvel ponderada linear; nível de suavização = 5 scans; largura mínima do pico = 8 scans; valor da janela sigma = 0,6; Corte de abundância MS/MS = 10 amplitude.

Para uma avaliação adequada dos metabólitos da etilmorfina, utilizou-se um banco de dados interno contendo a massa exata de metabólitos clássicos e putativos da etilmorfina. Este banco de dados foi carregado com os seguintes parâmetros: tolerância de tempo de retenção = 100 min; tolerância de massa precisa = 0,01 Da e pontuação de corte de identificação = 0,9%. As pesquisas de aduto da detecção de massa incluíram $[M+H]^+$ e $[M+Na]^+$, bem como a exclusão do íon precursor de etilmorfina de m/z 314,1751. Por fim, os sinais foram alinhados para corrigir as diferenças de tempo e massas entre as amostras que produziram parâmetros de alinhamento de: tolerância de tempo de retenção = 0,05 min; tolerância MS1 = 0,015 Da; filtro de contagem de pico = 5% e N% detectado em pelo menos um grupo = 10%.

O processamento dos dados resultantes foi submetido à análise estatística multivariada (MSA). A diferença entre as amostras foi determinada por uma análise de componentes principais (PCA). Em seguida, os metabólitos responsáveis pelas

diferenças entre os agrupamentos de amostras foram identificados por uma análise discriminante de mínimos quadrados ortogonal parcial (OPLS-DA). Os *score plots* dos modelos PCA e OPLS-DA foram utilizados para avaliar a separação entre os clusters e os *loading plots* foram realizados para identificar os metabólitos que contribuíram para a separação daqueles *clusters* que se formaram no *score plot*. A qualidade dos modelos OPLS-DA foi avaliada pelos valores Q².

Além disso, o OPLS-DA forneceu variáveis importantes para predição (VIP) em cada modelo. As variáveis estatisticamente significativas para discriminar o ZWT tratado (R1, R2 e R3 às 8h, 9h, 10h, 11h, 12h) em relação ao CQN (CN de 0h às 12h) foram identificadas por VIP maior que 1; Valores de $p < 0,05$ obtidos da ANOVA e *fold change* maior que 2. Para atribuições de metabólitos, procedemos a uma pesquisa no banco de dados interno, bem como pesquisas em bancos de dados públicos.

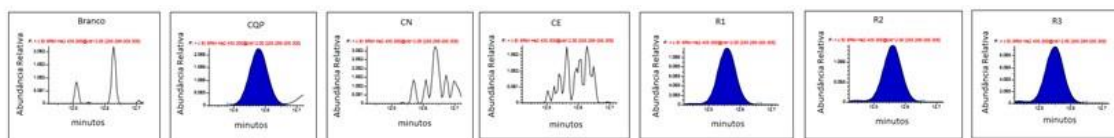
7.g. Resultados

7.g.1. Metiltestosterona

7.g.1.a. Investigação da presença de metabólitos monitorados por CG-EM

Como esperado, a metiltestosterona foi metabolizada em 17 α -metil-5 α -androstano-3 α ,17 β -diol (M1) pelo zebrafish (Figura 7.4, A), porém, não foi visto o metabólito 17 α -metil-5 β -androstano-3 α ,17 β -diol (M2) (Figura 7.4, B). A avaliação das informações coletadas pelo banco de dados da *National Center for Biotechnology Information* e comparando essas informações com o banco de dados do *The Zebrafish Information Network*, foi possível observar que o zebrafish não possui uma das enzimas ortólogas ao dos humanos a qual produz o metabólito M2.

A



B

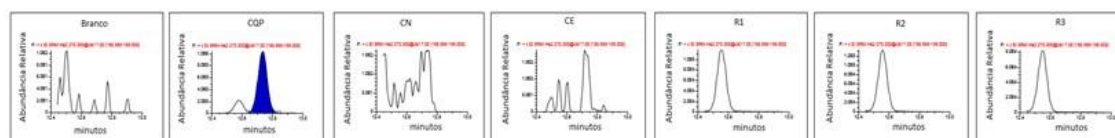


Figura 7.4. Cromatogramas de SRM dos metabólitos M1 (A) e M2 (B) (Branco: sem a presença da substância e da matriz; CQP: controle de qualidade positivo; CN: controle de qualidade negativo; R1 a R3 cromatogramas obtidos das amostras). A cor azul dos picos cromatográficos demonstra um resultado positivo para a presença das substâncias.

Todavia, foi possível observar metabólitos que não são usualmente monitorados na urina humana após a administração de metiltestosterona, como a mestanolona (Figura 7.5) e um candidato a isômero de M1 e M2 indicado pelo cromatograma no modo *full scan* no tempo de retenção de 14,40 minutos (Figura 7.6).

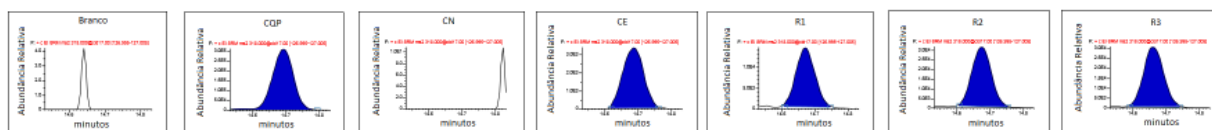


Figura 7.5. Cromatogramas em SRM do metabólito Mestanolona (Branco: sem a presença da substância e da matriz; CQP: controle de qualidade positivo; CN: controle de qualidade negativo; R1 a R3 cromatogramas obtidos das amostras). A cor azul dos picos cromatográficos demonstra um resultado positivo para a presença das substâncias.

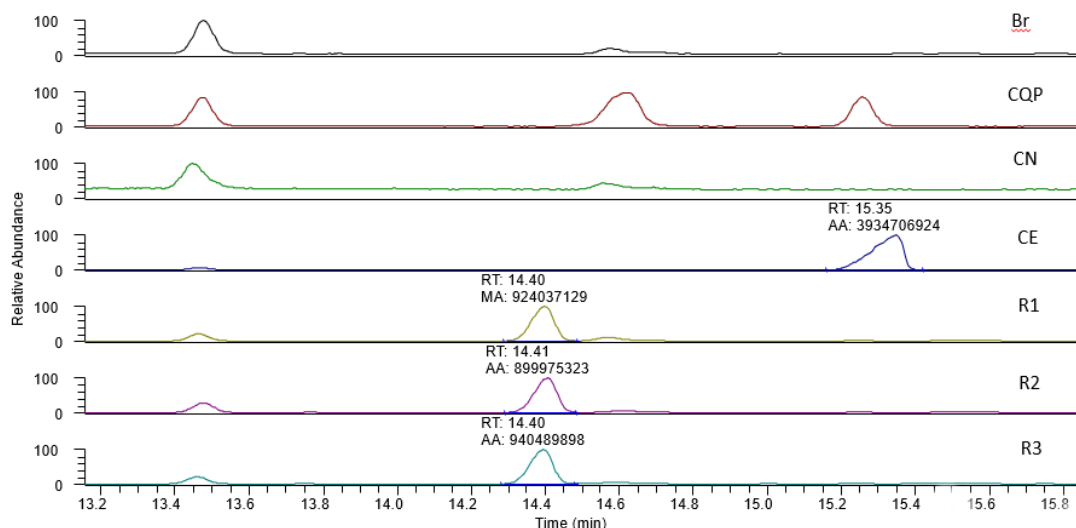


Figura 7.6. Cromatograma no modo *full scan* de Branco (Br), Controle de Qualidade Positivo (CQP), CN, CE, R1, R2 E R3 (após 8 horas de experimento) entre os tempos de retenção 13,1 min e 16,0 min.

Comparando os espectros de massas do controle de qualidade positivo (CQP) para o metabólito M1 (tempo de retenção de 12,52 minutos) e das replicatas R1, R2 e R3 obtidas dos experimentos no ZWT no tempo de retenção de 14,40 minutos (tempo de retenção dos picos cromatográficos mostrados na figura 6) é possível inferir que o metabólito encontrado em 14,40 minutos seja um metabólito isômero de M1 (Figura 7.7), para o qual as possibilidades estruturais seriam as modificações nas posições 17 e 3 gerando 17 α -metil-5 α -androstano-3 β ,17 β -diol, 17 β -metil-5 α -androstano-3 β ,17 α -diol ou 17 β -metil-5 α -androstano-3 α ,17 α -diol.

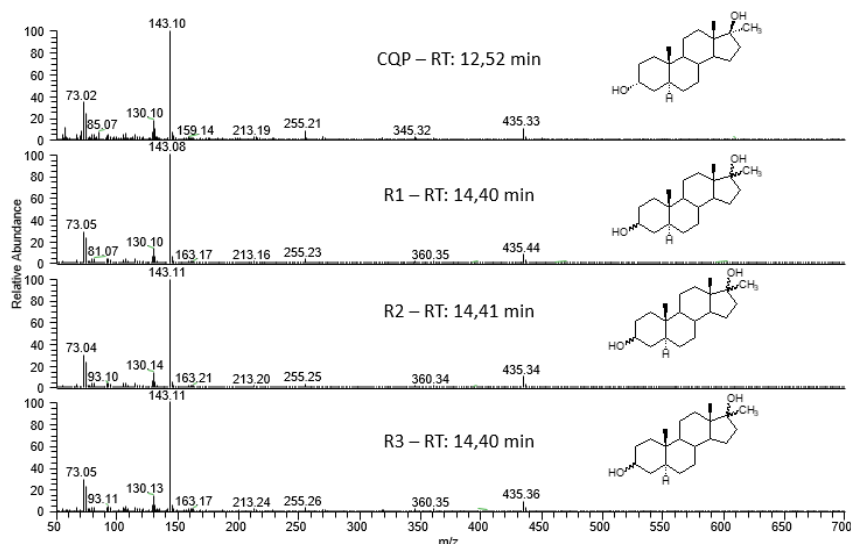


Figura 7.7. Espectro de Massas do CQP (M1, em 12,52 minutos), R1, R2 e R3 em 14,40 minutos.

Além da análise qualitativa desses metabólitos, também foi possível estimar uma curva de concentração dos mesmos ao longo das 8 horas de experimento, Gráficos 7.1 e 7.2.

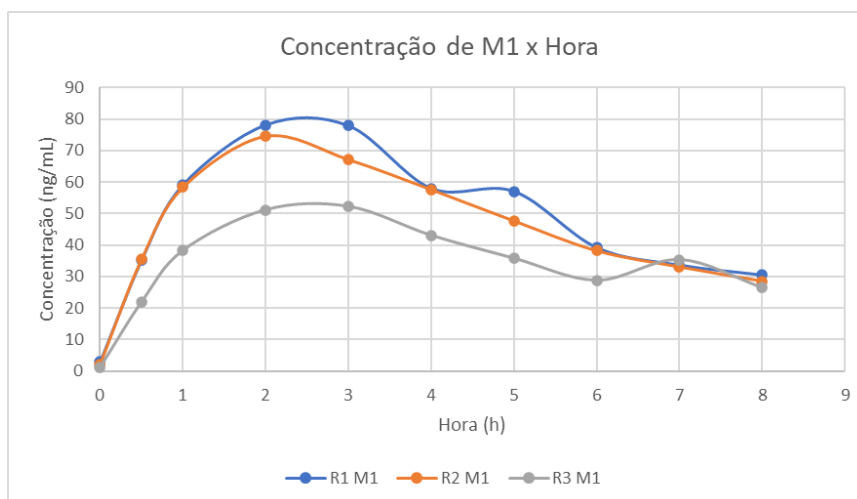


Gráfico 7.1. Concentração de M1 ao longo das 8 horas de experimento

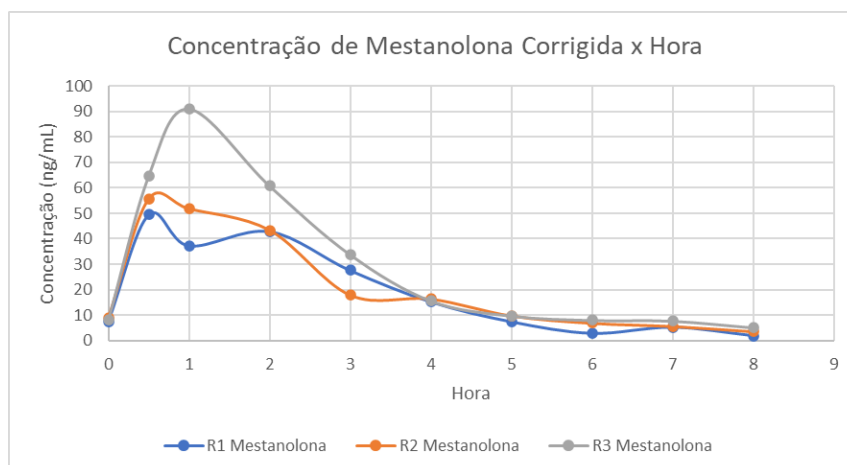


Gráfico 7.2. Concentração de Mestanolona corrigida (após subtração dos valores irrisórios encontrados no CE) ao longo das 8 horas de experimento.

Para alguns candidatos a metabólitos propostos havia uma dificuldade de identificação estrutural com base no íon molecular, devido a falta de material de referência. Entretanto, a utilização do modo *full scan* utilizando energias mais baixas permitiu sua identificação (Figura 7.8). Para esses metabólitos, duas abordagens foram feitas, a primeira foi concentrar as amostras e a segunda foi diminuir a energia de colisão da fonte de 70 eV para 10 eV, 15 eV, 20 eV e 25 eV.

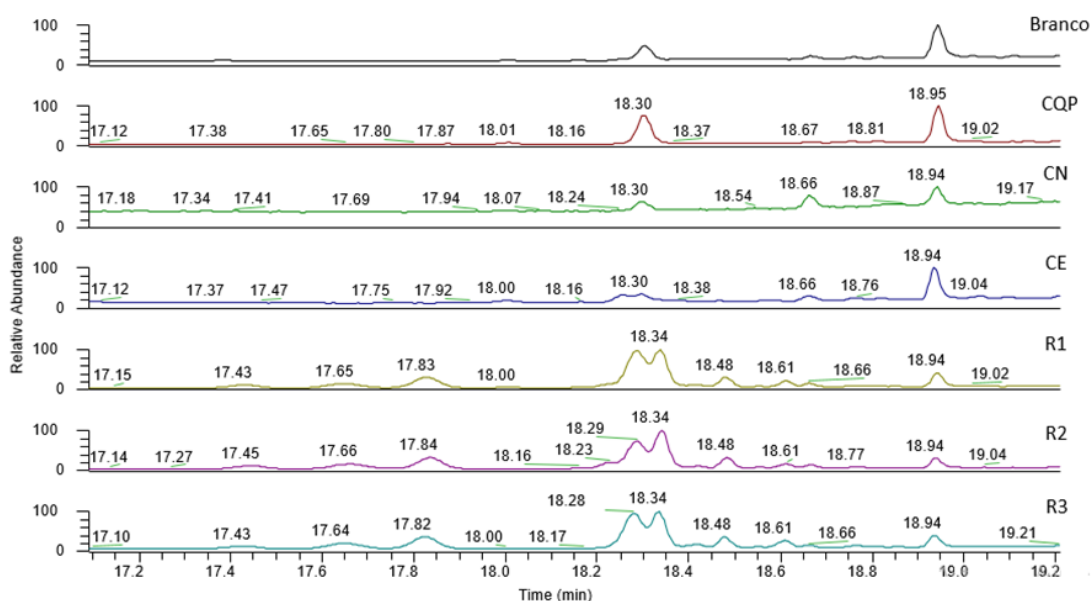


Figura 7.8. Cromatograma *full scan* dos controles e replicatas.

Para o primeiro pico, no tempo de retenção de 17,44 minutos, tem-se um espectro de massas onde o íon com 100% de abundância relativa é o m/z 231, indicando a quebra do anel D da estrutura característica dos 17-metil esteróides quando há uma hidroxila ligada ao carbono na posição C-15. O espectro de massas da amostra concentrada mostrou alguns íons diagnósticos que poderiam auxiliar a estabelecer a proposta estrutural do íon precursor. Por exemplo, o íon m/z 523, pode caracterizar a perda de 15 Da ($[M^+ - 15]$), referente a uma metila, se o íon precursor fosse o m/z 538. É possível ver um íon m/z 433, que pode ser a perda de 90 Da, e estaria associado a perda de um O-TMS ($[M^+ - 15 - 90]$). Logo, é possível propor que esse metabólito seja 17-metil-5 α -androstan-3,15,17-triol (Figura 7.9).

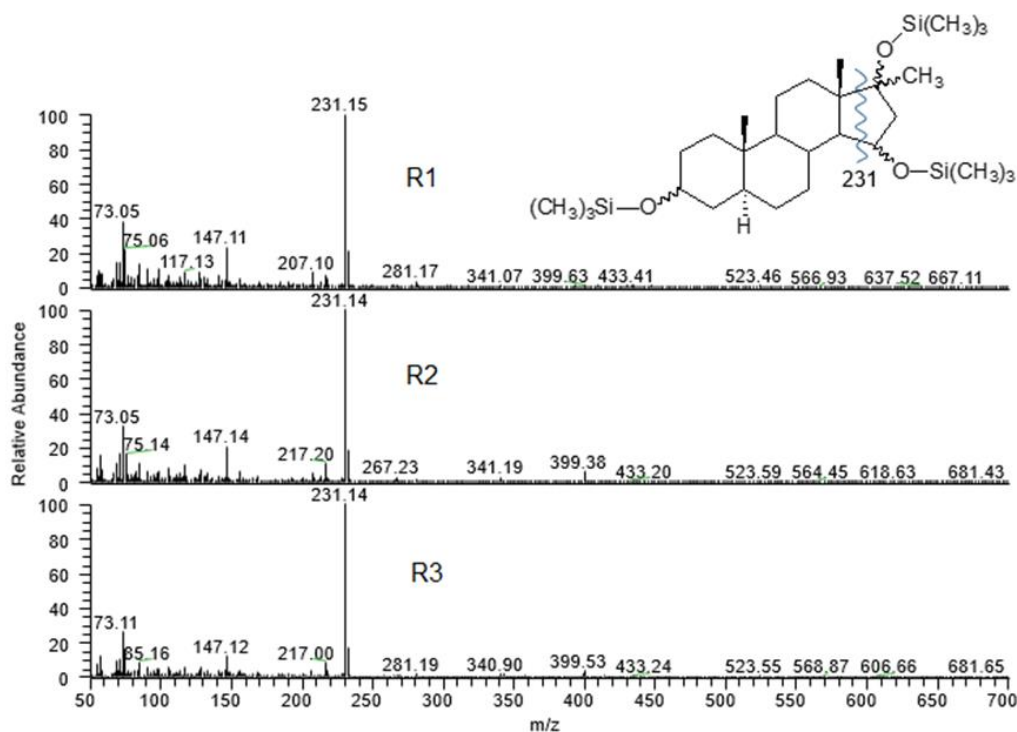


Figura 7.9. Espectro de massas e proposta estrutural do candidato a metabólito no tempo de retenção de 17,44 minutos para as 3 replicatas concentradas.

O segundo pico cromatográfico identificado no tempo de retenção de 17,65 minutos, mostrou, no espectro de massas, um íon fragmento de m/z 143 de abundância relativa de 100%. Este íon fragmento, também indica a quebra no anel D para os 17-

metil esteroides, com a hidroxila conhecida apenas no carbono 17. Ao observar o espectro de massas após 6 horas do início do experimento, identificou-se um íon com m/z 538 podendo ser o íon precursor do metabólito, também foi possível observar um íon com m/z 448, referente a perda de massa de 90 Da, relativa ao O-TMS ($[M^+ - 90]$). O íon m/z 358 aponta a perda do segundo O-TMS ($[M^+ - 90 - 90]$) e o íon m/z 268, a perda do terceiro O-TMS ($[M^+ - 90 - 90 - 90]$). Assim, é possível inferir que esse metabólito seja 17-metil-5 α -androstan-2,3,17-triol ou 17-metil-5 α -androstan-3,6,17-triol ou 17-metil-5 α -androstan-3,11,17-triol (Figura 7.10). Foi levantada a hipótese da hidroxila estar na ligada ao carbono na posição 4, a observação e confirmação da identidade dessa metabólito indicaria que o zebrafish teria metabolizado a metiltestosterona em um outro AAS, a 4-hidróxi-metiltestosterona, conhecida como oximesterona. Entretanto, não se confirmou essa hipótese, uma vez que essa substância foi monitorada utilizando o modo SRM e não foi observada.

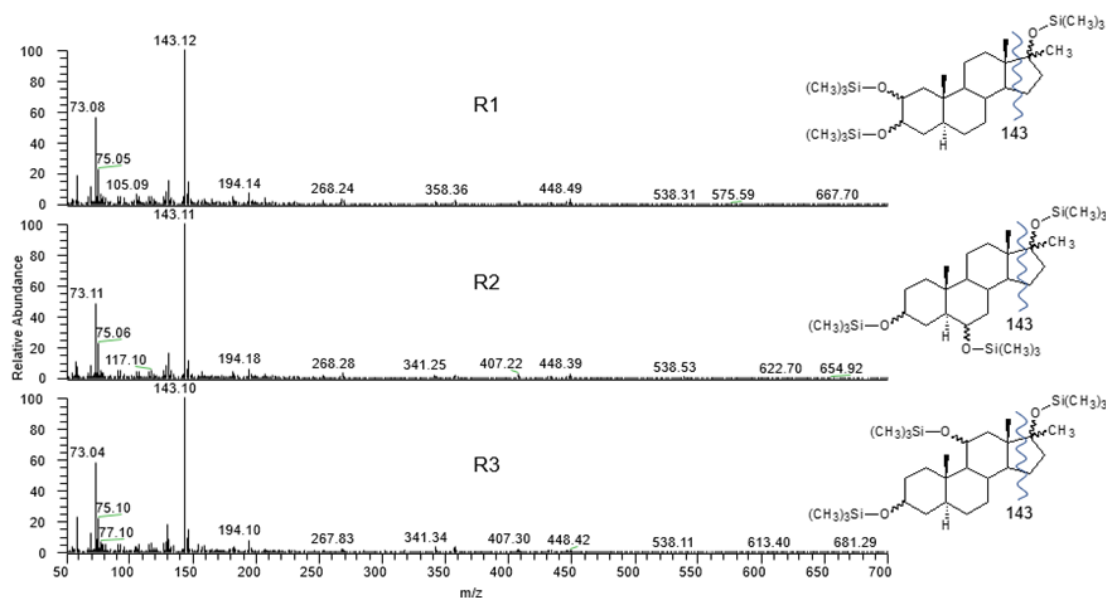


Figura 7.10. Espectro de massas e propostas estruturais do candidato a metabólito no tempo de retenção de 17,65 minutos na hora 6 do experimento para as 3 replicatas.

O terceiro pico cromatográfico, no tempo de retenção de 17,83 minutos, observou uma abundância relativa de 100% para o íon fragmento m/z 143. Como dito anteriormente, este íon diagnóstico é relativo à quebra do anel D da estrutura. Alguns íons fragmento, como m/z 448 e 358, podem ser característicos das perdas de O-TMS,

cuja massa é 90 Da. Logo, levantou-se a possibilidade desse candidato a metabólito ter um íon precursor de m/z 538. Com o experimento de baixa energia de colisão da fonte (15 eV), pôde-se ver o íon m/z 538 com uma abundância relativa maior, em torno de 20%, o que corrobora para ser o íon precursor. O íon fragmento m/z 448 aparece com uma abundância relativa de 100%, e é possível ver os íons m/z 358 e m/z 268, esses 3 íons fragmentos são característicos de perdas de O-TMS (90 Da). Esta massa seria um indício dos seguintes candidatos a metabólitos: 17-metil-5 α -androstan-2,3,17-triol, 17-metil-5 α -androstan-3,6,17-triol e 17-metil-5 α -androstan-3,11,17-triol, todos eles O-*tris*-TMS (Figura 7.11).

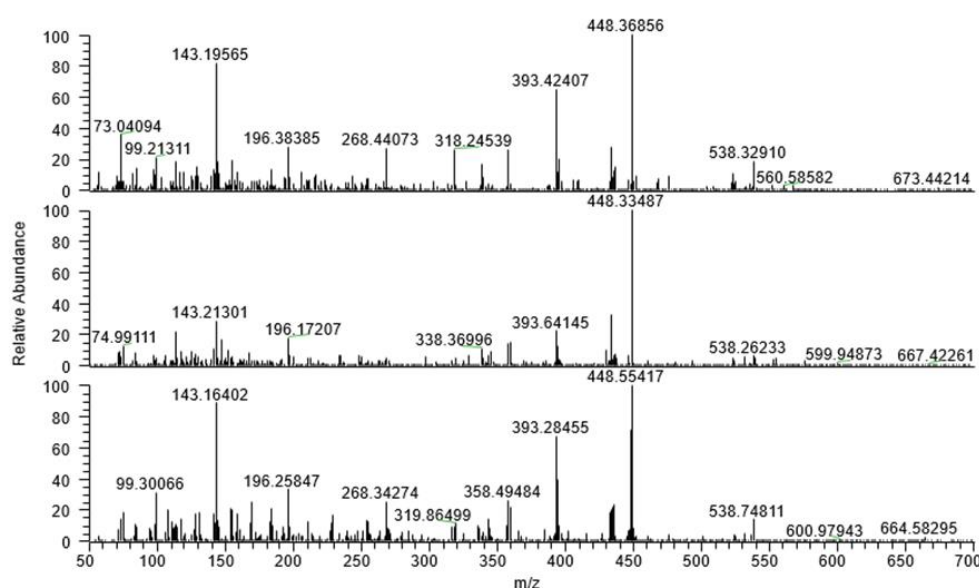


Figura 7.11. Espectro de massas com energia de colisão de 15 eV do candidato a metabólito no tempo de retenção de 17,83 minutos para as 3 replicatas.

O quarto pico cromatográfico observado, no tempo de retenção de 18,22 minutos, apresentou uma coeluição com os picos nos tempos de retenção de 18,29 e 18,34 minutos. Seu espectro de massas tem abundância relativa de 100% referente ao íon m/z 536, indicando ser o íon precursor, quando a amostra foi concentrada. Sabe-se que esse é um metabólito, pela presença do íon fragmento diagnóstico m/z 143, característico da quebra do anel D. O íon m/z 521 é característico da perda de uma metila cuja massa é de 15 Da ($[M^+ - 15]$), já o íon m/z 446, da perda de um O-TMS, massa de 90 Da ($[M^+ - 90]$). Isso pôde ser verificado pelo espectro de massas das amostras concentradas.

Sendo o íon precursor sendo m/z 536, podemos inferir que esse metabólito seja hidroxilado nas posições 2, 6 ou 11 e tenha sofrido redução da dupla ligação entre o carbono 4 e 5, C-5 α . Face a isto, as estruturas possíveis seriam: 17-metil-5 α -androstan-2,17-diol-3-ona, 17-metil-5 α -androstan-6,17-diol-3-ona e 17-metil-5 α -androstan-11,17-diol-3-ona (Figura 7.12).

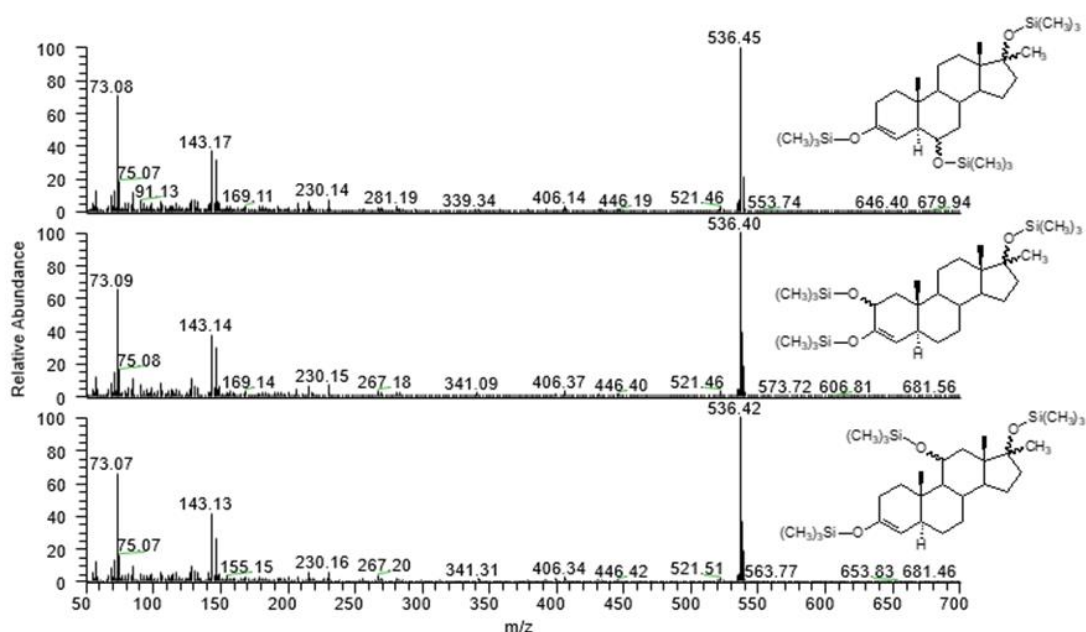


Figura 7.12. Espectro de massas no tempo de retenção de 18,22 minutos para as replicatas R1, R2 e R3 nas amostras concentradas.

O quinto pico cromatográfico, no tempo de retenção de 18,29 minutos, apresentou um espectro de massas onde a abundância relativa de 100% é de um íon fragmento de m/z 143, mais uma vez caracterizando a quebra do anel D. O experimento de baixa energia de colisão da fonte (15 eV) foi feito, e o íon de maior abundância foi o m/z 534. Os íons fragmentos m/z 492 e m/z 389 foram vistos. De acordo com o trabalho publicado por Matinez-Brito e colaboradores (2020), essas massas foram utilizadas em um experimento por transição de massa para o metabólito 6-hidróxi-metiltestosterona, em que essas transições foram: 534 \rightarrow 492 e 534 \rightarrow 389. De acordo com esses dados, o metabólito identificado poderia ser a 6-hidroxi-metiltestosterona, com a hidroxilação na posição C-6 α ou C-6 β (Figura 7.13).

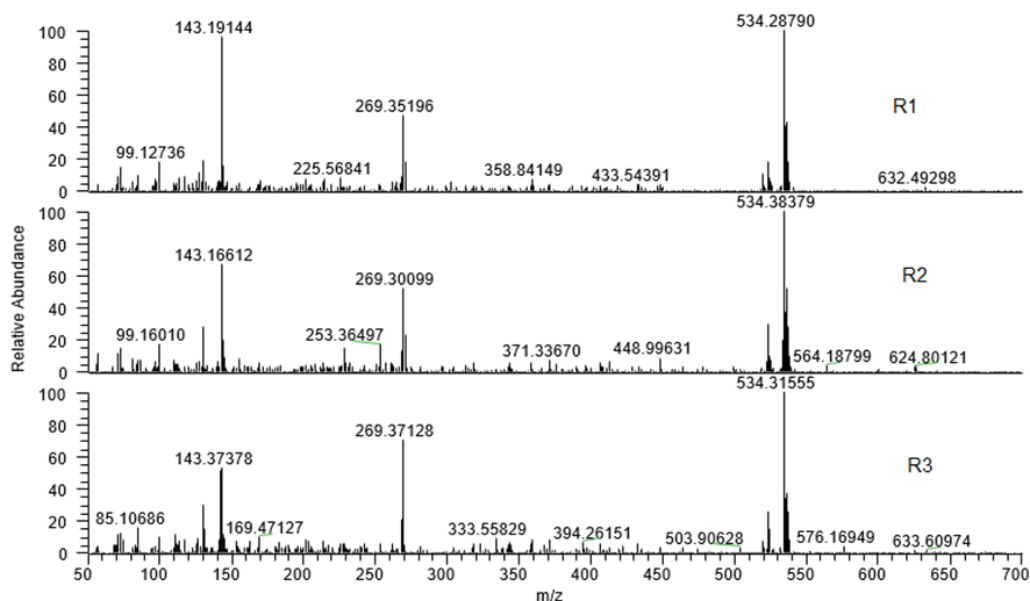


Figura 7.13. Espectro de massas com energia de colisão de 15 eV do candidato a metabólito no tempo de retenção de 18,29 minutos para as 3 replicatas.

No sexto pico cromatográfico cujo tempo de retenção é 18,34 minutos, o espectro de massas mostra um íon fragmento m/z 143, condizente com a quebra do anel D. Mais uma vez, o experimento de baixa energia de colisão da fonte foi feito (15 eV) e verificou-se a presença de um íon precursor de m/z 534, cuja abundância relativa está cerca de 50% para as 3 replicatas. Ao examinar os possíveis íons fragmentos, percebeu-se os íons m/z 492 e m/z 389, bem como aconteceu no metabólito supracitado, o que indica esses metabólitos serem isômeros entre si, sendo um deles 6 α -hidróxi-metiltestosterona e o outro, 6 β -hidróxi-metiltestosterona (Figura 7.14).

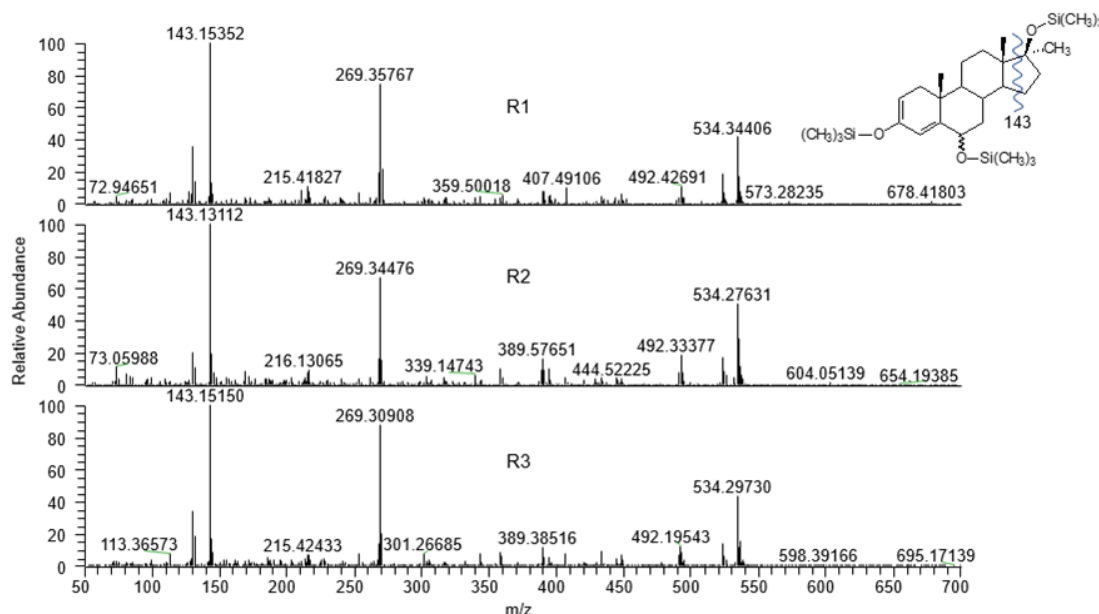


Figura 7.14. Espectro de massas com energia de colisão de 15 eV do candidato a metabólito no tempo de retenção de 18,34 minutos para as 3 replicatas.

O sétimo pico cromatográfico, no tempo de retenção de 18,48 minutos, apresentou um espectro de massas onde dois íons fragmento m/z 218 e 231 foram observados. Esses íons são característicos da quebra do anel D quando há uma hidroxila ligada ao carbono 16. Também pode-se considerar o íon precursor m/z 538 mostrado no espectro de massas, e outro íon fragmento m/z 448 indicando a perda de uma massa de 90 Da, característico de um O-TMS ($[M^+ - 90]$). O mesmo acontece para o íon m/z 358 cuja perda de 90 Da é identificada pela saída de um segundo O-TMS ($[M^+ - 90 - 90]$). Pode-se pressupor o metabólito identificado seja 17-metil-5 α -androstan-3,16,17-triol (Figura 7.15).

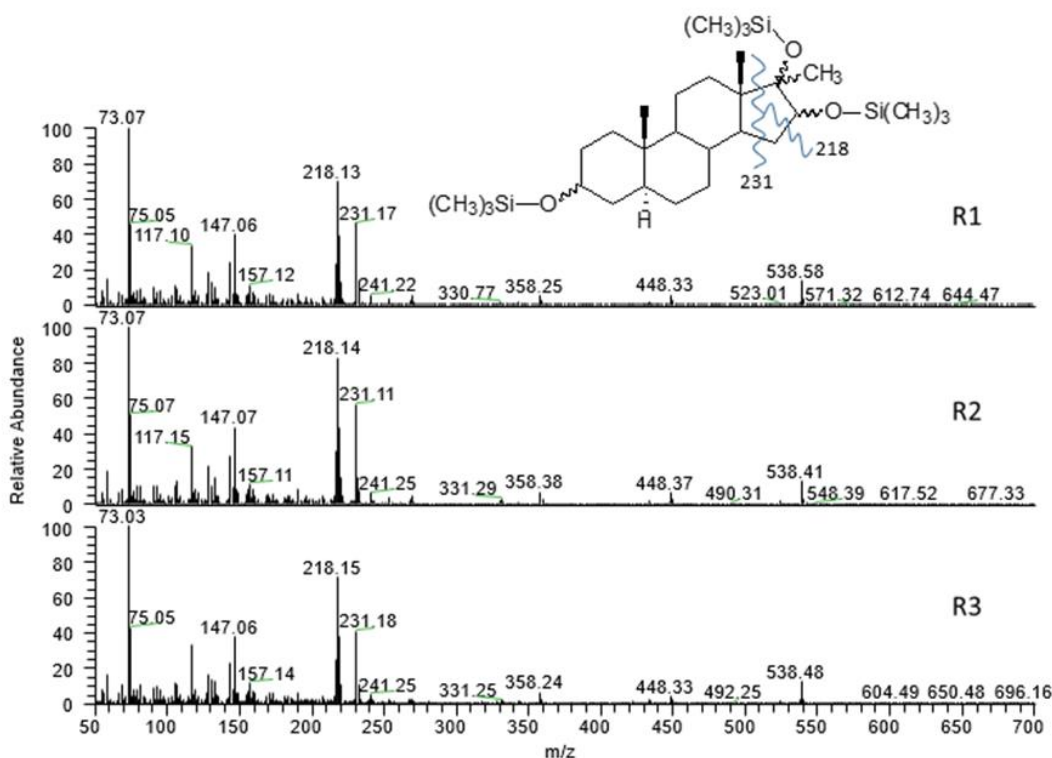


Figura 7.15. Espectro de massas do candidato a metabólito 17-metil-5 α -androstano-3,16,17-triol no tempo de retenção de 18,48 minutos para as 3 replicatas.

Para o oitavo e último pico cromatográfico observado, no tempo de retenção de 18,61 minutos, o espectro de massas apresentou uma similaridade ao anterior (comparação com o observado no tempo de retenção de 18,48 minutos), o que pode ser um indicativo de isomeria entre esses metabolitos. Novamente, os íons fragmentos m/z 218 e 231 inferem a quebra do anel D quando uma hidroxila está ligada ao carbono 16. Deduz-se que esses dois metabolitos possuem uma isomeria na posição C-16, sendo um deles 17-metil-5 α -androstano-3,16 α ,17-triol e o outro 17-metil-5 α -androstano-3,16 β ,17-triol, principalmente pelos íons fragmentos característicos identificados, m/z 448 (perda de um O-TMS) e 358 (perda do segundo O-TMS), se repetirem para os dois espectros de massas nos diferentes tempos de retenção (Figura 7.16).

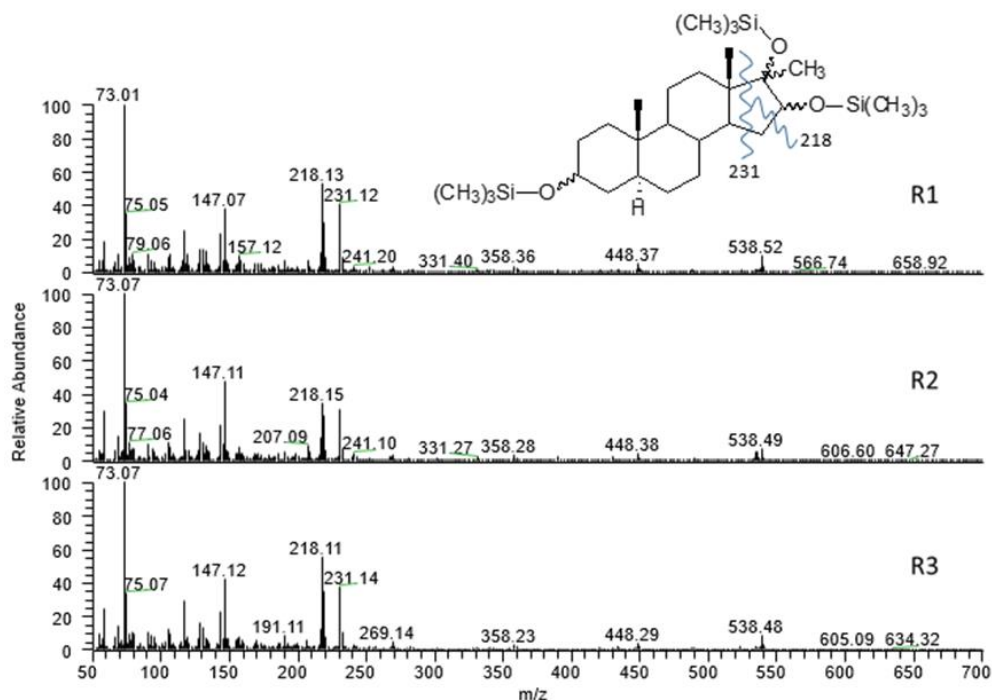


Figura 7.16. Espectro de massas do candidato a metabólito 17-metil-5 α -androstano-3,16,17-triol no tempo de retenção de 18,61 minutos para as 3 replicatas.

Os candidatos a metabólitos encontrados através dessas abordagens foram: 17-metil-5 α -androstano-3,15,17-triol; 6 α -hidroxi-metiltestosterona; 6 β -hidroxi-metiltestosterona; 17-metil-5 α -androstano-3,16 α ,17-triol; 17-metil-5 α -androstano-3,16 β ,17-triol; 17-metil-5 α -androstano-2,17-diol-3-ona ou 17-metil-5 α -androstano-6,17-diol-3-ona ou 17-metil-5 α -androstano-11,17-diol-3-ona; 17-metil-5 α -androstano-2,3,17-triol ou 17-metil-5 α -androstano-3,6,17-triol ou 17-metil-5 α -androstano-3,11,17-triol.

7.g.1.b. Investigação da presença de metabólitos monitorados por CLUE-EMAR

Nas análises por cromatografia líquida foi possível observar a presença de alguns metabólitos de fase 2. Os metabólitos de fase 2 esperados são o 17 β -metil-5 α -androstano-3 α ,17 α -diol 3 α -sulfato (S2) e 17 β -metil-5 β -androstano-3 α ,17 α -diol 3 α -sulfato (S3). Ambos os metabólitos possuem uma razão massa-carga 385 (m/z 385), visto em modo negativo ($[M-H]^-$). Porém, conforme observado para os experimentos anteriores através da

cromatografia gasosa, o zebrafish não foi capaz de formar o metabólito M2 e, por consequência, pode-se dizer que S2 e S3 também não foram formados. Entretanto, dois picos cromatográficos foram observados para m/z 385 (Figura 7.17).

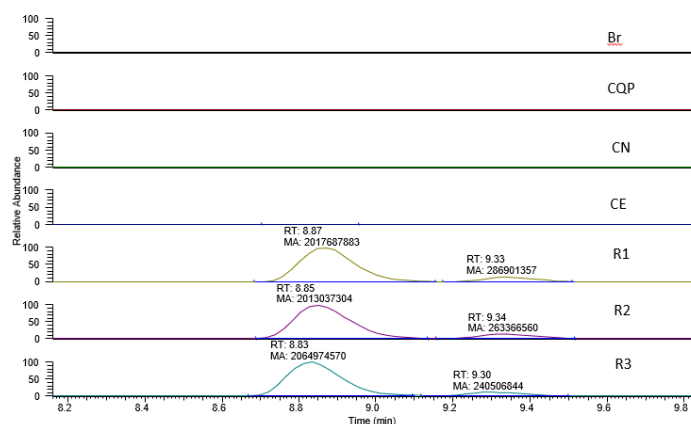


Figura 7.17. Cromatogramas em modo *full scan* entre 8,0 minutos e 10,0 minutos.

Acredita-se que um dos picos seja referente ao 17 α -metil-5 α -androstandio-3 α ,17 β -diol 3 α -sulfato e o outro pico, a outro metabólito sulfoconjugado encontrado na cromatografia gasosa, isômero de 17 α -metil-5 α -androstandio-3 α ,17 β -diol, de acordo com as relações estruturais as possibilidades seriam: 17 α -metil-5 α -androstandio-3 β ,17 β -diol 3 β -sulfato ou 17 β -metil-5 α -androstandio-3 β ,17 α -diol 3 β -sulfato ou 17 β -metil-5 α -androstandio-3 α ,17 α -diol 3 α -sulfato. A confirmação estrutural pode se dar pela comparação direta com um material de referência, entretanto a indisponibilidade desse material não permitiu confirmar quais são eles de fato (sua configuração absoluta), mas pôde-se comparar seus espectros de massas com os já referenciados na literatura e confirmar que os mesmos são realmente metabólitos sulfoconjugados (Figura 7.18).

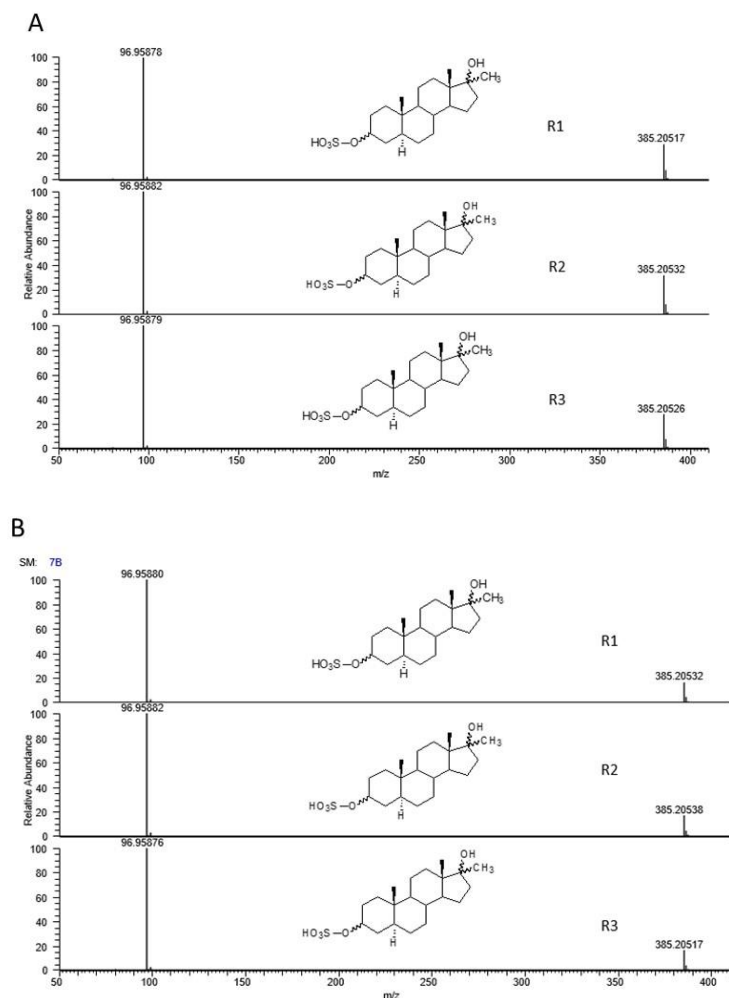


Figura 7.18. Espectros de massas nos tempos de retenção de 8,85 minutos (A) e 9,33 minutos (B).

7.g.2. Tamoxifeno

7.g.2.a. Dilute and Shoot

Na Figura 7.19, encontram-se os cromatogramas extraídos para m/z 372,23219 correspondendo a massa exata do TMX nas alíquotas retiradas no início (0h) e fim (8h) do experimento em uma das replicatas dos tanques (ZWT) tratados com TMX na presença de peixes, e do material de referência (Figura 7.19 A-C). Além disso, foi plotada uma curva da razão da área pico do analito TMX sobre a área do padrão interno (PI),

construída com as médias das respostas das replicatas e o desvio padrão, obtidos das amostras, dos CPs (controles positivos) e do CN (controles negativos), Figura 7.19 D.

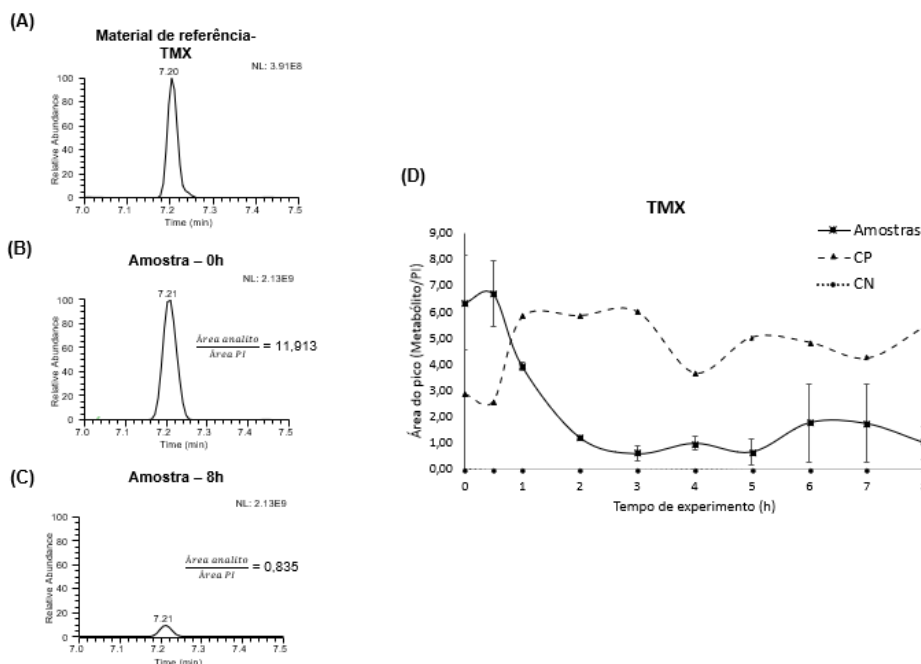


Figura 7.19. Cromatogramas extraídos por CLUE-EMAR com uma tolerância de 5 ppm de massa para o analito TMX m/z 372,23219 a partir da solução padrão (A) e das amostras coletadas dos tanques do modelo ZWT nos tempos 0h (B) e 8h (C) de experimento. Curva obtida da razão área do TMX/área do PI ao longo do tempo experimental (D).

A presença de um único pico intenso (na ordem de grandeza de 10^9) nos cromatogramas da amostra (Figura 7.19 B), atendendo aos critérios de identificação cromatográficos em relação ao material de referência (Figura 7.19 B) indicaram que o pico com tempo de retenção (t_R) em 7,20 min, se refere ao TMX.

Além disso, verificou-se que a razão das áreas entre o analito e padrão interno obtida para a amostra no início do experimento (Figura 7.19 B) é cerca de 14 vezes maior que a obtida para a mesma amostra após 8h de experimento (Figura 7.19 C). Tal fato, aliado a comparação da magnitude dos picos, representa o consumo de parte da dose administrada do TMX pelo *zebrafish* e sua possível conversão em produtos de metabolismo. O mesmo comportamento foi observado na curva do TMX ao longo tempo (Figura 7.19 D). Em 2h de experimento é observada uma queda na intensidade do analito nas amostras, sendo mais um indício da biotransformação do TMX em seus metabólitos.

Além disso, foi possível observar um comportamento, em geral, constante da dose administrada para o CP e a ausência do TMX no CN.

7.g.2.b Detecção de metabólitos de fase I e II por *Dilute and Shoot*

As vias metabólicas de fase I descritas na literatura para o tamoxifeno incluem hidroxilação em diferentes posições da molécula, dihidroxilação, *N*-desmetilação, metoxilação, carboxilação, *N*-oxidação, epoxidação e a combinação entre estas vias (MAZZARINO *et al.*, 2013; KWOK *et al.*, 2017; SANCHEZ-SPITMAN *et al.*, 2019). Na Tabela 7.1, encontra-se as biotransformações e as possíveis combinações mencionadas na literatura acompanhadas da composição elementar e da massa teórica associadas ao íon precursor ($[M-H]^+$) do metabólito (M) gerado.

Tabela 7.1. Biotransformações mencionadas na literatura para o TMX, composição elementar e massa teórica $[M-H]^+$

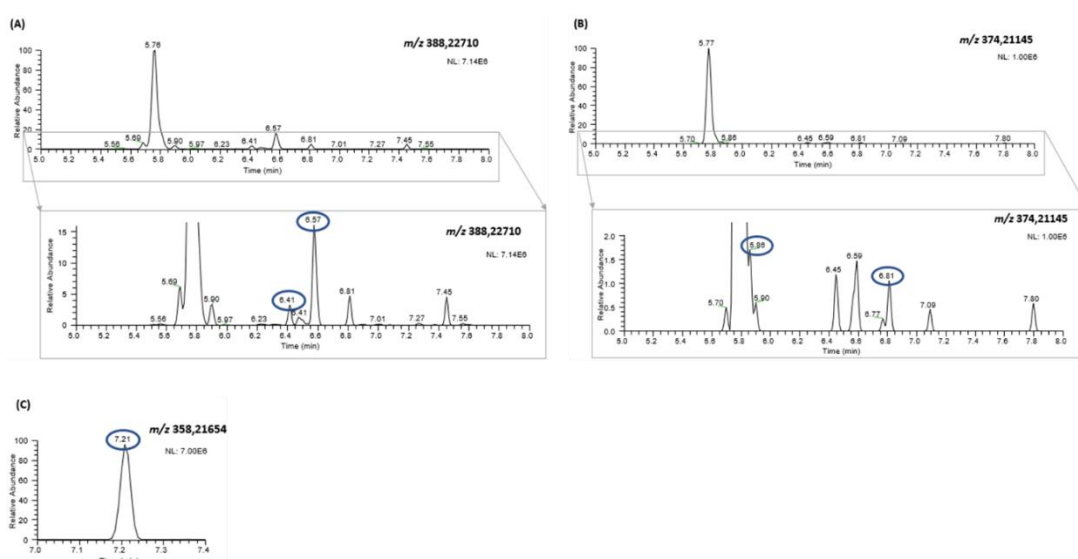
	Biotransformações	Composição elementar (M)	Massa teórica $[M-H]^+$
	- *	$C_{26}H_{29}NO$	372,23219
1	Hidroxilação,	$C_{26}H_{29}NO_2$	388,22710
2	<i>N</i> -desmetilação	$C_{25}H_{27}NO$	358,21654
3	Carboxilação	$C_{26}H_{27}NO_3$	402,20637
4	Dihidroxilação	$C_{26}H_{29}NO_3$	404,22202
5	Dihidroxilação**	$C_{26}H_{31}NO_3$	406,23767
6	<i>N,N</i> -desmetilação	$C_{24}H_{25}NO$	344,20089
7	<i>N</i> -oxidação	$C_{26}H_{29}NO_2$	388,22710
8	Epoxidação	$C_{26}H_{29}NO_2$	388,22710
9	Redução	$C_{26}H_{31}NO$	374,24784
10	Hidroxilação + Metoxilação	$C_{27}H_{31}NO_3$	418,23767
11	Hidroxilação + <i>N</i> -desmetilação	$C_{25}H_{27}NO_2$	374,21145
12	Hidroxilação + <i>N</i> -oxidação	$C_{26}H_{29}NO_3$	404,22202
13	<i>N</i> -desmetilação + Carboxilação	$C_{25}H_{25}NO_3$	388,19072
14	<i>N</i> -desmetilação + Dihidroxilação	$C_{25}H_{27}NO_3$	390,20637
15	<i>N,N</i> -didesmetilação + Hidroxilação	$C_{24}H_{25}NO_2$	360,19580
16	Carboxilação + Redução	$C_{26}H_{29}NO_3$	404,22202
17	<i>N</i> -oxidação + Metoxilação	$C_{27}H_{31}NO_3$	418,23767
18	<i>N</i> -oxidação + Epoxidação	$C_{26}H_{29}NO_2$	388,22710
19	Dihidroxilação + Metoxilação	$C_{27}H_{31}NO_4$	434,23258
20	<i>N</i> -desmetilação + Hidroxilação + <i>N</i> -oxidação	$C_{25}H_{27}NO_3$	390,20637
21	<i>N</i> -desmetilação + Carboxilação + Redução	$C_{25}H_{27}NO_3$	390,20637
22	<i>N</i> -desmetilação + Metoxilação + Hidroxilação	$C_{26}H_{29}NO_3$	404,22202
23	<i>N</i> -oxidação + Hidroxilação + Metoxilação	$C_{27}H_{31}NO_4$	434,23258

* A primeira linha da tabela corresponde ao tamoxifeno sem biotransformação.

** Adição de um grupo hidroxila para cada carbono nas posições 1 e 2.

Ao considerar todas as biotransformações descritas na Tabela 7.1 e as posições nas quais estas podem ocorrer têm-se os 37 metabólitos do TMX reportados na literatura para estudos em humanos (MAZZARINO *et al.*, 2013; LU *et al.*, 2014; SANCHEZ-SPITMAN *et al.*, 2019). Na Figura 7.20 encontram-se os cromatogramas extraídos de uma das replicatas dos tanques com peixes e tratados com TMX após 8 horas de

experimento para massas exatas correspondendo aos metabólitos 4OH-TMX (4-hidroxitamoxifeno), END (Endoxifeno) e NDM-TMX (*N*-desmetiltamoxifeno). Isto é, os cromatogramas dos íons precursoros m/z 388,22710 (A), m/z 374,21145 (B) e m/z 358,21654 (C). Os cromatogramas para estas biotransformações redentes aos CN e CP não apresentaram nenhum interferente frente aos resultados observados nas amostras, o que demonstra que o modelo ZWT teve êxito na produção de metabólitos do TMX. A presença de picos (destacados em azul) nos cromatogramas das amostras com o t_R atendendo a todos os critérios cromatográficos de confirmação para os metabólitos NDM-TMX, 4OH-TMX e END (Figura 7.20 A, B e C) indicam da presença destes metabólitos.



Na Figura 7.21 encontram-se as curvas de acumulação para cada um destes metabólitos e seus resultados obtidos por *Dilute and Shoot* com o intuito de analisar seu comportamento ao longo do experimento frente aos controles.

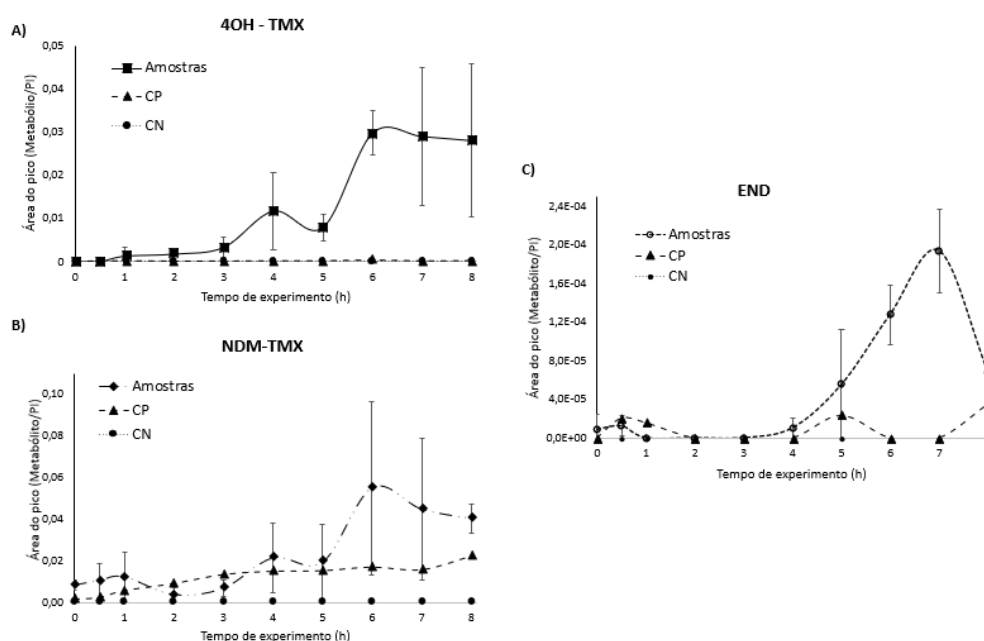


Figura 7.21. Curvas de acumulação ao longo do experimento para os metabólitos 4OH-TMX (A), NDM-TMX (B) e END (C) e os respectivos controles CP e CN.

Nas curvas da Figura 7.21, observa-se que o comportamento da curva associada ao CP para os metabólitos manteve-se estável e abaixo, em geral, do que foi obtido para amostras ao longo de todo o experimento. Assim sendo, a produção de metabólitos pelo modelo ZWT ocorreu a despeito da presença destes no medicamento utilizado para a administração do TMX. Os comportamentos observados indicam a conversão dos metabólitos 4OH-TMX (Figura 7.21 A) e NDM-TMX (Figura 7.21 B) no END (Figura 7.21 C) o que se encontra de acordo com o observado em humanos, apesar da falta de um órtologo da enzima CYP2D6 no *zebrafish*.

A Figura 7.22 apresenta os cromatogramas gerados extraíndo-se os m/z dos íons precursores correspondentes aos metabólitos dihidroxilados e produtos das combinações das biotransformações 12, 16 e 22 (A) e produtos de metoxilação com hidroxilação ou *N*-oxidação (B) e dihidroxilados na ligação dupla central da molécula (C). Os cromatogramas para estas biotransformações do CN e CP também não

apresentaram nenhum interferente frente aos resultados observados nas amostras, o que demonstra que o modelo ZWT teve êxito na produção de metabólitos do TMX.

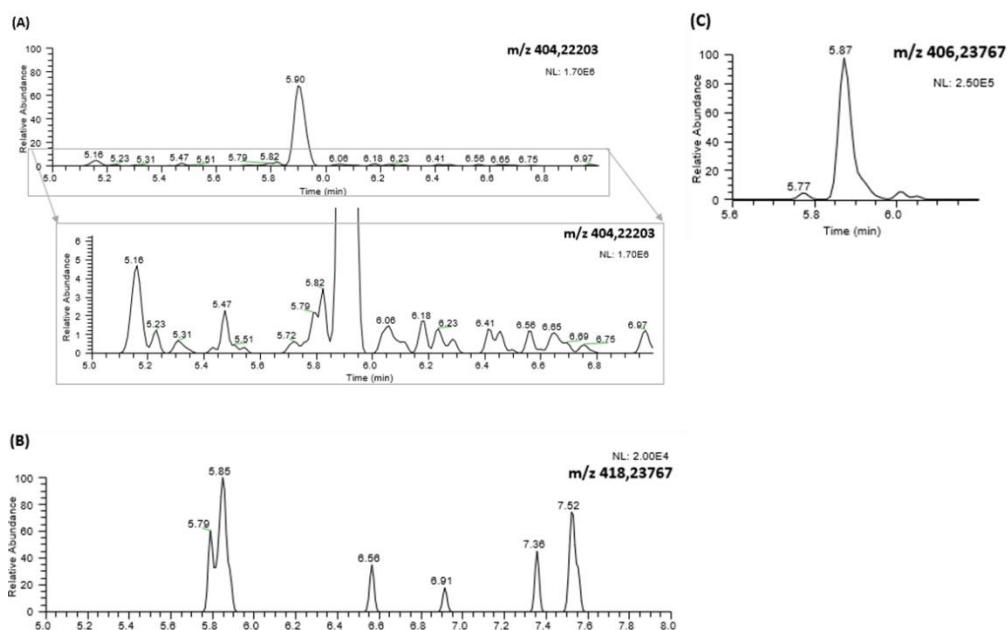


Figura 7.22. Cromatogramas extraídos por CLUE-EMAR com uma tolerância de 5 ppm de massa para metabólitos com m/z 404,22203 (A), m/z 418,23767 (B) e m/z 406,23767 (C) para a amostra e CP do ZWT após 8h

A ausência de picos nos cromatogramas correspondentes as outras biotransformações indicadas na Tabela 1 nas alíquotas de *Dilute and Shoot* para metabólitos de fase I indica três possíveis causas: (1) o uso de uma alíquota com um volume pequeno (90 μ L) não é adequado para detectar esses metabólitos, (2) esses metabólitos, no *zebrafish*, são observados apenas em sua forma conjugada e (3) não há a produção destes metabólitos pelo *zebrafish*. Tais suposições foram investigadas nas próximas etapas.

Tanto o fármaco quanto os metabólitos de fase I do TMX podem passar por um processo de conjugação pelas enzimas sulfotransferases (SULTs) e uridina-5'-difosfoglucuronosil-transferases (UGTs), formando metabólitos de fase II, sulfo e glico conjugados, respectivamente. No que tange ao *zebrafish*, um total de 45 genes foram identificados para as enzimas UGTs, os quais foram divididos em três famílias UGT1s, UGT2s e UGT5s, sendo as duas primeiras aquelas que apresentam maior similaridade

com mamíferos. A maioria das SULTs no *zebrafish* que foram clonados pertencem a família SULT1, a qual corresponde a maior família de SULTs em humanos (ANSELMO *et al.*, 2018; COLEMAN, 2020).

Na Figura 7.23 encontram-se os cromatogramas extraídos de uma das replicatas dos tanques com *zebrafish* e tratados com TMX após 8 horas de experimento para m/z esperadas para os metabólitos, após a conjugação com um grupamento ácido glicucurônico, correspondente aos *N*-desmetilados e hidroxilados (A), hidroxilados e produtos das biotransformações 7, 8, 13 e 18 da Tabela 1 (B), dihidroxilados e produtos das combinações das biotransformações 12, 16 e 22, (C) dihidroxilados na ligação dupla central da molécula (D) e *N*-desmetilados e dihidroxilados e produtos das biotransformações 20 e 21 (E). Nenhum pico foi observado no CN e CP na busca por metabólitos de fase II. Além disso, a verificação de picos referentes ao metabólitos de fase II ratificou a necessidade de um preparo de amostras para as alíquotas de 3 mL que incluísse etapas de hidrólise de forma a possibilitar a confirmação dos metabólitos de acordo com os critérios da espectrometria de massas.

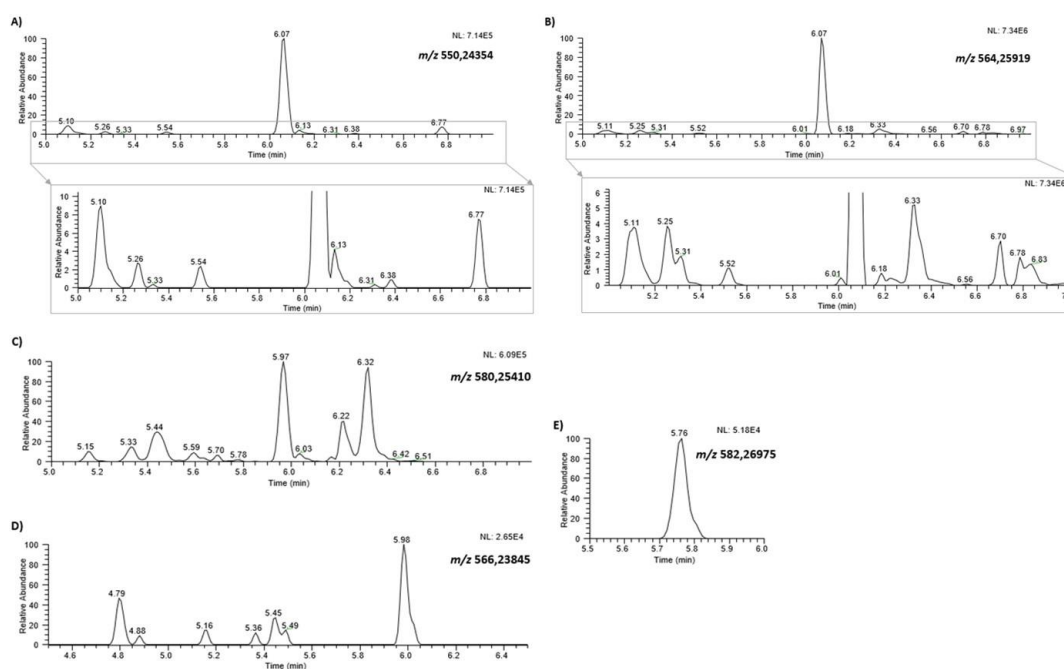


Figura 7.23. Cromatogramas extraídos por CLUE-EMAR com uma tolerância de 5 ppm de massa para metabólitos de fase II com m/z 550,24354 (A), m/z 564,25919 (B) e m/z 580,25410 (C), m/z 582,26975 e m/z 566,23845 (E) para a amostra do ZWT após 8h.

Esses resultados demonstram um perfil de metabolização extensivo para TMX, semelhante entre os humanos e o modelo ZWT.

7.g.3 Confirmação dos principais metabólitos do TMX

Após a análise preliminar, utilizando as amostras *Dilute and Shoot* no modo *Full Scan*, foram observados picos cromatográficos correspondentes as m/z e tempos de retenção de metabólitos cujos materiais de referência estavam disponíveis. Dessa forma, com intuito de confirmar a presença destes metabólitos de acordo com critérios, estabelecidos pela WADA, relacionados com a cromatografia e espectrometria de massas, foram realizadas uma segunda etapa de fragmentação (Full-Scan/ MS^2). A lista de inclusão para a realização desses experimentos foi construída fornecendo as massas protonadas dos metabólitos e as energias colisão determinadas após a análise do material de referência disponível, resultando na Tabela 7.2.

Tabela 7.2. Composição elementar, massa exata ($[M-H]^+$) e energia de colisão normalizada obtida na análise do material de referência do TMX e seus metabólitos.

Código	Substância/ Metabólito	Composição elementar (M)	m/z ($[M-H]^+$)	Energia de colisão (eV)	Tempo de retenção (t_R)*
TMX	Tamoxifeno	C ₂₆ H ₂₉ NO	372,23219	30	7,35
M1	<i>N</i> -desmetiltamoxifeno	C ₂₅ H ₂₇ NO	358,21654	25	7,36
M2a e M2b	(<i>E/Z</i>)-4-hidroxitamoxifeno	C ₂₆ H ₂₉ NO ₂	388,22710	30	6,61 e 6,77
M3a e M3b	(<i>E/Z</i>)- <i>N</i> -desmetil-4-hidroxitamoxifeno	C ₂₅ H ₂₇ NO ₂	374,21145	25	5,94 e 6,94
M4a e M4b	(<i>E/Z</i>)-3-hidroxi-4metoxitamoxifeno	C ₂₇ H ₃₁ NO ₃	418,23767	30	6,22 e 7,00
M5a e M5b	(<i>E/Z</i>)-4,4'-dihidroxi- <i>N</i> -desmetiltamoxifeno	C ₂₅ H ₂₇ NO ₃	390,20637	25	5,60 e 6,06
M6a e M6b	(<i>E/Z</i>)-4,4'-dihidroxitamoxifeno	C ₂₆ H ₂₉ NO ₃	404,22203	30	5,48 e 5,95
M7a e M7b	(<i>E/Z</i>)- <i>N,N'</i> -didesmetil-4-hidroxitamoxifeno	C ₂₄ H ₂₅ NO	360,19580	25	6,62 e 6,77

A busca por estes metabólitos foi feita nas três frações obtidas após o preparo envolvendo ELL (livre, glico conjugada e sulfo conjugada). Na Figura 7.24 encontra-se a imagem da planilha utilizada para comparar os resultados obtidos no material de

referência e das amostras de acordo com os critérios relacionados a cromatografia e a espectrometria de massas definidos pelo documento técnico IDCR.

Residue confirmation (by Relative Ion Intensities and RT)									
CONTROLE POSITIVO / POSITIVE CONTROL					AMOSTRA / SAMPLE				
Ions (m/z)				RT Mean	Ions (m/z)				RT Mean
RT (min)					RT (min)				
Area				FWHM (min)	Area				
Rel. Int.	100.00	0.00	0.00	1.000	Rel. Int.	100	0.00	0.00	
MAXIMUM TOLERANCE WINDOWS FOR RELATIVE ION INTENSITIES AND RT (± X%)					CONFORMITY CRITERIA				
Rel. Abund. (% of reference diagnostic ion)	EL-GC/MS; CI-GC/MS; GC/MS ⁿ ; LC/MS; LC/MS ⁿ	+/-	10	(absolute)	Ions (m/z)	Ref - X%	Amostra / Sample	Ref + X%	Conformity ^{4b}
> 50% to 100%		+/-	20%	(relative)	0	90.00	100.00	110.00	OK
>25% to 50% ⁽¹⁾		+/-	5	(absolute)	0	<1%	0.00	<1%	<1%, NOT OK
1% to 25% ⁽¹⁾		+/-	1.0%	or	0	<1%	0.00	<1%	<1%, NOT OK
RT (%) or (min) ^{(2),(3)}					RT				

⁽¹⁾ The diagnostic ions must always be detected in the Sample (S/N > 3:1)

⁽²⁾ The retention time RT(%) and RT(min). The greater one shall be used in the diagnostic

⁽³⁾ A maximum ΔRT is set at the FWHM of the reference peak in the positive control

^(4b) Only if all the conformity criteria are OK, the analyte is confirmed

WADA Technical Document - TD2021IDCR

Figura 7.24. Planilha utilizada para confirmação de metabólitos do TMX em comparação com o material de referência e de acordo com os critérios estabelecidos pela WADA.

Como foram realizados experimentos de fragmentação (*Full-Scan/MS²*), 3 íons produtos diagnósticos de cada metabólito/substância foram utilizados para o preenchimento da planilha (células verdes da planilha). Sendo possível confirmar a presença do TMX e 9 metabólitos nas amostras de água do ZWT. O TMX e seus metabólitos M1, M2a-b foram confirmados nas três frações (fração livre, fração glico conjugada e fração sulfo conjugada). Já os metabólitos M3a-b, M5a-b e M6b foram confirmados apenas na fração glico conjugada. Na Figura 7.25, encontram-se os espectros de fragmentação e a proposta de fragmentação e íons diagnóstico para os metabólitos identificados e confirmados nas amostras do modelo ZWT.

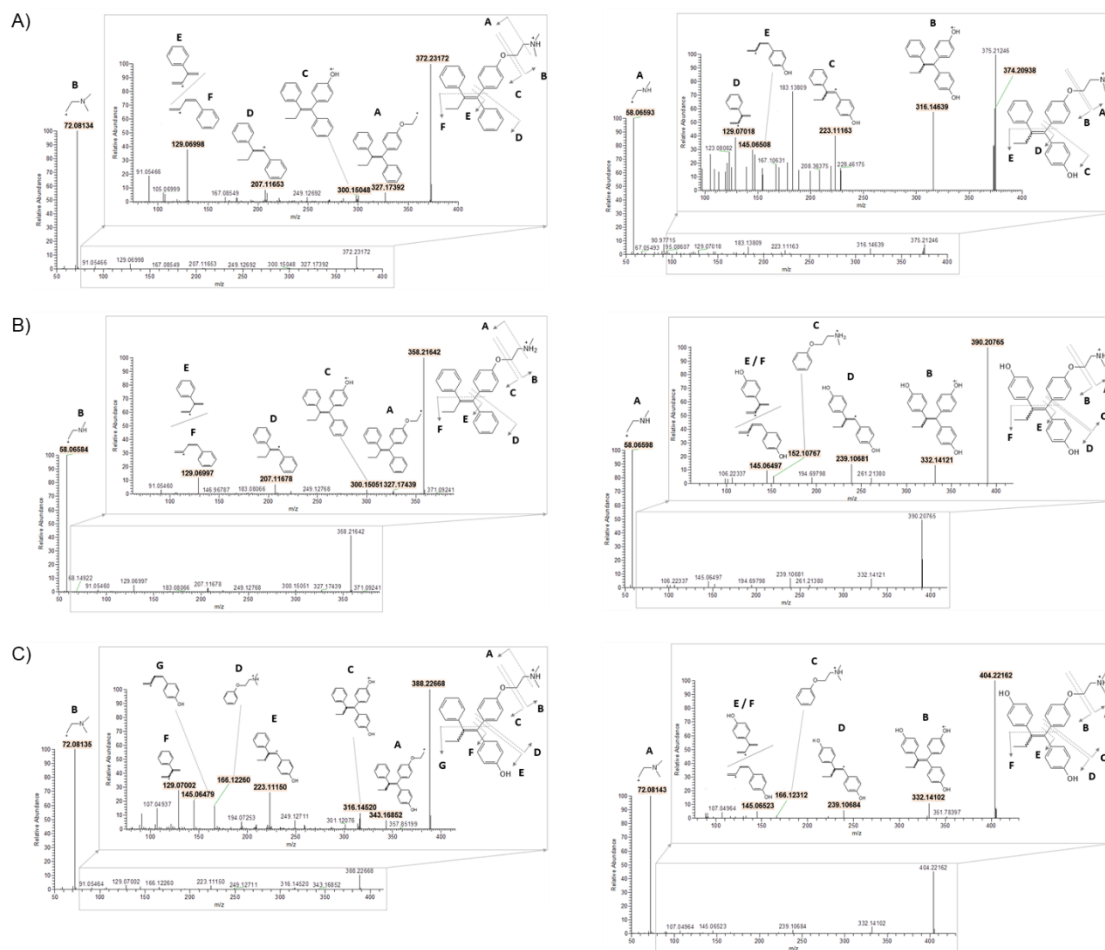


Figura 7.25. Espectros de massas obtidos por experimentos de fragmentação MS² para as substâncias/metabólitos: (A) Tamoxifeno, (B) *N*-desmetiltamoxifeno, (C) 4-hidroxitamoxifeno, (D) Endoxifeno, (E) 4,4'-dihidroxi-*N*-desmetiltamoxifeno e (F) 4,4'-dihidroxitamoxifeno nas amostras do modelo ZWT após 8h de experimento.

Apesar da falta de material de referência, o exame de outros potenciais metabólitos do TMX baseou-se na busca de vias típicas de biotransformação, que tenham associada uma alteração na fórmula molecular e seu correspondente deslocamento de massa em relação ao TMX (Tabela 3). Assim, além dos 9 metabólitos identificados com material de referência, 26 metabólitos foram encontrados nas amostras após 8h de experimento. Este grande número está alinhado com o que foi relatado na literatura para outros modelos, como humanos (23 metabólitos) e ratos (38 metabólitos) (DOMÍNGUEZ-ROMERO *et al.*, 2015; MAZZARINO *et al.*, 2013). Algumas das reações químicas propostas para as vias de biotransformação do TMX incluem hidroxilação em

diferentes posições, carboxilação, N-desmetilação, N-oxidação, metoxilação e combinações delas. Padrões primários seriam necessários para confirmação adicional da estrutura do metabólito.

Tabela 7.3. Metabólitos putativos do TMX encontrados nas amostras após 8h de experimento.

<i>m/z</i> teórico ([M-H] ⁺)	Nº de metabólitos	Modificação na fórmula	Composição elementar	<i>t_R</i> (min)	Erro (ppm)
374.21145	4	+O -CH ₂	C ₂₅ H ₂₇ NO ₂	5.46; 5.78; 6.45; 6.59	< 5ppm
388.22710	6	+O	C ₂₆ H ₂₉ NO ₂	5.70; 5.76; 5.89; 6.81; 7.42; 7.44	< 5ppm
390.20637	3	+O ₂ -CH ₂	C ₂₅ H ₂₇ NO ₃	4.62; 5.17; 5.92	< 5ppm
402.20637	3	+O ₂ -H ₂	C ₂₆ H ₂₇ NO ₃	5.39; 5.47; 6.41	< 5ppm
404.22203	10	+O ₂	C ₂₆ H ₂₉ NO ₃	4.62; 5.17; 5.62; 5.72; 5.79; 5.84; 6.03; 6.31; 6.39; 7.00	< 5ppm

7.g.4 Etilmorfina

7.g.4.a. Investigação da presença de metabólitos no padrão de referência de etilmorfina

Apesar da elevada pureza (99,5%) do padrão utilizado, a presença de possíveis metabólitos provenientes do padrão foi investigada. Preparou-se uma solução de 1 µg/mL em fase móvel A utilizando o padrão de referência da etilmorfina. Essa solução foi utilizada em uma infusão direta no espectrômetro de massas de alta resolução, sob 5 diferentes parâmetros da fonte. O espectro obtido indicou a presença do *m/z* correspondente aos metabólitos noretilmorfina e morfina em todas as 5 condições. Os sinais identificados no espectro apresentaram intensidades 1000 vezes mais baixas que a Etilmorfina, Figura 7.26.

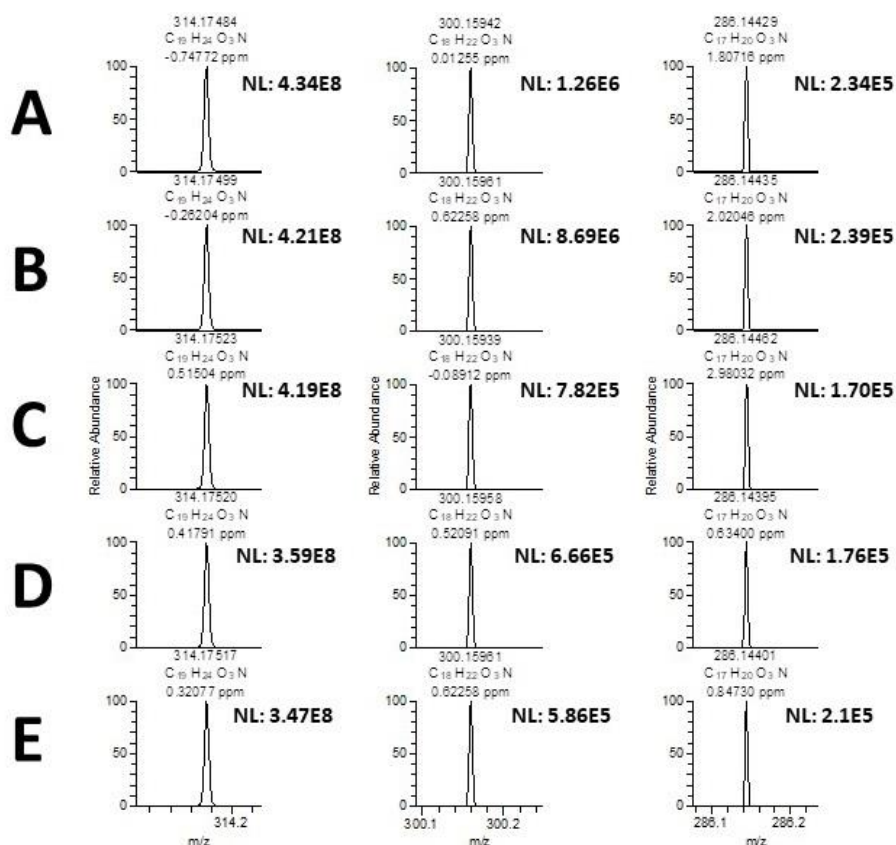


Figura 7.26. Sinais dos espectros obtidos nas infusões diretas do padrão de ETM sob 5 condições de injeção diferentes. Os m/z correspondem a ETM, MOR e nor-ETM.

7.g.4.b. Rendimento de extração

Para compreender melhor o comportamento de cada um dos analitos frente ao procedimento de preparo de amostra, foi realizado um teste de rendimento de extração usando padrões de referência. Os analitos de fase 1 tiveram uma recuperação entre 80 e 90%, enquanto os analitos da fase 2 tiveram recuperações mais baixas (Figura 7.26). Os metabólitos de fase 2 são conjugados com o ácido glicurônico, o que aumenta a polaridade das moléculas, isso proporciona uma maior afinidade com os solventes de extração e consequentemente uma menor recuperação destes glicoconjugados. A etilmorfina-6 β -glicuronídeo apresentou uma recuperação de 50% enquanto os glicuronídeos da morfina apresentaram uma recuperação consideravelmente menor, de 2% e 3%. Essa diferença de recuperação pode ser justificada pela ausência do grupamento etila nos glicoconjugados da morfina, uma vez que a hidroxila livre na

posição 3 ou 6 permite que mais ligações de hidrogênio possam ser feitas entre a molécula e o solvente de extração, tornando-a menos recuperável. A etilmorfina-6 β -glicuronídeo, por ter a posição 3 ocupada pelo grupamento etila, interage menos com o solvente, sendo recuperado em maiores quantidades.

Com o intuito de evitar perdas de analitos importantes de maior polaridade como os glicuronídeos, o uso do *Dilute and Shoot* em paralelo com o método de extração em fase sólida é justificado.

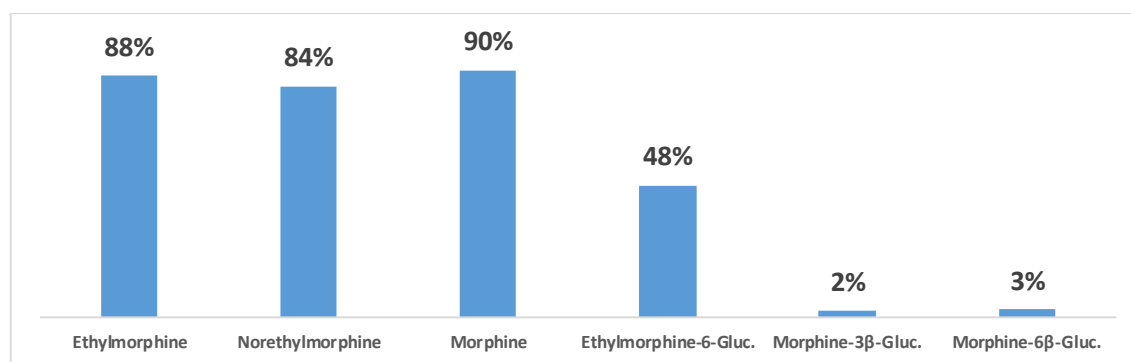


Figura 7.26. Rendimentos de extração dos padrões de referência analitos de fase 1 e fase 2 utilizando o procedimento de extração de fase sólida.

7.g.4.c. Avaliação da hidrólise indireta

Com intuito de verificar se o procedimento de hidrólise das amostras seria uma etapa necessária para a avaliação dos metabólitos nas amostras de ZWT, foi realizada uma investigação através da avaliação indireta dos metabólitos. Essa investigação abordou duas diferentes enzimas amplamente utilizadas em procedimentos de hidrólise, a enzima β -glucuronidase de *E. coli* e a enzima β -glucuronidase de *H. pomatia*.

Primeiramente, foi realizado um teste de rendimento de hidrólise utilizando padrões de referência para avaliar se as condições de hidrólise seriam suficientes. Os padrões utilizados para este teste foram etilmorfina-6 β -glicuronídeo e morfina-3 β -glicuronídeo. Os resultados apresentados na Figura 7.27 demonstram que as condições utilizadas para ambas as enzimas apresentaram condições de hidrólise suficientes para promover a hidrólise dos analitos glicoconjugados.

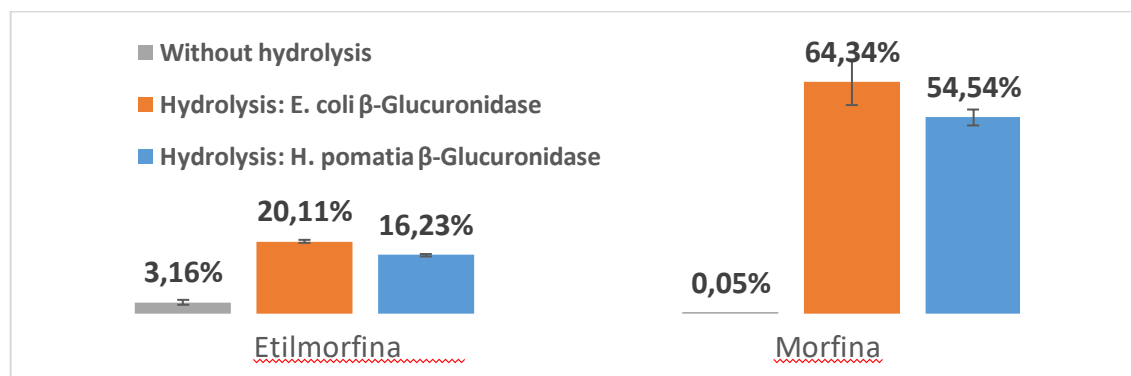


Figura 7.27. Rendimento de hidrólise das soluções preparadas a partir do padrão de referência de etilmorfina-6β-glicuronídeo e morfina-3β-glicuronídeo para as diferentes condições. Sem hidrólise (cinza); hidrólise utilizando β-glucuronidase de *E. coli* (laranja); hidrólise utilizando β-glucuronidase de *H. pomatia* (azul).

A partir dos resultados obtidos no rendimento de hidrólise, ambos os procedimentos de hidrólise foram utilizados em paralelo para a avaliação indireta dos analitos nas amostras de ZWT. Optou-se por utilizar ambas as enzimas, uma vez que a β-glucuronidase de *E. coli* é uma enzima mais específica que a β-glucuronidase de *H. pomatia*. Na Figura 7.28 é possível observar a concentração média estimada obtida para etilmorfina e seus metabólitos clássicos de fase 1 após aplicação dos diferentes procedimentos.

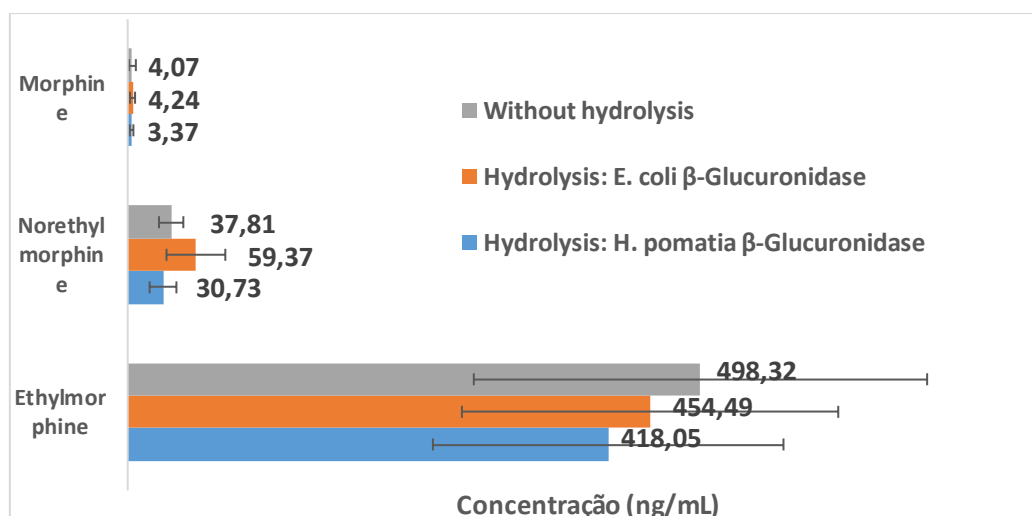


Figura 7.28. Comparação entre a concentração estimada dos analitos em relação aos diferentes procedimentos utilizados. Sem hidrólise (cinza); hidrólise utilizando β-glucuronidase de *E. coli* (laranja); hidrólise utilizando β-glicuronidase de *H. pomatia* (azul)

Um teste ANOVA foi realizado para comparar se há diferença significativa entre os 3 procedimentos experimentais (Tabela 4). No que se refere a comparação entre os métodos utilizados, o resultado do valor-p no teste ANOVA foi de 0,812, o valor de F obtido foi de 0,210 e o valor de F crítico foi de 3,554 (Tabela 5). Portanto, ao comparar os 3 procedimentos, uma vez que o valor de F é menor que o valor de F crítico, o teste ANOVA indica que não há diferença significativa entre os métodos com uma confiança de 95%. Além disso, como o valor-p obtido foi de 0,812, que é maior que o nível de significância estabelecido de 0,05. Dessa forma, entendeu-se que a etapa de hidrólise não seria uma etapa necessária para a análise dos metabólitos nas amostras de ZWT.

Tabela 7.4. Tabela base contendo as concentrações estimadas das réplicas obtidas nos diferentes métodos experimentais. Tabela utilizada para o teste ANOVA

Réplica	Tratamento	Sem Hidrólise	Hidrólise: E. coli	Hidrólise: H. pomatia
1	Etilmorfina	320,6412228	305,2686751	274,3098186
2	Etilmorfina	463,8375601	428,6124432	401,872912
3	Etilmorfina	710,4713022	629,5891302	577,9802967
1	Noretilmorfina	32,0428153	44,00265613	23,53068493
2	Noretilmorfina	50,040876	88,91070531	44,19619651
3	Noretilmorfina	31,34736479	45,18749912	24,45754772
1	Morfina	1,583753096	2,835847646	1,678408145
2	Morfina	3,184631239	3,134920337	3,584801296
3	Morfina	7,436322206	6,753749644	4,856802804

Tabela 7.5. Tabela resultante do teste ANOVA

ANOVA						
Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Amostra	1135270,463	2	567635,2316	56,85703145	1,66E-08	3,554557
Colunas	4195,884877	2	2097,942439	0,210139844	0,812431	3,554557
Interações	6830,788328	4	1707,697082	0,171051022	0,950372	2,927744
Dentro	179703,9681	18	9983,553785			
Total	1326001,105	26				

7.g.4.d. Triagem dos metabólitos por Full-MS

Para a investigação dos metabólitos, estes foram racionalizados com base nos metabólitos encontrados em outros modelos, incluindo humanos (VAN 'T KLOOSTER et al., 1992; XU et al., 1993, XU et al., 1995; AASMUNDSTAD et al., 1995; XU et al., 1997; JAKOBSSON et al., 2020; Cottril et al. 2021). A massa exata de metabólitos clássicos e metabólitos candidatos foi obtida usando o software Xcalibur 3.0 (Thermo Fisher Scientific). Os cromatogramas de íons de massa exata do modo full-scan (erro <5 ppm) foram analisados evidenciando a presença, ou não, dos metabólitos. A extração de cromatogramas usando a massa exata de analitos minimiza a interferência e aumenta a sensibilidade. A Tabela 6 mostra os picos cromatográficos encontrados para possíveis metabólitos de etilmorfina.

Tabela 7.6. Composição elemental, Massa teórica, Tempo de retenção e intensidade dos picos cromatográficos de metabólitos clássicos extraídos da aquisição Full-Scan.

Reação	Composição elemental	Massa teórica ([M+H]⁺)	Tempo de retenção (min)	Intensidade do pico (SPE/DS/sangue)
Etilmorfina	C ₁₉ H ₂₃ NO ₃	314.17507	6.10	10E8 /10E8 /10E5
Glicoconjugação	C ₂₅ H ₃₁ NO ₉	490.20716	-	-
N-desmetilação (Noretilmorfina)	C ₁₈ H ₂₁ NO ₃	300.15942	4.82 5.93	10E6 /10E5 / - 10E7 /10E5 /-
N-desmetilação + Glicoconjugação	C ₂₄ H ₂₉ NO ₉	476.19151	-	-
O-deetilação (Morfina)	C ₁₇ H ₁₉ NO ₃	286.14377	2.20	10E6 /10E4 /10E5
O-deetilação + Glicoconjugação	C ₂₃ H ₂₇ NO ₉	462.17586	1.41	10E4 /10E4 /10E4
N-desmetilação + O- deetilação (Normorfina)	C ₁₆ H ₁₇ NO ₃	272.12812	1.59	- / - / 10E3
N-desmetilação + O- deetilação + Glicoconjugação	C ₂₂ H ₂₅ NO ₉	448.16021	-	-

7.g.4.e. Identificação dos metabólitos clássicos da Etilmorfina

Após a triagem, Full-MS mostrou picos cromatográficos correspondentes às massas teóricas de 4 metabólitos encontrados em humanos (Noretilmorfina, Morfina, Morfina-3 β -Glucuronideo e Normorfina). O critério escolhido para identificar os metabólitos com padrão de referência foi o critério IDCR emitido pelo documento técnico da WADA. (TD2021IDCR). O pico cromatográfico correspondente à massa teórica da Normorfina foi encontrado apenas em amostras de sangue, com concentração muito baixa, não sendo possível proceder à sua identificação através dos critérios IDRC. Para a identificação dos demais metabólitos, além da comparação com o tempo de retenção do padrão de referência, é necessária a utilização do método CL-EM/EM para maior informação estrutural.

Os cromatogramas obtidos indicam a presença de 4 possíveis metabólitos (M1, M2, M3 e M4), além da substância original (m/z 314,17507 - Figura 29.A). Os picos dos padrões internos MOR-D3 e MOR-3 β -glicuronídeo-D3 (m/z 289,16260 e m/z 465,19469 - Figuras 29.C e 29.E) indicam através do tempo de retenção que M3 e M4 (m/z 286,14377 e m/z 462,17586 - Figuras 29.D e 29.F) são MOR e MOR-3 β -glicuronídeo, respectivamente. M1 e M2 têm o mesmo m/z da nor-ETM (m/z 300,15942 - Figura 29.B). Morfina-6 β -glicuronídeo e qualquer outro metabólito característico não foram encontrados nos cromatogramas de ZWT.

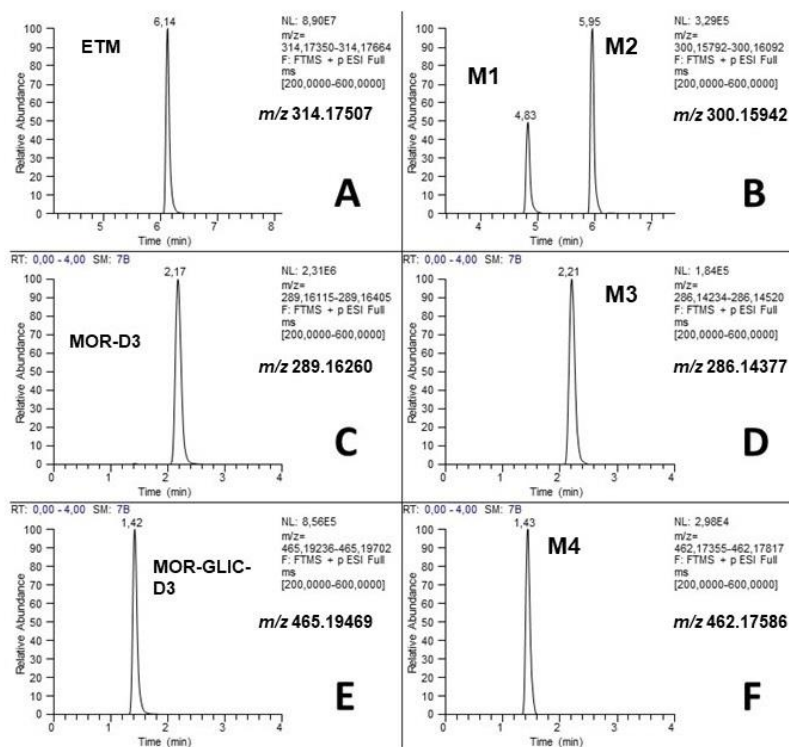


Figura 7.29. Cromatograma de amostras DS ZWT de m/z de metabólitos já descritos na literatura. Etilmorfina (A); M1 e M2 (B); IS: Morfina-D3 (C); M3 (D); IS: Morfina-3 β -Glucuronida-D3 (E); M4 (F).

A ausência de sinal no controle de qualidade negativo (Figura 7.30 A) indica que as substâncias detectadas não eram endógenas do animal. O controle de estabilidade indicou a presença de M1 (Figura 7.30 B). A amostra (Figura 7.30 C) contém M1 e M2 (pico principal). Os padrões de referência COD (Figura 7.30 D) e nor-ETM (Figura 7.30 E) mostram o mesmo tempo de retenção que M1 e M2, respectivamente. Esses dados indicam que M2 é nor-ETM e é produzido pelo metabolismo do zebrafish. Os tempos de retenção de nor-ETM, MOR, MOR-3B-Glic corresponderam aos tempos de retenção de seus respectivos padrões de referência, de acordo com os critérios do IDCR. Este estabelece que o tempo de retenção do pico cromatográfico do analito não pode variar mais de 0,1 min de uma amostra de referência. Além disso, os espectros de PRM (EM/EM²) obtidos dos picos da amostra correspondem aos espectros obtidos dos padrões de referência (Figura 7.31).

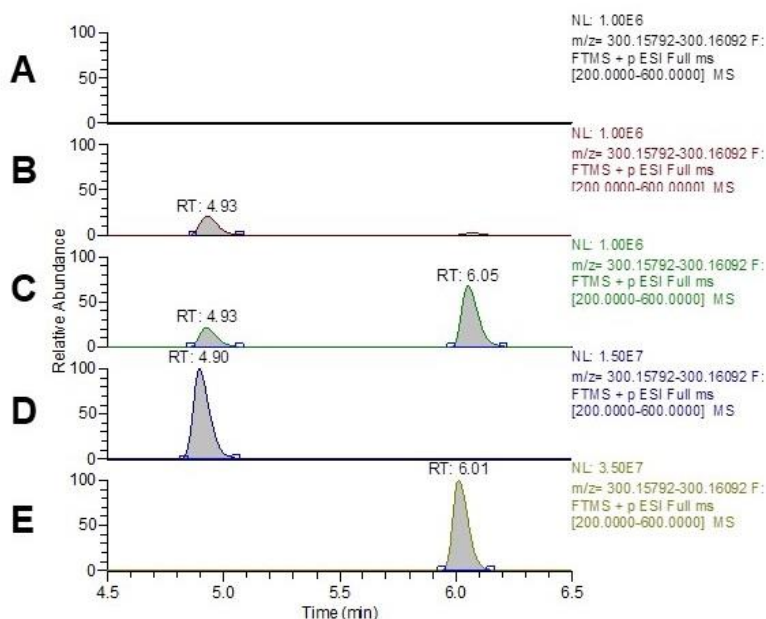


Figura 7.30. Comparação do tempo de retenção de M1 e M2 com controles negativos e com padrões de referência. NQC com peixe/sem substância (A); Controle negativo sem peixe/com ETM (B); amostra ZWT (C); padrão de referência COD (D); padrão de referência nor-ETM (E).

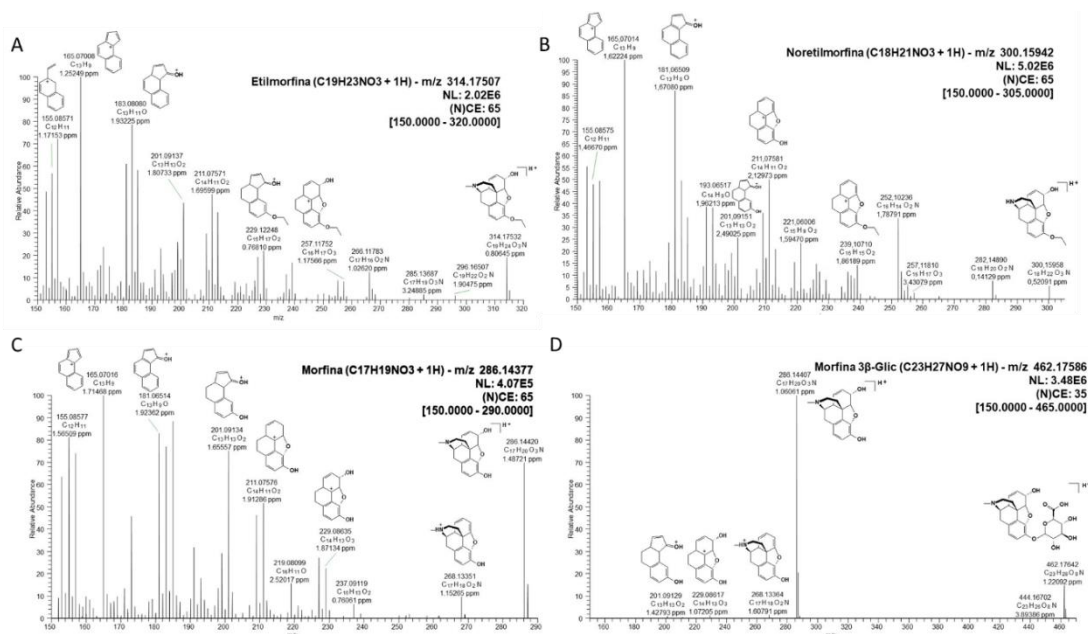


Figura 7.31. Espectros obtidos dos padrões de referência para ETM (A), nor-ETM (B), MOR (C) e MOR-3β-glic (D).

A Tabela 7.7 indica os principais fragmentos descritos na literatura foram identificados para cada analito, e uma proposta de fragmentação foi estabelecida para os espectros de cada analito. Como esperado, o pico de base encontrado no EM/EM² de ETM foi o fragmento m/z 165,0701, além deste, outros fragmentos característicos foram m/z 257,1175; m/z 229,1225; m/z 183,0808 e m/z 155,0857. Para nor-ETM, obteve-se como pico base o fragmento m/z 165,0701, além dos fragmentos característicos m/z 239,1071; m/z 211,0758; m/z 201,0915 e m/z 181,0651. MOR EM/EM² também apresentou o fragmento m/z 165,0702 como pico de base, além de fragmentos característicos como m/z 229,0863; m/z 211,0758; m/z 201,0913; m/z 181,0651. MOR-3 β -glicuronídeo apresentou um espectro de fragmentação com um pico de base de m/z 286,1441; além dos fragmentos característicos m/z 268,1335; m/z 229,0863; e m/z 201,0913. Apesar de ser descrito na literatura para MOR-3 β -glicuronídeo, o fragmento m/z 165,0702 não pôde ser observado, devido ao uso de uma energia de colisão normalizada menor.

Tabela 7.7. Fragmentos característicos descritos pela literatura para cada analito

	Íon precursor (Teórico)	Fragmento 1 (Experimental)	Fragmento 2 (Experimental)	Fragmento 3 (Experimental)	Fragmento 4 (Experimental)	Fragmento 5 (Experimental)
Etilmorfina	314.17507	165.0691	229.12213	257.11703	183.0797	155.0554
Noretilmorfina	300.15942	165.0697	229.1221	239.1064	181.0646	211.0752
Morfina	286.14377	165.00	229.0861	201.09094	181.0638	211
Morfina-3-Glic	462.17586	165.10	286.15	268	201	
Etilmorfina-D5	319.20645	-	-	-	-	-
Morfina-D3	289.16260	165.05	201			
Morf-3-Glic-D3	462.17586	289.15				

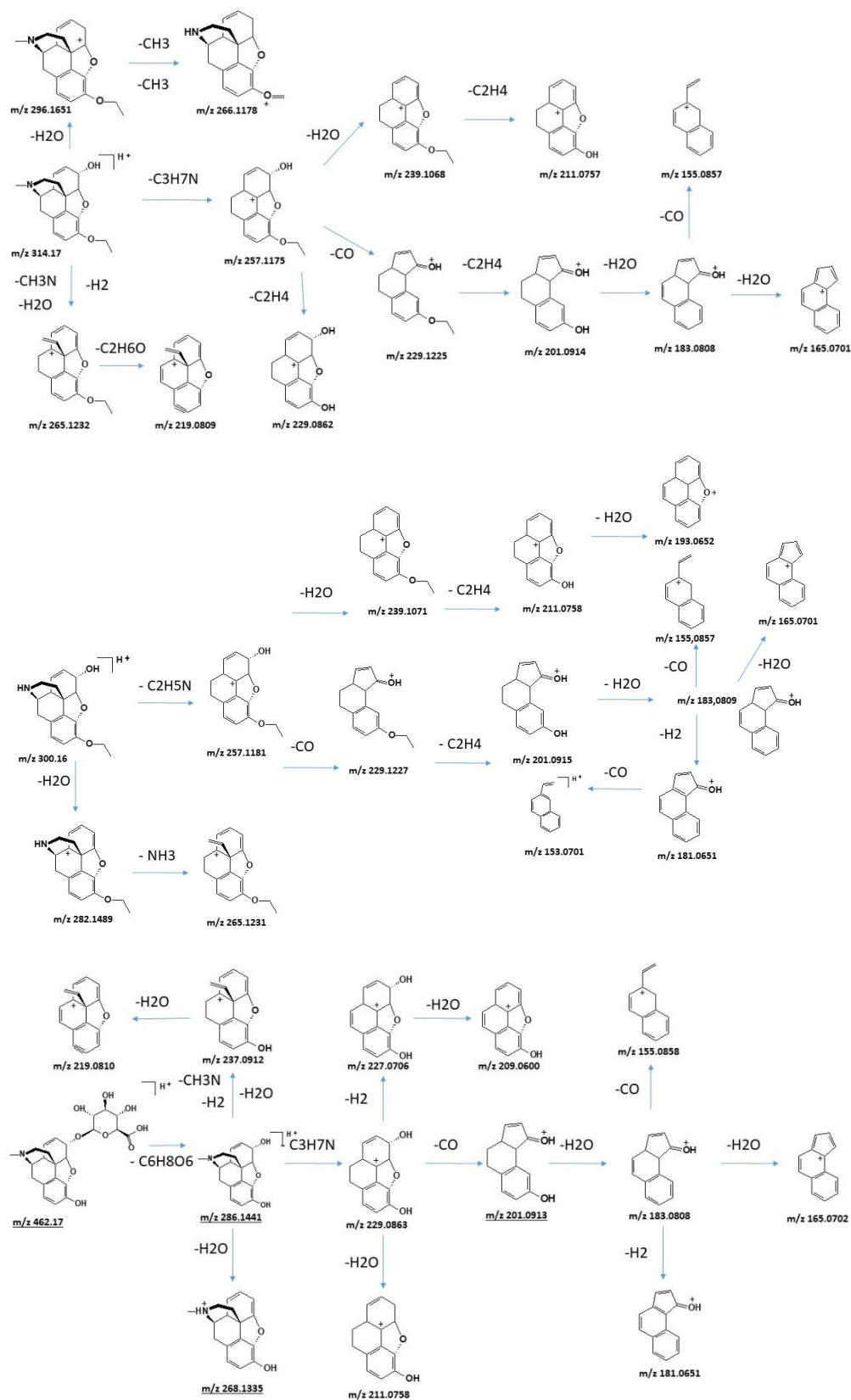


Figura 7.32. Propostas de fragmentação para ETM, nor-ETM, MOR. MOR-3β-glic.

Como pode ser observado na Figura 7.32, os analitos compartilham fragmentos comuns entre si, uma vez que seu esqueleto de carbono permanece o mesmo, com a perda de seus diferentes grupos periféricos principalmente.

O critério IDCR estabelece que, ao utilizar técnicas multiestágio, pelo menos 2 íons diagnósticos devem ser utilizados; a relação sinal-ruído deve ser maior que 3:1; a abundância de íons diagnósticos deve ser calculada integrando a área do pico no cromatograma filtrado pelo íon diagnóstico; o íon diagnóstico mais abundante deve ser o íon de referência para calcular a abundância relativa (AR); o íon diagnóstico de referência do controle positivo deve ser o mesmo para a amostra, mesmo que não seja o íon mais abundante da amostra; a AR deve ser calculado pela razão entre o íon diagnóstico com o íon diagnóstico de referência; a AR não deve diferir dos intervalos determinados no documento (TD2021IDCR).

Para nor-ETM, os íons diagnósticos escolhidos para caracterização foram m/z 165,0701 como íons diagnósticos de referência, m/z 181,0651 e m/z 252,1021. Embora o íon m/z 252,1021 não seja um dos principais íons descritos para nor-ETM, este é um íon diferente entre o espectro desta molécula e o da codeína, seu isômero (dados não mostrados). As AR obtidas de cada fragmento para o controle positivo foram 100%, 78,56% e 29,64%, respectivamente, enquanto para a amostra foram 100%, 78,88% e 29,25%, respectivamente, concordando com os valores de aceitação para IDCR. Os mesmos critérios foram aplicados para MOR, MOR-3 β -Glic e codeína, todos preencheram os critérios.

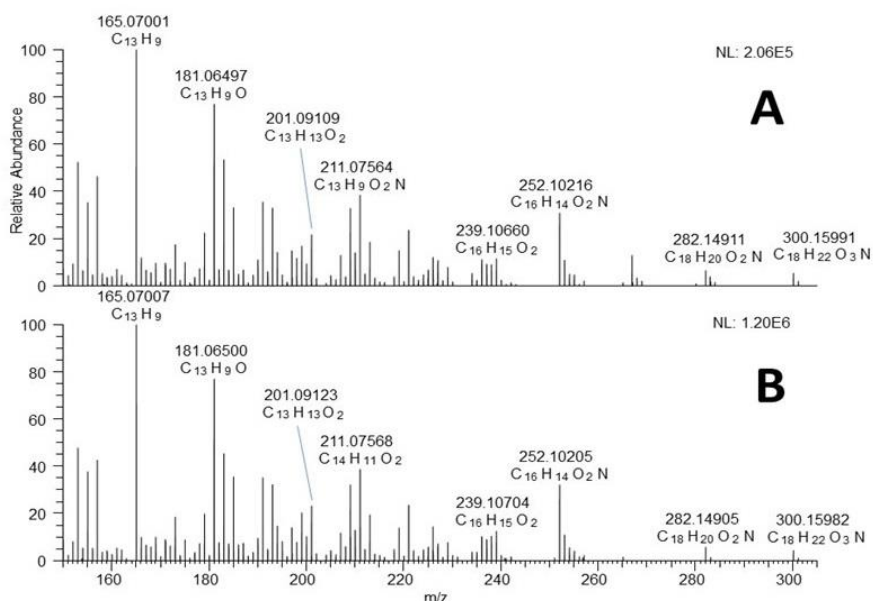


Figura 7.33. Comparação dos espectros MS/MS² de nor-ETM (A) com seu respectivo padrão de referência (B).

Tabela 7.8. Informações obtidas para cada um dos analitos.

Analito	Padrão Interno	Íon precursor (m/z) Massa teórica [M+H] ⁺	(N)CE	Íon produto (m/z) Experimental [M+H] ⁺	Erro (ppm)	Composição elementar	Tempo de Retenção
Etilmorfina	Etilmorfina-D5	314.17507	65	257.1175	1.17566	C ₁₆ H ₁₆ O ₃ + H ⁺	6.10
				229.1225	0.76810	C ₁₅ H ₁₆ O ₂ + H ⁺	
				183.0808	1.93225	C ₁₃ H ₁₀ O + H ⁺	
				165.0701	1.25249	C ₁₃ H ₈ + H ⁺	
				155.0857	1.17153	C ₁₂ H ₁₀ + H ⁺	
Noretilmorfina	Etilmorfina-D5	300.15942	65	239.1071	1.86189	C ₁₆ H ₁₄ O ₂ + H ⁺	5.93
				211.0758	2.12973	C ₁₄ H ₁₀ O ₂ + H ⁺	
				201.0915	2.49025	C ₁₃ H ₁₂ O ₂ + H ⁺	
				181.0651	1.67080	C ₁₃ H ₈ O + H ⁺	
				165.0701	1.62224	C ₁₃ H ₈ + H ⁺	
Morfina	Morfina-D3	286.14377	65	229.0863	1.87134	C ₁₄ H ₁₂ O ₃ + H ⁺	2.20
				211.0758	1.91286	C ₁₄ H ₁₀ O ₂ + H ⁺	
				201.0913	1.65557	C ₁₃ H ₁₂ O ₂ + H ⁺	
				181.0651	1.92362	C ₁₃ H ₈ O + H ⁺	
				165.0702	1.71468	C ₁₃ H ₈ + H ⁺	
Morfina-3β-Glucuronideo	Morfina-3β-Glucuronideo-D3	462.17586	35	286.1441	1.06061	C ₁₇ H ₁₉ NO ₃ + H ⁺	1.41
				268.1335	1.60791	C ₁₇ H ₁₇ NO ₂ + H ⁺	
				229.0863	1.07205	C ₁₄ H ₁₂ O ₃ + H ⁺	
				201.0913	1.42793	C ₁₃ H ₁₂ O ₂ + H ⁺	
Etilmorfina-D5	-	319.20645	65	262.1493	2.73832	C ₁₆ H ₁₁ D ₅ O ₃ + H ⁺	6.10
				234.1539	0.96238	C ₁₅ H ₁₁ D ₅ O ₂ + H ⁺	
				165.0701	1.43736	C ₁₃ H ₈ + H ⁺	
Morfina-D3	-	289.16260	65	271.1524	1.36158	C ₁₇ H ₁₄ D ₃ NO ₂ + H ⁺	2.17
				201.0912	1.12441	C ₁₃ H ₁₂ O ₂ + H ⁺	
				165.0701	1.25249	C ₁₃ H ₈ + H ⁺	
Morfina-3β-Glucuronideo-D3	-	465.19469	35	289.1627	0.51872	C ₁₇ H ₁₆ D ₃ NO ₃ + H ⁺	1.42
				271.1523	1.13648	C ₁₇ H ₁₄ D ₃ NO ₂ + H ⁺	
				201.0911	0.36561	C ₁₃ H ₁₂ O ₂ + H ⁺	

7.g.4.f Perfil metabólico de Etilmorfina

Uma forma de avaliar a cinética de formação e excreção de metabólitos ao longo do tempo é através das curvas de bioacumulação. A curva de bioacumulação é obtida traçando a concentração dos metabólitos em relação ao tempo do experimento. A concentração dos metabólitos é obtida pela relação entre a razão do analito com o padrão interno de um controle positivo desse metabólito e a razão do analito para o padrão interno da amostra.

As curvas de bioacumulação para os metabólitos clássicos identificados foram feitas para alíquotas extraídas de DS e SPE (Figura 7.22). Uma vez que o experimento foi realizado em triplicata, a concentração utilizada para preparar a curva de bioacumulação foi a concentração média das réplicas. Os metabólitos encontrados no tanque tratado não foram encontrados no NQC, indicando que não são substâncias endógenas do peixe. No entanto, alguns desses metabólitos foram encontrados em SC em intensidades constantes do ponto 0 até o final do experimento (dados não mostrados), o que indica uma impureza do padrão de referência de etilmorfina utilizado na administração. Dessa forma, a curva de bioacumulação foi elaborada descontando-se a área obtida no ponto 0 do experimento, descontando-se assim estes interferentes.

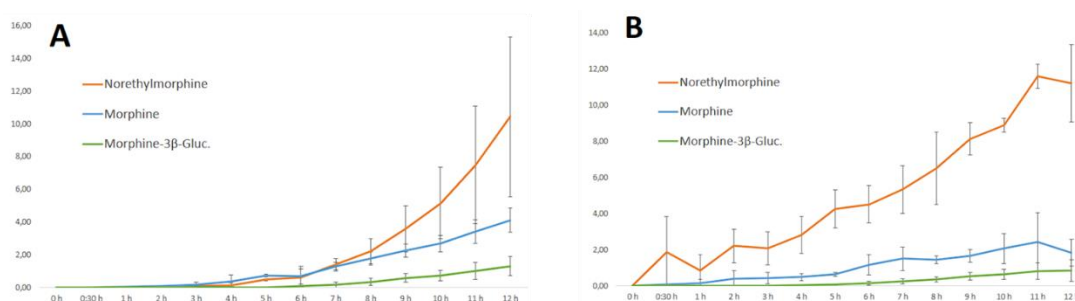


Figura 7.34. (A) curva de bioacumulação para alíquotas de DS; (B) curva de bioacumulação para alíquotas de SPE.

Através da curva de bioacumulação do DS, é possível visualizar a presença de metabólitos de fase 1 após 3 horas de experimento, enquanto o MOR-3β-glicuronídeo pode ser visualizado após 7 horas. Na curva de bioacumulação de SPE, é possível

identificar mais precocemente os metabólitos da fase 1, devido à capacidade de concentração do processo de extração e, assim, permitir a identificação dos picos cromatográficos dos analitos. O MOR-3 β -glicuronídeo é visualizado novamente após 7 horas de experimento. Ambas as curvas de bioacumulação mostraram uma tendência de aumento da concentração de metabólitos até o final do período de 12h do experimento, indicando que experimentos mais longos permitiriam o acúmulo de ainda mais metabólitos.

Curiosamente, apesar da alta similaridade nas vias metabólicas com humanos, a literatura ainda não identificou um ortólogo para a subfamília enzimática humana CYP2D para o zebrafish (ANSELMO *et al.*, 2018; LOERRACHER; BRAUNBECK, 2021). CYP 2D6 é uma importante enzima humana para O-deetilação de ETM para MOR. Uma limitação do modelo ZWT levantada por Sardela *et al.* é a falta de um ortólogo humano CYP2 no zebrafish, portanto este estudo trará esclarecimentos sobre esta limitação (SARDELA *et al.*, 2018). Apesar dessas limitações levantadas para o modelo zebrafish, MOR foi um dos principais metabólitos produzidos pelo modelo ZWT. Esse resultado indica que, apesar da falta de um homólogo para a família CYP2D, o modelo é capaz de produzir metabólitos dessa via metabólica. É possível que enzimas de outras famílias CYP atuem para promover a O-deetilação.

Em humanos, a glicoconjugação da etilmorfina é a principal via metabólica, consistindo em 28 a 53% da dose, enquanto a segunda via metabólica mais importante é a produção de morfina e seus glicuronídeos, compreendendo cerca de 15% da dose. A rota metabólica para a produção de noretilmorfina e seu glicuronídeo correspondeu a 9%. Finalmente, a formação de Normorfina após N-desmetilação e O-desetilação correspondeu a 2-5% da dose (AASMUNDSTAD *et al.*, 1995). Por outro lado, um estudo *in vitro* realizado com hepatócitos em ratos mostrou uma maior tendência de metabolização pela via da N-desmetilação em comparação com a via da O-desetilação. Neste estudo, cerca de 45% da dose de ETM foi convertida em nor-ETM, enquanto aproximadamente 10% foram convertidos em MOR e 7% em MOR-3 β -Glic, no ponto de maior concentração desses analitos (XU *et al.*, 1993).

A Figura 7.38 mostra uma comparação da produção de cada metabólito entre as diferentes matrizes obtidas ao final do experimento. Assim como no modelo de hepatócitos em ratos, não foram encontrados 6-glicuronídeos para MOR, nem-ETM ou

ETM, embora o ETM-6 β -glicuronídeo seja um dos principais metabólitos descritos na literatura. Este resultado sugere que, assim como os ratos, o zebrafish pode ter limitações de glicuronidação nesta posição. Comparando as diferentes matrizes do modelo ZWT, observa-se uma maior predominância da via metabólica via *N*-desmetilação, sendo a nor-ETM mais comumente encontrada na água do aquário. Os níveis de morfina encontrados no sangue e os obtidos por ZWT são equivalentes, bem como para morfina-3 β -glicuronídeo. Esse maior destaque para a produção de nor-ETM pelo zebrafish é semelhante ao perfil do modelo usando ratos, porém é possível que essa menor produção de MOR seja devido à falta de um CYP especializado em *O*-deetilação como o CYP2D presente em ratos e humanos.

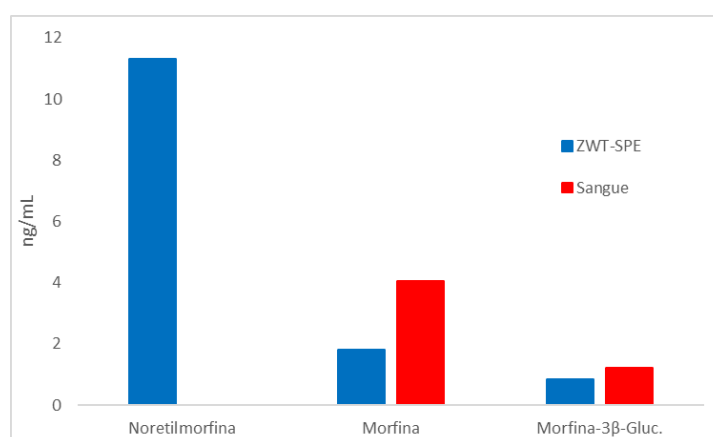


Figura 7.38. Concentração dos diferentes metabólitos clássicos (nor-ETM, MOR e MOR-3B-Gluc.) em cada uma das matrizes utilizadas ao final do experimento pelo modelo ZWT.

7.g.4.g Análise comparativa entre DDA e SWATH-type DIA

A aquisição sem alvo específico (*untargeted*) é uma ferramenta interessante para a investigação metabolômica. Por esta razão, foram comparados dois experimentos de espectrometria de massa de alto uso para aquisição *untargeted*. A *Data dependent analysis* (DDA) sofre de baixa reprodutibilidade e favorece a seleção de íons mais abundantes que podem ser biologicamente irrelevantes (HILAIRE et al., 2020). A *Data independent analysis for sequential window acquisition of all theoretical fragment-ion spectra* (SWATH-type DIA) é um experimento alternativo ao DDA. SWATH-type DIA

utiliza janelas de isolamento amplas e consecutivas, geralmente entre 10 e 50 Da, mas isso pode levar à perda da relação entre o íon precursor e os fragmentos pelas bandas largas (HILAIRE et al., 2020). PRM (análise com alvo específico) foi usado como espectro de referência para comparação de experimentos não direcionados.

Para realizar a comparação entre os métodos de aquisição, as amostras do ZWT foram injetadas no LC-HRMS e adquiridas nos três diferentes modos de aquisição. Os analitos usados para esta comparação foram os dois metabólitos previamente identificados, nor-ETM e MOR. Como nor-ETM está presente em maior concentração na amostra, enquanto MOR está presente em menor concentração, a comparação dos métodos de aquisição abrange ambos os níveis.

A avaliação do MOR (Figura 7.39) demonstrou que todos os três métodos de aquisição foram capazes de identificar os 5 fragmentos característicos da MOR. Não foi possível observar o íon pseudomolecular (IPM) no *SWATH-type* DIA (Figura 7.39 C). A intensidade dos fragmentos obtidos no *SWATH-type* DIA foi ainda maior do que os obtidos pelo PRM (Figura 7.39 A), porém, como a fragmentação desse método é feita em blocos e um dos padrões internos é o MOR-D3, que possui um TR muito semelhante, os fragmentos obtidos podem vir tanto da MOR quanto do MOR-D3. Por outro lado, o DDA (Figura 7.39 B) apresentou níveis semelhantes ao PRM e até mesmo o IPM.

Novamente, os três métodos de aquisição foram capazes de identificar os 5 fragmentos característicos, agora para nor-ETM (Figura 7.40). Embora novamente o IPM não tenha sido observado, as intensidades dos fragmentos obtidos no *SWATH-type* DIA (Figura 7.40 C) foram maiores quando comparadas ao DDA (Figura 7.40 B), indicando uma maior sensibilidade deste método. As intensidades do *SWATH-type* DIA e do PRM (Figura 7.40 A) foram semelhantes entre si, uma vez que não há coeluição com uma substância de estrutura semelhante como no caso da MOR. Apesar da menor sensibilidade, o DDA apresentou novamente o IPM e menos fragmentos interferentes, indicando maior seletividade.

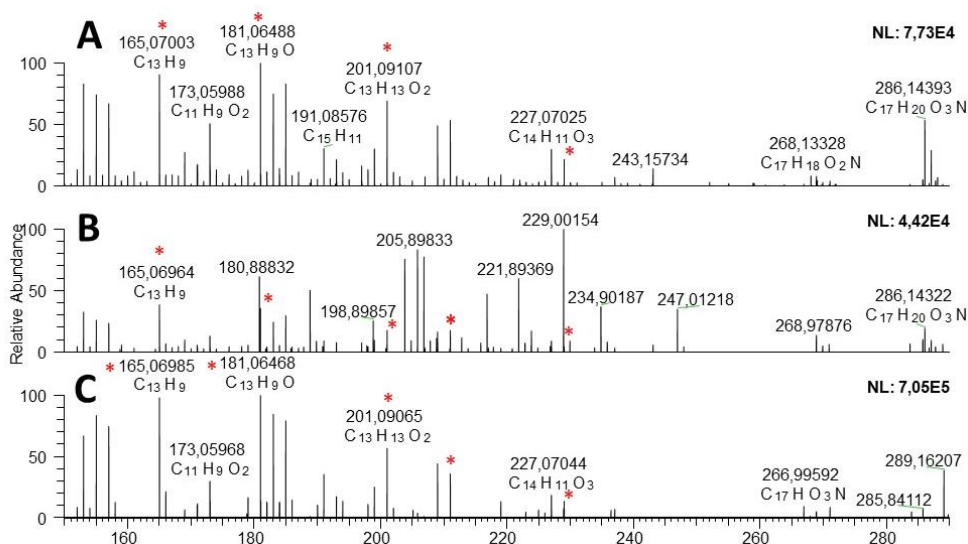


Figura 7.39. Comparação entre espectros obtidos com PRM, DDA e *SWATH-type* DIA para Morfina em amostras de ZWT. (A) PMR; (B) DDA; (C) DIA.

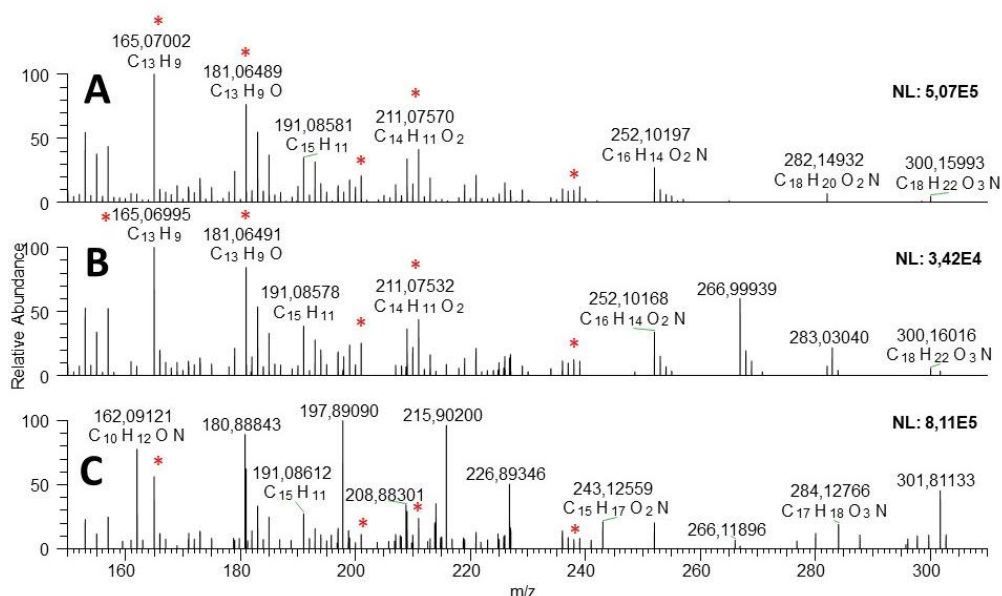


Figura 7.40. Comparação entre espectros obtidos com PRM, DDA e *SWATH-type* DIA para Noretilmorfina em amostras de ZWT. (A) PMR; (B) DDA; (C) DIA.

Além das questões mencionadas anteriormente, é possível observar as diferenças de sensibilidade do método *SWATH-type* DIA em relação ao DDA para as condições utilizadas neste trabalho, ao observarmos a diferença no número de pontos de aquisição entre os métodos. Nas Figuras 7.41 e 7.42 é possível observar o número de pontos de

aquisição dos determinados m/z filtrados para o tempo de retenção da MOR nos cromatogramas dos 3 diferentes métodos de aquisição utilizados no trabalho.

Na Figura 7.41, os cromatogramas estão sendo filtrados pelo m/z de 286.14377, o qual é correspondente à massa teórica do íon pseudomolecular da MOR. Pode-se observar uma maioridade de pontos de aquisição (Figura 7.41 A; 14 pontos) para o *SWATH-type* DIA frente ao DDA (Figura 7.41 B; 2 pontos), além da maior intensidade dos sinais. Isto se deve ao fato do *SWATH-type* DIA realizar fragmentações em blocos de faixas de massa, sendo mais rápido, enquanto o DDA realiza um primeiro scan para determinar os íons que serão selecionados e levados para fragmentação, então só após um segundo scan esses íons são levados para a célula de colisão para fragmentar e ser adquirido. Considerando que os parâmetros dos métodos estão pareados para que seja feita essa comparação de forma nivelada, ou seja os métodos não estão otimizados para o seu máximo desempenho, é possível observar uma grande discrepância no tempo de aquisição dos íons, de forma que o DDA leva aproximadamente 0.2 min. Quando comparado ao PRM (Figura 7.41 C; 7 pontos), o *SWATH-type* DIA também apresentou maior número de pontos de aquisição, porém a intensidade dos sinais foi menor que o PRM.

Agora, ao observar a Figura 7.42, onde os cromatogramas estão sendo filtrados pelo m/z de 165.0702, o qual é um dos fragmentos característicos mais abundantes obtidos na fragmentação da MOR, observa-se um número ainda maior de aquisições por parte do *SWATH-type* DIA (Figura 7.42 A; 25 pontos) quando comparado ao DDA (Figura 7.42 B; 2 pontos) e ao PRM (Figura 7.42 C; 7 pontos). Neste caso, até mesmo a intensidade dos sinais é maior para o *SWATH-type* DIA. Estes resultados reforçam a maior sensibilidade por parte do *SWATH-type* DIA, este que é um parâmetro fundamental para as análises de metabolômica, uma vez que moléculas investigadas por esta abordagem podem estar em baixíssimas concentrações.

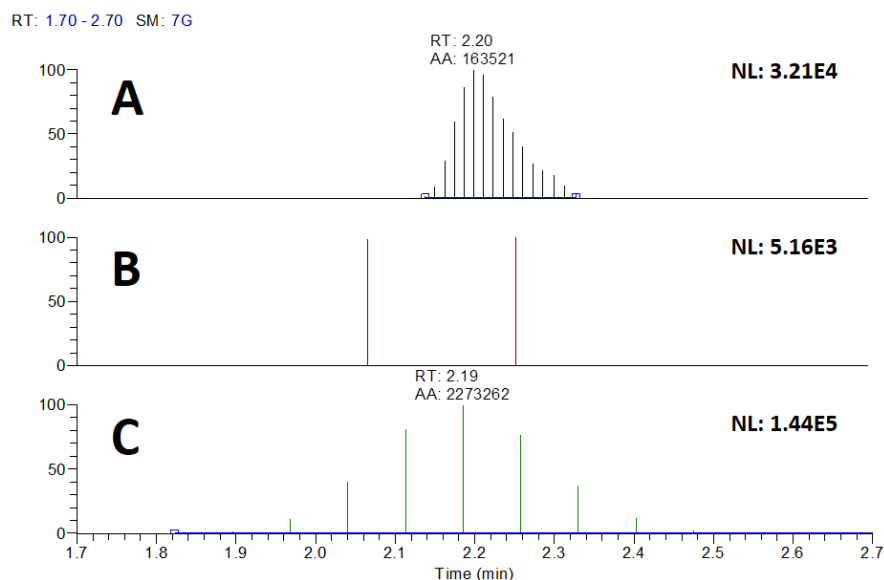


Figura 7.41. Pontos de aquisição dos cromatogramas dos 3 diferentes métodos de aquisição filtrado para o m/z de 286.14377. (A) SWATH-type DIA; (B) DDA; (C) PRM.

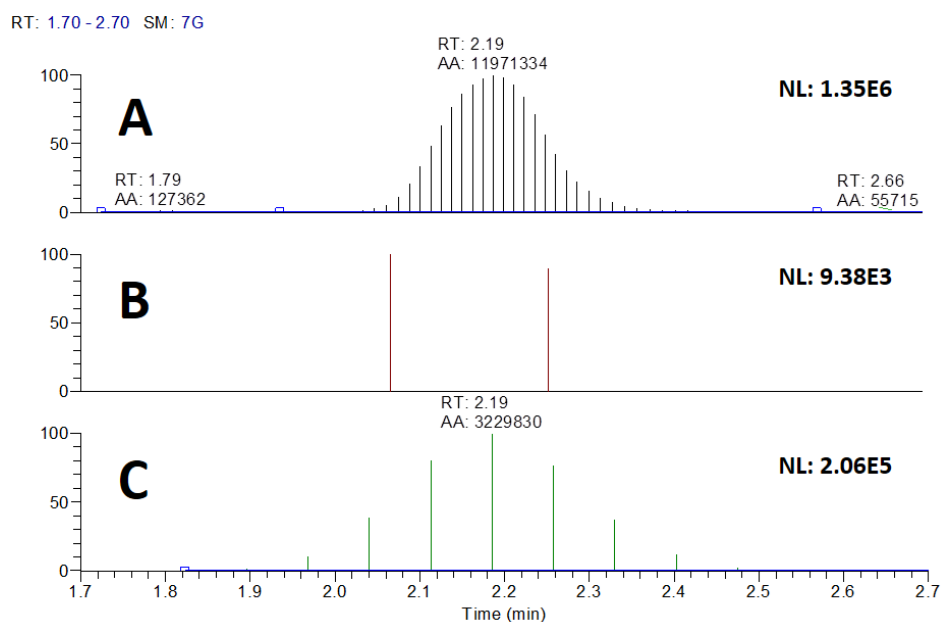


Figura 7.42. Pontos de aquisição dos cromatogramas dos 3 diferentes métodos de aquisição filtrado para o m/z de 165.0702. (A) SWATH-type DIA; (B) DDA; (C) PRM.

7.g.4.h Análise por metabolômica

A abordagem metabolômica foi escolhida para determinar possíveis novos metabólitos candidatos e novos alvos analíticos capazes de sugerir o uso de etilmorfina. Para isso, foram utilizadas duas abordagens diferentes, uma análise supervisionada e outra não supervisionada. Para a realização das análises metabolômicas, optou-se por utilizar os arquivos das amostras de ZWT obtidos a partir do método de aquisição *SWATH-type* DIA uma vez que, devido a maior sensibilidade deste método, estes arquivos possivelmente preservariam maiores informações que o DDA. Apesar disto o DDA foi utilizado de forma complementar devido sua maior seletividade, como uma segunda análise.

O PCA permitiu avaliar uma diferenciação entre as amostras de ZWT tratadas e as amostras do CQN, apresentando um modelo que representa 78,5% (componente principal 1 + componente principal 2) da informação do conjunto de dados. O gráfico de pontuação PCA (Figura 7.43) permitiu uma observação visual da distribuição das amostras, em que amostras próximas umas das outras podem ser quimicamente semelhantes e amostras distantes umas das outras podem ser diferentes. Portanto, as amostras de ZWT tratadas foram agrupadas no mesmo grupo, enquanto as amostras do CQN foram agrupadas em um grupo distinto. O gráfico de pontuação mostrou 1 amostra atípica pertencente às amostras tratadas com ZWT, que foi removida da análise subsequente.

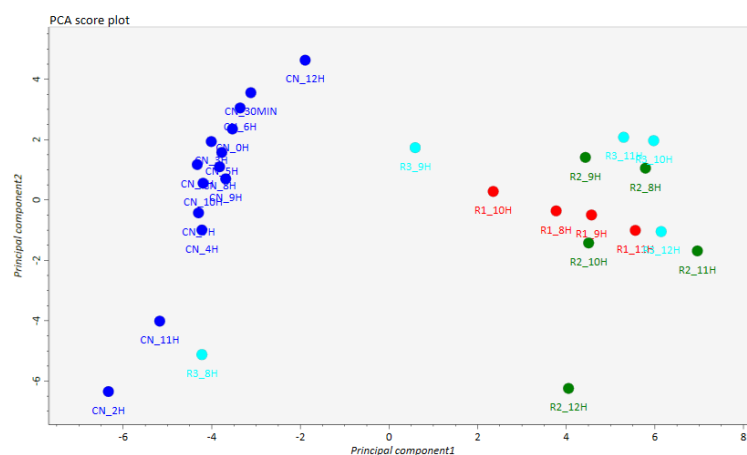


Figura 7.43. Gráfico de pontuação da análise de componentes principais (PCA) para as amostras de ZWT tratadas e as amostras de CQN.

7.g.4.h.1 Análise supervisionada

Para análise supervisionada, vários metabólitos putativos foram racionalizados com base nas reações CYP clássicas para cada um dos analitos clássicos previamente identificados. Dessa forma, seria possível determinar a presença desses possíveis candidatos.

A identificação dos metabólitos responsáveis por este agrupamento deve ser realizada para uma compreensão satisfatória do metabolismo da etilmorfina. Para isso, o método OPLS-DA foi utilizado para maximizar o agrupamento e agrupar amostras de acordo com a ocorrência de metabólitos de etilmorfina. O modelo OPLS-DA demonstrou capacidade preditiva cumulativa suficiente ($Q^2 = 0,42$). Além disso, o OPLS-DA gerou os VIPs e o modelo também forneceu o valor p e a mudança de dobra para cada metabólito. Portanto, foi possível atribuir a identidade de 5 metabólitos de etilmorfina alvo (Tabela 7.9).

Tabela 7.9. Metabólitos putativos da etilmorfina obtidos através da análise supervisionada, responsáveis por discriminar amostras de ZWT e CQN.

ID	TR (min)	m/z	aduto	p-valor	fold change	Reação metabólica
1036	6.380956	300.1593	[M+H] ⁺	7.35E-15	59.90886	N-desmetilação
1165	6.091979	312.1593	[M+H] ⁺	5.84E-10	7136.062	Oxidação
1266	6.152807	316.1905	[M+H] ⁺	2.48E-09	94.63036	Redução
855	6.047325	284.1281	[M+H] ⁺	3.59E-10	22.65885	O-deetilação + Oxidação
1726	5.846876	348.1447	[M+H] ⁺	3.66E-08	4.136545	N-desmetilação + Trihidroxilação

Uma vez definido quais metabólitos estavam participando da diferenciação das amostras tratadas de ZWT do CQN, buscou-se comparar a proporção dessas substâncias frente ao controle de estabilidade (CP). Dentre os metabólitos obtidos, apenas o ID 1036 referente a Noretilmorfina, a qual já havia sido identificada nos metabólitos clássicos, demonstrou aumento ao longo do tempo (Figura 7.44), enquanto os outros (ex: ID 855) não demonstravam diferença ao longo do tempo e estavam presentes em níveis próximos ou abaixo do nível do CP (Figura 7.45), desta forma não sinalizando participação do peixe. Portanto não foi possível identificar nenhum metabólito putativo através da análise supervisionada.

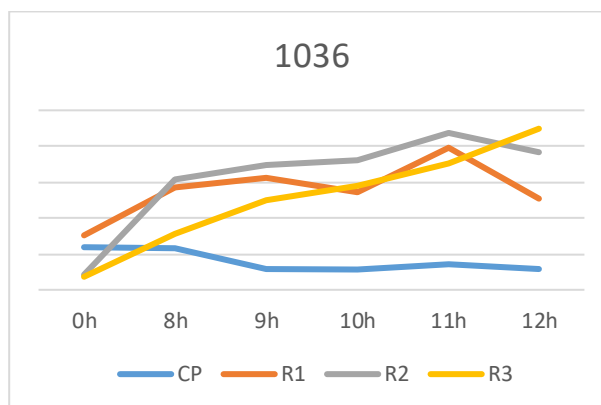


Figura 7.44. Comportamento das amostras tratadas e do CP ao longo do tempo para o ID 1036 (Noretilmorfina).

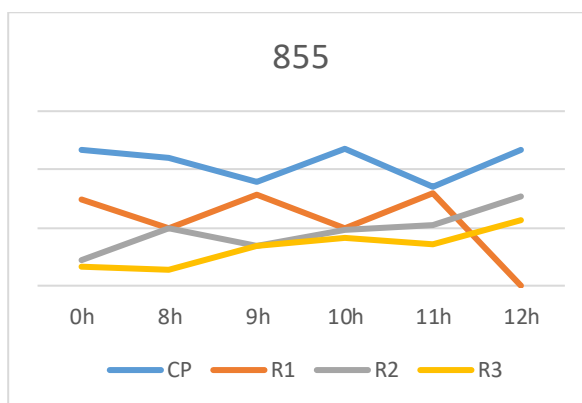


Figura 7.45: Comportamento das amostras tratadas e do CP ao longo do tempo para o ID 855.

7.g.4.h.1 Análise não-supervisionada

Esta análise abrange qualquer marcador, endógeno ou metabólito, responsável por diferenciar o CQN e as amostras de ZWT tratadas. Desta forma, uma lista contendo aproximadamente 30 candidatos foi gerada e os candidatos foram investigados em comparação ao CP. Destes, diversos candidatos tiveram problemas com a integração de suas áreas devido problemas de coeluição e baixa intensidade, resultando no não prosseguimento da análise destas substâncias. Das amostras que seguiram com a investigação, foram divididas em 3 grupos referente ao seu comportamento ao longo do tempo e em relação ao CP. O grupo que diminuiu ao longo tempo foi composto por apenas um integrante, o ID 1917; o grupo que se manteve ao longo do tempo foi o grupo com mais integrantes, estes são: ID 1128, 1448, 906, 1764, 855, 1164, 1266, 1522, 1521

e 1719; já o grupo que aumentou ao longo do tempo, sendo o mais promissor, foi composto pelos integrantes: ID 1036 (noretilmorfina), 679, 1399, 1034, 2452 e 1765. A diferença do comportamento ao longo do tempo de cada representante dos grupos pode ser observada na Figura 7.46.

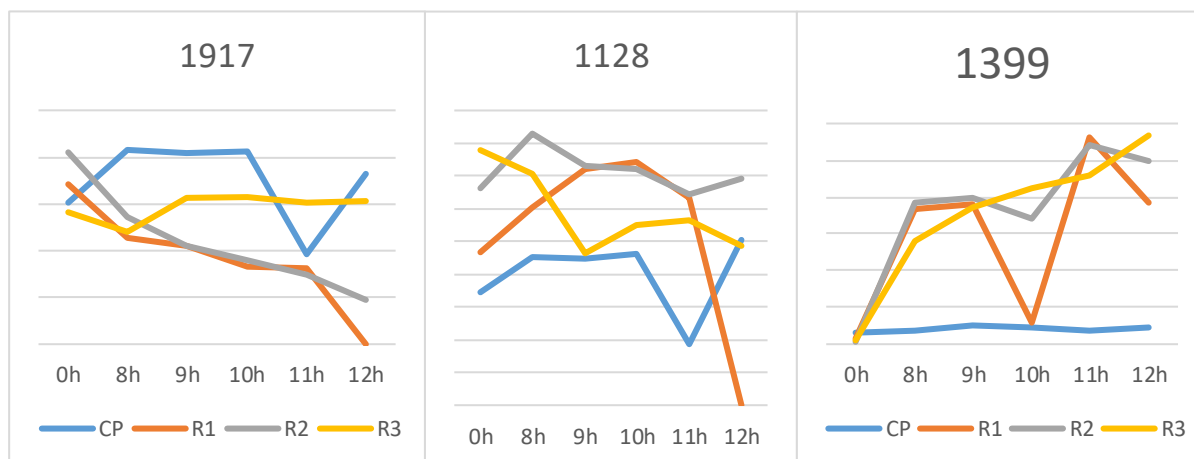


Figura 7.46. Comparação do comportamento de cada um dos grupos ao longo do tempo e em relação ao CP. ID 1917, representante do grupo que diminuiu; ID 1128, representante do grupo que se manteve; ID 1399, representante do grupo que aumentou.

A investigação do ID 1917 é interessante, uma vez que sua diminuição poderia estar sendo resultante de alguma alteração metabólica devido a presença da etilmorfina, sendo este um endógeno. Para auxílio na elucidação das fórmulas moleculares, utilizou-se o software MS-Finder, uma vez que este software sugere fórmulas moleculares relacionadas a bases de dados referente ao m/z indicado. Porém SWATH-type DIA e DDA apresentaram fragmentos muito diferentes entre si, além dos fragmentos presentes serem diferentes dos fragmentos clássicos do grupo de moléculas da etilmorfina. Além disso, todas as fórmulas moleculares sugeridas não eram plausíveis. Portanto a investigação desta molécula foi descontinuada.

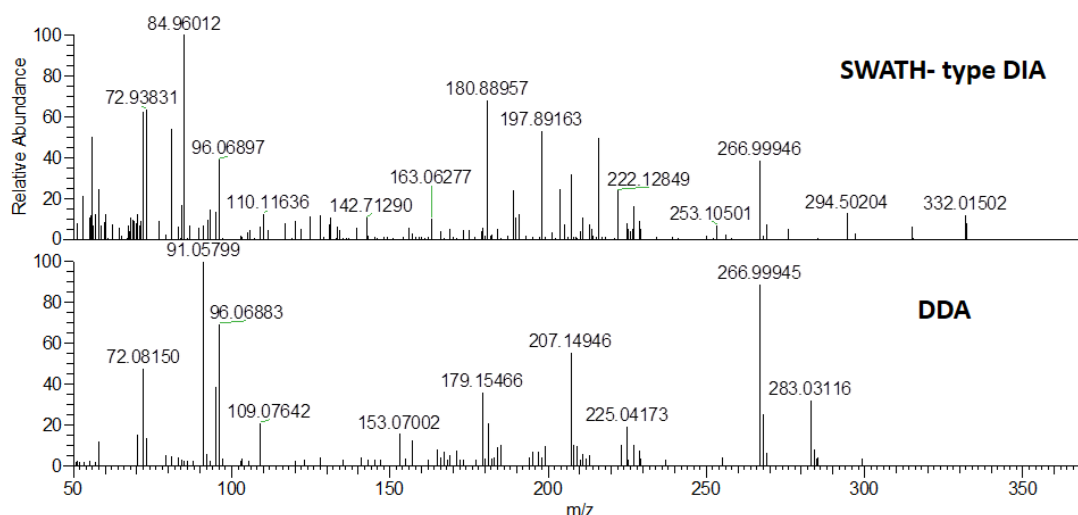


Figura 7.47. Espectros de MS² obtidos para o m/z 362.1514 (ID 1917) nos métodos de aquisição SWATH-type DIA e DDA

Dentro do grupo das substâncias que aumentaram ao longo do tempo e tiveram comportamento diferente do CP, dois candidatos se destacaram, o ID 1034 e o ID 1399.

Para o ID 1034, o qual possui m/z 300.1241, utilizando o MS-Finder como guia para a proposta de uma fórmula molecular, obteve-se a fórmula molecular $C_{17}H_{17}NO_4$ (erro de 3.5 ppm, aceitável). Criou-se a hipótese de que a etilmorfina poderia formar esta substância a partir da combinação das seguintes reações O-deetilação, Oxidação e Hidroxilação. Portanto, a investigação dos espectros se fez necessária (Figura 43) e através dela pode-se observar que: tanto o *SWATH-type* DIA quanto o DDA apresentaram os fragmentos 169 e 197, com erros aceitáveis para as composições elementares de $C_{12}H_9O$ e $C_{13}H_9O_2$ respectivamente; a morfina (um derivado O-deetilado da etilmorfina) apresenta os fragmentos 153 e 181, com erros aceitáveis para as composições elementares de $C_{12}H_9$ e $C_{13}H_9O$ respectivamente; dois dos principais fragmentos da MOR apresentaram uma diferença de massa de 16, além de um O na composição elementar, indicando uma possível hidroxilação nestes fragmentos; como a variação de m/z referente à oxidação não pôde ser observada, acredita-se que esta instauração esteja presente numa região facilmente perdida pela fragmentação.

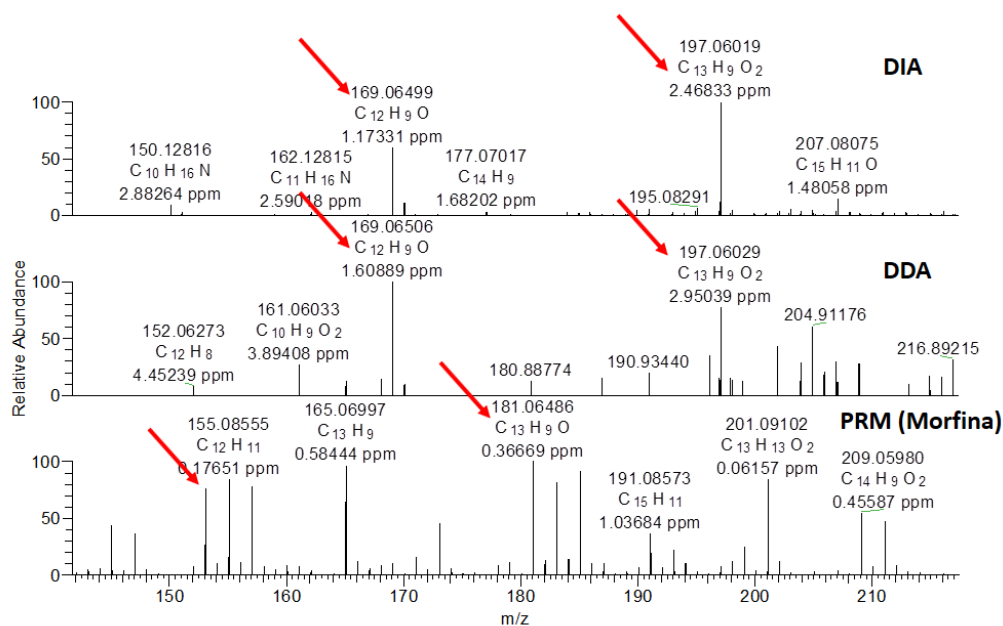


Figura 7.48. Comparação dos espectros de MS² obtidos para o *m/z* 300,1241 (ID 1034) nos métodos de aquisição SWATH-type DIA (TR: 1,06-1,15 min) e DDA (TR: 1,06 min) com o espectro de PRM da morfina (TR: 2,20 min).

Através do raciocínio levantado com a análise dos espectros e da hipótese de reação para obtenção do ID 1034, uma estrutura para esta substância foi proposta (Figura 7.49). Nesta estrutura a hidroxila está inserida no anel aromático, o qual é a região que mais se manteve estável durante as fragmentações propostas para a substâncias clássicas, e a instauração está presente no anel piperidínico, que por sua vez é o primeiro grupamento a ser perdido durante a fragmentação das substâncias clássicas da etilmorfina. Portanto a estrutura proposta, é condizente com o raciocínio e a hipótese levantados anteriormente.

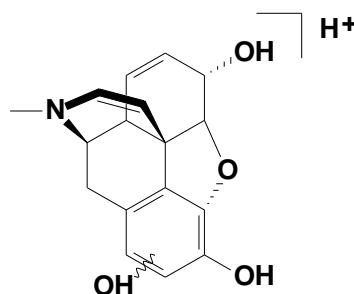


Figura 7.49. Fórmula estrutural proposta para o ID 1034.

Já para o ID 1399, que possui m/z 326.1399, realizou-se uma abordagem diferente. Inicialmente, obteve-se através do MS-Finder a fórmula molecular $C_{19}H_{19}NO_4$ (erro de -3.7 ppm, aceitável). Esta fórmula molecular permite a elaboração da hipótese de que a etilmorfina possa sofrer a combinação de uma hidroxilação e duas oxidações, resultando no ID 1399. Ao investigar os espectros obtidos pelo *SWATH-type* DIA e pelo DDA (Figura 7.50) para essa substância, observa-se grande semelhança entre os fragmentos obtidos por ambos. Dentre os fragmentos de maior destaque nestes espectros estão: 310.14326; 295.12053; 280.09721; 268.13349; 252.10203; 239.09407; 197.06013. Uma vez definidos os fragmentos de interesse, fez-se uso do software Mass Frontier®, mesmo software utilizado para auxiliar na proposta de fragmentação, para tentar obter uma estrutura com as modificações estruturais racionalizadas e com a fragmentação correspondente ao espectro.

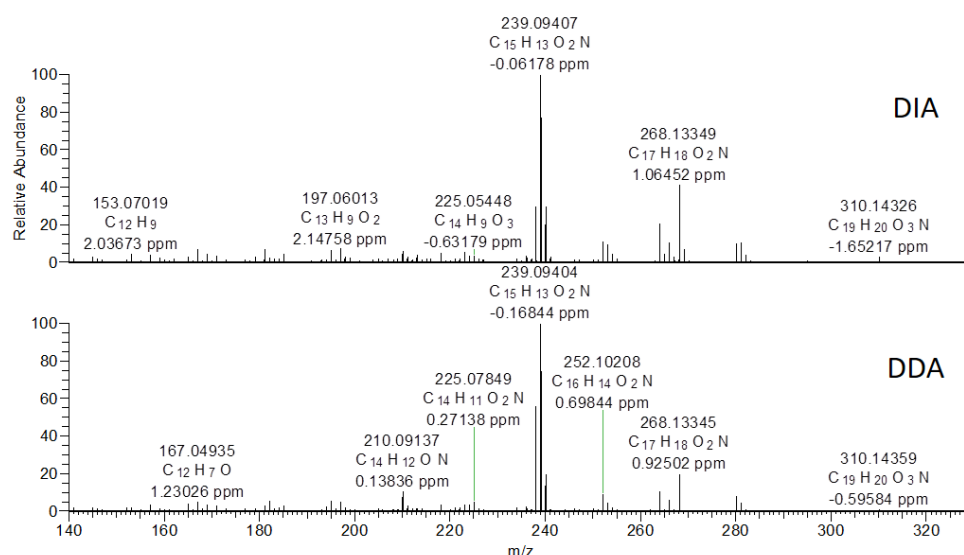


Figura 7.50. Espectros de MS² obtidos através da aquisição por *SWATH-type* DIA e DDA.

As estruturas racionalizadas para a hidroxilação com duas oxidações foram modificadas a partir da estrutura original da etilmorfina, tendo a hidroxila fixada no anel aromático, assim como para a estrutura proposta do ID 1034, e diversas combinações de oxidações foram racionalizadas conforme a estrutura permitiu (Figura 7.49). Dentre as moléculas propostas, a única que obteve fragmentos propostos para todos os 9

fragmentos observados no espectro foi a fórmula estrutural sugerida para o ID 1399 (Figura 7.51).

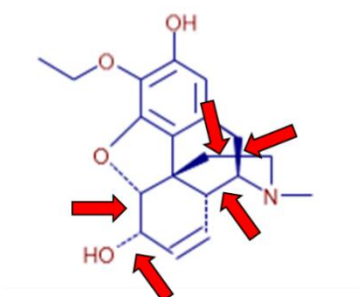


Figura 7.51. Estrutura base da etilmorfina com um hidroxilação no anel aromático e possíveis sítios de oxidação (setas vermelhas)

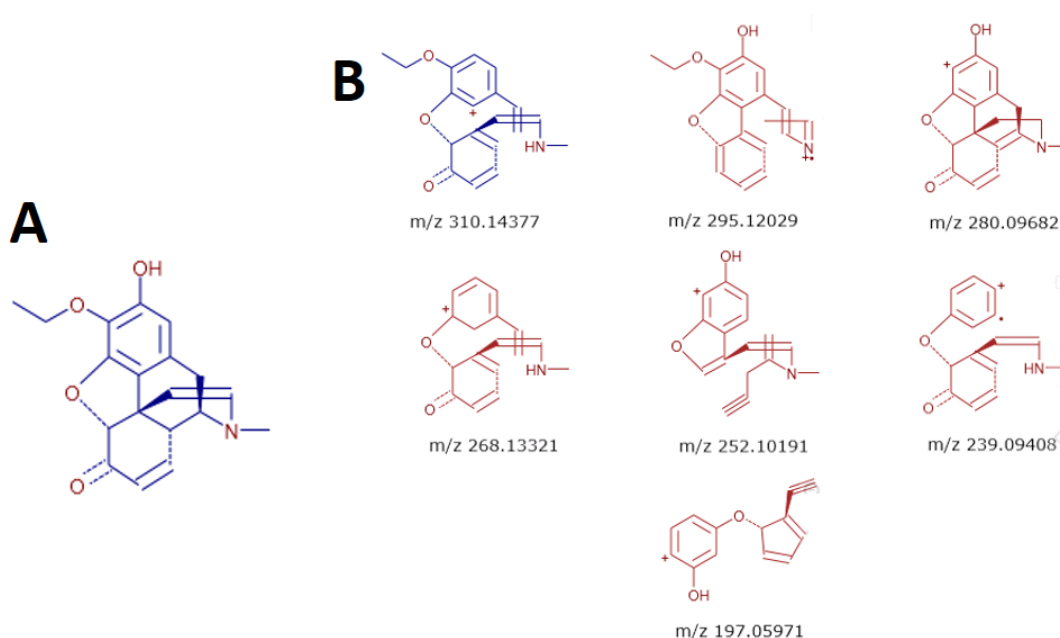


Figura 7.52. (A) Fórmula estrutural teórica sugerida para o ID 1399. (B) Fragmentos teóricos obtidos a partir da estrutura sugerida para o ID 1399, utilizando Mass Frontier.

7.g.5. Condições ambientais do modelo ZWT

A temperatura da água dos aquários, a qual tem um papel importante em diversos processos biológicos do *zebrafish*, incluindo o metabolismo (LÓPEZ-OLMEDA & SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, 2011; DREIER *et al.*, 2021; LIN *et al.*, 2022), foi controlada por um aquecedor situado na sala. O instrumento utilizado no monitoramento deste parâmetro consistiu em um sensor no medidor multiparâmetros. As análises foram feitas com uma maior frequência no primeiro dia (0h, 1h, 3h, 6h, 12h) e com intervalo de 24h até o fim do experimento, gerando o gráfico da Figura 7.53.

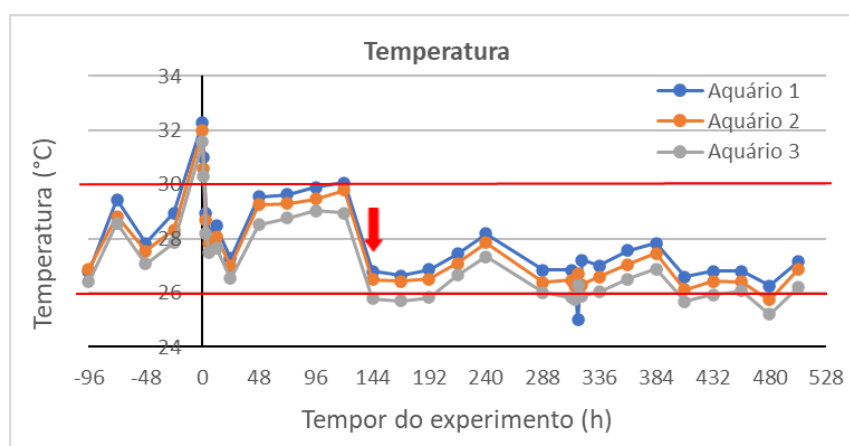


Figura 7.53. Gráfico da temperatura da água dos aquários ao longo do experimento.

A manutenção de temperaturas elevadas é capaz de induzir um aumento na taxa metabólica do *zebrafish* (LÓPEZ-OLMEDA, 2011; BENNOIT & CRAIG, 2020), o que poderia favorecer o metabolismo de agentes dopantes em experimentos posteriores. Entretanto, com o aumento da temperatura há uma maior demanda por oxigênio pelos peixes e, em contraste, há uma diminuição da solubilidade do oxigênio na água do aquário (NOGA, 2010; HAMMER, 2019). Neste cenário, há a possibilidade do desenvolvimento de um quadro de hipóxia ambiental aguda ou crônica, resultando em sintomas como letargia, estresse e, em último caso, alta mortalidade (NOGA, 2010). Assim como a temperatura, o pH da água em sistemas aquáticos exerce um papel importante nos processos biológicos dos peixes, bem como na microbiota do aquário (HAPPER & LAWRENCE, 2011). O pH no experimento referência foi monitorado com a

mesma frequência que a temperatura, através de um eletrodo de pH acoplado no medidor multiparâmetros, gerando o gráfico da Figura 7.54.

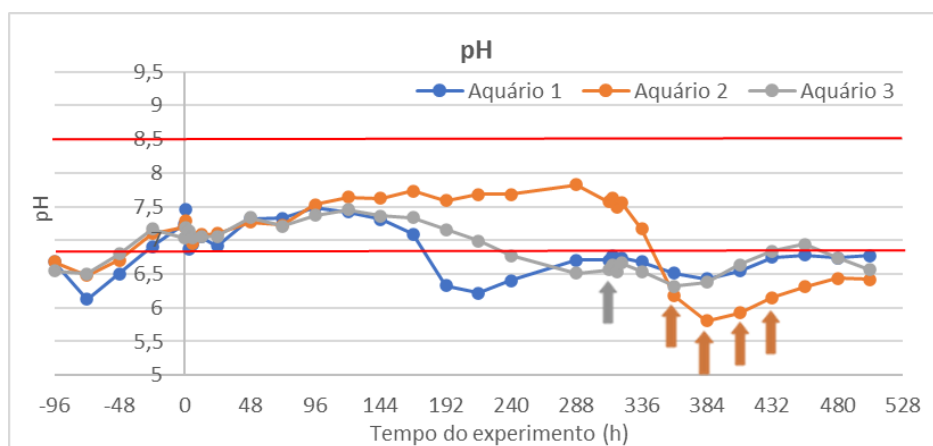


Figura 7.54. Gráfico do pH ao longo experimento.

O decaimento de pH enfrentado pelos três aquários está de acordo com o comportamento descrito pela literatura. Ou seja, em sistemas fechados, como o aquário, processos incluindo a respiração dos peixes, a decomposição de resíduos orgânicos e o metabolismo de resíduos nitrogenados, resultam na produção contínua de ácidos, reduzindo gradualmente o pH do meio (NOGA, 2010; HAPPER & LAWRENCE, 2011; HAMMER, 2019). Os óbitos, por sua vez, ocorreram em uma faixa de pH de 5,81 a 6,15, no aquário 2, e com o pH igual à 6,32 para o aquário 3. Tais eventos aconteceram ao longo do processo de diminuição de pH, sendo mais um indício de que a vida aquática apresenta dificuldades em se ajustar à mudança repentina e manter a regulação ácido-base e iônica e a excreção de amônia (ZAHANGIR *et al.*, 2015). Isto posto, para experimentos com uma duração superior à 7 dias, pode ser considerada a adição, de forma cautelosa, de condicionantes como bicarbonato de sódio (para valores de pH baixos) e uma solução diluída de ácido clorídrico ou ácido acético (para valores de pH altos) (HAMMER, 2019).

Um outro processo que pode ser influenciado pelo pH é a prevalência da forma da amônia não ionizada (NH_3) no sistema, a qual é tóxica para os peixes (HAMMER, 2019; ARANDA-MORALES *et al.*, 2021). Uma forma de eliminação deste resíduo nitrogenado, consiste no processo de oxidação, por bactérias nitrificantes e com o íon

nitrito (NO_2^-) como produto intermediário, até o íon nitrato (NO_3^-), espécie menos tóxica aos peixes (NOGA, 2010; HAMMER, 2019). Com base nos dados de concentração de amônia não ionizada (NH_3), concentração de nitrogênio amoniacal total, pH e temperatura obtidos no experimento, foram gerados os gráficos da Figura 7.53.

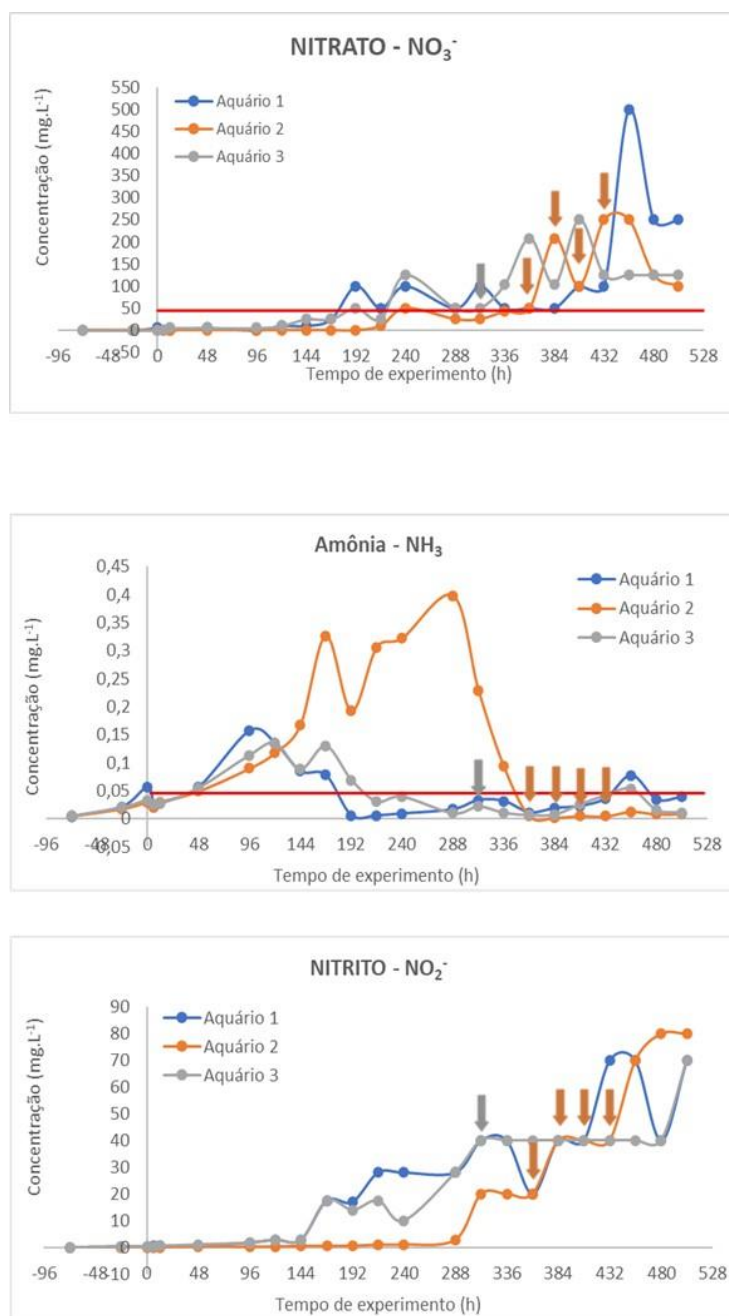


Figura 7.55. Gráficos das concentrações de resíduos nitrogenados ao longo do tempo: A – NH_3 , B – NO_2^- e C – NO_3^- .

Um comportamento inicial observado nos três aquários, consistiu em um acúmulo de amônia não ionizada no meio seguido por um decaimento. Logo em seguida, no início deste declínio de NH_3 no meio, ocorreu um crescimento na concentração de nitrito, indicando a primeira etapa de oxidação da amônia ao íon nitrito pelas bactérias nitrificantes. Os aquários 1 e 3 iniciaram o processo de decaimento após atingirem seus máximos em $0,16 \text{ mg.L}^{-1}$ (96h - 4 dias) e em $0,13 \text{ mg.L}^{-1}$ (120h - 5 dias) de amônia, respectivamente. Já, para o aquário 2, o máximo foi alcançado apenas em 288h (12 dias), com $0,40 \text{ mg.L}^{-1}$ de NH_3 , indicando um maior acúmulo desta espécie. Os óbitos, por sua vez, ocorreram ao longo deste processo do aumento do íon NO_2^- , indicando que este parâmetro pode ter um impacto negativo no estado dos peixes. Outro ponto importante a ser destacado consiste que os mesmos comportamentos informados para os valores de amônia no meio foram observados para o parâmetro pH. Diante desse cenário, pode-se confirmar a correlação entre o pH e os resíduos nitrogenados, principalmente, a NH_3 , reafirmando a indispensabilidade do seu controle e monitoramento em experimentos de longa duração. Além disso, um estudo crônico no qual incluía a variação do pH e temperatura, em paralelo com o monitoramento dos resíduos nitrogenados, faz-se necessário para verificar a possibilidade de um controle na produção de espécies tóxicas aos peixes no meio, permitindo, assim, experimentos com uma maior duração. As variáveis salinidade, dureza total e cloro livre não apresentaram uma variação significativa ao longo do experimento visto que nenhum condicionante foi adicionado ao experimento que impactasse nesses parâmetros.

7.h. Conclusões

7.h.1. Metiltestosterona

Através dos dados relacionados a metiltestosterona, foi possível verificar que o ZWT é uma boa ferramenta para estudo de metabolismo de agentes esteróides anabolizantes e a solubilidade desse tipo de substância na água não afeta a disponibilidade para o *zebrafish*, além de abrir novas perspectivas para novos projetos envolvendo outros esteróides. Também foi possível utilizar o CG-MS com uma energia de colisão da fonte mais baixa do que é usualmente utilizado, o que ajuda em projetos futuros relacionados ao questionamento do íon molecular das substâncias quando não

se tem material de referência a fim de comparação. Apesar da metiltestosterona ser um AAS conhecido há décadas, apenas em 2013 seus LTM's (Long Term Metabolites), substâncias sulfoconjugadas monitoradas pelo CLUE-EMAR, foram apresentados como tal na comunidade antidopagem, por isso a importância de continuar estudando substâncias já conhecidas através dos diferentes modelos e métodos.

7.h.2. Tamoxifeno

De acordo com os resultados obtidos, um total de 35 metabólitos foram observados nas amostras do ZWT. Ademais, o modelo foi capaz de reproduzir o metabolismo humano do tamoxifeno, sendo os principais metabólitos de fase I observados em humanos, confirmados nas amostras do modelo ZWT. Foi possível observar indícios da conversão dos metabólitos N-desmetiltamoxifen e 4-hidroxitamoxifeno no metabólito Endoxifeno, demonstrando que este metabólito foi produzido apesar da falta de um órtologo da enzima CYP2D6 no zebrafish. Portanto, o modelo ZWT representa uma ferramenta interessante para investigação outros agentes dopantes com estrutura semelhante.

7.h.3. Etilmorfina

No presente estudo, foi possível determinar, através da investigação do metabolismo, que o zebrafish é capaz de metabolizar ETM nos metabólitos de fase 1 nor-ETM (N-desmetilação) e MOR (O-deetilação), mesmo não possuindo um ortólogo humano CYP 2D descrito pela literatura. No que diz respeito ao metabolismo de fase 2, o peixe foi capaz de metabolizar MOR em MOR-3 β -Glicuronídeo, evidenciando sua capacidade de glicoconjugação destas moléculas na posição 3. A não observação da formação do metabólito MOR-6 β -Glicuronídeo é um indicativo de que, assim como o modelo de ratos, o zebrafish tende a não glicoconjuguar nesta posição. Apesar de, nas condições utilizadas, o DDA se mostrar mais seletivo, o *SWATH-type* DIA foi o método utilizado para a análise de metabolômica devido a maior sensibilidade e mais pontos de aquisição, preservando mais informações para a análise de metabolômica. Através da análise não-supervisionada da metabolômica, dentre as diversas substâncias

investigadas, foi possível sugerir a presença de dois metabólitos putativos o ID 1034 e o ID 1399 como substâncias provenientes do consumo de etilmorfina, além de sugerir uma possível estrutura para estas substâncias.

7.h.4. Condições ambientais do modelo ZWT

Ao todo, foram observadas 14 mortes nos tanques, 12 no aquário 2 e 2 no aquário 3. As mortes foram observadas principalmente durante o processo de diminuição do pH e concentração de amônia e aumento da concentração de nitrato e nitrito, sendo este último o resíduo de nitrogênio mais tóxico para peixes. Alguns sinais foram identificados durante o experimento que indicam deterioração na qualidade da água do aquário. A realização de experimentos com duração superior a 7 dias requer algumas adaptações, como a adição de condicionadores para controle do pH (ácidos e/ou bases) e o monitoramento das condições ambientais em experimentos de longa duração. Finalmente, um estudo sistemático que inclua a variação e controle do pH, em paralelo com o monitoramento dos resíduos de nitrogênio, é necessário para verificar a possibilidade de controlar a produção de espécies tóxicas (NH_3 e NO_2^-) ao zebrafish no meio, permitindo experimentos com maior duração.

7.i. Referências Bibliográficas

- AASMUNDSTAD, T. et al. Biotransformation and pharmacokinetics of ethylmorphine after a single oral dose. *British Journal of Clinical Pharmacology*, v. 39, n. 6, p. 611–620, 1995.
- Anselmo, C. S., Sardela, V. F., Matias, B. F., Carvalho, A. R., Sousa, V. R., Pereira, H. M. G., Aquino Neto, F. R. Is zebrafish (*Danio rerio*) a tool for human-like metabolism study? *Drug Testing and Analysis*, 9, p. 1685-1694, 2017.

- ELMESHAD, A. N. et al. Core in Cup Ethylmorphine Hydrochloride Tablet for Dual Fast and Sustained Pain Relief: Formulation, Characterization, and Pharmacokinetic Study. *AAPS PharmSciTech*, v. 21, n. 7, p. 1–11, 2020.
- Gómez, C., Pozo, O. J., Marcos, J., Segura, J., Ventura, R. Alternativa long-term markers for the detection of methyltestosterone misuse. *Steroids*, 78, p. 44-52, 2013.
- HACKNEY, A. C. "Hormone and Metabolic Modulators", Doping, Performance Enhancing Drugs, and Hormones in Sport, p. 77–89, 2018. DOI: 10.1016/b978-0-12-813442-9.00007-9.
- HELLAND, A.; ISAKSEN, C. V.; SLØRDAL, L. Death of a 10-month-old boy after exposure to ethylmorphine. *Journal of Forensic Sciences*, v. 55, n. 2, p. 551–553, 2010.
- HILAIRE, P. B. SAINT et al. Comparative evaluation of data dependent and data independent acquisition workflows implemented on an orbitrap fusion for untargeted metabolomics. *Metabolites*, v. 10, n. 4, 2020.
- KWOK, K. Y., CHAN, G. H. M., KWOK, W. H., et al. "In vitro phase I metabolism of selective estrogen receptor modulators in horse using ultra-high performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry", *Drug Testing and Analysis*, v. 9, n. 9, p. 1349–1362, 2017. DOI: 10.1002/dta.2158.
- LU, Jianghai, HE, C., HE, G., et al. "Structural elucidation of new urinary tamoxifen metabolites by liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry", *Journal of Mass Spectrometry*, v. 49, n. 7, p. 570–578, 2014. DOI: 10.1002/jms.3375.

- Matos, R. R., Martucci, M. E. P., Anselmo, C. S., Neto, F. R. A., Pereira, H. M. G., Sardela, V. F. Pharmacokinetic study of xylazine in a zebrafish water tank, a human-like surrogate, by liquid chromatography Q-Orbitrap mass spectroscopy. *Forensic Toxicology*, 38, p. 108-121, 2019.
- MAZZARINO, M., BIAVA, M., DE LA TORRE, X., *et al.* "Characterization of the biotransformation pathways of clomiphene, tamoxifen and toremifene as assessed by LC-MS/(MS) following in vitro and excretion studies", *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 405, n. 16, p. 5467–5487, 2013. DOI: 10.1007/s00216-013-6961-7.
- Musharraf, S. G., ul Arfeen, Q., Haq, F. Ul., Khatoon, A., Ali, R. A. Stability-Indicating TLC-Densitometric assay for methyltestosterone and quantum chemical calculations. *Journal of Chromatographic Science*, 55, p. 954-960, 2017.
- Prado, E., Matos, R. R., Gomes, G. M. L., Sá, C. B. L., Nunes, I. K. C., Anselmo, C. S., Oliveira, A. S., Cohen, L. S. A., Siqueira, D. S., Oliveira, M. A. M., Ambrosio, J. C. L., Costa, G. V., Neto, F. R. A., Padilha, M. C., Pereira, H. M. G. Metabolism of synthetic cathinones through the zebrafish water tank model: a promising tool for forensic toxicology laboratories. *Forensic Toxicology*, 39, p. 73-88, 2020.
- SALVADOR, J. P., VILA-ROCA, E., MONFORT, N., *et al.* "New approach based on immunochemical techniques for monitoring of selective estrogen receptor modulators (SERMs) in human urine", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 156, p. 147–152, 2018. DOI: 10.1016/j.jpba.2018.04.027. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.04.027>.
- SANCHEZ-SPITMAN, A. B., SWEN, J. J., DEZENTJE, V. O., *et al.* "Clinical pharmacokinetics and pharmacogenetics of tamoxifen and endoxifen", *Expert Review of Clinical Pharmacology*, v. 12, n. 6, p. 523–536, 2019. DOI: 10.1080/17512433.2019.1610390. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/17512433.2019.1610390>.

- Sardela V. F., Sardela P. D. O., Lisboa R. R., Matias B. F., Anselmo C. S., de Carvalho A. R., Nunes I. K. C., Padilha M. C., de Aquino Neto F. R., Pereira H. M. G. Comprehensive Zebrafish Water Tank Experiment for Metabolic Studies of Testolactone. *Zebrafish*. 17(2), p. 104-111. 2020.
- Sardela, V. F., Martucci, M. E. P., de Araújo, A. L. D., Leal, E. C., Oliveira, D. S., Carneiro, G. R. A., Deventer, K., Van Eenoo P., Pereira, H. M. G., Aquino Neto, F. R. Comprehensive Analysis by liquid chromatography Q-Orbitrap mass spectrometry: Fast screening of peptides and organic molecules. *Journal of Mass Spectrometry*, 53, p. 476-503, 2018.
- Schänzer, W. Metabolism of anabolic androgenic steroids. *Clinical Chemistry*, 42:7, p. 1001-1020, 1996.
- World Anti-Doping Agency (WADA). 2012 *Anti-Doping Testing Figures Report*, 2012. Disponível em: <https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/WADA-2012-Anti-Doping-Testing-Figures-Report-EN.pdf>. Acesso em: 05 de abril de 2022.
- World Anti-Doping Agency (WADA). 2019 *Anti-Doping Testing Figures Report*, 2019. Disponível em: https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/2019_anti-doping_testing_figures_en.pdf. Acesso em: 05 de abril de 2022.
- XU, B. Q. et al. Ethylmorphine Metabolism in Isolated Rat Hepatocytes. *Pharmacology & Toxicology*, v. 73, n. 1, p. 35–40, 1993.
- Xu, B. Q., Aasmundstad, T. A., Bjørneboe, A., Christophersen, A. S., & Mørland, J. Ethylmorphine o-deethylation in isolated rat hepatocytes. *Biochemical Pharmacology*, 49(4), 453–460, 1995.

- Xu, B. Q., Aasmundstad, T. A., Christophersen, A. S., Mørland, J., & Bjørneboe, A. Evidence for CYP2D1-mediated primary and secondary O-dealkylation of ethylmorphine and codeine in rat liver microsomes. *Biochemical Pharmacology*, 53(4), 603–609, 1997.
- YONG, Y. F., TAN, S. C., LIEW, M. W. O., *et al.* "Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method development for screening of potential tamoxifen-drug/herb interaction via in vitro cytochrome P450 inhibition assay", *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, v. 1148, n. May, p. 122148, 2020. DOI: 10.1016/j.jchromb.2020.122148. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2020.122148>.
- SANCHEZ-SPITMAN, A. B., SWEN, J. J., DEZENTJE, V. O., *et al.* "Clinical pharmacokinetics and pharmacogenetics of tamoxifen and endoxifen", *Expert Review of Clinical Pharmacology*, v. 12, n. 6, p. 523–536, 2019. DOI: 10.1080/17512433.2019.1610390. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/17512433.2019.1610390>.
- SALVADOR, J. P., VILA-ROCA, E., MONFORT, N., *et al.* "New approach based on immunochemical techniques for monitoring of selective estrogen receptor modulators (SERMs) in human urine", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 156, p. 147–152, 2018. DOI: 10.1016/j.jpba.2018.04.027. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.04.027>.
- MAZZARINO, M., BIAVA, M., DE LA TORRE, X., *et al.* "Characterization of the biotransformation pathways of clomiphene, tamoxifen and toremifene as assessed by LC-MS/(MS) following in vitro and excretion studies", *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 405, n. 16, p. 5467–5487, 2013. DOI: 10.1007/s00216-013-6961-7.

- LU, Jianghai, HE, C., HE, G., *et al.* "Structural elucidation of new urinary tamoxifen metabolites by liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry", *Journal of Mass Spectrometry*, v. 49, n. 7, p. 570–578, 2014. DOI: 10.1002/jms.3375.
- KWOK, K. Y., CHAN, G. H. M., KWOK, W. H., *et al.* "In vitro phase I metabolism of selective estrogen receptor modulators in horse using ultra-high performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry", *Drug Testing and Analysis*, v. 9, n. 9, p. 1349–1362, 2017. DOI: 10.1002/dta.2158.
- HACKNEY, A. C. "Hormone and Metabolic Modulators", *Doping, Performance Enhancing Drugs, and Hormones in Sport*, p. 77–89, 2018. DOI: 10.1016/b978-0-12-813442-9.00007-9.
- XU, B. Q. *et al.* Ethylmorphine Metabolism in Isolated Rat Hepatocytes. *Pharmacology & Toxicology*, v. 73, n. 1, p. 35–40, 1993.
- Xu, B. Q., Aasmundstad, T. A., Bjørneboe, A., Christophersen, A. S., & Mørland, J. Ethylmorphine o-deethylation in isolated rat hepatocytes. *Biochemical Pharmacology*, 49(4), 453–460, 1995.
- Xu, B. Q., Aasmundstad, T. A., Christophersen, A. S., Mørland, J., & Bjørneboe, A. Evidence for CYP2D1-mediated primary and secondary O-dealkylation of ethylmorphine and codeine in rat liver microsomes. *Biochemical Pharmacology*, 53(4), 603–609, 1997.

SUBPROJETO 8. Implementação de novos alvos para análise por espectrometria de massas por razão isotópica - II. Confirmação de prednisolona, prednisona e cortisol por IRMS.

Coordenação executiva: Drdo. Fábio Azamor de Oliveira

8.a Introdução

A determinação da razão isotópica de carbono por cromatografia gasosa acoplada a forno de combustão e a espectrometria de massas por razão isotópica (CG/C/EMRI) é a técnica requerida pela Agência Mundial Antidopagem (*World Anti-Doping Agency*, Wada) para a confirmação do abuso de esteroides endógenos em amostras de atletas. O uso desses esteroides é proibido a atletas, dada a sua reconhecida ação anabólica ou inibidora de aromatase (OLIVEIRA *et al.*, 2019; WADA, 2022; WADA, 2023).

A inferência quanto à origem dos esteroides encontrados em amostras de urina por CG/C/EMRI se dá com base na composição dos isótopos de carbono nessas moléculas. Esteroides produzidos pelo metabolismo endógeno têm o colesterol como precursor e sua composição isotópica é relativamente abundante em ^{13}C (resultando em uma razão $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ relativamente elevada, portanto, maiores valores de $\delta^{13}\text{C}$, superiores a -25 ‰), enquanto os homólogos desses esteroides, obtidos via síntese química a partir de substâncias extraídas de plantas chamadas C3, são caracterizados pela composição empobrecida em ^{13}C (menor razão $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ e, portanto, menor $\delta^{13}\text{C}$) (PIPER *et al.*, 2008; SOTTAS *et al.*, 2010; WADA, 2022).

Como o $\delta^{13}\text{C}$ do colesterol endógeno está relacionado à dieta do indivíduo e, consequentemente, à cultura alimentar das diferentes regiões e países, há uma variação nos valores de $\delta^{13}\text{C}$ dos esteroides endógenos analisados em amostras de diferentes indivíduos. O valor de $\delta^{13}\text{C}$ característico do metabolismo endógeno em uma amostra é determinado a partir de análise de outros esteroides, formados pelo organismo humano pela metabolização do colesterol, chamados de referências endógenas (RE). Essas substâncias mantêm a razão isotópica proveniente do colesterol e não são afetadas pela

administração de pró-hormônios dopantes de origem sintética (PIPER *et al.*, 2008; OUELLET *et al.*, 2013).

Para conclusão sobre resultados da análise confirmatória por CG/C/EMRI, calculam-se os valores de $\Delta\delta^{13}\text{C}$, ou seja, a diferença entre o $\delta^{13}\text{C}$ da RE e o $\delta^{13}\text{C}$ da substância alvo ($\Delta\delta^{13}\text{C} = \delta^{13}\text{C}_{\text{RE}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{SA}}$) (de la TORRE *et al.*, 2012; PIPER *et al.*, 2013).

A Wada estabelece que pregnanodiol (PD) é a principal RE a ser empregada na análise de esteroides endógenos por CG/C/EMRI, e que uma segunda RE deve ser usada para confirmar a conclusão sobre um resultado analítico adverso. O escopo do LBCD conta atualmente com duas RE validadas, PD e 11-cetoetiocolanolona (11K). Outras RE reportadas na literatura são pregnanotriol (PT), 16-androstenol (16EN) e 11 β -hidroxiandrosterona (11OHA) (PIPER *et al.*, 2011; de la TORRE *et al.*, 2019; OLIVEIRA *et al.*, 2019; WADA, 2022).

A análise das RE presentes em uma amostra de urina podem ser prejudicada pela administração pelo atleta de precursores sintéticos dessas RE. A administração de preparações farmacêuticas de pregnenolona ou progesterona afeta os valores de $\delta^{13}\text{C}$ de PD e 16EN, enquanto o uso de cortisol ou cortisona de origem sintética afeta o $\delta^{13}\text{C}$ de 11K e 11OHA. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ menores ou iguais a -25 ‰ são considerados incompatíveis com produção endógena, e RE apresentando tais valores de $\delta^{13}\text{C}$ são consideradas inválidas (PIPER *et al.*, 2011; de la TORRE *et al.*, 2019; WADA, 2022).

Caso o laboratório não tenha validado duas RE que possam ser consideradas válidas para avaliação de uma dada amostra, esta deve ser encaminhada a outro laboratório com capacidade analítica para concluir sobre a amostra (WADA, 2022).

8.b. Objetivo

O presente projeto visa à validação para inclusão de PT e 16EN no escopo analítico do LBCD como referências endógenas para a análise de esteroides endógenos por CG/C/EMRI em amostras de urina. Para tanto, serão avaliados todos os parâmetros de validação estabelecidos pela Wada.

8.C. Soluções e Padrões de Trabalho

A Tabela 8.1 apresenta os códigos internos dos padrões e soluções dos esteroides usados no presente trabalho.

Tabela 8.1. Lista das soluções e padrões de referência utilizados nesse estudo.

Substância	Solução (SI)	Padrão
5 β -Pregnano-3 α ,17,20 α -triol (Pregnanotriol; PT)	21SI079-11542	20P079-12450
5 α -Androst-16-en-3 α -ol (16-Androstenol; 16EN)	21SI1075-10695	15P1075-6221

8.d. Métodos e condições de análise

8.d.1. Preparo da amostra

O preparo de amostras para determinação da origem sintética de substâncias proibidas por CG/C/EMRI hifenado a espectrometria de massas com analisador quadrupolo simples (CG-EMq/C/EMRI) é descrito na literatura (OLIVEIRA *et al.*, 2019) e é aqui apresentado de forma resumida: purificação das amostras empregando a extração em fase sólida (EFS) contendo a fase estacionária octadecilsilano (C₁₈), seguida da extração líquido-líquido com TBME em pH neutro, hidrólise enzimática dos derivados glicuronídeos, nova extração líquido-líquido com TBME em pH alcalino. A fração glicuronídeo hidrolisada dos esteroides é extraída pelo solvente TBME. O solvente orgânico é evaporado, e o extrato seco é fortificado com acetato de trembolona (Trem_Ac) como padrão interno e purificado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) preparativa.

8.d.2. Cromatografia Líquida Preparativa

8.d.2.a. Primeira etapa de purificação de amostras por CLAE (CLAE1)

8.d.2.a.1. Condições da análise

Coluna analítica XBridge™ Shield RP18 da Waters, fase estacionária (C₁₈, 25 cm, 4,6 mm, 5 µm) protegida por pré-coluna XBridge™ Shield RP18 (2 cm, 4,6 mm, 5 µm). Temperatura da coluna: 25 °C; fase móvel A: água; fase móvel B: acetonitrila (ACN); volume de injeção: 125 µL; padrão interno: Trem_Ac. O gradiente de eluição para a purificação dos esteroides em CLAE1 é apresentado na Tabela 8.2. Os comprimentos de onda do detector por arranjo de diodos (DAD) foram de 195 nm e 345 nm.

Tabela 8.2. Gradiente de fase móvel para purificação dos esteroides em CLAE1.

Tempo (min)	% A	% B	Vazão (mL/min)
0	60	40	1,0
18,00	40	60	1,0
19,00	2	98	1,0
30,00	2	98	1,0
30,01	60	40	1,0
35,00	60	40	1,0

8.d.2.a.2 Resultados

Misturas de padrões são usadas para determinar os t_R dos esteroides nas etapas de purificação por CLAE e os intervalos de coleta das frações das amostras. Para purificação das duas RE adicionais em CLAE1, à mistura de padrões de esteroides STD MIX1 usada em rotina foram acrescentados padrões de PT e 16EN às respectivas concentrações de 400 ng/µL e 40 ng/µL. A composição original do STD MIX1 é descrita por Oliveira e colaboradores (2019). A Figura 8.1 mostra um cromatograma típico da

injeção do STDMIX1 acrescido de PT e 16EN, identificando a ordem de eluição dos analitos em CLAE1.

O intervalo de coleta foi definido estabelecendo um tempo de coleta suficientemente largo para recuperar os analitos com mínimo de interferentes da matriz. O alargamento do intervalo de coleta da fração FIIIA permitiu a coleta de PT junto com epitestosterona (E). Após o fracionamento das amostras, as frações FIIIA e FIIIB (esta contendo 5β -androstano- $3\alpha,17\beta$ -diol, 5β -diol) de cada amostra são misturadas para dar continuidade ao seu preparo. 16EN foi coletado em uma fração separada.

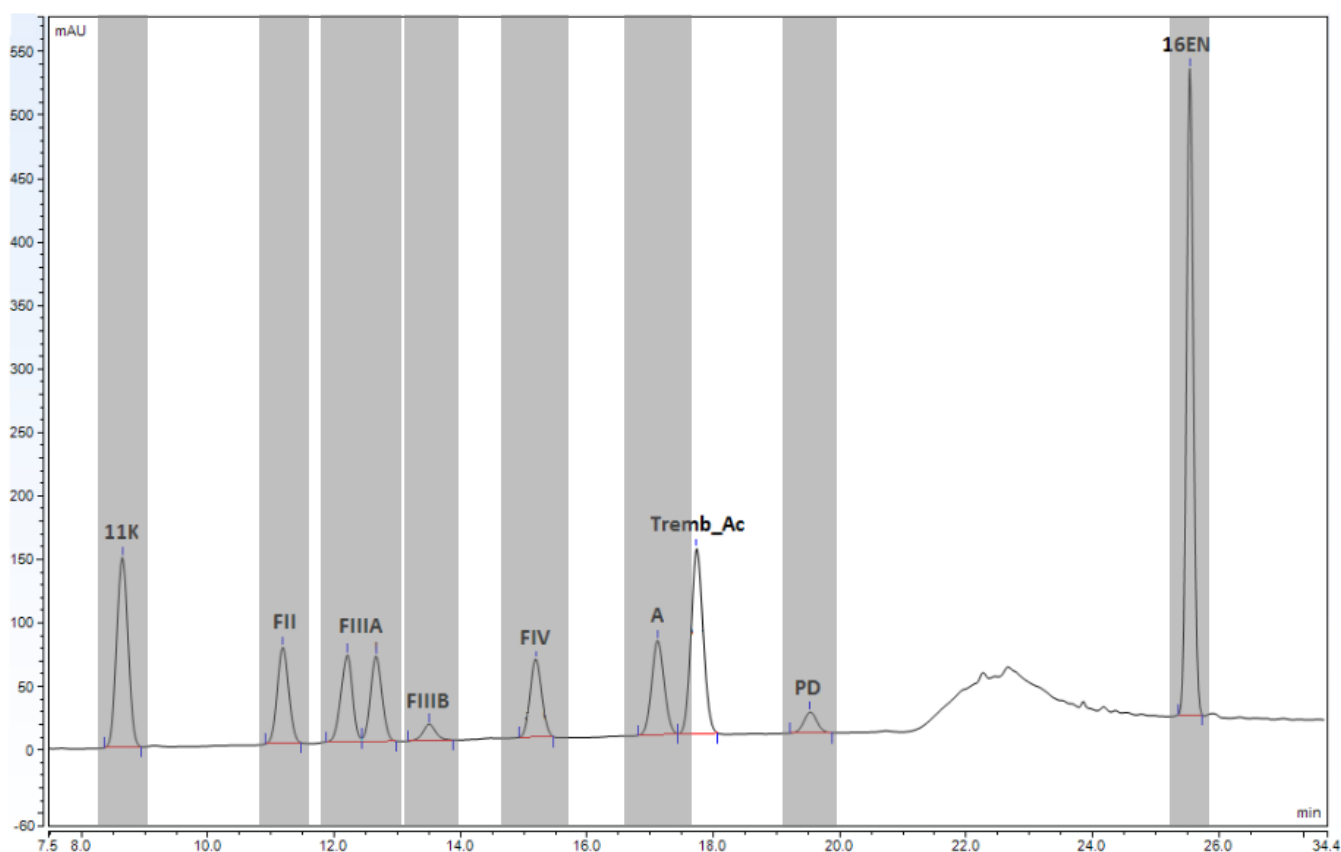


Figura 8.1. Cromatograma do STDMIX1 acrescido de PT e 16EN para determinação dos tempos de coleta das frações em CLAE1. Por ordem de eluição, são observados os picos de 11K, testosterona (T), PT, E, 5β -diol, eticolanolona (Etio), androsterona (A), PD e 16EN. O esteroide 5α -androstano- $3\alpha,17\beta$ -diol (5α -diol) coelui com Etio e é coletado na mesma fração.

Após coleta das frações obtidas, a fase móvel é evaporada. Todas as frações obtidas são derivatizadas por reação com anidrido acético e piridina conforme descrito por Oliveira e colaboradores (2019). Após esta etapa de acetilação, os extratos secos das frações FI (11K), FV (A), FVI (PD) e FVII (16EN) são reconstituídos em volumes adequados de acetato de etila e analisados por CG/C/EMRI. As frações FII (T), FIII (E, PT e 5 β -diol) e FIV (Etio e 5 α -diol) são submetidas à segunda etapa de purificação por CLAE preparativa (CLAE2).

8.d.2.b. Segunda etapa de purificação de amostras por CLAE (CLAE2)

8.d.2.b.1 condições da análise

Coluna analítica XBridge™ Shield RP18 da Waters, fase estacionária (C₁₈, 25 cm, 4,6 mm, 5 μ m) protegida por pré-coluna XBridge™ Shield RP18 (2 cm, 4,6 mm, 5 μ m). Temperatura da coluna: 25 °C; fase móvel A: água; fase móvel B: acetonitrila (ACN); volume de injeção: 125 μ L; padrão interno: Trem_Ac. O gradiente de eluição para a purificação dos esteroides em CLAE2 é apresentado na Tabela 8.3. Os comprimentos de onda do detector por arranjo de diodos (DAD) foram de 195 nm e 345 nm.

Tabela 8.3. Gradiente de fase móvel para purificação dos esteroides em CLAE2.

Tempo (min)	% A	% B	Vazão (mL/min)
0	40	60	1,0
16,00	2	98	1,0
25,00	2	98	1,0
25,50	40	60	1,0
30,50	40	60	1,0

8.d.2.b.2 Resultados

Para purificação de PT em CLAE2, acrescentou-se padrão de PT a 400 ng/ μ L à mistura de esteroides STD MIX2 usada em rotina. A composição original do STD MIX2 é descrita por Oliveira e colaboradores (2019). O padrão de PT foi previamente acetilado. A Figura 8.2 apresenta o cromatograma típico da injeção do STD MIX2 acrescido de diacetato de PT (PT_Ac) identificando a ordem de eluição dos analitos em CLAE2.

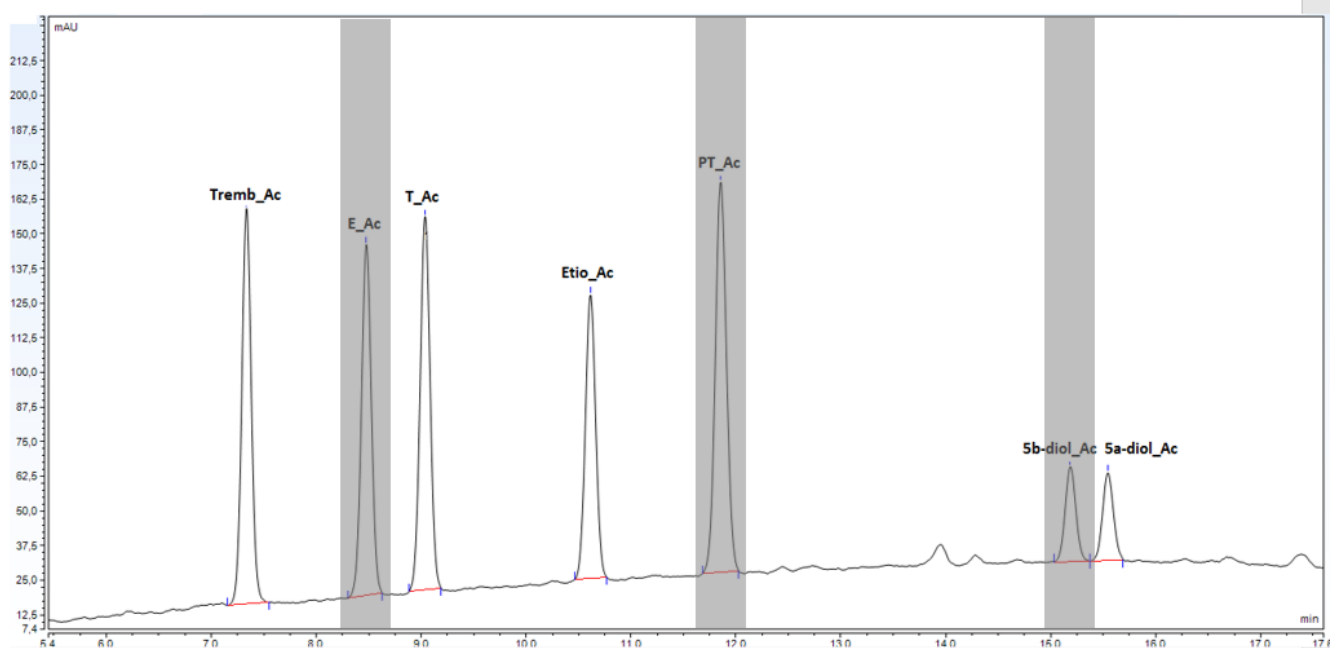


Figura 8.2. Cromatograma do STD MIX2 para determinação dos tempos de coleta das frações em CLAE2. São representados os intervalos de coleta referentes à segunda etapa de purificação da fração FIII, que contém E_Ac, PT_Ac e 5 β -diol_Ac.

8.e. Análise por CG-EMq/C/EMRI

8.e.1. Condições da análise

Coluna capilar VF-17ms J&W (50 % fenil, 50 % metilsiloxana, 30 m, 0,25 mm D.I., espessura de filme 0,25 μ m). Gás de arraste He 6.0, fluxo constante de 1,4 mL/min. Temperatura do injetor: 280 °C. Modo de injeção: 1 a 3 μ L, sem divisão de fluxo; purga do septo, 5 mL/min. Um método de injeção dupla foi usado para injeção de 0,2 μ L acetato de 5 α -androstano-3 β -ol (3 β -OH_Ac) como padrão interno. Septo de baixo sangramento. Encamisamento de vidro inerte, sem divisão de fluxo, com duas restrições, 105 mm, 5 mm D.I. Programação de temperatura: temperatura inicial do forno, 100 °C (2 min), em seguida programada para aquecimento a 270 °C a 25 °C/min, depois a 290 °C a 2 °C/min e 300 °C a 30 °C/min (2 min). Temperatura do reator de oxidação: 950 °C.

Condições de operação do espectrômetro de massas: temperatura da interface, 280 °C; temperatura da fonte iônica, 230 °C; temperatura do quadrupolo, 150 °C; energia de ionização, 70 eV. Espectros de massas obtidos no modo de varredura de m/z 40 a 500.

8.e.2. Resultados

As Figuras 8.3 e 8.4 apresentam os picos cromatográficos e os espectros de massas de PT_Ac e 16EN_Ac obtidos a partir da injeção de soluções dos respectivos padrões acetilados.

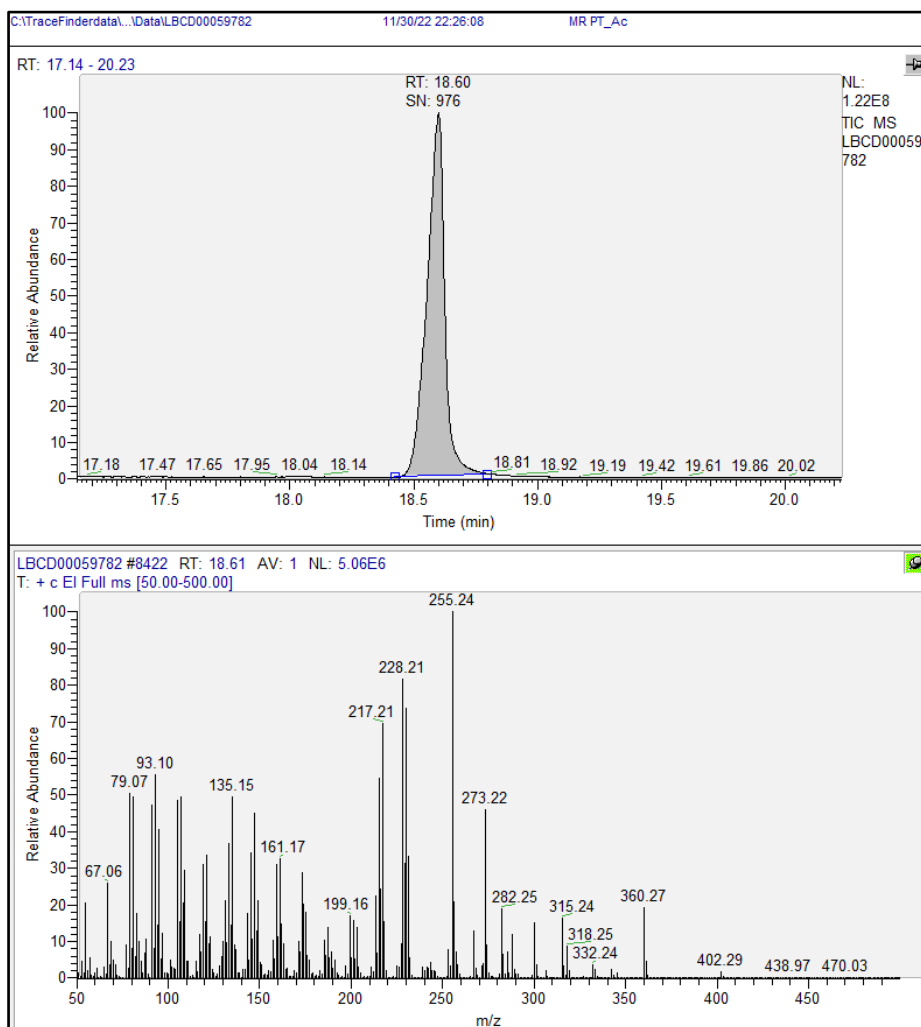


Figura 8.3. Cromatograma e espectro de massas obtidos a partir da análise de solução padrão de PT previamente acetilado.

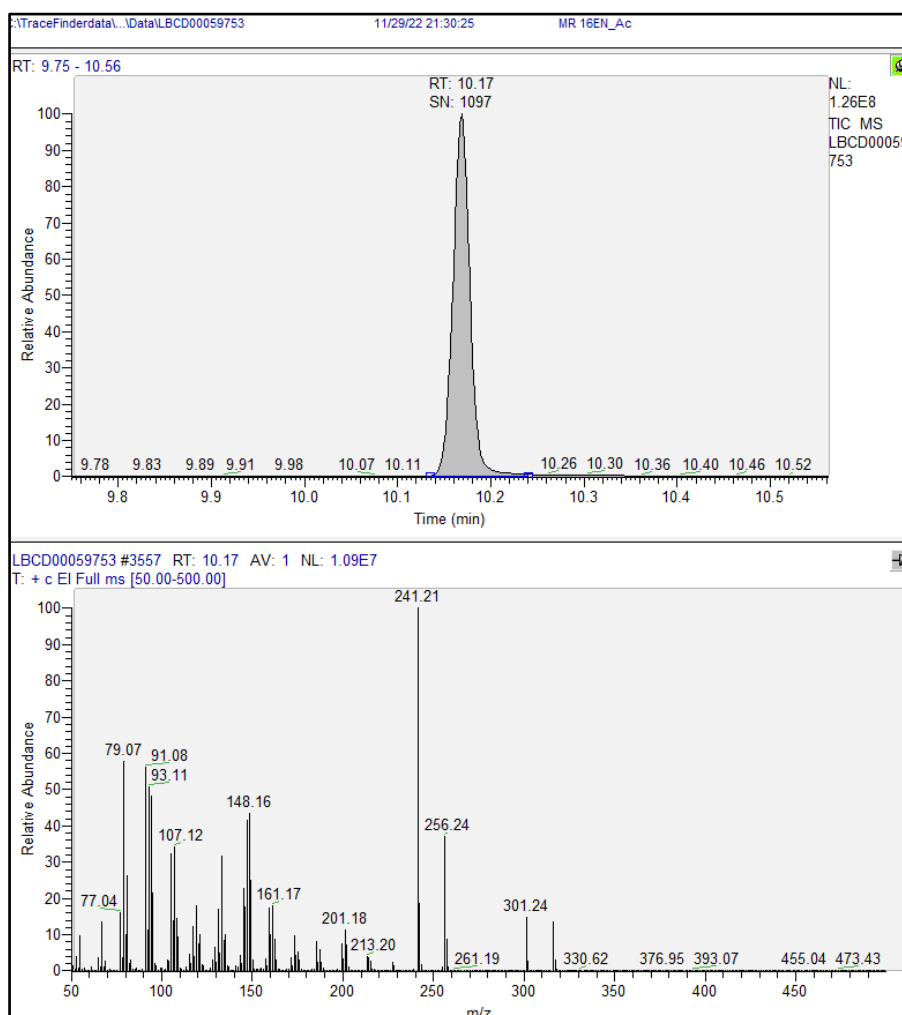


Figura 8.4. Cromatograma e espectro de massas obtidos a partir da análise de solução padrão de 16EN previamente acetilado.

8.f. Parâmetros de validação

Todos os parâmetros aqui informados foram avaliados tendo em vista as determinações da Wada, atendendo aos preceitos do *Detection of Synthetic Forms of Prohibited Substances by GC/C/IRMS*, TD2022IRMS.

8.f.1. Linearidade do instrumento

Faixa de intensidades de pico (em mV) dos analitos injetados que produz um valor de $\delta^{13}\text{C}$ consistente e repetitivo a partir da análise de padrões dos esteroides.

8.f.1.a. Procedimento de determinação utilizado

A faixa linear do instrumento foi determinada pela análise de soluções com diferentes concentrações dos materiais de referência em triplicata. A faixa linear para cada analito foi determinada contemplando entre 6 e 10 pontos.

Os critérios de aceitação dos resultados incluíram desvios-padrão (DP) menores ou iguais a 0,5 ‰ na triplicata em cada concentração e variações menores ou iguais a 0,5 ‰ para a média da triplicata em cada concentração em relação à média geral.

8.f.1.b. Resultados

Os resultados dos experimentos são apresentados nas Tabelas 8.4 a 8.7 e nas Figuras 8.5 a 8.8 que apresentam os gráficos de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) x amplitude (mV). A Tabela 8.8 resume os resultados obtidos para determinação da linearidade dos instrumentos 15E1406 e 15E1412.

Tabela 8.4. Linearidade do instrumento 15E1406 para PT.

Ponto	Massa injetada (ng)	Amplitude média (mV)	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)				
			Curva 1	Curva 2	Curva 3	DP	Média
P1	20	503	-31,07	-30,20	-30,48	-30,58	0,45
P2	40	937	-30,69	-31,01	-30,79	-30,83	0,16
P3	80	2110	-30,48	-30,26	-30,34	-30,36	0,11
P4	120	3057	-30,26	-30,23	-30,20	-30,23	0,03
P5	160	3757	-30,23	-30,26	-30,39	-30,29	0,08
P6	250	4870	-30,19	-30,31	-30,31	-30,27	0,07
P7	400	7881	-30,73	-30,30	-30,51	-30,51	0,22
Média			-30,44				
Média – 0,5 ‰			-30,94				
Média + 0,5 ‰			-29,94				

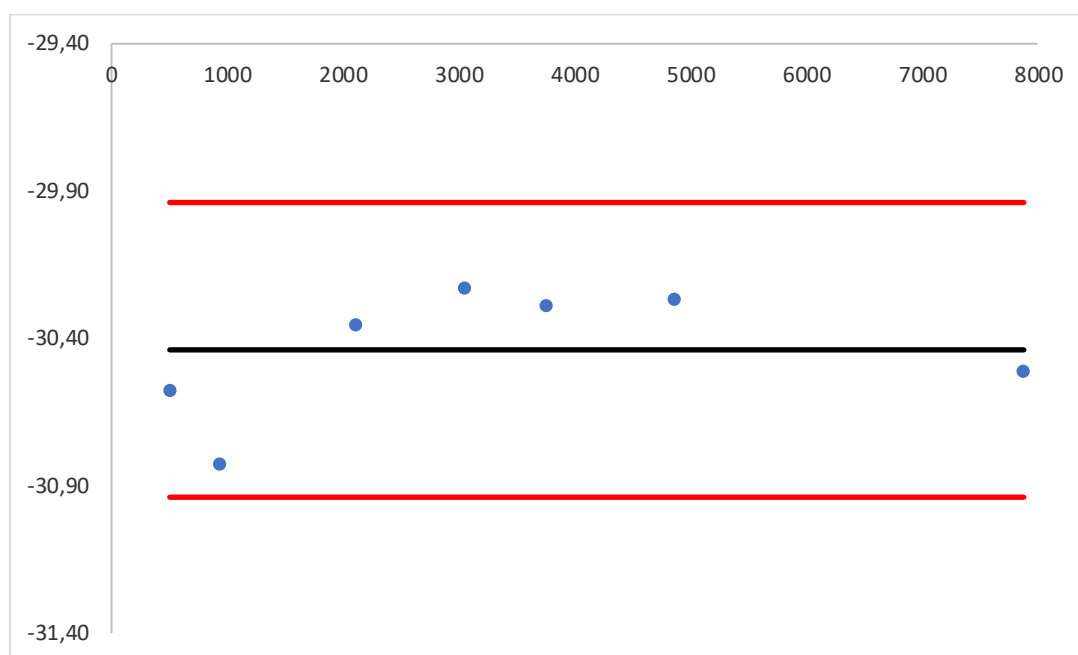


Figura 8.5. Avaliação gráfica da linearidade do instrumento 15E1406 para PT.

Tabela 8.5. Linearidade do instrumento 15E1406 para 16EN.

Ponto	Massa injetada (ng)	Amplitude média (mV)	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)				
			Curva 1	Curva 2	Curva 3	DP	Média
P1	1132	1132	-32,43	-32,03	-32,16	-32,21	0,20
P2	2570	2570	-32,10	-32,00	-32,14	-32,08	0,07
P3	3084	3084	-31,96	-32,15	-32,20	-32,10	0,12
P4	4534	4534	-32,05	-32,31	-31,98	-32,11	0,18
P5	7858	7858	-32,05	-32,03	-31,92	-32,00	0,07
P6	10356	10356	-31,93	-32,10	-31,96	-32,00	0,09
P7	12770	12770	-31,96	-31,88	-31,94	-31,92	0,04
P8	19118	19118	-31,89	-31,92	-31,71	-31,84	0,11
P9	28388	28388	-31,72	-31,86	-31,59	-31,72	0,13
Média			-32,00				
Média – 0,5 ‰			-32,50				
Média + 0,5 ‰			-31,50				

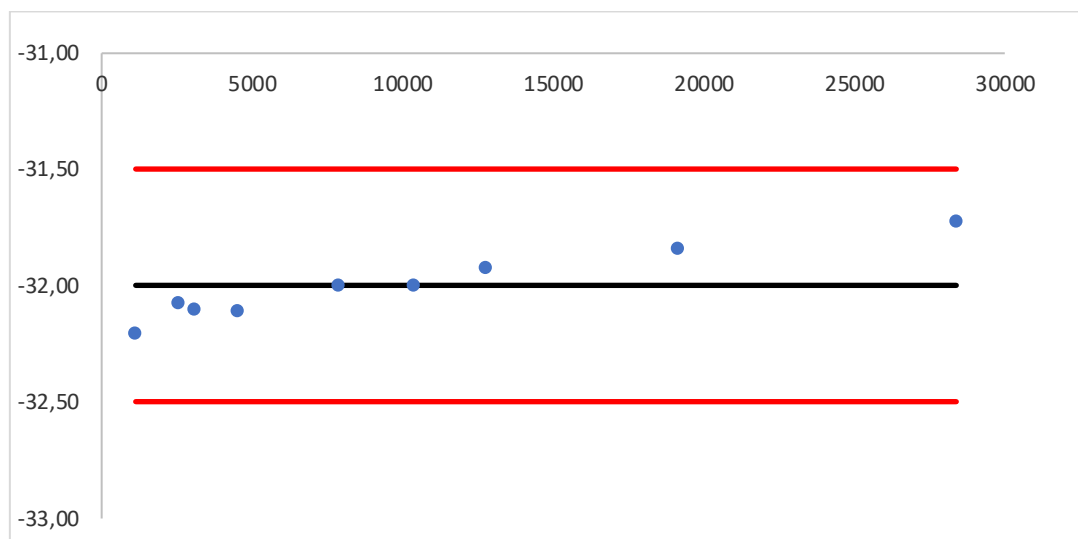


Figura 8.6. Avaliação gráfica da linearidade do instrumento 15E1406 para 16EN.

Tabela 8.6. Linearidade do instrumento 15E1412 para PT.

Ponto	Massa injetada (ng)	Amplitude média (mV)	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)				
			Curva 1	Curva 2	Curva 3	DP	Média
P1	10	215	-31,91	-31,80	-31,68	-31,80	0,12
P2	20	608	-31,85	-31,43	-31,46	-31,58	0,23
P3	40	834	-31,71	-31,60	-31,66	-31,66	0,05
P4	80	1643	-31,58	-31,44	-31,48	-31,50	0,07
P5	120	2393	-31,49	-31,42	-31,50	-31,47	0,04
P6	250	4365	-31,33	-31,42	-31,45	-31,40	0,06
P7	400	5962	-31,45	-31,49	-31,54	-31,49	0,05
Média			-31,56				
Média – 0,5 ‰			-32,06				
Média + 0,5 ‰			-32,56				

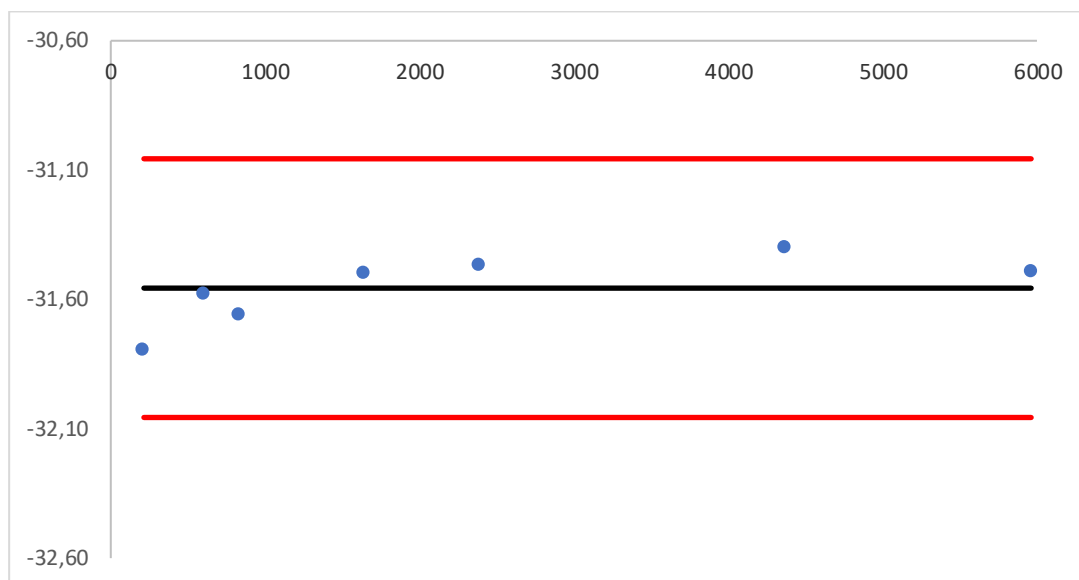


Figura 8.7. Avaliação gráfica da linearidade do instrumento 15E1412 para PT.

Tabela 8.7. Linearidade do instrumento 15E1412 para 16EN.

Ponto	Massa injetada (ng)	Amplitude média (mV)	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)				
			Curva 1	Curva 2	Curva 3	DP	Média
P1	10	699	-32,19	-31,93	-31,90	-32,01	0,16
P2	20	1629	-32,09	-31,62	-31,71	-31,81	0,25
P3	40	2974	-32,04	-31,44	-31,82	-31,77	0,30
P4	80	7166	-32,02	-32,14	-31,99	-32,05	0,08
P5	120	8643	-32,08	-31,92	-32,00	-32,00	0,08
P6	160	14677	-31,93	-31,93	-31,90	-31,92	0,02
P7	250	20924	-31,91	-32,02	-31,86	-31,93	0,08
P8	400	30321	-31,87	-31,89	-31,86	-31,87	0,01
Média			-31,92				
Média – 0,5 ‰			-32,42				
Média + 0,5 ‰			-31,42				

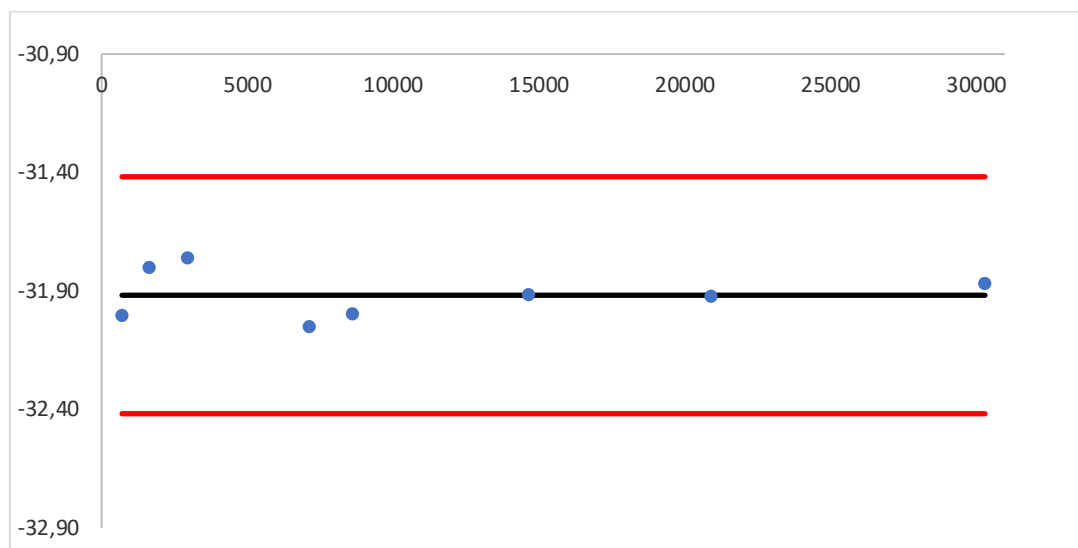


Figura 8.8. Avaliação gráfica da linearidade do instrumento 15E1412 para 16EN.

Tabela 8.8. Faixas lineares do instrumento para PT e 16EN.

Analito	Faixa linear (mV)	
	15E1406	15E1412
PT	503 – 7881	215 – 5962
16EN	1132 – 28388	699 – 30321

O instrumento apresentou linearidade adequada para a análise dos dois esteroides. Picos com intensidade fora da respectiva faixa linear devem ser desconsiderados durante a análise de amostras de atletas.

8.f.2. Precisão intermediária

Variação dos resultados observados quando um ou mais fatores, como tempo, equipamento e analista, mudam no laboratório. A precisão intermediária é expressa como o DP do valor de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) entre as replicatas reais de análise de uma dada amostra.

8.f.2.a Procedimento de determinação utilizado

A precisão intermediária (precisão interensaio) foi obtida através da análise de vinte ($n = 20$) alíquotas do Controle da Qualidade Negativo (CQN, urina 19U0002454-01). Três (3) analistas diferentes estiveram envolvidos no preparo das alíquotas, realizados em dias diferentes.

8.f.2.b Resultados

Os DP obtidos pela avaliação de PT e 16EN no CQN são apresentados nas Tabelas 8.9 e 8.10, respectivamente.

Tabela 8.9. Determinação da precisão intermediária para PT.

n	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	Amplitude (mV)
1	-21,80	2635
2	-21,74	2241
3	-21,76	2173
4	-21,81	2404
5	-21,76	3491
6	-21,27	1542
7	-21,25	1586
8	-21,45	1581
9	-21,28	1302
10	-21,44	1562
11	-21,49	866
12	-21,04	2182
13	-20,81	2360
14	-20,84	2073
15	-20,80	2239
16	-20,79	2444
17	-20,85	2458
18	-20,74	2427
19	-20,83	2352
20	-20,78	2585
DP	0,41	

Tabela 8.10. Determinação da precisão intermediária para 16EN.

<i>n</i>	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	Amplitude (mV)
1	-20,42	3272
2	-20,29	4822
3	-20,21	3354
4	-20,14	3601
5	-20,06	1655
6	-20,38	1645
7	-20,70	1300
8	-20,21	1687
9	-20,70	911
10	-20,46	1298
11	-20,35	2757
12	-20,42	2115
13	-20,49	2236
14	-20,53	2014
15	-20,37	2290
16	-20,62	1723
17	-20,19	1771
18	-20,53	1535
19	-20,53	1291
20	-20,64	1582
DP	0,19	

Os valores de precisão intermediária obtidos para PT (0,41 ‰) e 16EN (0,19 ‰) são considerados satisfatórios.

8.f.3 Exatidão

O desvio da exatidão é estimado através da comparação entre os valores de $\delta^{13}\text{C}$ obtidos pela análise direta de soluções de padrões dos analitos em solvente puro (após acetilação) e os valores de $\delta^{13}\text{C}$ obtido após a fortificação de alíquotas de urina com os mesmos padrões e o subsequente processamento dessas alíquotas por todo o

procedimento de extração, derivatização e análise de esteroides endógenos por CG/C/EMRI. Valores baixos de desvio da exatidão indicam a ausência de fracionamento isotópico relacionado às etapas de purificação e derivatização de amostras, assim como de qualquer interferência de matriz. O propósito do experimento é comparar os valores de $\delta^{13}\text{C}$ dos padrões de esteroides quando analisados diretamente e após serem fortificados em urina e submetidos a todo o procedimento analítico.

8.f.3.a Procedimento de determinação utilizado

A exatidão do método foi determinada através do experimento de adição padrão, já amplamente descrito na literatura para a análise de esteroides por CG/C/EMRI. Aqui “exatidão” é relacionada à confirmação da falta de fracionamento isotópico em decorrência do método.

A adição padrão compara os valores de $\delta^{13}\text{C}$ obtidos através da análise direta dos materiais de referência dos esteroides diluídos em solvente com os valores de $\delta^{13}\text{C}$ obtidos para as mesmas substâncias fortificadas em urina a diferentes concentrações e processadas através de todo o método de análise (incluindo as etapas de preparo de amostra, derivatização e análise necessários à determinação do $\delta^{13}\text{C}$ dos esteroides endógenos). A coincidência desses valores de $\delta^{13}\text{C}$ garante a exatidão do método devido à ausência de fracionamento isotópico relacionado aos procedimentos de preparo de amostra e derivatização, assim como de interferência da matriz. O propósito desse experimento é comparar os valores experimentais obtidos para $\delta^{13}\text{C}$ dos materiais de referência, quando diretamente analisados *versus* a análise após fortificação em urina e processamento da amostra por todo o método analítico.

A comparação com a equação linear ($y = ax + b$) mostra que a equação correspondente à regressão linear representa a diferença entre o $\delta^{13}\text{C}$ do esteroide endógeno presente na urina ($\delta^{13}\text{C}_e$) e do padrão adicionado ($\delta^{13}\text{C}_a$), ou seja, $\delta^{13}\text{C}_e - \delta^{13}\text{C}_a$, como coeficiente angular. O valor absoluto de $\delta^{13}\text{C}_a$ é obtido por extrapolação da curva até o eixo y, ou seja, corresponde ao coeficiente linear da equação. Portanto, a equação pode ser reescrita conforme a Equação 8.1.

$$\delta^{13}C_m = (\delta^{13}C_e - \delta^{13}C_a) \times \frac{C_e}{C_m} + \delta^{13}C_a \quad \text{Equação 8.1}$$

Onde:

C_e = Concentração do esteroide endógeno presente na urina;

C_a = Concentração do padrão adicionado;

C_m = Concentração da mistura, ou seja, $C_a + C_e$.

Foram preparadas três curvas com seis níveis correspondendo a seis valores de C_e/C_m . Foram preparadas alíquotas do CQN de 10 mL para análise de PT e 16EN. As alíquotas foram fortificadas com concentrações adequadas dos padrões dos respectivos esteroides. As curvas foram preparadas em dias diferentes e por analistas diferentes.

8.f.3.b Resultados

Os valores médios de $\delta^{13}C$ referentes aos materiais de referência analisados a partir das soluções puras são apresentados na Tabela 8.11. Cada média foi estabelecida a partir de n determinações do $\delta^{13}C$ das soluções padrão usadas no experimento, previamente acetiladas.

Tabela 8.11. Valores médios de $\delta^{13}C$ referentes aos padrões acetilados e analisados diretamente a partir das soluções puras.

	PT	16EN
n	24	24
$\delta^{13}C_{\text{médio}} (\text{‰})$	-31,65	-32,07

As Tabelas 8.12 e 8.13 apresentam os resultados das curvas de adição padrão. As avaliações gráficas dos resultados obtidos são apresentadas nas Figuras 8.9 e 8.10. A Tabela 8.14 resume os valores de $\delta^{13}C_{\text{teórico}}$ (esperado, correspondente ao valor médio determinado pela análise direta dos padrões acetilados) e $\delta^{13}C_{\text{gráfico}}$ (obtido, igual ao coeficiente linear da equação obtida no experimento de adição padrão), assim como os valores de exatidão obtidos.

Tabela 8.12. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ obtidos para a curva de adição padrão de PT_Ac.

Ponto	c_e/c_m	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)			
		Curva 1	Curva 2	Curva 3	Média
P0	1,00	-21,63	-21,78	-21,08	-21,49
P1	0,62	-25,60	-26,00	-24,55	-25,38
P2	0,45	-27,03	-27,66	-26,26	-26,98
P3	0,36	-28,43	-28,23	-27,94	-28,20
P4	0,29	-29,15	-28,94	-28,13	-28,74
P5	0,25	-29,44	-29,51	-28,75	-29,23

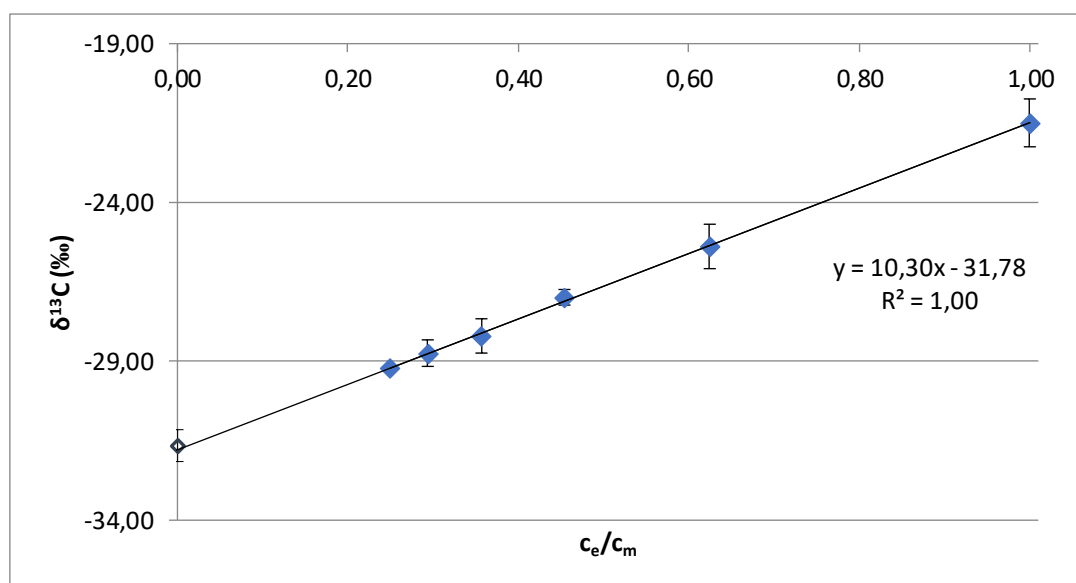


Figura 8.9. Avaliação gráfica do experimento de adição padrão para PT_Ac.

Tabela 8.13. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ obtidos para a curva de adição padrão de 16EN_Ac.

Ponto	c_e/c_m	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)			
		Curva 1	Curva 2	Curva 3	Média
P0	1,00	-20,27	-19,76	-20,44	-20,15
P1	0,63	-25,55	-24,81	-25,58	-25,31
P2	0,46	-27,36	-26,92	-27,47	-27,25
P3	0,36	-28,42	-28,06	-28,51	-28,33
P4	0,30	-28,92	-28,62	-29,30	-28,94
P5	0,25	-29,15	-29,15	-29,63	-29,31

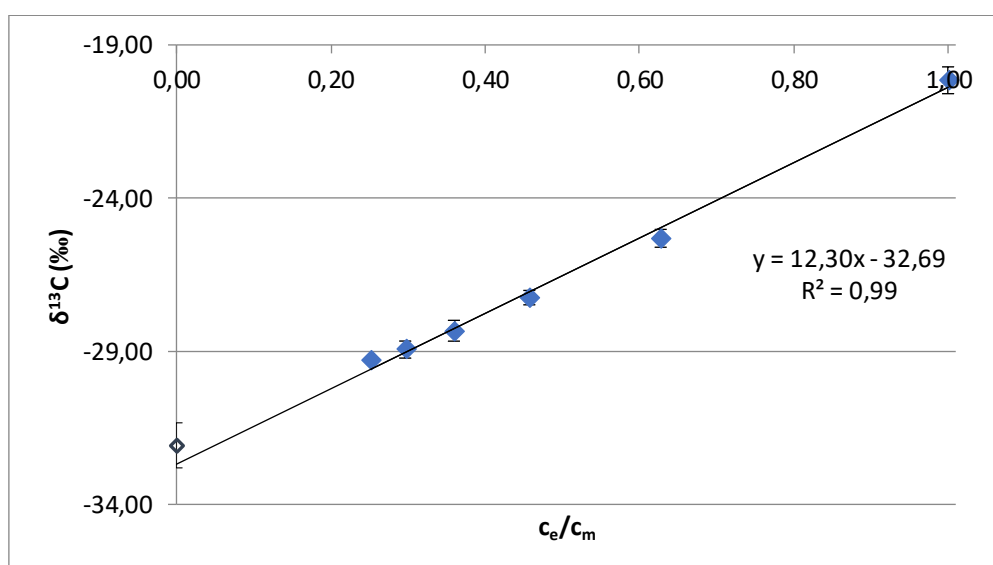


Figura 8.10. Avaliação gráfica do experimento de adição padrão para 16EN_Ac.

Tabela 8.14. Exatidão para PT e 16EN.

Analito	$\delta^{13}\text{C}_{\text{esperado}} (\text{‰})^1$	$\delta^{13}\text{C}_{\text{gráfico}} (\text{‰})^1$	Exatidão (%)
PT	-31,65	-31,78	0,13
16EN	-32,07	-32,69	0,61

¹ $\delta^{13}\text{C}_{\text{teórico}}$ corresponde ao valor esperado, ou seja, ao valor médio determinado pela análise direta dos padrões acetilados, e $\delta^{13}\text{C}_{\text{gráfico}}$ é igual ao coeficiente linear da equação obtida no experimento de adição padrão.

O método apresentou boa exatidão para PT e 16EN, caracterizada pela ausência de desvios significativos na comparação entre os valores de $\delta^{13}\text{C}$ obtidos pela análise direta das soluções dos padrões acetilados e a análise dos esteroides após fortificação em matriz e tratamento das amostras por todo o procedimento de análise. Isso confirma que não há fracionamento isotópico dos analitos durante as etapas de purificação, derivatização e análise em presença da matriz urinária.

8.f.4. Incerteza combinada

Considera as contribuições de incerteza de todo o método analítico.

8.f.4. Procedimento de determinação utilizado

A incerteza combinada (u_c) é determinada pela combinação dos resultados de precisão intermediária e exatidão, conforme descrito na Equação 8.2.

$$u_c = \sqrt{P^2 + E^2} \quad \text{Equação 8.2}$$

Onde:

u_c = Incerteza combinada;

P = Precisão intermediária;

E = Exatidão.

A u_c do método não deve exceder o valor máximo estabelecido pela Wada para os analitos, conforme apresentado na Tabela 8.15.

Tabela 8.15. Incerteza combinada máxima estabelecida para os esteroides.

Analito	$u_{c,máx}$ (‰)
PT	0,7
16EN	0,7

8.f.4.a Resultados

A Tabela 8.16 apresenta os cálculos de u_c a partir dos valores de precisão intermediária (P) e exatidão (E) determinados para PT e 16EN.

Tabela 8.16. Incerteza combinada do método para cada PT e 16EN.

Analito	P (‰)	E (‰)	$u_c = (P^2 + E^2)^{1/2}$ (‰) ¹
PT	0,41	0,13	0,4
16EN	0,19	0,61	0,6

¹ u_c arredondada para uma casa decimal.

Todas as u_c determinadas foram menores ou iguais aos respectivos valores máximos estipulados pela WADA.

8.f.5. Limite de Quantificação

Menor concentração (ng/mL) de cada esteroide em urina que produz um sinal mensurável dentro da faixa linear do instrumento. O Limite de Quantificação (LQ) foi determinado em triplicata e, por definição, o DP entre as replicatas não pode exceder a u_c estimada para o respectivo esteroide. Devem ser usadas alíquotas de urina menores ou iguais a 25 mL.

8.f.5.a Procedimento de determinação utilizado

O Controle da Qualidade Negativo (CQN) usado na rotina do LBCD foi usado para determinação do LQ.

A faixa de trabalho do método foi determinada a partir de diluições progressivas do CQN em água, com fatores de diluição de 2 a 40 vezes, resultando em 25 mL de alíquota em cada ponto testado. Uma alíquota do CQN sem diluição também foi analisada. A faixa de trabalho foi estabelecida como aquela capaz de produzir picos com amplitudes dentro da faixa linear do instrumento e valores de $\delta^{13}\text{C}$ iguais ao $\delta^{13}\text{C}_{\text{médio}} \pm 3 \text{ DP}$. A Tabela 8.17 apresenta as concentrações avaliadas para PT e 16EN.

Tabela 8.17. Concentrações (ng/mL) em diferentes diluições do CQN para determinação da faixa de trabalho do método.

Analito	Concentração (ng/mL)									
	P0	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9
	s/ dil.	Dil. 2x	Dil. 3x	Dil. 4x	Dil. 6x	Dil. 8x	Dil. 10x	Dil. 15x	Dil. 20x	Dil. 40x
PT	524,2	262,1	174,7	131,1	87,4	65,5	52,4	-	6,2	13,1
16EN	623,5	311,7	207,8	155,9	103,9	77,9	62,3	41,6	31,2	15,6

O ponto de menor concentração da faixa de trabalho do método foi analisado em triplicata para determinação do LQ. A Wada estabelece valores máximos de LQ para os esteroides a serem analisados por CG/C/EMRI (WADA, 2022).

8.f.5.b. Resultados

A Tabela 8.18 apresenta a avaliação da faixa de trabalho para PT e 16EN, e a Tabela 8.19 apresenta a avaliação do LQ para os dois esteroides.

Tabela 8.18. Avaliação da faixa de trabalho do método.

	PT	16EN
Faixa de concentrações (ng/mL)	13,1 a 524,2	15,6 a 623,5
$\delta^{13}\text{C}_{\text{médio}}$ (‰)	-21,02	-20,35
DP (‰)	0,09	0,14

Tabela 8.19. Avaliação do LQ selecionado para 16EN.

	PT	16EN
LQ _{máximo permitido} (ng/mL)	50	50
LQ (ng/mL)	13,1	15,6
$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	R1	-21,21
	R2	-20,91
	R3	-20,72
	DP	0,20

Os DP obtidos durante a análise do LQ para PT e 16EN, iguais a 0,20 ‰ e 0,07 ‰ respectivamente, são inferiores às respectivas u_c estimadas para análise dessas RE, iguais a 0,4 ‰ e 0,6 ‰. O LQ para PT foi definido a 13,1 ng/mL e para 16EN, a 15,6 ng/mL.

8.f.6. Adequação do método – População de referência

Determinação dos valores de $\Delta\delta^{13}\text{C}$ para todos os pares de referência endógena e analito alvo em amostras negativas de uma população de voluntários ou atletas a fim de demonstrar que o método validado é adequado ao propósito do controle de dopagem.

Pelos critérios estabelecidos no TD2022IRMS da Wada:

- $|\Delta\delta^{13}\text{C}|$ médio + 2 DP para cada combinação contendo A como alvo tem que ser $\leq 2,0 \text{ ‰}$;
- $|\Delta\delta^{13}\text{C}|$ médio + 2 DP para cada combinação contendo T, 5 α -diol, 5 β -diol ou Etio como alvo tem que ser $\leq 3,0 \text{ ‰}$;
- $|\Delta\delta^{13}\text{C}|$ médio + 2 DP para cada combinação contendo E como alvo tem que ser $\leq 4,5 \text{ ‰}$;
- Para as combinações contendo T, 5 α -diol, 5 β -diol, A ou Etio como alvo, o DP de todos os valores de $|\Delta\delta^{13}\text{C}|$ tem que ser $\leq 1,0 \text{ ‰}$;
- Para as combinações contendo E como alvo, o DP de todos os valores de $|\Delta\delta^{13}\text{C}|$ tem que ser $\leq 1,2 \text{ ‰}$.

8.f.6.a Procedimento de determinação utilizado

Para estabelecer uma população de referência, serão coletadas amostras de urina negativas de voluntários masculinos e femininos até que sejam obtidas no mínimo 40 medições de valores de $\Delta\delta^{13}\text{C}$ para cada par de alvo analítico e as referências endógenas PT e 16EN, devendo ser 20 resultados provenientes de amostras de voluntários do sexo masculino e 20 do sexo feminino. No caso dos pares envolvendo os alvos analíticos T e E, não é necessário que o laboratório obtenha 20 resultados para amostras de voluntários do sexo feminino, mas ainda assim o total deve ser de pelo menos 40 resultados.

8.f.6.b Resultados

Foram analisadas 72 amostras de urina negativas, sendo 35 de voluntários do sexo masculino e 37 de voluntários do sexo feminino. A Tabela 8.20 apresenta o sexo e os valores de densidade e pH referentes a cada urina testada e codificada. As Tabelas 8.21 e 8.22 apresentam os valores de $\Delta\delta^{13}\text{C}$ calculados para os alvos T, E, 5 α -diol, 5 β -diol, A e Etio usando PT e 16EN como referências endógenas.

Tabela 8.20. Sexo, densidade e pH das urinas da população de referência.

Amostra	Código	Sexo	Densidade (g/mL)	pH
1	0591UH	F	1,010	6,50
2	0592UH	M	1,012	5,52
3	0594UH	F	1,015	5,84
4	0595UH	M	1,017	6,82
5	0596UH	M	1,025	5,59
6	0597UH	F	1,013	6,28
7	0598UH	M	1,025	5,96
8	0599UH	M	1,019	5,86
9	0600UH	F	1,010	6,32
10	0601UH	M	1,022	6,17
11	0602UH	F	1,020	5,87
12	0603UH	F	1,014	6,02
13	0604UH	F	1,015	6,00
14	0605UH	F	1,016	5,81
15	0606UH	F	1,015	7,15
16	0607UH	M	1,028	5,99
17	0608UH	M	1,024	6,10
18	0609UH	F	1,011	6,08
19	0610UH	F	1,015	6,11
20	0611UH	F	1,025	5,91
21	0612UH	M	1,022	5,69
22	0614UH	F	1,009	6,16

Tabela 8.20. Sexo, densidade e pH das urinas da população de referência (Cont).

Amostra	Código	Sexo	Densidade (g/mL)	pH
23	0615UH	F	1,009	5,75
24	0616UH	F	1,028	5,93
25	0617UH	F	1,022	5,88
26	0618UH	M	1,017	5,73
27	0619UH	F	1,005	6,63
28	0620UH	M	1,024	6,85
29	0621UH	F	1,028	5,77
30	0622UH	F	1,017	6,05
31	0623UH	M	1,013	6,88
32	0624UH	F	1,015	5,39
33	0629UH	M	1,017	5,85
34	0630UH	M	1,031	5,51
35	0631UH	M	1,015	5,72
36	0632UH	F	1,028	6,78
37	0633UH	M	1,012	7,21
38	0634UH	F	1,014	7,20
39	0635UH	F	1,029	5,77
40	0636UH	F	1,012	6,30
41	0637UH	M	1,025	5,58
42	0638UH	F	1,013	6,65
43	0639UH	M	1,014	5,63
44	0640UH	F	1,028	5,58
45	0641UH	M	1,014	5,85
46	0642UH	F	1,017	5,83
47	0699UH	M	1,010	6,30
48	0700UH	M	1,011	5,27
49	0702UH	M	1,028	5,80
50	0703UH	M	1,016	5,70
51	0704UH	F	1,015	6,35
52	0708UH	M	1,018	6,59

Tabela 8.20. Sexo, densidade e pH das urinas da população de referência.

Amostra	Código	Sexo	Densidade (g/mL)	pH
53	0709UH	F	1,018	6,06
54	0713UH	M	1,009	5,72
55	0753UH	M	1,018	5,68
56	0754UH	F	1,027	5,67
57	0755UH	M	1,018	5,71
58	0756UH	M	1,014	5,94
59	0757UH	F	1,020	5,68
60	0758UH	F	1,013	5,93
61	0759UH	F	1,022	5,80
62	0760UH	F	1,012	6,06
63	0761UH	M	1,023	5,44
64	0788UH	M	1,014	5,21
65	0790UH	F	1,026	6,87
66	0735UH	M	1,016	6,28
67	0736UH	M	1,024	5,27
68	0737UH	F	1,024	5,33
69	0738UH	M	1,034	5,37
70	0739UH	M	1,008	5,73
71	0740UH	F	1,024	5,63
72	0741UH	M	1,010	5,49

Tabela 8.21. $\Delta\delta^{13}\text{C}$ da população de referência usando PT como referência endógena.

Amostra	Código	Sexo	5 β -diol	5 α -diol	A	Etio	T	E
2	0592UH	M	1,5	1,7	1,0	1,8	1,7	3,6
3	0594UH	F	2,0	2,1	1,0	1,7		
4	0595UH	M	1,6	1,4	0,7	1,4	1,3	2,0
5	0596UH	M	1,2	1,2	0,4	0,9	0,9	2,0
6	0597UH	F	2,0	1,5	0,2	1,3		
7	0598UH	M	2,0	2,6	1,2	2,1	2,1	4,1
8	0599UH	M	1,6	1,6	0,9	0,8	1,5	2,0
9	0600UH	F	2,4	2,2	1,3	1,8		
10	0601UH	M	1,5	1,3	0,4	1,6	1,6	2,7
12	0603UH	F	1,9	1,8	0,8	1,5		
13	0604UH	F		1,9	0,9	2,2		
14	0605UH	F	1,3	1,6	0,6	1,9		4,2
15	0606UH	F	2,4	1,7	0,3	1	1,7	3,8
16	0607UH	M	0,9	0,7	0,4	0,3	0,4	1,3
17	0608UH	M	0,9	1,4	0,6	0,5	1,7	2,4
18	0609UH	F	2,2	2,1	0,8	1,5		
19	0610UH	F	2,9	2,3	0,8	1,7		
20	0611UH	F	1,6	1,7	0,7	1,2		
21	0612UH	M	1,4	2,3	1,3	1,8	2,4	3,3
22	0614UH	F	2,2	2,4	1,0	1,4		
23	0615UH	F			0,9	1,5		
24	0616UH	F	2,0	2,0	0,7	1,4	2,3	2,0
25	0617UH	F	2,5	2,5	1,0	2,0		
26	0618UH	M	0,6	0,9	0,2	0,9	1,8	1,8
27	0619UH	F	1,6		1,0	1,4		
28	0620UH	M	2,1	2,6	0,9	1,8	2,6	2,3
29	0621UH	F	1,4	1,4	0,7	1,3	2,7	2,8
30	0622UH	F	1,3	2,5	1,7	2,2	2,7	3,5
31	0623UH	M	1,6	1,5	0,4	1,7	1,9	4,0
32	0624UH	F	1,4	2,3	0,6	1,7		3,5
33	0629UH	M	0,5	1,5	0,9	0,7	1,1	1,5

Tabela 8.21. $\Delta\delta^{13}\text{C}$ da população de referência usando PT como referência endógena (cont.).

Amostra	Código	Sexo	5 β -diol	5 α -diol	A	Etio	T	E
34	0630UH	M	0,8	2,1	1,0	0,6	1,7	2,2
35	0631UH	M	0,8	1,6	0,9	0,8	1,4	1,6
36	0632UH	F	1,0	2,0	0,7	0,6	2,7	2,5
37	0633UH	M	1,0	1,4	0,1	1,2	1,3	3,0
38	0634UH	F	2,2	1,8	0,4	1,4		3,3
39	0635UH	F	1,6	1,7	0,8	1,7	2,2	3,9
40	0636UH	F	2,8	1,8	0,5	1,8		3,6
41	0637UH	M	1,5	1,7	0,1	1,0	1,0	2,1
42	0638UH	F			0,8	1,3		
43	0639UH	M	1,1	1,4	0,2	1,5	1,1	2,3
44	0640UH	F	1,1	1,4	0,2	1,2	2,6	2,7
45	0641UH	M	1,2	1,6	0,7	1,4	1,4	4,1
46	0642UH	F	0,5	1,7	0,3	1,9	2,6	3,4
47	0699UH	M	1,4	1,4	0,9	2,9	1,8	3,0
48	0700UH	M	1,3	1,7	1,0		2,6	3,1
49	0702UH	M	1,2	1,6	0,7	1,5	2,1	2,1
50	0703UH	M	1,7	1,6	0,8	1,4	2,5	2,0
51	0704UH	F	2,5	1,9	0,5	1,9	2,7	1,7
52	0708UH	M	1,1	2,3	1,8	1,9	2,1	2,9
53	0709UH	F	1,9	2,1	0,5	1,8	2,4	2,6
54	0713UH	M	1,7	2,4	1,3	2,4	1,8	3,2
55	0753UH	M	1,2	2,0	0,3	1,1	1,2	2,2
56	0754UH	F	1,1	2,5	0,6	1,7	2,2	
57	0755UH	M	2,0	2,5	0,8	2,3	2,0	2,6
58	0756UH	M	1,5	2,1	0,5	1,3	1,5	2,2
59	0757UH	F	1,9	2,5	0,2	1,4	1,7	2,5
60	0758UH	F	0,4	1,8	0,4	1,1	1,3	1,8
61	0759UH	F	2,4	2,7	0,6	1,3	2,1	1,8
62	0760UH	F	0,9	1,7	0,3	0,7		2,4
63	0761UH	M	0,5	2,4	0,1	2,1	2,3	2,6

Tabela 8.21. $\Delta\delta^{13}\text{C}$ da população de referência usando PT como referência endógena (cont.).

Amostra	Código	Sexo	5 β -diol	5 α -diol	A	Etio	T	E
64	0788UH	M	1,5	2,5	0,4	1,9	1,8	3,4
65	0790UH	F	2,3	1,8	0,3	2,1	0,7	2,2
66	0735UH	M	1,1	1,1	0,7	0,4	0,8	1,4
67	0736UH	M	0,9	1,7	0,2	0,7	1,5	2,2
68	0737UH	F	1,3	1,2	0,3	0,5	1,6	2,1
69	0738UH	M	2,4	2,0	0,3	1,2	2,3	1,6
70	0739UH	M	0,5	1,5	0,4	0,2	1,6	1,8
71	0740UH	F	1,6	2,1	0,1	0,5	1,3	3,1
72	0741UH	M	0,8	2,0	0,1	0,5	2,6	2,5
nº M / F			35 / 32	35 / 32	35 / 35	34 / 35	35 / 17	35 / 21
Média			1,5	1,8	0,6	1,4	1,8	2,6
DP			0,6	0,5	0,4	0,6	0,6	0,8
$\Delta\delta^{13}\text{C}+2\text{DP}$			2,7	2,8	1,4	2,5	3,0	4,1

Tabela 8.22. $\Delta\delta^{13}\text{C}$ da população de referência usando 16EN como referência endógena.

Amostra	Código	Sexo	5 β -diol	5 α -diol	A	Etio	T	E
1	0591UH	F	0,8	2,1	0,0	1,8		1,3
2	0592UH	M	0,9	0,7	1,4	0,7	0,8	1,2
4	0595UH	M	1,6	1,4	0,7	1,4	1,2	1,9
5	0596UH	M	0,1	0,1	0,7	0,2	0,2	0,9
6	0597UH	F	1,5	1,0	0,3	0,9		
7	0598UH	M	1,1	1,7	0,3	1,1	1,2	3,1
8	0599UH	M	0,7	0,8	0,0	0,0	0,6	1,2
9	0600UH	F	2,0	1,8	0,8	1,4		
10	0601UH	M	0,4	0,2	0,7	0,5	0,5	1,6
11	0602UH	F	2,7	2,3	0,6	2,3		3,5
12	0603UH	F	1,1	1,0	0,1	0,7		
13	0604UH	F		1,2	0,1	1,4		
14	0605UH	F	0,3	0,0	1,0	0,3		2,6
15	0606UH	F	1,5	0,8	0,6	0,5	0,8	2,9
16	0607UH	M	1,1	0,9	0,2	0,5	0,7	1,5
17	0608UH	M	0,1	0,6	0,2	0,2	0,9	1,7
18	609UH	F	1,7	1,5	0,2	0,9		
19	0610UH	F	2,1	1,5	0,1	1,0		
20	0611UH	F	0,8	0,8	0,1	0,3		
21	0612UH	M	0,0	1,0	0,1	0,4	1,0	1,9
22	0614UH	F	1,3	1,4	0,0	0,5		
23	0615UH	F			0,5	1,0		
24	0616UH	F	1,4	1,4	0,1	0,8	1,7	1,4
25	0617UH	F	1,8	1,7	0,3	1,2		
26	0618UH	M	0,1	0,4	0,3	0,5	1,4	1,4
27	0619UH	F	1,3		0,6	1,1		
28	0620UH	M	1,7	2,2	0,5	1,5	2,2	1,9
29	0621UH	F	1,0	1,0	0,3	0,9	2,3	2,4
30	0622UH	F	0,3	1,5	0,7	1,2	1,7	2,5
31	0623UH	M	1,1	1,0	0,1	1,3	1,4	3,5

Tabela 8.22. $\Delta\delta^{13}\text{C}$ da população de referência usando 16EN como referência endógena (cont.).

Amostra	Código	Sexo	5 β -diol	5 α -diol	A	Etio	T	E
32	0624UH	F	0,4	1,2	0,4	0,7		2,5
33	0629UH	M	0,7	1,3	0,7	0,5	0,9	1,3
34	0630UH	M	0,5	1,7	0,6	0,2	1,4	1,9
35	0631UH	M	0,5	1,3	0,6	0,5	1,1	1,3
36	0632UH	F	0,4	1,3	0,1	0,0	2,0	1,9
37	0633UH	M	0,0	0,4	0,9	0,1	0,2	1,9
38	0634UH	F	1,5	1,1	0,3	0,7		2,6
39	0635UH	F	0,7	0,8	0,1	0,8	1,3	3,0
40	0636UH	F	2,2	1,2	0,1	1,2		3,0
41	0637UH	M	0,9	1,1	0,7	0,4	0,4	1,5
42	0638UH	F			0,4	1,0		
44	0640UH	F	1,0	1,3	0,2	1,2	2,5	2,7
45	0641UH	M	0,4	0,1	0,8	0,1	0,1	2,5
46	0642UH	F	0,2	1,4	0,0	1,6	2,3	3,1
47	0699UH	M	1,3	1,2	0,7	2,8	1,6	2,8
48	0700UH	M	0,5	0,9	0,2		1,8	2,3
49	0702UH	M	0,8	1,2	0,3	1,1	1,7	1,7
50	0703UH	M	1,0	0,9	0,1	0,7	1,8	1,3
51	0704UH	F	1,9	1,2	0,2	1,2	2,1	1,1
52	0708UH	M	0,5	0,7	0,2	0,3	0,6	1,3
53	0709UH	F	1,6	1,8	0,2	1,5	2,1	2,3
54	0713UH	M	0,0	0,7	0,4	0,7	0,1	1,4
55	0753UH	M	0,3	0,4	1,2	0,5	0,4	0,6
56	0754UH	F	0,0	1,5	0,5	0,6	1,1	
57	0755UH	M	0,8	1,2	0,4	1,1	0,8	1,3
58	0756UH	M	0,2	0,8	1,7	0,0	0,3	1,0
59	0757UH	F	0,7	1,3	1,1	0,1	0,5	1,2
60	0758UH	F	1,2	0,2	1,9	0,5	0,3	0,2
61	0759UH	F	1,6	2,0	0,1	0,6	1,3	1,0
62	0760UH	F	0,5	1,3	0,1	0,3		2,0

Tabela 8.22. $\Delta\delta^{13}\text{C}$ da população de referência usando 16EN como referência endógena (cont.).

Amostra	Código	Sexo	5 β -diol	5 α -diol	A	Etio	T	E
63	0761UH	M	0,3	2,2	0,2	1,8	2,1	2,3
64	0788UH	M	0,7	0,4	1,7	0,2	0,3	1,3
65	0790UH	F	1,7	1,2	1,0	1,5	0,1	1,6
66	0735UH	M	0,9	0,9	0,9	0,2	0,6	1,2
67	0736UH	M	0,5	1,4	0,5	0,3	1,1	1,8
68	0737UH	F	1,7	1,6	0,1	0,9	2,0	2,5
69	0738UH	M	2,1	1,6	0,6	0,8	2,0	1,3
70	0739UH	M	0,8	1,8	0,1	0,5	1,9	2,1
71	0740UH	F	1,8	2,3	0,3	0,7	1,5	3,3
72	0741UH	M	0,5	1,6	0,5	0,1	2,2	2,1
nº M / F			34 / 33	34 / 33	34 / 36	33 / 36	34 / 17	34 / 23
Média			0,9	1,2	0,5	0,8	1,2	1,9
DP			0,6	0,5	0,4	0,6	0,7	0,8
$\Delta\delta^{13}\text{C}+2\text{DP}$			2,2	2,3	1,3	1,9	2,6	3,4

Para cada par de referência endógena e alvo analítico, foram obtidos valores de $\Delta\delta^{13}\text{C}$ de pelo menos 33 amostras de voluntários do sexo masculino e 32 do sexo feminino, perfazendo um mínimo de 67 resultados, exceto para T e E. Para os pares envolvendo T e E como alvos, o número de amostras de voluntárias (sexo feminino) capazes de produzir um resultado dentro da faixa linear do equipamento e com a pureza de pico adequada à análise foi inferior ao observado para os demais analitos, conforme esperado em decorrência da sua concentração mais baixa que a dos demais esteroides na urina. Ainda assim, para avaliar PT como RE foram obtidos 52 resultados para T e 56 para E, e para avaliar 16EN como RE foram obtidos 51 resultados para T e 57 para E.

Os critérios de avaliação da adequação do método ao propósito do controle de dopagem foram atendidos. O maior DP obtido em todo o experimento foi igual a 0,8 ‰, observado para os pares envolvendo E como alvo.

O maior resultado de $\Delta\delta^{13}\text{C}+2\text{DP}$ obtido para E foi igual a 4,1 ‰, observado para o par PT-E.

Para A, o maior resultado de $\Delta\delta^{13}\text{C}+2\text{DP}$ obtido foi igual a 1,4 ‰, observado para o par PT-A.

Para os demais alvos, o maior resultado de $\Delta\delta^{13}\text{C}+2\text{DP}$ obtido foi igual a 3,0 ‰, observado para o par PT-T.

8.g. Conclusão

Os resultados obtidos apontam que o método é adequado para a análise de PT e 16EN por CG-EMq/C/EMRI.

O uso de CLAE preparativa como etapa de purificação de amostras permitiu uma separação adequada dos analitos a partir da análise de misturas de padrões e de amostras reais, sem prejuízo para a purificação dos demais analitos já validados nesse método.

O sistema CG-EMq/C/EMRI apresentou boa linearidade para a análise de PT e 16EN. O método apresentou boas precisão e exatidão para análise dessas duas RE, resultando em uma u_c adequada para a análise conforme os requisitos da Wada. Os LQ determinados para a análise de PT e 16EN também atenderam aos critérios estabelecidos pela Wada.

Avaliação da população de referência demonstra que o método é adequado ao propósito do controle de dopagem.

8.h. Referências bibliográficas

- de la TORRE, Xavier; Colamonici, C.; Curcio, D.; Molaioni, F.; Botrè, F. A comprehensive procedure based on gas chromatography-isotope ratio mass spectrometry following high performance liquid chromatography purification for the analysis of underivatized testosterone and its analogues in human urine. **Analytica Chimica Acta** 756, 23-29, 2012.
- de la TORRE, Xavier; Jardines, D.; Curcio, D.; Colamonici, C.; Botrè, F. Isotope ratio mass spectrometry in antidoping analysis: The use of endogenous reference compounds. **Rapid Communication in Mass Spectrometry** 33, 579-586, 2019.
- OLIVEIRA, Fábio Azamor; Casilli, A.; Piper, T.; Silva, T. R.; Silva, C. A.; Silva, R. V. S.; Dal Sasso, M. A.; Salgueiro, G. R. S. G.; Padilha, M. C.; Pereira, H. M. G.; Thevis, M.; Aquino Neto, F. R. Implementation and performance of the gas chromatography/combustion/isotope ratio mass spectrometry-based method for the confirmatory analysis of endogenous anabolic steroids during the Rio de Janeiro Olympic and Paralympic Games 2016. **Analytical Chemistry** 91, 11747–11756, 2019.
- OUELLET, Alexandre; LeBerre, N.; Ayotte, C. A simplified and accurate method for the analysis of urinary metabolites of testosterone-related steroids using gas chromatography/combustion/isotope ratio mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry** 27, 1739-1750, 2013.
- PIPER, Thomas; Mareck, U.; Geyer, H.; Flenker, U.; Thevis, M.; Platen, P.; Schänzer, W. Determination of $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratios of endogenous urinary steroids: method validation, reference population and application to doping control purposes. **Rapid Communications in Mass Spectrometry** 22, 2161-2175, 2008.
- PIPER, Thomas; Schlug, C.; Mareck, U.; Schanzer, W. Investigations on changes in $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratios of endogenous urinary steroids after pregnenolone administration. **Drug Testing and Analysis** 3, 283-290, 2011.
- PIPER, Thomas; Emery, C.; Thomas, A.; Saugy, M.; Thevis, M. Combination of carbon isotope ratio with hydrogen isotope ratio determinations in sports drug testing. **Analytical and Bioanalytical Chemistry** 405, 5455-5466, 2013.

- SOTTAS, Pierre-Edouard; Saugy, M.; Saudan, C. Endogenous steroid profiling in the Athlete Biological Passport. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America** 39, 59-73, 2010.
- WADA, Agência Mundial Antidopagem. WADA Technical Document – TD2022IRMS – Detection of synthetic forms of prohibited substances by GC/C/IRMS, v1.0. Montreal: s.n., 2022.
- WADA, Agência Mundial Antidopagem. –. The 2023 Prohibited List – International Standard. Montreal: s.n., 2023.

SUBPROJETO 9. Estabelecimento do intervalo de referência urinário do agente dopante Cobalto na população brasileira por espectrometria de massas

Coordenação executiva: Drda. Vanessa Farelo

9.a. Introdução

Como apresentado no Relatório Parcial 2, o cobalto foi incorporado, em 2015, a Lista de Substâncias e Métodos Proibidos da Agência Mundial Antidopagem (do inglês, *World Anti-Doping Agency*, WADA) (WADA, 2015), apesar do uso de cianocobalamina (vitamina B12) ser permitido (WADA, 2014). A suplementação com sais de cobalto tem efeito no estímulo da eritropoiese através da estabilização do fator induzível por hipóxia (do inglês, *Hipoxia Inducible Factor*, HIF) (LIPPI *et al.*, 2005; THEVIS & SCHÄNZER, 2014). A exposição a 120 ou 150 mg/dia de cloreto de cobalto resulta no desenvolvimento de policitemia, com um aumento substancial de hematócrito e hemoglobina até 20% acima dos níveis de pré-tratamento (LIPPI *et al.*, 2006). Este aumento de hemoglobina, a principal proteína nos eritrócitos, aumenta a oxigenação, já que é majoritariamente através dela que o oxigênio é carreado no sangue (apenas aproximadamente 3% do oxigênio transportado é dissolvido no plasma). Isto permite que os músculos se tornem mais resistentes, o que promove o aumento de desempenho físico dos atletas (LIPPI *et al.*, 2005). Além de seu efeito na eritropoiese, a suplementação com cloreto de cobalto exibe efeitos benéficos na biossíntese de proteínas (KRUG *et al.*, 2014), na modificação de parâmetros do metabolismo de lipídios e glicose, em particular no aumento da oxidação de ácidos graxos no músculo esquelético (SIMONSEN *et al.*, 2011), e previne o estresse oxidativo induzido por altitudes elevadas (SIMONSEN *et al.*, 2012). Em 2015, Thevis *et al.* reportou, através de análises por Espectrometria de Massas com Plasma Indutivamente Acoplado (do inglês, *Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry*, ICP-MS), quantidades significativas de cobalto e níquel não declarados em produtos vendidos como agentes estimuladores de eritropoiese (THEVIS *et al.*, 2015). Níquel, assim como o cobalto, também é conhecido por induzir hipóxia, mas não está presente na Lista Proibida da WADA (MAXWELL & SALNIKOW, 2004).

No relatório parcial referente ao primeiro semestre de 2022, foram apresentadas e discutidas as etapas descritas na Tabela 1. Para fins de simplificação, as etapas concluídas não serão abordadas novamente neste documento.

Tabela 9.1. Etapas concluídas e apresentadas no relatório referente ao primeiro semestre de 2022.

Síntese do complexo tris(dietilditiocarbamato)cobalto(III) $[\text{Co}(\text{DDC})_3]$ e caracterização por Espectrofotometria na região do Ultravioleta-Visível (UV-Vis), Teoria do Funcional de Densidade (DFT), Teoria do Funcional de Densidade Dependente do Tempo (TD-DFT) e MS;
Otimização das condições de (a) fonte de <i>electrospray</i> (ESI), (b) MS, (c) Extração Líquido-Líquido (ELL), (d) síntese do complexo em urina humana e (e) LC;
Seleção dos padrões internos para a análise;
Estudo sistemático do efeito do pH na síntese do complexo de cobalto com o ligante proposto;
Ajustes finais do método;
Validação qualitativa para detecção de cobalto em urina por LC-MS empregando hidrólise ácida em banho seco.

Após a validação qualitativa para detecção de cobalto por LC-MS empregando hidrólise ácida em banho seco, elevados Coeficientes de Variação (CV%) foram obtidos tanto no cálculo de precisão quanto no de precisão intermediária. Portanto, no presente relatório referente ao segundo semestre de 2022, a digestão ácida assistida por radiação micro-ondas foi proposta como uma alternativa para eliminação da matriz, etapa necessária para que a validação quantitativa de cobalto por LC-MS atenda aos requisitos de validação da WADA.

9.b. Justificativa / Relevância do Estudo

A detecção e a quantificação de cobalto em urina humana é ainda um desafio devido a sua incompatibilidade com as estratégias analíticas clássicas disponíveis em laboratórios antidopagem acreditados pelo mundo. Para atingir tais objetivos, através da Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas (do inglês, *Liquid Chromatography coupled with Mass Spectrometry*, LC-MS), técnica analítica amplamente utilizada e disponível na área, é necessária sua complexação a partir da matriz com um ligante. Desta forma, a ionização por eletrospray (do inglês, *Electrospray Ionization*, ESI) de complexos de dietilditiocarbamato (DDC, $(C_2H_5)_2NCSS^-$) com íons metálicos é conhecida há mais de vinte anos (SCHOENER *et al.*, 1999; ROSS *et al.*, 2000). Minakata *et al.* relatou, pela primeira vez, um método empregando essa estratégia de complexação para a quantificação de cobalto na urina sem a inclusão de uma separação cromatográfica (MINAKATA *et al.*, 2008). Ho *et al.* introduziu a separação cromatográfica no método de confirmação de cobalto em urina e plasma equinos (HO *et al.*, 2015). No entanto, ambos métodos analíticos mencionados apresentam gargalos, os quais dificultam a correta quantificação do analito na matriz: a ausência (1) de padrão interno, (2) de correção do pH da amostra com um tampão antes da síntese do complexo e (3) de hidrólise da urina. Por isso, previamente à análise de amostras de urina de usuários de cianocobalamina (vitamina B12), é necessária a elaboração e validação de um método analítico por LC-MS buscando estratégias capazes de superar os desafios encontrados nos métodos anteriores disponíveis na literatura.

9.c. Objetivos Gerais

Desenvolver e validar, de acordo com o “WADA International Standard for Laboratories (ISL)”, um método analítico por LC-MS para detecção e quantificação de cobalto em urina humana para o controle antidopagem no esporte.

9.c.1 Objetivos Específicos

- Sintetizar o complexo de cobalto com o ligante DDC e caracterizá-lo por espectrofotometria na região do Ultravioleta-Visível, Teoria do Funcional de Densidade e Espectrometria de Massas.

- Otimizar as condições experimentais de método de preparo de amostras e análise instrumental através de Planejamento de Experimentos.
- Propor padrões internos para a análise.
- Estudar sistematicamente o efeito do pH na síntese do complexo de cobalto com o ligante proposto.
- Aplicar o método validado para a análise de cobalto em urina de usuários de vitamina B12.

9.d. Procedimento Experimental

9.d.1. Avaliação do efeito de matriz empregando hidrólise ácida em banho seco

Para a avaliação do efeito de matriz, comparou-se o CV% obtido para sete replicatas de água ultrapura e sete replicatas de amostras de três voluntários diferentes com urinas de gravidade específica classificadas em baixa (<1,013), média (1,013-1,021) e alta (>1,021), segundo o *Laboratory Technical Note on Analytical Method Validation for Doping Control* (WADA, 2020).

Para o preparo de cada amostra, adicionou-se, a um tubo de polipropileno, 40 µL de uma solução diluída a 50 ng mL⁻¹ do Material de Referência Certificado (do inglês, *Certified Reference Material*, CRM) de cobalto (Sigma-Aldrich, Brasil), a qual foi submetida à evaporação em banho a 40°C sob fluxo de nitrogênio. Ao resíduo seco, adicionou-se 200 µL de amostra e fortificou-se 10 µL de uma solução diluída a 2 µg mL⁻¹ do CRM de paládio (Sigma-Aldrich, Brasil), proposto como padrão interno (PI) da análise, seguido por agitação em vórtex. 50 µL de HCl 37% foi adicionado a fim de realizar hidrólise ácida em banho seco a 98 °C – 100 °C por 1 hora. Após a hidrólise, a amostra foi neutralizada com 40 µL de NaOH 10 mol L⁻¹ e o pH foi ajustado com 1,00 mL de tampão acetato pH 6 2 mol L⁻¹. 50 µL de NaDDC.3H₂O 0,2 mol L⁻¹ e 80 µL de ácido cítrico 0,2 mol L⁻¹ foram adicionados e a amostra foi agitada por 1 minuto. Para a ELL, 1,00 mL de *tert*-butil metil éter (TBME) foi adicionado, seguido de nova agitação em vórtex por 1 minuto. Após centrifugação a 3000 rpm por 10 minutos, a fase orgânica foi transferida para novo tubo de polipropileno, no qual foi fortificado 10 µL da solução diluída

a $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ do CRM de ródio (Sigma-Aldrich, Brasil). A amostra foi evaporada à secura em banho a 40°C sob fluxo de nitrogênio, o resíduo seco foi reconstituído com $50 \mu\text{L}$ de fase móvel (30% fase móvel aquosa pH 4 e 70% acetonitrila) e submetido à análise instrumental por LC-MS.

A separação foi realizada em uma coluna de fase reversa (Synchronis – Thermo, EUA, C18, $1,7 \mu\text{m}$, $50 \text{ mm} \times 2,1 \text{ mm}$) a 40°C em uma corrida cromatográfica isocrática de cinco minutos (30% de fase móvel aquosa pH 4 e 70% de acetonitrila), a um fluxo constante de $300 \mu\text{L min}^{-1}$. O efluente do cromatógrafo líquido proveniente do sistema Dionex (ThermoFisher Scientific, Bremen, Germany) foi bombeado para o espectrômetro de massas QExactive híbrido quadrupolo-Orbitrap (ThermoFisher Scientific, Bremen, Germany) operado em modo ESI positivo, calibrado diariamente com uma solução de calibração do fabricante. Foram empregadas voltagem de $4,0 \text{ kV}$, voltagem na *S-lens* de 70 V e temperatura do capilar de 250°C . *Sheath gas*, *auxiliary gas* e *sweep gas* foram definidos em 40, 10 e 1 unidades arbitrárias, respectivamente. Os dados de varredura total (do inglês, *Full Scan*) foram adquiridos em uma faixa de m/z 70-1000 em uma resolução de 70.000 largura a meia altura (do inglês, *Full Width at Half Maximum*, FWHM) com *Automatic Gain Control* (AGC) de 3×10^6 e *Injection Time* (IT) de 100 ms. Os dados de Monitoramento Paralelo de Reação (do inglês, *Parallel Reaction Monitoring*, PRM) foram adquiridos com uma resolução de 17.500 FWHM, com AGC de 1×10^6 , IT de 20 ms, *Loop Count* 2 e *Isolation Window* de m/z 0,4. Os íons precursores de $[\text{Co}(\text{DDC})_2]^+$ (m/z 354,98358), $[\text{Pd}(\text{DDC})_2 + \text{H}]^+$ (m/z 402,96279) e $[\text{Rh}(\text{DDC})_3 + \text{H}]^+$ (m/z 547,98918) foram fragmentados em uma célula de colisão HCD (do inglês, *Higher-energy Collisional Dissociation*) com energias (N)CE de 45, 25 e 15, respectivamente.

9.d.2 Avaliação do efeito de matriz empregando digestão ácida assistida por radiação de micro-ondas

Para a avaliação do efeito de matriz empregando digestão ácida assistida por radiação de micro-ondas, foram utilizadas sete replicadas das mesmas amostras de urina do item 1 da presente seção, assim como sete replicatas de água ultrapura. A um tubo de polipropileno, adicionou-se $2,00 \text{ mL}$ de amostra, $20 \mu\text{L}$ de CRM de cobalto 1.004

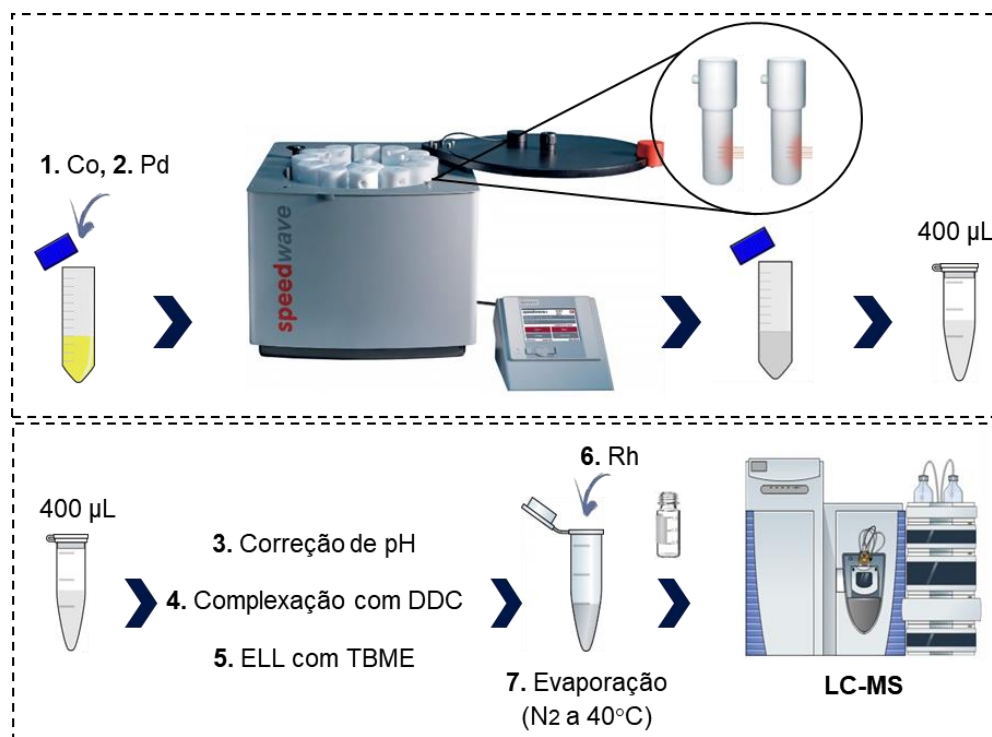
ng mL⁻¹ e 100 µL de solução diluída a 2 µg mL⁻¹ de CRM de paládio. 1,00 mL de HNO₃ 65% bidestilado a subebulição foi adicionado, separadamente em duas alíquotas de 500 µL, para completa transferência da amostra para o tubo de quartzo alocado na porta amostra do micro-ondas *SpeedWave* (Berghof, Alemanha). A Tabela 9.2 resume as condições aplicadas ao forno para digestão.

Tabela 9.2. Condições aplicadas ao forno de micro-ondas *SpeedWave* para digestão de amostras de urina e água.

Etapa	Temperatura (°C)	Pressão (bar)	Rampa	Tempo (min)	Potência
1	120	80	2	0	100
2	150	80	2	0	100
3	200	80	2	15	100
4	50	0	0	0	0
5	50	0	0	0	0

O conteúdo digerido foi transferido para novo tubo de polipropileno, o qual foi avolumado a 4 mL com água ultrapura. À 400 µL da amostra digerida, foram adicionados 102 µL de NaOH 10 mol L⁻¹ para neutralização parcial e 1,00 mL de tampão acetato pH 6 2 mol L⁻¹. O procedimento experimental de preparo de amostras e análise instrumental subsequente seguiu o descrito no item 1 da presente seção. O esquema 1 resume todos os processos descritos.

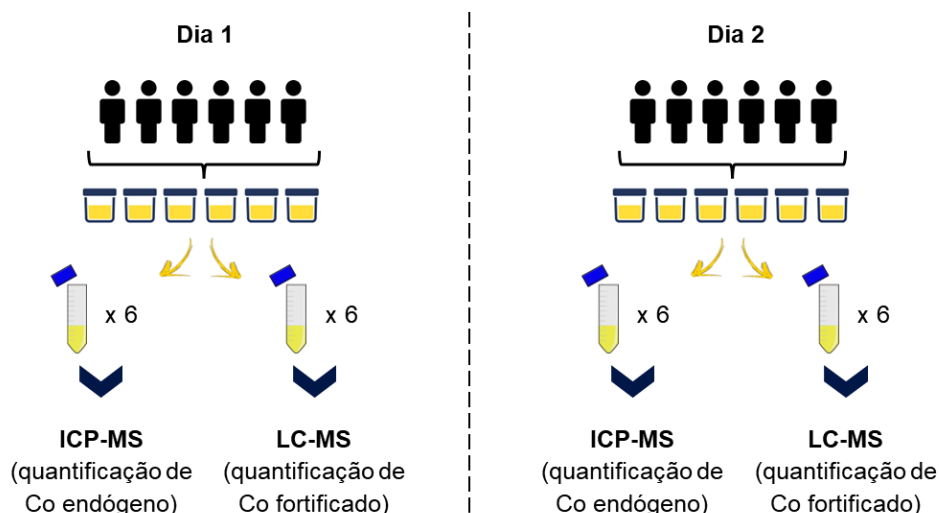
Esquema 9.1. Esquema representativo do procedimento experimental utilizado para avaliação do efeito de matriz para cobalto por LC-MS, empregando digestão assistida por micro-ondas.



9.d.3. Quantificação de cobalto por Espectrometria de Massas com Plasma Indutivamente Acoplado (do inglês, *Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry*, ICP-MS)

Previamente à validação por LC-MS, alíquotas das amostras de urina de doze voluntários foram submetidas à análise por ICP-MS para a quantificação do cobalto endógeno, assim como para o estudo das frações líquida e de sedimentos da urina (Esquema 2).

Esquema 9.2. Representação das alíquotas submetidas às análises por ICP-MS (quantificação de cobalto endógeno). A validação por LC-MS para quantificação de cobalto ocorreu após o estabelecimento do intervalo de concentração de cobalto endógeno dos voluntários.



9.d.3.a. Quantificação de cobalto total endógeno

Imediatamente após a homogeneização das amostras de urina de cada voluntário, uma alíquota de 4,00 mL foi transferida para frascos de polipropileno, estéreis e livres de contaminação por metais, para quantificação de cobalto total endógeno. A esse volume, foi adicionado 1,00 mL de HNO_3 65% e o conteúdo foi agitado em vórtex. Deste, uma alíquota de 1,00 mL foi retirada e diluída 10x com H_2O ultrapura em novo tubo de polipropileno estéril. A amostra diluída foi submetida à análise instrumental descrita no item 3.5.

9.d.3.b. Quantificação de cobalto na fração líquida da urina

Uma alíquota de 4,00 mL foi retirada de cada uma das urinas dos voluntários e centrifugada a 3500 rpm por 10 minutos. A fração líquida foi separada para um frasco de polipropileno estéril e uma alíquota de 1,00 mL desta fração foi diluída 10x com HNO_3 2%. A amostra foi submetida à análise instrumental descrita no item 3.5.

9.d.3.c. Quantificação de cobalto nos sedimentos da urina e em suas respectivas frações líquidas

Cinco amostras de urina foram selecionadas para quantificação de cobalto endógeno presente nos sedimentos e em suas respectivas frações líquidas. Os frascos utilizados foram pesados vazios (m_1) em balança analítica. Após homogeneização das amostras, uma alíquota de 4,00 mL foi retirada e acondicionada em cada frasco previamente pesado. Uma nova pesagem na mesma balança analítica foi realizada (m_2). Após centrifugação a 3500 rpm por 10 minutos, a fração líquida foi separada para novo frasco estéril e a fração sólida foi novamente pesada (m_3). A massa de sólido proveniente da alíquota original foi dada pela diferença entre a m_3 e a m_1 . Ao sólido resultante foi adicionado 1,00 mL de HNO_3 65%, o qual foi agitado em vórtex até solubilização completa. Uma alíquota de 200 μL da solução resultante foi retirada e avolumada a 10,00 mL com H_2O ultrapura. A amostra foi submetida à análise instrumental descrita no item 3.5.

9.d.3.d. Quantificação de cobalto nos sedimentos da urina e em suas respectivas frações líquidas: fortificação de CRM de cobalto 500 ng mL⁻¹ e cianocobalamina comprimido e injetável

Para estes ensaios, foram utilizadas alíquotas das amostras dos mesmos cinco voluntários escolhidos para o item 3.3.

9.d.3.e. Ensaio com fortificação de CRM de cobalto 500 ng mL⁻¹

O CRM de cobalto foi fortificado em alíquota de 4,00 mL das amostras de urina em uma concentração de 500 ng mL⁻¹. Anteriormente à separação das frações sólida e líquida, as amostras foram armazenadas em geladeira por 5 dias. Todos os demais processos de pesagem e diluição descritos no item 3.3 foram mantidos.

9.d.3.f. Ensaio com fortificação de cianocobalamina comprimido

Um comprimido de cianocobalamina 500 µg (FDC) foi macerado com gral e pistilo de polipropileno, o qual foi solubilizado com 5,00 mL de metanol grau HPLC. Após centrifugação a 3500 rpm por 10 minutos, 9,20 µL do sobrenadante foram fortificados a uma alíquota de 4,00 mL das amostras de urina. Todos os demais processos foram mantidos em relação ao descrito no item 3.4.1.

9.d.3.g. Ensaio com fortificação de cianocobalamina injetável

Uma alíquota de 147 µL da solução de cianocobalamina injetável contida na ampola do medicamento Cianotrat 5000 (5000 µg/2 mL) foi diluída em metanol à concentração de 1,6 µg/mL. Da solução intermediária resultante, 25 µL foram fortificados em nova alíquota de 4,00 mL das amostras de urina. Todos os demais processos foram mantidos em relação ao descrito no item 3.4.1.

9.d.3.h. Análise instrumental por ICP-MS

Para a determinação das concentrações de cobalto nas amostras preparadas nos itens 3.1 a 3.4, foi utilizado um ICP-MS Thermo Fisher Scientific (Bremen, Alemanha), modelo iCAP Qc, equipado com célula de colisão e/ou reação, cones de amostragem (“*sample cone*”) e espuma (“*skimmer*”) de níquel, câmara de nebulização refrigerada ciclônica de duplo passo (“*baffled*”) de quartzo, nebulizador concêntrico de Teflon® (FPA-ST), Peltier, injetor de quartzo de 2,5 mm de diâmetro interno, amostrador automático marca CETAC, modelo ASX 520 (CETAC Technologies, Omaha, Nebraska, USA) e software operacional Qtegra (versão 2.5) para a aquisição dos dados. As condições de operação do equipamento foram: 1550 W de potência incidente (RF), 14 L min⁻¹ de vazão de gás no plasma, 0,80 L min⁻¹ de vazão de gás auxiliar, 1,08 L min⁻¹ de vazão de gás do nebulizador, tempo de aquisição por massa (“*dwell time*”) de 10 ms e 1 canal por unidade de massa. A razão *m/z* 59, utilizada para quantificação, foi monitorada em modo normal (STD – “*Standard mode*”).

As determinações do analito foram realizadas utilizando curvas analíticas com seis soluções-padrão para a calibração e a quantificação foi realizada por interpolação.

As soluções foram preparadas a partir de diluição de solução-padrão estoque monoelementar *SpecSol* de concentração igual a 1.000 mg L⁻¹ (Quimlab Química & Metrologia®, Jardim Califórnia, Jacareí, São Paulo, Brasil), até obtenção das concentrações desejadas utilizando água ultrapura.

9.d.3.i. Validação quantitativa para cobalto em urina humana por LC-MS

O procedimento experimental de preparo de amostras e análise instrumental adotado para a validação do método de confirmação qualitativo para substâncias sem *threshold* seguiu o explicado no item 2 da seção. A validação foi proposta com base no documento *Laboratory Technical Note on Analytical Method Validation for Doping Control* (WADA, 2020). Os parâmetros avaliados incluíram: (1) Seletividade, (2) Limite de Identificação (do inglês, *Limit of Identification*, LOI), (3) Precisão, (4) Precisão Intermediária, (5) Arraste, (6) Robustez e (7) Estabilidade no amostrador automático.

Seletividade: Doze amostras de urina diferentes foram analisadas em dois dias, sendo seis amostras em cada. Não houve fortificação da solução CRM de cobalto, porém houve a fortificação do PI de paládio e ródio a uma concentração de 100 ng mL⁻¹.

LOI: foram utilizadas doze amostras de urina diferentes, divididos igualmente em dois dias de validação para cada um dos cinco níveis de concentração de CRM de cobalto fortificado descritos na Tabela 9.3.

Tabela 9.3. Volumes adicionados do CRM de cobalto 1.004 ng mL⁻¹ às amostras de urina para validação.

Concentração em 2,00 mL de urina	Volume a ser adicionado (μL) do CRM de cobalto
0 ng mL ⁻¹ - Seletividade	0
2,5 ng mL ⁻¹	4,98
5,0 ng mL ⁻¹	9,96
7,5 ng mL ⁻¹	14,94
10 ng mL ⁻¹	19,92
25 ng mL ⁻¹	49,80

Precisão: calculada a partir das amostras fortificadas na concentração de 10 ng mL^{-1} em cada um dos dois dias de validação.

Precisão Intermediária: calculada a partir de todas as doze amostras fortificadas na concentração de 10 ng mL^{-1} consideradas na validação.

Arraste: uma amostra de urina foi fortificada com $199,20 \mu\text{L}$ de CRM de cobalto 1.004 ng mL^{-1} . Para verificar se houve arraste, dois brancos foram injetados após a injeção da amostra concentrada no LC-MS.

Robustez: uma amostra de um único voluntário foi preparada em sete replicatas segundo o procedimento convencional de preparo de amostras (item 2 da seção). Outras sete replicatas da mesma amostra foram submetidas a modificações nos parâmetros de (1) volume de ligante $\text{NaDDC} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ ($40 \mu\text{L}$), (2) volume do oxidante ácido cítrico $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ ($60 \mu\text{L}$), (3) tempo de agitação para a ELL (30 segundos em vórtex) e (4) tempo no evaporador em banho a 40°C sob fluxo de nitrogênio (10 minutos a mais que o tempo necessário para secar).

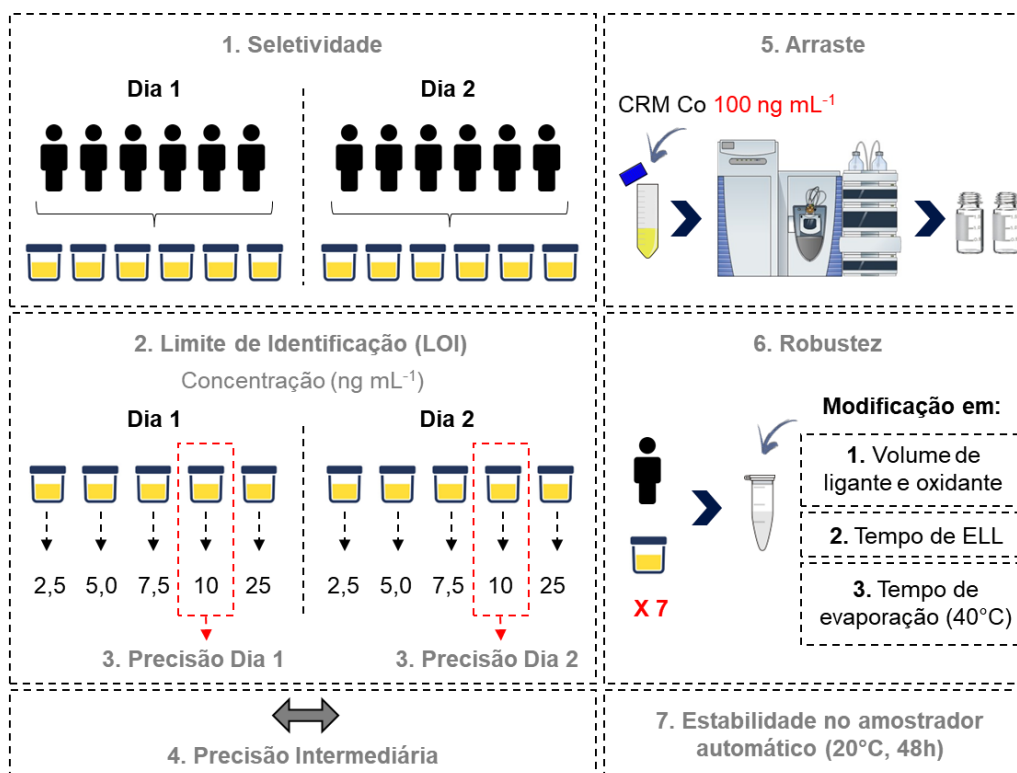
Estabilidade no Amostrador Automático: as amostras preparadas no dia 1 foram mantidas no amostrador automático do LC-MS a 20°C , as quais foram reinjetadas após 24 horas e 48 horas do preparo.

O Esquema 9.3 resume o procedimento de validação descrito acima.

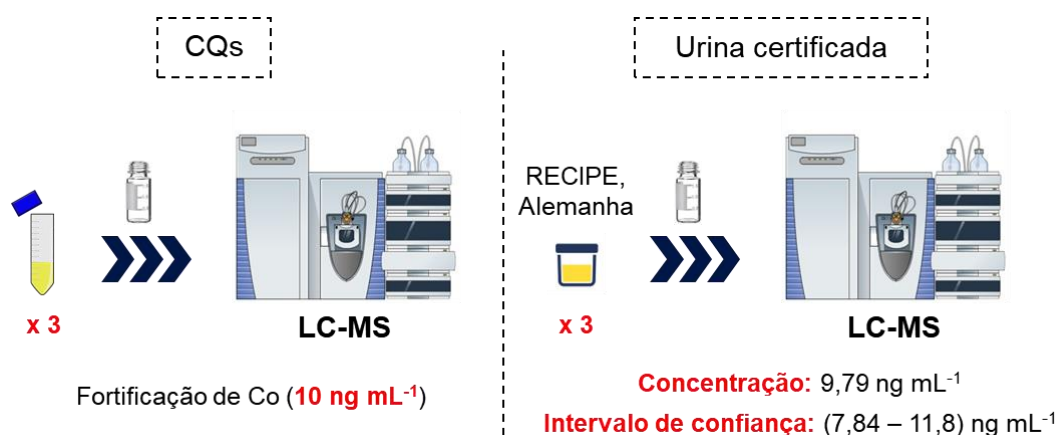
Para a avaliação quantitativa, uma curva analítica foi preparada com amostras de urina de um único voluntário fortificadas nas concentrações apresentadas na Tabela 3. Todas as amostras foram submetidas à digestão ácida assistida por radiação micro-ondas em uma única batelada. Para avaliação da precisão, três replicatas de $2,00 \text{ mL}$ de uma mesma urina foram fortificadas a 10 ng mL^{-1} com um padrão de cobalto de diferente fornecedor (LGC Standards, Inglaterra) (Amostras Controle de Qualidade, CQ). Para avaliação do *bias*, três replicatas de uma amostra de referência certificada para elementos traço de urina humana liofilizada (RECIPE, Alemanha) foi utilizada, cuja

concentração de cobalto e seu intervalo de confiança são conhecidos e rastreáveis. Os Esquemas 9.3 e 9.4 resumem o procedimento experimental adotado.

Esquema 9.3. Representação do procedimento de validação adotado para a confirmação qualitativa de cobalto em urina por LC-MS.



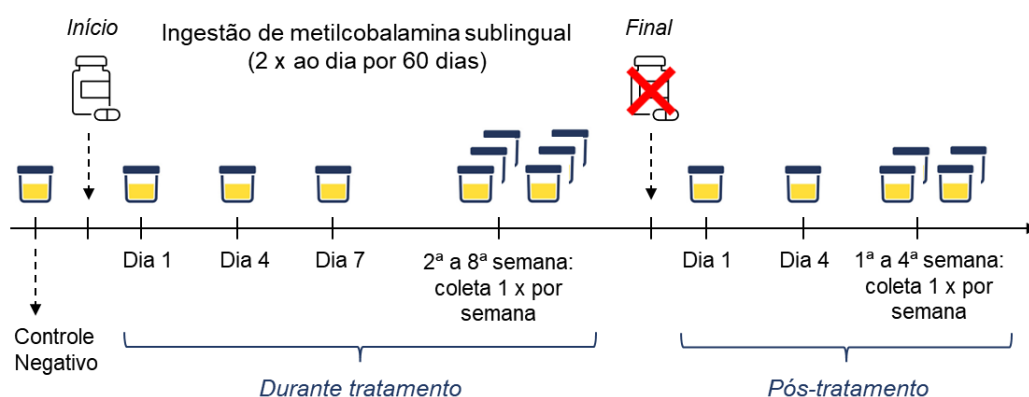
Esquema 9.4. Representação das amostras CQ fortificadas a 10 ng mL^{-1} com CRM de cobalto e urina de referência certificada (RECIFE). Não houve fortificação de cobalto nas replicatas da urina comercial.



9.d.3.j. Quantificação de cobalto em amostras de urina de usuária de metilcobalamina (vitamina B12) através do método validado por LC-MS

Após a validação do método para quantificação de cobalto em urina humana, um estudo de excreção com uma voluntária usuária de vitamina B12 foi realizado a fim de avaliar o impacto de seu uso na concentração de cobalto urinário. O estudo foi aprovado previamente pelo Comitê de Ética do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho – UFRJ (CAAE: 20152719.6.0000.5257). A voluntária fez uso de metilcobalamina sublingual 900 microgramas/cada, com administração duas vezes ao dia por dois meses, sob prescrição médica. Uma amostra foi coletada previamente ao início da administração (Controle Negativo). Após o início do tratamento, a primeira urina da manhã foi coletada nos dias 1, 4 e 7, seguido de uma coleta por semana da 2ª a 8ª semana. Após a suspensão da medicação, uma amostra de urina foi coletada nos dias 1, 4, 7 e uma vez por semana por um mês. O Esquema 9.5 resume a sistemática de coleta das amostras de urina descrito.

Esquema 9.5. Representação da sistemática de coleta de amostras de urina realizada pela voluntária durante o tratamento com metilcobalamina sublingual.



O procedimento de preparo de amostras e análise instrumental seguiu o explicado no item 2 da presente seção. Para a construção da curva analítica, as mesmas concentrações utilizadas durante a validação foram empregadas (item 4 da seção).

9.e. Resultados e Discussão

9.e.1. Avaliação do efeito de matriz empregando hidrólise ácida em banho seco e digestão assistida por radiação de micro-ondas

Como evidenciado por Sobolevsky e Ahrens (SOBOLEVSKY & AHRENS, 2021), o cobalto (e outros íons metálicos) podem ficar agregados por moléculas endógenas presentes na urina que possam doar elétrons. Baseados nesta evidência e, após a validação qualitativa para detecção de cobalto por LC-MS empregando hidrólise ácida em banho seco apresentada no relatório referente ao primeiro semestre de 2022, as hipóteses apresentadas abaixo foram formuladas para justificar os elevados CV% obtidos no cálculo de precisão e precisão intermediária.

- (1) A hidrólise ácida em banho seco, adaptada de Sobolevsky e Ahrens (SOBOLEVSKY & AHRENS, 2021), não foi suficiente para eliminar a matriz. Além disso, paládio e cobalto não responderam de forma semelhante ao efeito de matriz observado;
- (2) A síntese do complexo não é reprodutível e/ou não ocorre de forma completa;
- (3) O elevado CV% observado resulta de variações decorrentes dos procedimentos de preparo de amostra e/ou análise instrumental.

A Figura 9.1 representa os cromatogramas de íon extraído para as transições monitoradas do complexo de $[\text{Co}(\text{DDC})_2]^+$ (m/z 354,98358), $[\text{Pd}(\text{DDC})_2 + \text{H}]^+$ (m/z 402,96279) e $[\text{Rh}(\text{DDC})_3 + \text{H}]^+$ (m/z 547,98918). A Figura 9.2 representa os resultados obtidos para as amostras de água e de urina com diferentes gravidades específicas dos voluntários selecionados. A razão utilizada para o cálculo do CV% foi “Área cobalto (m/z 354,98358 \rightarrow m/z 207,96594) / Área paládio (m/z 402,96279 \rightarrow m/z 339,01755)”. Pode-se observar que o CV% obtido com o procedimento de digestão assistida por radiação de micro-ondas apresentou-se suficientemente mais baixo (cerca de 6% - 16% inferior

ao procedimento de hidrólise em banho seco) para atender aos critérios de validação da WADA. Além disso, observa-se que a digestão por micro-ondas foi mais eficiente em eliminar a matriz urina e que os CV% obtidos mesmo com este preparo devem decorrer de outras variações inerentes ao preparo de amostra/análise instrumental. Para a avaliação da hipótese 2 levantada, observou-se a complexação do ródio adicionado à fase orgânica após a ELL. Através dos resultados obtidos, pode-se concluir que ligante livre suficiente passa para a fase orgânica para que ocorra a complexação deste íon metálico, o que corrobora o fato de que a complexação do analito tenha ocorrido de forma completa na etapa inicial.

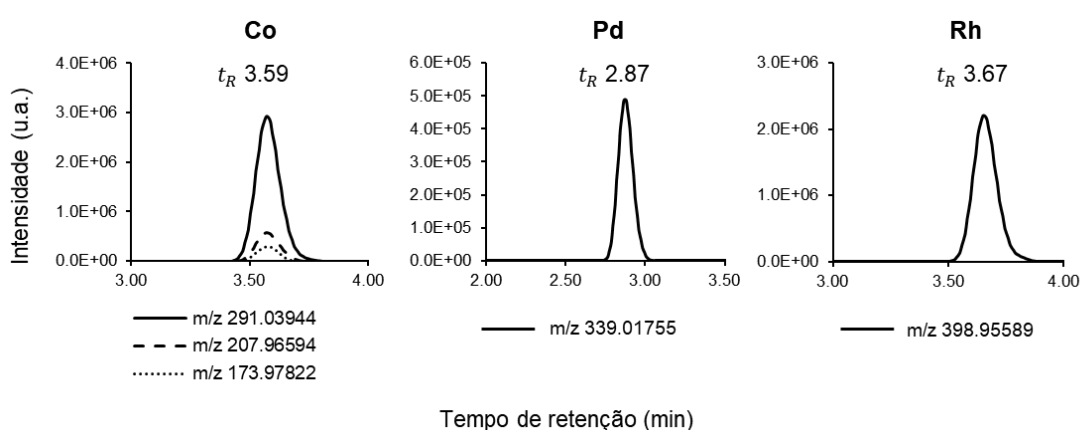


Figura 9.1. Cromatogramas de íon extraído para as transições monitoradas de $[\text{Co}(\text{DDC})_2]^+$ (m/z 354,98358), $[\text{Pd}(\text{DDC})_2 + \text{H}]^+$ (m/z 402,96279) e $[\text{Rh}(\text{DDC})_3 + \text{H}]^+$ (m/z 547,98918).

AMOSTRA	GRAVIDADE ESPECÍFICA	HIDRÓLISE ÁCIDA	DIGESTÃO POR MICRO-ONDAS
		CV(%)	CV(%)
Água (x7)		7,4 %	3,0 %
Voluntários	Baixo (< 1,013)	19 %	13 %
1, 2 e 3 (x7)	Intermediário (1,013-1,021)	25 %	14 %
	Alto (> 1,021)	25 %	9,0 %

Figura 9.2. Resultados de CV% obtidos para replicatas de amostras de água e urina com diferentes gravidades específicas utilizando hidrólise ácida em banho seco e digestão assistida por radiação micro-ondas.

9.e.2. Quantificação de cobalto por Espectrometria de Massas com Plasma Indutivamente Acoplado (do inglês, *Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry*, ICP-MS)

9.e.2.a Quantificação de cobalto endógeno: total e fração líquida

Cobalto é um elemento traço constituinte dos humanos, cuja principal fonte é a dieta. De acordo com a variação geográfica e dos hábitos alimentares culturais da população, a concentração endógena de cobalto pode variar tipicamente entre 0,2 e 3 ng/mL, com a mediana estimada entre 0,2 e 1 ng/mL (SOBOLEVSKY & AHRENS, 2021). Para as amostras dos voluntários selecionadas para a etapa posterior de validação do método por LC-MS, a concentração de cobalto total (fração líquida e sedimentos) variou entre 0,23 – 2,72 ng/mL, o que corrobora os dados apresentados na literatura. Ao avaliar somente a fração líquida das amostras, a concentração variou de forma semelhante: 0,23 – 2,88 ng/mL. No entanto, para duas amostras, o cobalto quantificado na fração total e líquida diferiu consideravelmente: 1,98 ng/mL (total) contra 0,86 ng/mL (líquida) e 2,72 ng/mL (total) contra 1,75 ng/mL (líquida). Este resultado levou à proposta do estudo dos sedimentos da urina.

9.e.2.b. Quantificação de cobalto nos sedimentos da urina e em suas respectivas frações líquidas: endógeno, fortificação de CRM de cobalto 500 ng mL⁻¹ e cianocobalamina comprimido e injetável

Novas alíquotas das amostras de cinco voluntários foram separadas para os ensaios de quantificação de cobalto nas frações líquida e de sedimentos. As massas pesadas de sedimentos das amostras para cada procedimento experimental descrito encontram-se na Tabela 9.4. Os resultados obtidos para a quantificação de cobalto total endógeno e na fração líquida (item 2.1), assim como na nova alíquota, separada em sedimentos e fração líquida, encontram-se na Tabela 9.5.

Tabela 9.4. Massas pesadas de sedimentos das amostras dos voluntários selecionados para os estudos de cobalto endógeno, fortificação de (1) CRM de cobalto 500 ng mL⁻¹, (2) cianocobalamina comprimido e (3) cianocobalamina injetável.

Massa de sedimentos na urina (g) em 1,00 mL de urina				
Amostra	Endógeno	Experimentos com fortificação		
		CRM 500 ng mL⁻¹	Cianocobalamina Comprimido	Cianocobalamina Injetável
1	0,04964	0,03336	0,02801	0,01576
2	0,01207	0,01388	0,01814	0,00994
3	0,00809	0,00971	0,01025	0,00970
4	0,01081	0,00967	0,00811	0,00897
5	0,01477	0,01360	0,01139	0,01005

Tabela 9.5. Resultados obtidos na quantificação de cobalto endógeno em cada fração considerada (líquida e sedimentos), sendo o “Total” o somatório das concentrações nas frações. Os resultados do item 2.1 foram incluídos para fins de comparação.

Concentração (ng mL⁻¹) de cobalto endógeno na urina					
Amostra	Resultados do item 2.1		Resultados do item 2.2		
	Fração total	Fração líquida	Sedimentos (1)	Fração Líquida (2)	Total (1+2)
1	2,72	1,75	1,58	1,44	3,01
2	2,23	2,38	<LOQ	2,00	2,00
3	1,13	1,08	<LOQ	0,96	0,96
4	1,84	1,75	<LOQ	1,45	1,45
5	0,85	0,85	<LOQ	0,62	0,62

Pode-se observar que a amostra do voluntário 1 apresenta a maior quantidade de sedimentos em relação aos demais analisados. A quantificação de cobalto desta amostra também indicou que 52,49% do cobalto endógeno fica agregado no sedimento, fato não observado para os demais voluntários. A hipótese formulada para a variabilidade intrínseca observada na concentração da amostra, quando analisados o total endógeno e as frações separadas, é que esta pode estar relacionada à quantidade de sedimentos

em cada alíquota e a sua composição. Este resultado corrobora a evidência de Sobolevsky e Ahrens (SOBOLEVSKY & AHRENS, 2021) de que moléculas endógenas da urina podem agregar cobalto e íons metálicos, sendo, portanto, necessária uma etapa de digestão prévia para eliminação da matriz. A fim de mimetizar possíveis administrações exógenas de cobalto e de cianocobalamina (vitamina B12) comprimido e injetável, os ensaios de fortificação foram realizados, cujos resultados estão resumidos na Tabela 9.6. Vale ressaltar que não ocorreram administrações reais pelos voluntários e que os dados apresentados podem ser afetados quando analisados casos de abuso de cobalto. Novamente, observa-se que uma fração pequena ($< 8\%$) ficou retida pelos sedimentos da amostra 1 em cada caso. Para os demais voluntários, a porcentagem retida se apresentou consideravelmente menor ($< 1,5\%$), com a maioria dos resultados ficando abaixo do Limite de Quantificação (LOQ) do método para a fortificação com cianocobalamina. Dessa forma, pode-se concluir que a fração de sedimentos não pode ser desprezada no procedimento experimental e que a amostra deve ser corretamente homogeneizada previamente à retirada da alíquota para análise.

Tabela 9.6. Concentrações obtidas para cobalto nas frações líquida e de sedimentos da urina após fortificação de CRM de cobalto 500 ng mL⁻¹, cianocobalamina comprimido e injetável (as duas últimas na concentração de 10 ng mL⁻¹).

Fortificação de CRM de cobalto 500 ng mL ⁻¹				
Amostra	Concentração de cobalto (ng mL ⁻¹)			% Cobalto agregado nos sedimentos
	Sedimentos (1)	Fração Líquida (2)	Total (1+2)	
1	17.9	515	532	3,36%
2	6.90	515	522	1,32%
3	5.25	530	535	0,98%
4	5.07	552	557	0,91%
5	6.34	537	543	1,17%

Fortificação de cianocobalamina comprimido 10 ng mL ⁻¹				
Amostra	Concentração de cobalto (ng mL ⁻¹)			% Cobalto agregado nos sedimentos
	Sedimentos (1)	Fração Líquida (2)	Total (1+2)	
1	0,55	6,84	7,39	7,44%
2	<LOQ	7,17	7,17	-
3	<LOQ	6,62	6,62	-
4	<LOQ	7,27	7,27	-
5	<LOQ	6,85	6,85	-

Fortificação de cianocobalamina injetável 10 ng mL ⁻¹				
Amostra	Concentração de cobalto (ng mL ⁻¹)			% Cobalto agregado nos sedimentos
	Sedimentos (1)	Fração Líquida (2)	Total (1+2)	
1	0,22	10,57	10,79	2,04%
2	0,0043	11,72	11,72	0,04%
3	<LOQ	9,28	9,28	-
4	<LOQ	10,21	10,21	-
5	<LOQ	9,97	9,97	-

9.e.2.c. Validação qualitativa para confirmação de cobalto em urina humana por LC-MS: comparação de métodos

A validação qualitativa para confirmação de cobalto em urina humana por LC-MS foi proposta baseada nos documentos “*Laboratory Technical Note on Analytical Method Validation for Doping Control*” (WADA, 2020), “*WADA International Standard for Laboratories (ISL)*” (WADA, 2021) e “*WADA Technical Document – TD2021IDCR*” (WADA, 2021). Foram empregadas amostras de urina representativas de voluntários de ambos os sexos, com variação em gravidade específica (do inglês, *Specific Gravity*, SG) [e.g. baixa (SG <1,013), média (SG: 1,013 – 1,021) e alta (SG > 1,021)] e pH (entre 5,17 e 7,29).

9.e.2.c.1. Seletividade

Seletividade é a habilidade do método de diferenciar o analito de interferentes endógenos da matriz ou outras substâncias presentes na amostra. Todas as transições/íons diagnósticos devem ser avaliados e todas as amostras devem ser concluídas como “Negativas”. Como o cobalto é um analito endógeno [está presente em níveis traço na população, com variação entre 0,2 ng mL⁻¹ e 3 ng mL⁻¹ na urina (SOBOLEVSKY & AHRENS, 2021)], foi observada a primeira transição de massa para o complexo [Co(DDC)₃] (m/z 354,98358 → m/z 291,03944) para todos os voluntários quando empregada a hidrólise ácida em banho seco. As duas transições subsequentes (m/z 354,98358 → m/z 207,96594 e m/z 354,98358 → m/z 173,97822) se apresentaram mais específicas e não foram identificadas. Para a digestão assistida por radiação de micro-ondas, todas as três transições monitoradas foram observadas, porém a razão “Área cobalto (m/z 354,98358 → m/z 207,96594) / Área paládio (m/z 402,96279 → m/z 339,01755)” se mostrou igual ou próxima à razão referente ao branco de reagentes (*i.e.*, todos os reagentes, exceto cobalto, em água ultrapura). Dessa forma, concluiu-se que os métodos são seletivos para cobalto.

9.e.2.c.2. Limite de Identificação

O Limite de Identificação (LOI) é a concentração mais baixa do analito, que obedece aos critérios do TD IDCR¹ (WADA, 2021) em 95% das amostras representativas (i.e. 95% de taxa de identificação ou 5% de taxa de falso negativo) por avaliação gráfica ou através de função (e.g., ajuste sigmoide). Para substâncias sem *threshold* definido e sem *Minimum Reporting Levels* (MRL), pelo menos seis amostras de urina representativas devem ser analisadas em dois dias diferentes, com o analito presente em pelo menos quatro concentrações. Pela ausência também de *Minimum Required Performance Levels* (MRPL) para o cobalto, as concentrações de 2,5, 5,0, 10 e 25 ng mL⁻¹ foram escolhidas para fins de validação do método com hidrólise ácida em banho seco. O LOI estimado por ajuste sigmoide foi de 6,27 ng mL⁻¹ considerando os dois dias de ensaio.

Para a digestão assistida por micro-ondas, entretanto, foi incluído mais um nível de concentração de 7,5 ng mL⁻¹ além dos já mencionados acima. Como todas as transições do analito foram identificadas inclusive nas amostras de seletividade, o critério do LOI utilizado anteriormente (ajuste sigmoide) não pode ser utilizado. Dessa forma, o LOI foi estabelecido como a concentração que fornece uma razão “Área cobalto (m/z 354,98358 \rightarrow m/z 207,96594) / Área paládio (m/z 402,96279 \rightarrow m/z 339,01755)” de 3 x a razão observada para o branco de reagentes. O valor de concentração estimado segundo este critério foi de 2,5 ng mL⁻¹.

¹ Tempo de retenção (min) e abundâncias relativas dos íons nas amostras, preparadas em concentrações que permitem a identificação completa do analito.

9.e.2.c.3. Precisão

Para avaliar a precisão do método proposto, cálculos de CV% (Equação 1) foram realizados considerando as médias e desvios padrões das razões “Área do cobalto/Área do paládio” das amostras diferentes preparadas na concentração de 10 ng mL⁻¹ em cada um dos dois dias de validação. Para o método com hidrólise ácida em banho seco, no primeiro dia, o CV% se apresentou em 35% e, no segundo dia, em 15%, mostrando que um considerável efeito de matriz é observado. Para o método com digestão assistida por micro-ondas, no dia 1, o CV% se apresentou em 7% e, no dia 2, em 13%, indicando que

a redução da matriz proporciona uma melhora significativa para a reprodutibilidade do método.

$$\text{Coeficiente de variação (\%)} = \frac{\text{Desvio padrão}}{\text{Média}} \times 100\% \quad (\text{Equação 1})$$

9.e.2.c.4. Precisão Intermediária

De modo semelhante ao item 3.3, o cálculo de precisão intermediária levou em consideração o CV% de todo o conjunto de doze amostras preparadas nos dois dias de validação. Para precisão intermediária, o CV% se apresentou em 29% quando utilizada a hidrólise em banho seco e 11% com a digestão assistida por micro-ondas.

9.e.2.c.5. Arraste

Não foi observado arraste para a transição m/z 354,98358 \rightarrow m/z 207,96594 na concentração de 100 ng mL⁻¹ de cobalto fortificado em urina para nenhum dos dois métodos desenvolvidos.

9.e.2.c.6. Estabilidade no amostrador automático

A estabilidade das amostras no amostrador automático, mantido a 20 °C, foi avaliada através da reinjeção, após 24 e 48 horas, das amostras preparadas no primeiro dia de validação. A comparação das médias das razões “Área do cobalto/Área do paládio” para todas as amostras na concentração de 10 ng mL⁻¹ mostrou que as amostras são estáveis por 48 horas considerando ambos os procedimentos de hidrólise ácida em banho seco e digestão assistida por micro-ondas, conforme apresentado na Tabela 7.

Tabela 9.7. Média das razões “Área do cobalto/Área do Paládio” para as amostras preparadas com hidrólise ácida em banho seco e digestão assistida por micro-ondas, na concentração de 10 ng mL⁻¹, mantidas no amostrador automático a 20 °C por 48 horas.

Injeção das amostras a 10 ng mL ⁻¹	Média das razões “Área do cobalto/Área do paládio” – hidrólise ácida em banho seco	Média das razões “Área do cobalto/Área do paládio” – digestão assistida por micro-ondas
No momento do preparo	0,37	0,39
Após 24 h a 20 °C	0,40	0,39
Após 48 h a 20 °C	0,40	0,41

A Tabela 9.8 compara, de forma resumida, os resultados obtidos para os parâmetros de validação de confirmação qualitativo para os dois procedimentos experimentais desenvolvidos: o primeiro com hidrólise ácida em banho seco (apresentado no relatório referente ao primeiro semestre de 2022) e o segundo com digestão assistida por micro-ondas.

Tabela 9.8. Comparação dos parâmetros de validação de confirmação qualitativo para os métodos desenvolvidos no projeto.

Parâmetro	Hidrólise ácida em banho seco		Digestão assistida por microondas	
	Dia 1	Dia 2	Dia 1	Dia 2
Seletividade	Sim (transição monitorada: m/z 354,98358 → m/z 291,03944)		Sim (transição monitorada: m/z 354,98358 → m/z 291,03944)	
LOI	6,3 ng mL ⁻¹		2,5 ng mL ⁻¹	
Precisão (CV%)	35%	15%	7%	13%
Precisão intermediária (CV%)	29%		11%	
Arraste	Não		Não	
Estabilidade no amostrador automático (20°C, 48h)	Sim	Não avaliado	Sim	Não avaliado

9.e.2.d. Validação quantitativa para cobalto em urina humana empregando digestão assistida por micro-ondas

O procedimento experimental com a digestão assistida por micro-ondas se apresentou promissor para seguir para a validação quantitativa devido ao baixo CV% apresentado em ambas precisão e precisão intermediária. A Figura 3 representa a curva analítica obtida considerando a razão “Área cobalto (m/z 354,98358 \rightarrow m/z 207,96594) / Área paládio (m/z 402,96279 \rightarrow m/z 339,01755)” como eixo y e concentração (ng mL^{-1}) como eixo x. As concentrações das amostras CQ e da urina de referência certificada comercial, ambas preparadas em triplicata, foram dadas pela substituição das razões “Área cobalto/Área paládio” obtidas em cada caso na equação da reta. Pode-se observar na Figura 3 que a concentração da urina comercial ficou dentro do intervalo esperado de (7,84 – 11,8) ng mL^{-1} e que as amostras CQ fortificadas se apresentaram próximas à concentração teórica de 10 ng mL^{-1} . O CV% obtido para a triplicata das amostras CQ ficou em 6,22% e para as alíquotas da urina comercial, em 4,66%. Isso mostra que o método apresenta exatidão e precisão dentro do esperado para um método quantitativo validado de acordo com os parâmetros estabelecidos pela WADA.

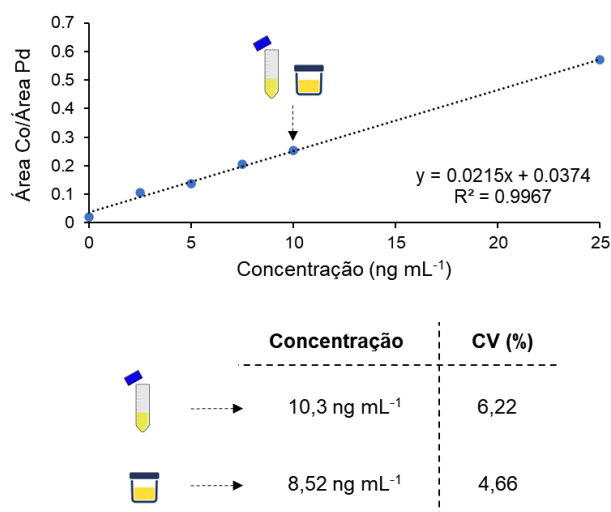


Figura 9.3. Curva analítica para quantificação de cobalto em urina humana por LC-MS. As concentrações das amostras CQ e urina de referência foram fornecidas por substituição da razão “Área cobalto/Área paládio” obtidas em cada caso na equação da reta.

9.e.2.e. Quantificação de cobalto em amostras de urina de usuária de metilcobalamina (vitamina B12) através do método validado por LC-MS

O cobalto (Co) é um elemento traço essencial necessário como centro metálico ativo na vitamina B12 (Figura 9.4) e em enzimas (*i.e.*, anidrases carbônicas e fosfatases alcalinas) (BAARS & CROOT, 2011). A ingestão recomendada de vitamina B12 para adultos é de 2,4 µg/dia, o que corresponde a 0,1 µg de cobalto (LEYSSSENS et al., 2017). No entanto, de acordo com o “2015 Prohibited List Summary of Major Modifications and Explanatory Notes” (WADA, 2014), a cianocobalamina é permitida. Dessa forma, o objetivo de conduzir um estudo com uma voluntária usuária deste suplemente foi verificar se as concentrações de cobalto em suas amostras de urina poderiam ser confundidas com resultados de uma administração de cobalto para fins de dopagem.

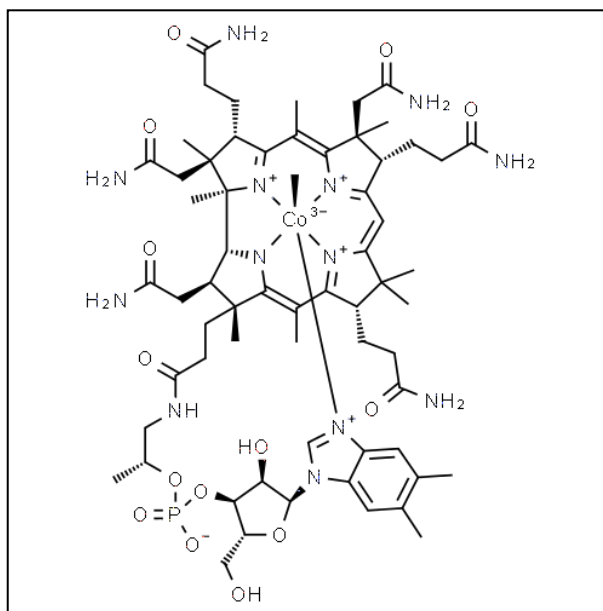


Figura 9.4. Representação da estrutura da metilcobalamina (vitamina B12) (Adaptado de Chemspider) (CHEMSPIDER, 2023).

A quantificação de cobalto nas amostras coletadas de acordo com o procedimento experimental descrito forneceu resultados abaixo do LOI do método validado, o que representa uma vantagem do método analítico já que a vitamina B12 não é proibida pela WADA.

9.f. Conclusões

O complexo de $[\text{Co}(\text{DDC})_3]$ sintetizado e caracterizado por espectrofotometria na região do UV-Vis, DFT, TD-DFT e MS foi utilizado para a otimização da (1) fonte de ESI, (2) parâmetros do MS e (3) ELL através de Planejamento de Experimentos (do inglês, *Design of Experiments*, DoE). A otimização da síntese do complexo *in situ*, o estudo de pH de síntese e de composição das fases móveis A e B (aquosa e orgânica, respectivamente) foram as etapas finais para o desenvolvimento do método analítico. Vale mencionar que a análise estatística multivariada empregada reduziu consideravelmente o tempo e o gasto com o desenvolvimento analítico e que regiões mais robustas de trabalho foram atingidas com esta abordagem. Devido a problemas de contaminação com cobalto proveniente dos reagentes utilizados durante o preparo de amostras, foi necessária a redução de volume de amostra e, conseqüentemente, de reagentes, sem a necessidade de re-otimização de todo o método desenvolvido. Com isso, o objetivo inicial do subtema de estabelecimento de intervalo de referência urinário da população brasileira por espectrometria de massas foi parcialmente prejudicado.

Como foi apresentado e discutido no presente relatório, através do ICP-MS foi possível constatar que o cobalto pode ficar agregado à fração sólida (sedimentos) presente na urina e que esta não pode ser desprezada para a correta quantificação do agente dopante em questão. Este resultado corrobora a evidência de Sobolevsky e Ahrens (SOBOLEVSKY & AHRENS, 2021) de que moléculas endógenas da urina podem agregar cobalto e íons metálicos, sendo, portanto, necessária uma etapa de hidrólise/digestão prévia para eliminação da matriz. Ao considerar a fortificação de CRM de cobalto e cianocobalamina comprimido e injetável, a porcentagem de acúmulo nesta fração é desprezível. Cabe ressaltar que este resultado pode ser afetado quando do abuso de cobalto para fins de dopagem dependendo da composição dos sedimentos, já que o ensaio foi realizado apenas com fortificação e não com administração real por voluntários.

Dessa forma, duas estratégias para eliminação da matriz foram desenvolvidas: hidrólise ácida em banho seco, adaptada de Sobolevsky e Ahrens (SOBOLEVSKY & AHRENS, 2021), e digestão ácida assistida por radiação de micro-ondas. A validação dos métodos analíticos, entretanto, mostrou que o efeito de matriz quando empregada a

hidrólise ácida causava um elevado CV% entre as amostras dos voluntários e que o PI proposto não respondia de forma semelhante ao analito frente a este efeito. Por isso, a completa remoção da matriz utilizando o forno de micro-ondas foi necessária para a obtenção de um CV% menor que 20%. Além da diferença em termos da precisão e precisão intermediária, o LOI também se apresentou menor para a digestão com micro-ondas (2,5 ng mL⁻¹) em relação à hidrólise em banho seco (6,3 ng mL⁻¹). Assim, a quantificação foi realizada apenas com o preparo de amostras com digestão por micro-ondas, a qual forneceu resultados com elevada precisão e exatidão para as amostras CQ e urina de referência certificada comercial para elementos traço. Por fim, empregando o método desenvolvido e validado por LC-MS, um estudo de excreção com amostras de uma usuária de metilcobalamina (vitamina B12) forneceram resultados abaixo do LOI, o que representa uma vantagem do método analítico já que esta não é proibida pela WADA.

Conclui-se, assim, que, apesar da incompatibilidade da análise de cobalto por técnicas analíticas clássicas disponíveis em laboratórios antidopagem pelo mundo e da ausência de ICP-MS nestes, foi possível desenvolver e validar por LC-MS um método para quantificação de cobalto em urina humana através de sua complexação com DDC. Dessa forma, será possível a inclusão deste analito em futuras análises de rotina, propor novos estudos para a descoberta de marcadores de longa excreção, assim como fornecer resultados para auxiliar o estabelecimento de MRPL, MRL e *threshold* para este analito.

9.g. Referências Bibliográficas

- BAARS, O., CROOT, P. L. Comparison of alternate reactants for pM level cobalt analysis in seawater by the use of catalytic voltammetry. *Electroanalysis*, 23, p. 1663-1670, 2011.
- CHEMSPIDER. Acesso em: 10 de janeiro de 2023. Disponível em: http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.29368587.html?rid=e1f145af-5393-457d-9287-2ad5b3efb4a5&page_num=0. 2023.

- LEYSSENS, L., VINCK, B., VAN DER STRAETEN, C., WUYTS, F., MAES, L. Cobalt toxicity in humans—A review of the potential sources and systemic health effects. *Toxicology*, 387, p. 43- 56, 2017.
- ROSS, A.R., IKONOMOU, M.G., ORIAN, K.J. Electrospray ionization of alkali and alkaline earth metal species. Electrochemical oxidation and pH effects. *J Mass Spectrom.*, 35, p. 981-989, 2000.
- SCHOENER, D.F., OLSEN, M.A., CUMMINGS, P.G., BASIC, C. Electrospray ionization of neutral metal dithiocarbamate complexes using in-source oxidation. *J Mass Spectrom.*, 34, p. 1069-1078, 1999.
- SOBOLEVSKY, T. & AHRENS, B. Measurement of urinary cobalt as its complex with 2-(5-chloro-2-pyridylazo)-5-diethylaminophenol by liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the purpose of anti-doping control. *Drug Test. Analysis*, 13, p.1-13, 2021.
- WORLD ANTI-DOPING AGENCY (WADA). *2015 Prohibited list - Summary of Major Modifications and Explanatory Notes*. Acesso em: 20 de junho de 2022. Disponível em <https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/wada-2015-prohibited-list-summary-of-modifications-en.pdf>. 2014.
- WORLD ANTI-DOPING AGENCY (WADA). *2015 Prohibited list*. Acesso em: 20 de junho de 2022. Disponível em <https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/wada-2015-prohibited-list-en.pdf>. 2015.
- WORLD ANTI-DOPING AGENCY (WADA). *Laboratory Technical Note on Analytical Method Validation for Doping Control*. Version 1. 2020.
- WORLD ANTI-DOPING AGENCY (WADA). *International Standard for Laboratories*. Acesso em: 27 de junho de 2022. Disponível em: https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/isl_2021.pdf. 2021.
- WORLD ANTI-DOPING AGENCY (WADA). *WADA Technical Document – TD2021IDCR. Minimum Criteria for chromatographic-mass spectrometric confirmation of the identity of analytes for doping control purposes*. Acesso em: 27 de junho de 2022. Disponível em: https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/td2021idcr_final_eng_0.pdf. 2021.

SUBPROJETO 10. Aumento da sensibilidade de métodos de detecção. Ionização por elétrons avançada, como estratégia analítica para o aumento da sensibilidade na análise de esteroides anabólicos por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

Coordenação Executiva: Profa. Dra. Monica Padilha

10.a. Introdução

Projeto 100% executado, deste o Relatório Parcial 2.

Entretanto, novos experimentos foram realizados a luz do estado da arte da estimativa dos Limites de Identificação. Deste modo, os resultados do projeto ficam alinhados com os métodos acreditados pela norma ISO17025, o que é mandatório para uso no LBCD.

Para detalhamento quando a objetivos e justificativas, vide Relatório Parcial 02.

10.b. Experimental

10.b.1. Preparo de amostras

O processo de preparo da amostra envolve a hidrólise enzimática e extração líquido-líquido com solvente orgânico. Aliquotas de 2 mL de cada amostra de urina foram fortificadas com 40 µL de solução de padrão interno. O pH é ajustado com 750 µL de tampão fosfato 0,8M e 50 µL de β-glicuronidase de E. coli. As amostras foram incubadas por 1 hora, seguindo da adição de 500 µL de tampão K₂CO₃ / KHCO₃ 20% (p/p) e 4 mL de metil-terc-butil-éter (MTBE). As amostras foram submetidas a centrifugação a 3000 rpm por 5 min, em seguida, foi realizada a separação de fases e a evaporação da fase orgânica sob fluxo de nitrogênio. Finalmente o resíduo seco é derivatizado com 100 µL da mistura (MSTFA:NH₄I:2-mercaptoetanol) na proporção 500:3:6 (v:m:v) a 60°C por 20 minutos. Aliquotas de 2 µL foram injetadas em cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas com analisador do tipo triplo quadrupolo (CG-TQ).

10.b2. Condições instrumentais

10.b.2.a. GC-EI-MS/MS

Coluna: Ultra 1-ms, 100% metilpolisiloxano, 17m X 0,25 mm X 0,11µm

Programa de temperatura do forno: 140°C → 40°C/min → 230°C → 3°C/min → 280°C → 300°C (3min).

Temperatura da linha de transferência: 300°C

Temperatura da fonte: 320°C

Modo de ionização: Ionização eletrônica, 70eV

10.b.2.b. Limite de identificação

A estimativa da concentração do limite de identificação (LOI) foi determinada pela curva sigmoide, calculada pela interpolação no gráfico da resposta de detecção do analito em relação à concentração, considerando 95% da taxa de detecção. A taxa de detecção dos analitos foi avaliada através da comparação entre a intensidade relativa referente aos íons diagnósticos e a variação no tempo de retenção dos analitos nos controles positivos. Através das amostras para estimativa do LOI também é possível avaliar a interferência da matriz e robustez do método validado.

Para avaliação do LOI foram avaliados 6 brancos de urina de origens e características diferentes, fortificados em 6 níveis de concentração de analitos: 100, 50, 20, 10, 2 e 0,02% do MRPL/MRL. As amostras fortificadas em 100% do MRPL/MRL foram nomeadas LOI1-1 a LOI1-6. As amostras fortificadas em 50% do MRPL/MRL foram nomeadas LOI2-1 a LOI2-6, e assim sucessivamente. Essas amostras foram divididas em dois lotes, preparados em momentos diferentes e por analistas diferentes, conforme definido no planejamento experimental.

Os analitos para os quais o laboratório não dispõe de material de referência tiveram seus LOI avaliados através de diluições seriadas de urinas de referência. Analisaram-se no mínimo três alíquotas em diferentes volumes da urina de referência, de forma a avaliar a aceitação dos parâmetros de identificação. A alíquota com maior concentração do analito foi comparada com as diluições seguintes até os critérios de identificação não serem mais atendidos. A última diluição em que os parâmetros foram atendidos foi considerada para estimar a concentração do analito. Sua concentração foi estimada utilizando-se um controle

positivo fortificado com um analito estruturalmente semelhante no MRPL, por comparação da razão de áreas analito/PI.

10.c. Resultados e discussão

Na Tabela 10.1 encontram-se os LOI alcançados para cada analito avaliado através de curva sigmoide. Todas as substâncias listadas apresentaram valor de LOI inferior ao MRPL.

Foram observados em determinados analitos alguns interferentes de menor intensidade, com razão entre íons diferente, o que afetou a avaliação dos critérios de identificação (razão entre íons) destes analitos e consequentemente os valores de LOI. Ainda assim estes ficaram abaixo do MRPL. Esse foi o caso de metasterona (Figura 10.2), metasterona M2, arimistano, metandriol, metil-1-testosterona, 5 α -THMT, nandrolona, OXM MI, calusterona e 3 α -hydroxy-7 α -methyl-estr-4-en-17-one (MENT-7 M1). Os oito primeiros somente foram testados utilizando-se ELL com TBME, há a possibilidade de testá-los com pentano para tentar a eliminação dos pequenos interferentes e diminuição do LOI. Os dois últimos já foram testados com os dois solventes e obteve-se melhor resultado com pentano.

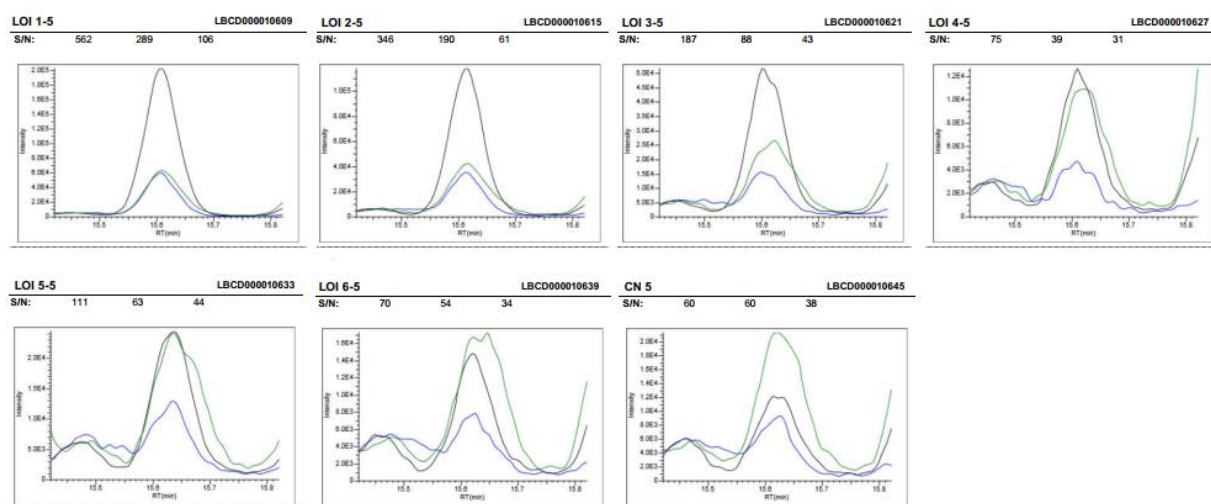


Figura 10.9. Cromatogramas de íons extraídos do analito metasterona em uma das 6 urinas utilizadas nos experimentos de LOI. Os critérios de identificação foram alcançados até a concentração de 20% do MRPL (LOI 3-5). A partir daí a razão entre íons foi afetada pela presença de um interferente.

A Figura 10.2 ilustra a planilha EX.198 utilizada para avaliação do LOI da metasterona. Na planilha há uma tabela que apresenta a avaliação dos 6 níveis de concentração nas 6 urinas utilizadas (colunas 2 a 7). O valor “1” representa as amostras cujos critérios de identificação foram cumpridos e o valor “0” as que não foram. A coluna 6 da tabela contém os resultados das amostras exibidas na Figura 10.2, cujos critérios de identificação foram cumpridos até 20% do MRPL. Abaixo, à direita, a representação gráfica da curva sigmoide obtida a partir dos dados da tabela e à esquerda o valor de LOI 0,89 ng/mL calculado pela equação da curva.

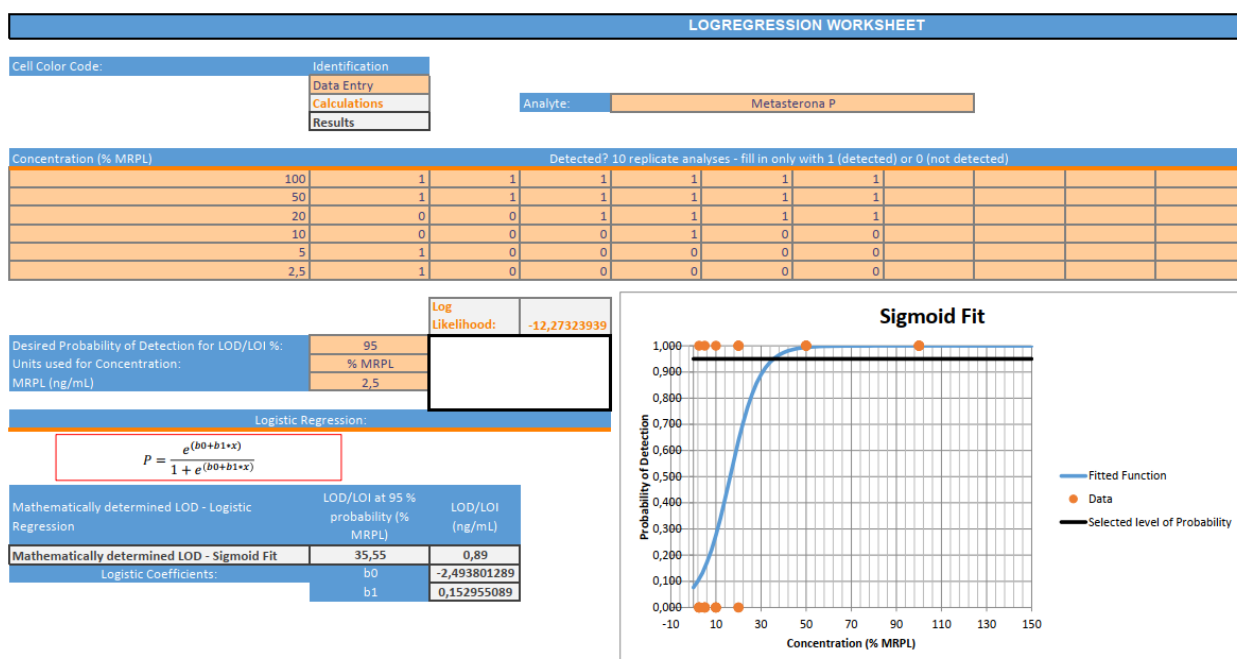


Figura 10.10. Planilha EX.198 utilizada para a avaliação do LOI da metasterona através de curva sigmoide.

Para seis analitos, foi possível atender os critérios de identificação em todas as urinas de todas as concentrações testadas. Quando todos os valores da tabela da planilha EX.198 são iguais a 1 não é possível calcular uma função sigmoide. Como recurso o último nível da tabela da planilha EX.198 foi inserido como zero. Para tais analitos, a função sigmoide obtida calculou um valor de LOI igual a 2,69% do MRPL, a saber: drostanolona (Figura 10.4 e anexo 5), bromantano-6OH, norboletona, androstenona-2 (delta-2), probenecida e tamoxifeno-4OH. A avaliação da probenecida foi realizada sem hidrólise, conforme indicado no TD vigente.

A menor concentração para a qual os critérios de identificação foram cumpridos nas 7 urinas de origens diferentes testadas foi considerada como o LOI. A avaliação por curva sigmoide está pendente.

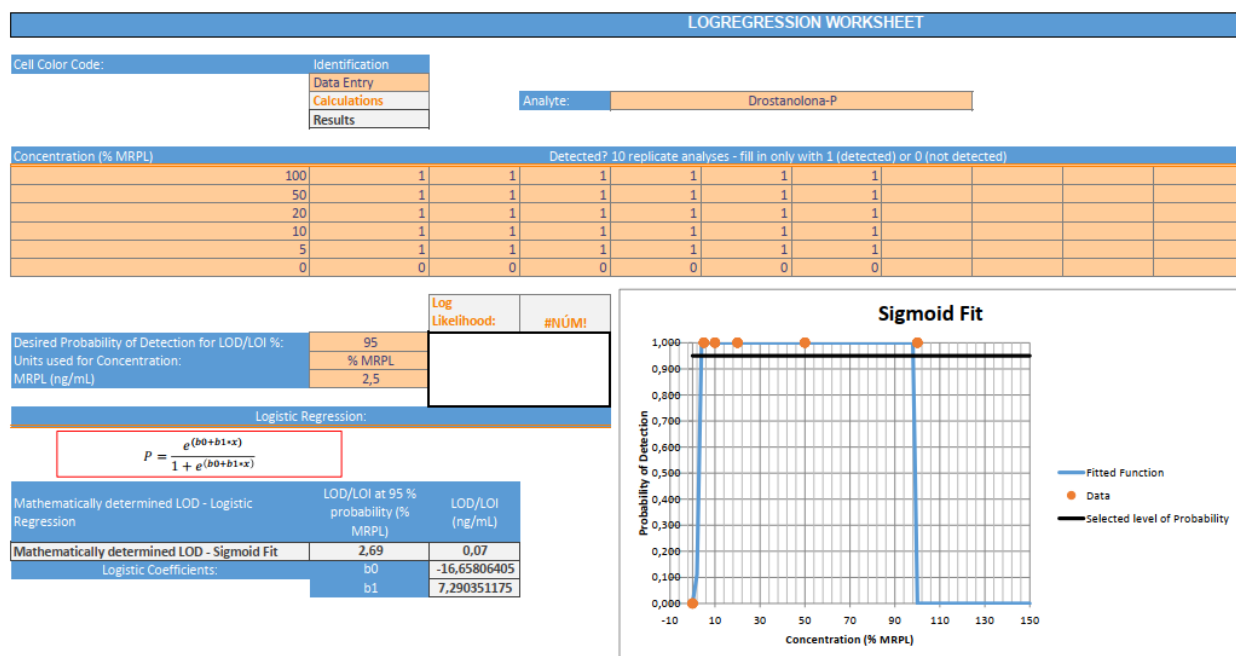


Figura 10.11. Planilha EX.198 utilizada para a avaliação do LOI da drostanolona através de curva sigmoide.

Para alguns analitos que são potencialmente endógenos ou formados a partir de degradação microbiana, observou-se, em alguns dos brancos de urina analisados durante a seletividade, a presença das transições monitoradas. Quando essas urinas foram fortificadas nos diferentes níveis de concentração para avaliação do LOI, observou-se um decréscimo da intensidade das transições até um valor constante, equivalente à intensidade das mesmas nos brancos de urina. Para cálculo do LOI pela função sigmoide, as amostras de urina que atingiram um valor constante na intensidade das transições foram consideradas como não detectadas. Este foi o caso do formestano, boldenona, boldiona, 1-epiandrosterona, 4OH-testosterona, 4-androstenodiona e 6aOH-androstenodiona. Oportunamente o LOI destes analitos será reavaliado utilizando a mesma abordagem dos analitos validados por urina de referência, ou seja, diluição em série de uma urina contendo o analito e padronização externa para estimativa da concentração.

Na Tabela 10.2 encontram-se os LOI alcançados para cada analito avaliado através de diluições em série da urina de referência. O padrão interno utilizado para o cálculo foi testosterona-d3. As concentrações do LOI estimadas através da padronização externa foram inferiores ao MRPL para todos, exceto oximetolona MI e clostebol M3 (LTM). Em ambos se utilizou ELL com TBME e há a possibilidade de testar ELL com pentano para melhorar a sensibilidade. Entretanto a detecção de oximetolona e clostebol no MRPL está coberta pelos seus outros metabólitos (oximetolona LTM M2, oximetolona-6bOH, clostebol M1) e pelo próprio clostebol (parent compound). A Figura 10.5 apresenta os cromatogramas de íons extraídos obtidos para a metasterona M3. A diluição de 0,5 mL foi considerada como o LOI e a concentração foi calculada por padronização externa comparando-se a área de seu pico (área 903203) com a área da metasterona M1 (área 1564449) obtida no CQA, que foi fortificado em 2,5 ng/mL. Este cálculo foi realizado utilizando-se a planilha EX.164, incluiu área do padrão interno testosterona-d3 e a concentração do LOI de metasterona M3 foi estimada em 1,6 ng/mL.

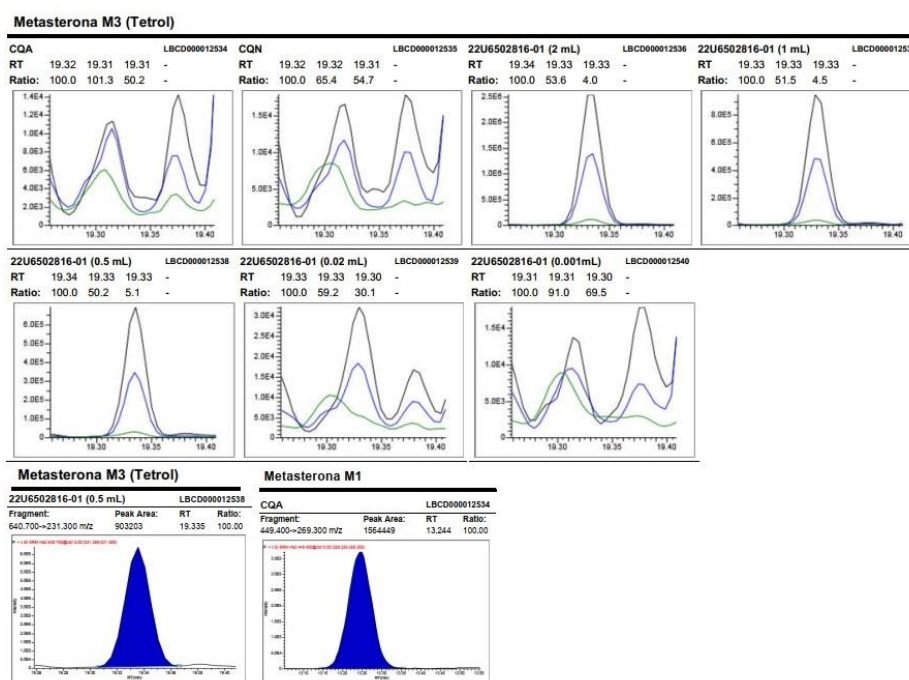


Figura 10.12. Cromatogramas de íons extraídos das amostras de avaliação do LOI da metasterona M3.

O arimistano apresentou interferência de matriz percebida como uma assimetria do pico em algumas das urinas fortificadas para a avaliação do LOI. Etilefrina, oxilofrina, brombuterol e probenecida apresentaram interferência de matriz percebida como deslocamento do tempo de retenção e utilizou-se o tempo de retenção relativo (TRR) na avaliação dos critérios de identificação.

Os EAASs são as principais substâncias proibidas relatadas como Descobertas Analíticas Adversas (AAFs) pelos laboratórios credenciados da WADA [26]. Sofrem um extenso metabolismo, fase I (reações de hidroxilação, isomerização, redução e oxidação) e fase II (principalmente conjugação com ácido glicurônico e sulfato), e seus metabólitos são excretados na urina. Assim, os laboratórios de dopagem rastreiam esses compostos indiretamente principalmente por seus metabólitos homólogos aglicona após hidrólise enzimática empregando técnicas cromatográficas acopladas a plataformas MS. Para fins de controle de dopagem, os melhores marcadores de EAAS são aqueles excretados por mais tempo em vez daqueles excretados na urina em grandes quantidades. Esses melhores marcadores (metabólitos) são conhecidos como metabólitos de longa duração (LTMs) e, com certeza, esses metabólitos devem ser incluídos nos métodos de aquisição de GC-MS/MS desenvolvidos nos laboratórios credenciados de doping. Dependendo do período de lavagem, sua concentração pode ser extremamente baixa em amostras de urina analisadas pelos laboratórios credenciados pela WADA. Muitas vezes, essa situação desafiadora ocorre em suas operações diárias de rotina e pode levá-los a relatar amostras falsas não conformes.

Para os procedimentos de confirmação de EAAS, o método deve ser capaz de identificar de forma confiável o(s) metabólito(s) de EAAS suspeito(s) em sua faixa MRPL (2 ng/mL - 5 ng/mL) ou menos em conformidade com o Documento Técnico da AMA relativo aos critérios mínimos para análise qualitativa (IDCR). Basicamente, o IDCR consiste em parâmetros cromatográficos e MS: tempo de retenção (t_R) e janelas de tolerância de intensidade relativa dependendo das intensidades relativas dos íons, respectivamente. Desde que o método analítico baseado em técnicas cromatográficas e espectrométricas de massa seja capaz de identificar os EAAS ou seus marcadores de forma confiável, não há limite de concentração para os laboratórios de dopagem reportarem um RAA para EAAS. Essa habilidade é conhecida como capacidade de

identificação ou limite de identificação e é avaliada durante a validação do método. Por esta razão, o método de confirmação deve ser altamente sensível para garantir a identificação adequada de EAAS proibidos.

A fonte de íons AEI proporcionou uma melhoria na capacidade de identificação de 48% dos AAS exógenos analisados até o presente momento. Apesar de ambas as fontes de íons terem obtido capacidades de identificação igual para alguns metabólitos/marcadores EAAS, a fonte de íons AEI identificou mais confortavelmente esses metabólitos do que a fonte de íons EI convencional. Essa melhor capacidade de identificação da fonte de íons AEI é mais evidente quando as fontes de íons e o sistema de GC estão contaminados com componentes da matriz. Este é um grande benefício para a análise GC-MS/MS no campo forense, pois reduz a reintegração manual de pico e a reanálise de amostras presumidas devido a problemas de qualidade analítica. Esses aspectos técnicos são críticos quando o laboratório tem pouco tempo para reportar seus resultados analíticos como em um grande evento esportivo, como Jogos Olímpicos e Paralímpicos. Para compostos com problema de seletividade não foi observada uma melhora significativa na capacidade de detecção empregando fonte AEI como esperado. Embora a relação sinal-ruído (s/n) tenha sido semelhante entre as duas fontes de íons de elétrons, o ganho de intensidade de íons obtido pela fonte de íons AEI foi suficiente para identificar adequadamente os marcadores com problemas de sensibilidade. Além disso, vale ressaltar que a fonte de íons EI ainda atende aos critérios da WADA para confirmação de EAAS (dados apresentados na tabela a seguir).

Tabela 10.1. Resultados obtidos para cada analito monitorado (com material de referência disponível)

Substância	Classe	MRPL/MRL (ng/mL)	TBME					pentano			
			LOI (ng/mL)	Seletividade	Arraste	Rendimento de extração (%)	Repetitividade (RSD%)	LOI (ng/mL)	Seletividade	Arraste	Rendimento de extração (%)
16b-OH-Furazabol	S1	2,5	-	-	-	-	-	0,42	ok	ok	-
3b-OH-Tibolona-M2	S1	2,5	0,29	ok	ok	68,6	14,0	0,75	ok	-	-
3'-OH-Estanozolol	S1	1	0,87	ok	ok	50,4	24,5	-	-	-	-
3'-OH-Prostanozol	S1	2,5	1,42	ok	-	-	-	-	-	-	-
4α-OH-epiandrosterona	S1	2,5	1,71	ok	ok	101,	22,4	-	-	-	-
4b-OH-Estanozolol	S1	1	1,12	ok	ok	56,9	18,6	-	-	-	-
4-OH-Ciclofenil M	S4	20	0,53	ok	ok	64,4	7,5	-	-	-	-
4-OH-Ospemifeno	S4	20	0,23	ok	-	-	-	-	-	-	-
4-OH-Testosterona	S1	2,5	0,59	ok	ok	87,6	21,0	-	-	-	-
5α-THMT	S1	2,5	1,26	ok	ok	90,9	4,6	-	-	-	-
5b-THMT	S1	2,5	2,23	ok	ok	91,4	9,2	-	-	-	-
6α-OH-androstenodiona	S4	20	5,0	ok	ok	75,1	24,9	-	-	-	-
6b-OH-DHCMT	S1	2,5	1,42	ok	ok	60,1	25,9	-	-	-	-
6b-OH-MTD	S1	2,5	0,4	ok	ok	83,6	7,3	0,45	ok	-	-
6-OH-bromantano	S6	50	-	ok	ok	58,1	6,1	1,35	ok	-	-
6-OXO	S4	20	2,19	ok	ok	109,	16,9	-	-	-	-
Androstenodiol-1	S1	2,5	2,23	ok	ok	102,	22,8	-	-	-	-
Androstenodiona-1	S1	2,5	0,42	ok	ok	100,	18,6	-	-	-	-
Androstenodiona-4	S1	2,5	-	ok	ok	111,	20,9	0,07	ok	-	-
Androstenona-2 (delta 2)	S4	20	-	nok	-	-	-	0,54	ok	-	-
Androsterona-1 (LTM)	S1	2,5	1,38	ok	ok	93,3	22,2	-	-	-	-
Arimistano	S4	20	3,55	ok	ok	104,	12,2	-	-	-	-
α-Zearalenol	S1	1	0,34	ok	ok	68,2	13,5	-	-	-	-
Bambuterol	S4	20	2,62	ok	ok	58,1	9,5	-	-	-	-
Bolandioli (19-	S1	2,5	-	ok	ok	74,3	19,9	1,38	ok	-	-
Bolasterona	S1	2,5	-	ok	ok	61,5	10,9	1,49	ok	ok	-
Bolasterona-M1	S1	2,5	-	ok	ok	66,1	8,2	0,52	ok	ok	-
Boldenona	S1	2,5	1,14	ok	ok	106,	24,1	0,94	ok	-	-
Boldenona-M1	S1	2,5	-	ok	ok	102,	21,0	0,53	ok	-	-
Boldiona	S1	2,5	-	ok	ok	117,	22,9	0,18	ok	-	-
Brombuterol	S3	20	0,21	ok	ok	53,5	5,8	-	-	-	-
Buprenorfina	S7	2,5	0,13	ok	ok	78,2	17,3	-	-	-	-
b-Zearalenol	S1	1	0,21	ok	ok	65,1	10,6	-	-	-	-
Calusterona	S1	2,5	-	ok	ok	85,1	5,2	0,42	ok	ok	-
Calusterona-M1	S1	2,5	-	ok	ok	56,3	9,1	0,54	ok	ok	-

Tabela 10.1. Resultados obtidos para cada analito monitorado (com material de referência disponível) – Continuação

Substância	Classe	MRPL/MRL (ng/mL)	TBME					pentano			
			LOI (ng/mL)	Seletividade	Arraste	Rendimento de extração (%)	Repetitividade (RSD%)	LOI (ng/mL)	Seletividade	Arraste	Rendimento de extração (%)
Carfedon	S6	50	17,18	ok	ok	16,4	8,1	-	-	-	-
Carteolol	P1	50	26,4	ok	ok	35,4	11,9	-	-	-	-
Clembuterol	S1.2	0,2	0,14	ok	ok	89,1	5,8	0,06	ok	ok	-
Clostebol P	S1	2,5	0,27	ok	ok	64,2	15,8	-	-	-	-
Clostebol-M1	S1	2,5	0,56	ok	ok	70,4	13,6	-	-	-	-
Codeína (monitoramento)	S7	25	3,28	ok	ok	65,8	7,2	-	-	-	-
Danazol-M1	S1	2,5	0,84	ok	ok	73,6	10,3	-	-	-	-
DHCMT	S1	2,5	-	ok	ok	66,3	7,1	0,07	ok	-	-
DHCMT EpiM4	S1	2,5	-	-	-	-	-	0,07	ok	-	-
DHCMT M3 (LTM)	S1	0,4	-	ok	-	46,4	25,0	0,04	ok	-	-
DHCMT M4	S1	2,5	-	ok	ok	-	-	0,29	ok	-	-
Dihidrotestolactona-M2	S4	20	-	-	-	-	-	0,64	ok	ok	-
DMT P	S1	2,5	0,42	ok	ok	19,2	10,8	0,19	ok	ok	-
Drostanolona	S1	2,5	0,57	ok	ok	69,3	13,3	0,07	ok	-	-
Drostanolona M1	S1	2,5	0,93	ok	ok	63,2	11,1	0,58	ok	-	-
EMD	S1	2,5	0,87	ok	ok	74,7	8,4	0,32	ok	-	-
Epiandrosterona-1	S1	2,5	-	-	-	-	-	1,47	ok	-	-
EpiMTD	S1	2,5	0,5	ok	ok	89,9	12,6	0,23	ok	-	-
EpiOXD	S1	2,5	1,92	ok	ok	61,0	22,8	0,47	ok	-	-
Estembolona	S1	2,5	0,93	ok	ok	66,2	21,5	0,71	ok	-	-
Etamivan	S6	50	11,75	ok	ok	61,6	6,2	-	-	-	-
Etilefrina	S6	50	23,64	ok	ok	26,8	12,4	-	-	-	-
Etilestrenol	S1	2,5	0,52	ok	ok	16,1	19,4	-	-	-	-
Etisterona	S1	2,5	0,56	ok	ok	72,3	10,5	-	-	-	-
Exemestano-M	S4	20	7,46	ok	ok	58,9	14,1	-	-	-	-
Fenoterol CN metileno	S3	20	1,45	ok	ok	-	-	-	-	-	-
Fenoterol penta-TMS	S3	20	3,53	ok	ok	45,1	24,2	-	-	-	-
Fenoterol tetra-TMS	S3	20	3,78	ok	ok	39,6	11,5	-	-	-	-
Fluoximesterona	S1	2,5	0,56	ok	ok	63,8	6,2	-	-	-	-
Fluoximesterona-M2	S1	2,5	0,19	ok	ok	65,1	6,6	-	-	-	-
Fluoximesterona-M3	S1	2,5	0,68	ok	ok	60,1	7,7	-	-	-	-
Formebolona M2	S1	2,5	0,15	ok	ok	86,2	4,2	-	-	-	-
Formestano	S4	50	0,54	ok	ok	76,3	21,0	-	-	-	-
Hidrocodona	S7	25	3,29	ok	-	-	-	-	-	-	-
Hidromorfona	S7	25	2,74	ok	ok	41,2	8,5	-	-	-	-

Tabela 10.1. Resultados obtidos para cada analito monitorado (com material de referência disponível) – Continuação

Substância	Classe	MRPL/MRL (ng/mL)	TBME					pentano			
			LOI (ng/mL)	Seletividade	Arraste	Rendimento de extração (%)	Repetitividade (RSD%)	LOI (ng/mL)	Seletividade	Arraste	Rendimento de extração (%)
Letrozol M	S4	20	<u>1,28</u>	ok	ok	64,5	8,9	-	-	-	-
M1T	S1	2,5	<u>0,93</u>	ok	ok	92,2	6,4	-	-	-	-
Mabuterol	S4	20	<u>1,45</u>	ok	ok	53,6	6,2	-	-	-	-
MENT-7	S1	2,5	0,57	ok	ok	53,8	16,9	<u>0,43</u>	ok	ok	-
MENT-7-M1	S1	2,5	-	ok	ok	55,6	18,4	<u>0,59</u>	ok	ok	-
Mestanolona	S1	2,5	<u>0,29</u>	ok	ok	90,2	3,3	-	-	-	-
Mesterolona	S1	2,5	-	ok	ok	82,8	19,2	<u>0,18</u>	ok	-	-
Mesterolona-M1	S1	2,5	-	ok	ok	66,0	14,6	<u>0,52</u>	ok	-	-
Mesterolona-M2	S1	2,5	-	ok	ok	70,1	14,2	<u>0,14</u>	ok	-	-
Metadona	S7	25	<u>6,03</u>	ok	ok	32,3	12,9	-	-	-	-
Metandriol	S1	2,5	<u>0,56</u>	ok	ok	91,7	3,8	-	-	-	-
Metasterona	S1	2,5	<u>0,89</u>	ok	ok	63,5	8,3	-	-	-	-
Metasterona-M1	S1	2,5	<u>0,29</u>	ok	ok	66,2	20,2	-	-	-	-
Metenolona	S1	2,5	-	ok	ok	75,9	13,2	<u>0,07</u>	ok	-	-
Metenolona M1	S1	2,5	-	ok	ok	71,9	12,0	<u>0,26</u>	ok	-	-
Metilclostebol	S1	2,5	<u>0,18</u>	ok	ok	65,0	6,4	-	-	-	-
Metildienolona	S1	2,5	-	-	-	-	-	<u>0,53</u>	ok	ok	-
Metilestembolona P	S1	2,5	<u>1,22</u>	ok	ok	66,1	5,0	-	-	-	-
Metilnortestosterona	S1	2,5	-	-	-	-	-	<u>0,59</u>	ok	ok	-
Mibolerona	S1	2,5	-	ok	ok	75,4	14,2	<u>0,45</u>	ok	ok	-
Mibolerona-M1	S1	2,5	0,56	ok	ok	77,3	20,0	<u>0,45</u>	ok	ok	-
Morfina	S7	25	<u>13,53</u>	ok	ok	-	-	-	-	-	-
MTD	S1	2,5	-	ok	ok	91,4	11,9	<u>0,07</u>	ok	-	-
MTD LTM	S1	1	-	ok	ok	-	-	<u>0,34</u>	ok	-	-
Nandrolona	S1	2,5	<u>1,2</u>	ok	ok	75,9	13,6	-	-	-	-
Norboletona	S1	2,5	0,18	ok	ok	69,4	14,6	<u>0,07</u>	ok	ok	-
Norboletona-M2	S1	2,5	-	ok	ok	68,6	18,5	<u>0,56</u>	ok	ok	-
Norbuprenorfina	S7	25	<u>6,17</u>	ok	ok	69,4	16,1	-	-	-	-
Norclostebol	S1	2,5	<u>0,93</u>	ok	ok	60,9	20,6	1,14	ok	ok	-
NorEMD (metandienona	S1	2,5	1,77	ok	ok	46,9	10,5	<u>0,27</u>	ok	-	-
Noretandrolona	S1	2,5	<u>0,16</u>	ok	ok	73,2	15,6	0,64	ok	ok	-
Noretandrolona-M1	S1	2,5	-	ok	ok	71,4	17,0	<u>0,28</u>	ok	ok	-
Noretandrolona-M2	S1	2,5	-	ok	ok	73,1	17,2	<u>0,75</u>	ok	ok	-
Noretandrolona-M3	S1	2,5	1,38	ok	ok	78,1	23,0	<u>0,61</u>	ok	ok	-
Noroxandrolona (NorOXD)	S1	2,5	-	-	-	-	-	<u>0,07</u>	ok	-	-

Tabela 10.1. Resultados obtidos para cada analito monitorado (com material de referência disponível) – Continuação

Substância	Classe	MRPL/MRL (ng/mL)	TBME					pentano			
			LOI (ng/mL)	Seletividade	Arraste	Rendimento de extração (%)	Repetitividade (RSD%)	LOI (ng/mL)	Seletividade	Arraste	Rendimento de extração (%)
Octopamina	S6	1000	209	ok	ok	0,1	6,7	-	-	-	-
Ospemifeno	S4	20	0,7	ok	-	-	-	-	-	-	-
Oxabolona	S1	2,5	0,54	ok	ok	44,2	28,8	-	-	-	-
Oxabolona-M1	S1	2,5	0,58	ok	ok	41,2	35,0	-	-	-	-
OXD	S1	2,5	2,89	ok	ok	58,7	20,4	1,43	ok	-	-
OXD LTM M1	S1	2,5	0,84	ok	ok	52,0	19,9	0,29	ok	-	-
OXD LTM M2	S1	2,5	1,08	ok	ok	51,2	16,5	0,61	ok	-	-
Oxicodona	S7	25	0,75	ok	ok	43,3	15,1	-	ok	-	-
Oxilofrina	S6	50	5,53	ok	ok	10,0	15,5	-	-	-	-
Oximesterona P	S1	2,5	0,25	ok	ok	63,2	6,9	-	-	-	-
Oximorфона	S7	25	1,38	ok	ok	33,8	15,6	-	-	-	-
Oximetolona LTM-M2	S1	2,5	-	-	-	-	-	0,21	ok	ok	-
Probenecida	S5	200	5,38	ok	ok	1,4	9,5	-	-	-	-
Promagnon	S1	2,5	0,18	ok	ok	60,3	13,0	-	-	-	-
Taleranol	S1	1	0,16	ok	ok	69,3	10,5	-	-	-	-
Tamoxifeno-M1	S4	20	0,58	ok	ok	24,7	10,0	-	-	-	-
Tamoxifeno-M2	S4	20	1,41	ok	ok	21,5	10,2	-	-	-	-
Terbutalina	S4	20	2,09	ok	ok	11,5	5,3	-	-	-	-
Testolactona-M1	S4	20	-	ok	ok	47,4	21,2	2,31	ok	-	-
Testolactona-M2	S4	20	-	-	-	-	-	0,64	ok	ok	-
Testosterona-1	S1	2,5	1,92	ok	ok	100,	19,2	-	-	-	-
Triantereno	S5	20	2,84	ok	ok	24,3	9,9	-	-	-	-
Zeranol	S1	1	0,43	ok	ok	71,0	11,5	-	-	-	-
Zilpaterol	S1	1	0,34	ok	ok	58,4	7,0	-	-	-	-

Tabela 10.2. Resultados obtidos para cada analito monitorado (com urina de referência)

Substância	Analito de referência	Classe	MRPL/MRL (ng/mL)	TBME	
				LOI (ng/mL)	Seletividade
OXM MI	OXM LTM2	S1	2,5	4,2	ok
OXM 6bOH		S1	2,5	0,1	ok
DHCMT EpiM2	DHCMT epi-M4	S1	2,5	0,7	ok
DHCMT EpiM3		S1	2,5	0,5	ok
DHCMT M2		S1	2,5	2,3	ok
DHCMT MI		S1	2,5	0,5	ok
Fluoximesterona LTM	Fluoximestero	S1	2,5	0,1	ok
Metasterona-M2	Metasterona M1	S1	2,5	0,7	ok
Metasterona-M3		S1	2,5	1,6	ok
Metenolona LTM	Metenolona	S1	2,5	0,9	ok
Mesterolona-M3	Mesterolona-M1	S1	2,5	0,7	ok
Mesterolona-M4 (LTM)		S1	2,5	0,1	ok
Clostebol M3 (LTM)	Clostebol M1	S1	2,5	4,7	ok

10.d. Conclusão

Empregando a fonte de íons AEI, foram alcançadas concentrações de capacidade de identificação mais baixas do que a fonte de íons EI para os marcadores mais difíceis de esteróides anabolizantes androgênicos exógenos (AAS). Além disso, mesmo para aqueles marcadores de AASs que apresentaram concentrações de capacidade de identificação iguais para ambas as fontes de íons, a fonte de íons AEI permite sua identificação mais confortavelmente do que a fonte de EI convencional. O objetivo do projeto foi alcançado.

10.f. Referências

- Schackleton, C.,H.L. Role of Disordered Steroid Metabolome in the Elucidation of Sterol and Steroid biosynthesis. *Lipids*. 47, 1-12, (2012).
- Kicman, A.T.: Pharmacology of Anabolic steroids. *British Journal of Pharmacology*.154, 502-521 (2008).
- Hartgens F, Kuipers H. Effects of androgenic-anabolic steroids in athletes. *Sports Med*. 34, 513–554 (2004).

- WADA. Available at: https://www.wadaama.org/sites/default/files/wada_2019_english_prohibited_list.pdf.
- - Gómez, C., Pozo, O.J., Garrosta, L., Segura, J., Ventura, R.: A new sulphate metabolite as a long-term marker of metadione misuse. *Steroids*. 78, 1245-1253 (2013).
- Pereira, H.M.G., Sardela, V.F., Padilha, M.C., Mirotti, L., Casilli, A., de Oliveira F.A., et al.: Doping Control Analysis at the Rio 2016 Olympic and Paralympic Games. *Drug Test. Anal.* 9, 1658-1672 (2017).
- Van Eenoo, P., Van Ganbeske, W., De Brabanter N., Deventer, K., Delbeke, F.T.: A fast, comprehensive screening method for doping agents in urine by gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry. *J. Chromatogr A*. 1218 (21), 3306-3316 (2011).
- Ahrens, B.D., Starcevic, B., Butch, A.W.: Detection of prohibited substances by liquid chromatography tandem mass spectrometry for sports doping control. *Methods Mol. Biol.* 902, 115-128 (2012).
- Cavalcanti, G., de A., Rodrigues L.M., dos Santos, L., Zheng X., Gujar, A., Cole, J., Padilha, M.C., Neto, F., R., de A.: Non-targeted acquisition strategy for screening doping compounds based on GC-ESI-hybrid quadrupole Orbitrap mass spectrometry: a focus on exogenous anabolic steroids. *Drug Test. Anal.* 10, 507-517 (2018).
- Sardela, V.F., Martucci, M.E.P., de Araujo, A.L.D., Leal, E.C., Oliveira, D.S., Carneiro, G.R.A., Deventer, K., Van Eenoo, P., Pereira, H.M.G., Neto, F.R. de A.: Comprehensive analysis by liquid chromatography Q-Orbitrap mass spectrometry: Fast screening of peptides and organic molecules. *J. Mass Spectrom.* 53, 476-503 (2018).
- WADA Technical Document - TD2018MRPL. Available at: https://www.wadaama.org/sites/default/files/resources/files/td2018mrpl_v1_finaleng.pdf.
- Ma, Y.C., Kim, Y.H.: Determination of steroids by liquid chromatography/Mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 8, 1010-1020 (1997).

- Raro, M., Portolés, T., Sancho, J.V., Pitarch., E., Hernández, F., Marcos, J., Ventura, R., Gómez., Segura, J., Pozo, O.J.: Mass spectrometric behavior of anabolic androgenic steroids using gas chromatography coupled to atmospheric pressure chemical ionization source. Part I: Ionization. *J. Mass Spectrom.* 49, 509-521 (2014).
- Dumont, Q., Bárcenas M., Dossmann, H., Bailloux, I., Buisson, C., Mechin, N., Molina, A., Lasne, F., Rannulu, N.S., Cole, R.B.: Improved Steroids Detection and Evidence for their Regiospecific Decompositions using Anion Attachment Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 88 (7), 3585-3591 (2016).
- Kim, S-H, Cha, E-J., Lee, K.M., Kim, H.J., Kwon, O-S., Lee, J.: Simultaneous ionization and analysis of 84 anabolic androgenic steroids in human urine using liquid chromatography-silver ion coordination ion spray/triple-quadrupole mass spectrometry. *Drug Test. Anal.* 6, 1174-1185 (2014).
- Pozo, O.J., Van Eenoo, P, Deventer, K., Delbeke, F.T.: Ionization of anabolic steroids by adduct formation in liquid chromatography electrospray mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* 42(4), 497-516 (2007).
- Pozo O.J., Van Eenoo, P., Deventer K., Elbardissy, H., Grimalt, S., Sancho, J.V., Hernandez, F., Ventura, R., Delbeke, F.T.: Comparison between triple quadrupole time of flight analyzers coupled to liquid chromatography for detection of anabolic steroids in doping control analysis. *Anal. Chim. Act.* 684(1-2), 98-111 (2011).
- Sobolevsky, T., Rodchenkov, G.: Mass spectrometric description of novel oxymetholone and desoxymethyltestosterone metabolites identified in human urine and their importance for doping control. *Drug Test. Anal.* 4, 682-691 (2012).
- Wong, A. S.Y., Leung, G.N.W., Leung, D.K.K., Wan, T.S.M. Doping control analysis of anabolic steroids in equine urine by gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Drug Test. Anal.* 9, 1320-1327 (2017).
- Cavalcanti G., de A., Leal, F.D., Garrido, B.C., Padilha, M.C., Neto, F.R. de A.: Detection of designer steroid methylstenbolone in "nutritional supplement" using gas chromatography and tandem mass spectrometry: Elucidation of its urinary metabolites. *Steroids.* 78(2) 228-233 (2013).

- Peters, F., T., Schaefer S., Staack, R.F., Kraemer, T., Maurer, H.H.: Screening for and validated quantification of amphetamines and of amphetamine- and piperazine-derived designer drugs in human blood plasma by gas chromatography/mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* 38, 659-676 (2003).
- Medeiros, P., M., Simoneit, B., R., T.: Analysis of sugars in environmental samples by gas chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 1141, 271-278 (2007).
- Bianchi, F., Careri, M., Musci, M., Mangia, A.: Fish and food safety: Determination of formaldehyde in 12 fish species by SPME extraction and GC–MS analysis. *Food Chem.* 100, 1049-1053 (2007).
- Dissertation by Steven Lowell Koontz, A VERY HIGH YIELD ELECTRON IMPACT ION SOURCE FOR QUADRUPOLE MASS SPECTROMETRY Ph.D. 1983, University of Arizona.
- Gómez, C., Pozo, O, J., Geyer, H., Marcos, J., Thevis, M., Schanzer, W., Segura, J., Ventura, R.: New potential markers for detection of boldenone misuse. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 132, 239-246 (2012).
- Pozo, O., J., Brabanter, de N., Fabregat, A., Segura, J., Van Eenoo, P., Deventer, K., : Current status and bioanalytical challenges in the detection of unknown anabolic androgenic steroids in doping control analysis. *Bioanalysis*, 5(21), 2661-2677 (2013).
- WADA Technical Document. TD2015IDCR. Available at: https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/td2015idcr_-_eng.pdf.
- 2017 Anti-Doping Testing Figures. Samples Analyzed and Reported by Accredited Laboratories in ADAMS. Available at: https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/2017_anti-doping_testing_figures_en_0.pdf.
- Sobolevsky, T., Rodchenkov, G.: Detection and mass spectrometric characterization of novel long-term dehydrochloromethyltestosterone metabolites in human urine. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 128, 121-127 (2012).
- Guddat, S., Fußholler, G., Beuck, S., Thomas, A., Rydevik, A., Bondesson, U., Hedeland, M., Lagojda A., Schanzer., W., Thevis, M.: Synthesis, characterization,

and detection of new oxandrolone metabolites as long-term markers in sports drug testing. Anal. Bional. Chem. 405, 8285-8294, (2013).

- Polet, M., Ganbeske, W., V., Geldof, L., Deventer, K., Van Eenoo, P.: Identification of novel long-term metabolites of oxymesterone and mesterolone in human urine by application of selected reaction monitoring GC-Cl-MS/MS. Drug Test. Anal. 9, 1673-1694, (2017).

II – A VISÃO DA COORDENAÇÃO GERAL

Ila. Avaliação Geral do Andamento do Projeto

Como infelizmente já é tradição em desenvolvimento de projetos de pesquisa no Brasil, a aquisição de insumos e afins foi um desafio para a realização e finalização dos subprojetos aqui apresentados.

A dinâmica das aquisições de tais materiais, em se tratando do desenvolvimento de Ciência é, reconhecidamente, um entrave. Entretanto, pela tramitação natural dos processos, os materiais necessários para conclusão dos projetos foram adquiridos.

Fica aqui registrado o agradecimento especial para a equipe administrativa do LBCD – LADETEC pelo empenho e dedicação na superação dos entraves burocráticos ao longo do percurso.

Este Relatório Final tem a vocação de apresentar o alcance integral dos objetivos propostos, com a obtenção de vários resultados tangíveis, como artigos científicos, dissertações de mestrado, teses de Doutorado, novos métodos e atualizações metodológicas que, hoje, são uma realidade.

Merece destaque os resultados de vários subprojetos viabilizados pela Autoridade Brasileira de Controle de Dopagem apresentados em eventos científicos nacionais e internacionais, contribuindo para colocar a NADO brasileira na posição de vanguarda no sistema antidopagem internacional.

Uma vez consolidados todos os resultados, e considerando a atualização do contexto técnico-científico-regulatório natural decorrido dois anos do início do projeto, declara-se que o mesmo se encontra 100% completo.

Para os projetos que tiveram seus cursos parcialmente corrigidos ao longo do desenvolvimento, cabe a perspectiva de que tal fato não deve ser interpretado com estranheza. Em determinados casos, notadamente as discussões regulatórias não evoluíram na mesma velocidade dos avanços científicos. Neste contexto, o projeto evoluiu até onde foi cientificamente possível, sem prejuízo conceitual da proposta original.

Uma avaliação do avanço de cada subprojeto é apresentada na Figura II.1

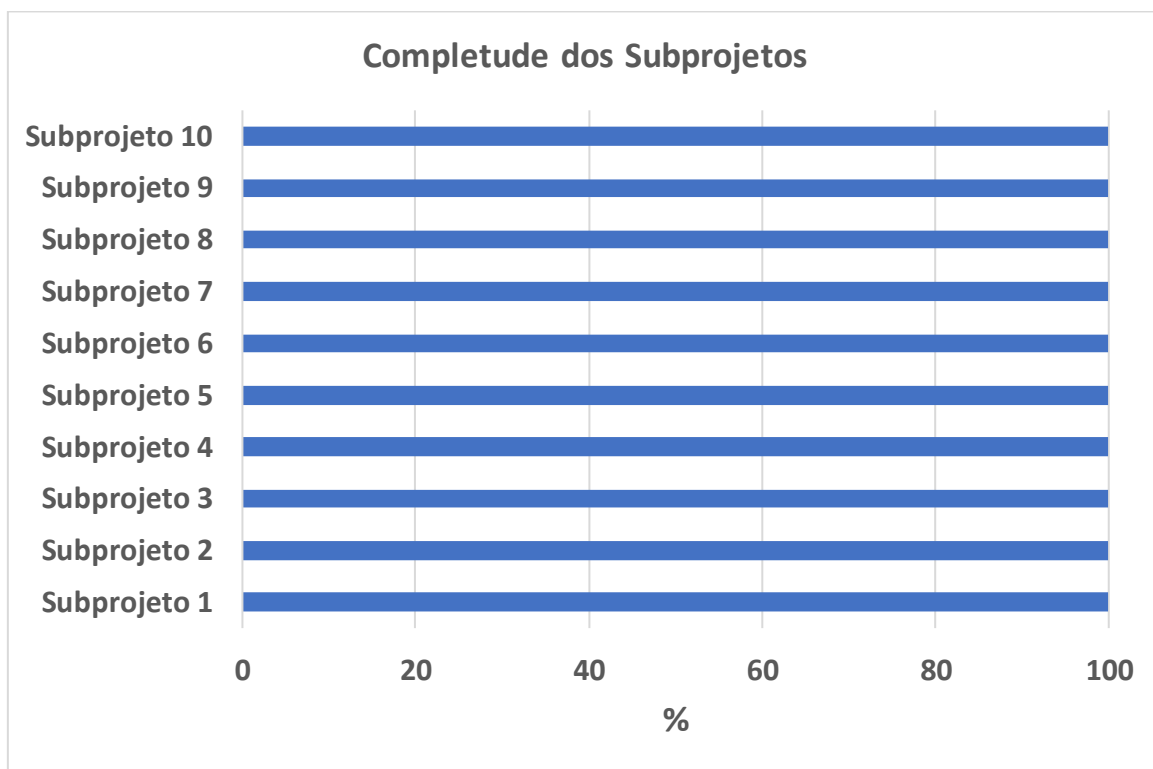


Figura II.1 Compleitude de cada subprojeto.

IIb. Produtos de Perspectivas em cada Subprojeto

SUBPROJETO 1. Dopagem sanguínea – I. Aprimoramentos na detecção de transfusões homólogas

Visão Geral

Observou-se o incremento do número de antígenos, e consequente aumento da abrangência de detecção, do método de transfusão homóloga no LBCD, já oferecido em rotina para a Autoridade Brasileira de Controle de Dopagem (ABCD).

Testes de concentração foram realizados com sucesso, permitindo o aumento da abrangência metodológica observada no LBCD.

Considerando-se os casos de HBT registrados nos Jogos Olímpicos de 2020, bem como casos já observados no próprio LBCD em amostras de outras Autoridades de Testes, reforça-se a recomendação do aumento progressivo do número de requisições de análises para HBT.

A inclusão de mais antígenos reduz significativamente a chance de resultados falso negativos.

Como resultado prático da realização do projeto, afirma-se que o LBCD encontra-se na vanguarda da detecção da transfusão homóloga.

Produtos derivados da realização do subprojeto

Produto 1: Método de HBT com 13 antígenos, mais abrangente, capaz de impactar positivamente no Sistema Antidopagem Brasileiro.

Produto 2: Artigo Científico. Título: “*Minor Red Blood Cells Antigens Phenotyping of Athletes Sampled in International Competitions*” Situação: Já submetido a avaliação dos pares. Jornal: Drug, Teste and Analysis.

Status: Concluído.

SUBPROJETO 2. Dopagem sanguínea – II. Desenvolvimento de estratégia para detecção de Transfusão autóloga

Visão Geral

A dopagem via Transfusão Autóloga é um dos grandes desafios da ciência antidopagem. No projeto, adotou-se a estratégia da busca por biomarcadores da imunomodulação desencadeada pelo armazenamento de sangue. Tal estratégia tem potencial concreto na detecção da Transfusão Autóloga. Notadamente, o subprojeto apresenta vies fortemente acadêmico.

Produtos derivados da realização do subprojeto

Produto 1: Artigo científico já publicado. Título: “*Extracellular vesicles from stored red blood cells convey heme and induce Spic expression on human monocytes*”. Jornal: *Frontiers in Immunology*, 2022. doi: 10.3389/fimmu.2022.833286

Nota: O LBCD financia desdobramento do Subprojeto 2 com recursos próprios.

Status: Concluído.

SUBPROJETO 3. Amostragem tipo Dried Blood Spot – I. Uma alternativa de amostragem de amostras visando a detecção de dopagem genética

Visão Geral

Notadamente, o subprojeto apresenta vies fortemente acadêmico, considerando a falta de diretriz efetiva da WADA na utilização de DBS para tal fim. Entretanto, uma vez incorporado, o DBS pode abrir perspectivas interessantes como ferramenta de coleta de amostras destinados a análises visando a detecção de dopagem genética.

Produtos derivados da realização do subprojeto

Produto 1: Acúmulo de informações acadêmicas relacionados a abrangência do método e estabilidade dos potenciais analitos.

Nota: Antes da consideração de novas iniciativas, é importante que a Agência Mundial Antidopagem estabeleça claramente a aplicabilidade das matrizes poliméricas secas em métodos de biologia molecular, aplicadas ao controle de dopagem no esporte.

Status: Concluído.

SUBPROJETO 4. Amostragem tipo Dried Blood Spot - II - Detecção de agentes dopantes proibidos em competição

Visão Geral

O projeto teve como foco as substâncias proibidas Em Competição, com *Minimum Reporting Limit* definido. Isso agrega ao projeto um vies acadêmico, considerando que atualmente não existe um critério definido pela WADA para a configuração de um Resultado Analítico Adverso para tais empregando DBS. EM alinhamento com a decisão estratégica da ABCD, o suporte Mitra foi avaliado nesta etapa do projeto.

Ressalta-se que os resultados do subprojeto tem potencial para agragar conhecimento na geração dos critérios supracitados.

O Amostrador será avaliado na próxima etapa do projeto.

Produtos derivados da realização do subprojeto

Produto 1: Desenvolvimento de método em matriz DBS polimérica a ser oferecido como produto a Autoridade Brasileira de Controle de Dopagem.

Produto 2: Participação discente em evento divulgação científica.

Produto 3: Apresentação sendo preparada para o Manfred Donike Workshop 2024.

Nota: O LBCD desenvolve projeto de desdobramento com recursos próprios.

Status: Concluído.

SUBPROJETO 5. Amostragem tipo Dried Blood Spot - III. Comparação das janelas de detecção entre amostragem do tipo DBS e DPS

Visão Geral

A rápida coleta e o baixo custo de transporte das amostras de *DBS* quando comparada com as coletas tradicionais de urina e sangue podem proporcionar uma maior frequência de amostragem no controle de dopagem para a análise de ésteres de testosterona. Essa estratégia em conjunto com as informações obtidas pelo passaporte esteroidal potencializam a probabilidade de detectar o abuso de testosterona no âmbito do esporte.

A validação completa do método foi concluída. Após avaliação de ésteres de testosterona, o método desenvolvido no LBCD apresenta abrangência comparável aos já descritos na literatura.

A injeção de um volume maior de amostra usando o injetor *Programmable Temperature Vaporizing (PTV)* assim como a utilização do *LC-HRMS* “by passing” a etapa de derivatização foram avaliados com relação ao potencial aumento nos limites de detecção (*LODs*) dos métodos analíticos empregados para análise dos ésteres de testosterona. O projeto já tem aprovação do comitê de ética em pesquisa (CEP) para obtenção de amostras reais.

Produtos derivados da realização do subprojeto

Produto 1: Desenvolvimento de método em matriz DBS polimérica a ser oferecido como produto à Autoridade Brasileira de Controle de Dopagem.

Status: Concluído.

SUBPROJETO 6. Investigação da possibilidade de dopagem acidental por higenamine como resultado da dieta

Visão Geral

Cerca de 50% dos frutos (Graviola) não apresentaram higenamina. Os outros 50% apresentaram concentrações que não resultaram em um Resultados Analítico Adverso, considerando os critérios atuais estabelecidos pela WADA.

O estudo foi ampliado para outros frutos geneticamente relacionados a graviola (Fruta do Conde). Foi estabelecido colaboração com o Laboratório de Colônia, também acreditado pela WADA.

Mesmo ampliando-se o número de voluntário, bem como a diversidade genética do grupo, os estudos de excreção resultado do projeto não geraram resultados analíticos adverso.

O objetivo principal do projeto, ou seja, responder a hipótese de razoabilidade de geração de um resultado analítico adverso pelo consumo de graviola foi atingido, colaborando com o Tribunal do Esporte em situação de casos futuros.

Produtos derivados da realização do subprojeto

Produto 1: Apresentação oral no Manfred Donike Workshop 2022.

Produto 2: Publicação de artigo científico. Título: Investigations into Annona fruit consumption as a potential source of dietary higenamine intake in the context of sports. DOI: 10.1002/dta.3558. Drug Testing and Analysis

Produto 3: Segundo informações, os resultados foram utilizados para dirimir dúvidas em relação ao caso de um atleta cuja Autoridade de Teste foi a ABCD.

Status: Concluído.

SUBPROJETO 7. Estudo de metabolismo de agentes dopantes – Modelo in vivo Zebrafish

Visão Geral

O projeto contribuiu na validação de uma ferramenta para estudo do metabolismo e agentes dopantes. O modelo em questão gera coleções de referência, passíveis de utilização como controle de qualidade metodológicos em análises de amostras onde a ABCD é Autoridade de Teste. Uma vantagem adicional é a velocidade de geração da informação metabólica, a baixo custo e sem exposição de voluntário humanos a substâncias com toxicidade não estudada.

Produtos derivados da realização do subprojeto

Produto 1: Artigo Científico. Título: “*Phase II stanozolol metabolism study using the zebrafish water tank (ZWT) model*”. Jornal: Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113886

Produto 2: Apresentação Oral em evento internacional. Manfred Dokine Workshop 2022. Título: Diving into the study of metabolism of SARMS through Zebrafish Water Tank (ZWT) — A proof-of-concept comparing water tank and blood analysis.

Produto 3: Artigo Científico já submetido. Título: How to Study the Metabolism of SARMS through Zebrafish Water Tank (ZWT)? —A proof-of-concept comparing water tank and blood.

Produto 4: Apresentação do projeto em formato poster: "Zebrafish Water Tank model as tool to evaluate phase I and II metabolites of Methyltestosterone" - 3rd Iberoamerican Conference on Mass Spectrometry - 3rd IBERO, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, dezembro de 2022. Contemplado com o prêmio de melhor trabalho na categoria poster.

Produto 5: Apresentação do projeto em formato de pôster: “Metabolism study of selective estrogen receptor modulator Tamoxifen through the Zebrafish Water Tank Model” – 35º Congresso Latinoamericano de Química/61º Congresso Brasileiro de Química – 35ºCLAQ/61ºCBQ – Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Novembro de 2022.

Produto 6: Apresentação do projeto em formato de pôster: Zebrafish Water Tank Model for the study of xenobiont metabolism: systematic analysis of environmental parameters – 35º Congresso Latinoamericano de Química/61º Congresso Brasileiro de Química – 35ºCLAQ/61ºCBQ – Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Novembro de 2022.

Produto 7: Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Química – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Discente: Laryssa Santos.

Produto 8: Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Química – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Discente: Renan Aquino.

Produto 9: Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Química – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Discente: Beatriz Hoffman.

Status: Concluído.

SUBPROJETO 8. Implementação de novos alvos para análise por espectrometria de massas por razão isotópica - II. Confirmação de prednisolona, prednisona e cortisol por IRMS.

Visão Geral

O projeto contribuiu na validação de uma ferramenta de aprimoramento de diagnóstico para administração de testosterona e precursores.

O projeto oferece ainda solução científica para o uso de substâncias que potencialmente impedem o diagnóstico da análise por IRMS por impactar os valores de delta de C13 do prednanodiol.

Produtos derivados da realização do subprojeto

Produto 1: Ampliação da abrangência do método de IRMS aplicado a amostras onde a ABCD é Autoridade de Teste.

Status: Concluído.

SUBPROJETO 9. Estabelecimento do intervalo de referência urinário do agente dopante Cobalto na população brasileira por espectrometria de massas

Visão Geral

O Cobalto é reconhecidamente um indutor da produção de fatores que estimulam a eritropoiese, com claro potencial como agente dopante e, por isso, incluído na lista da WADA. A comunidade ainda carece de regulação apropriada para interpretação do resultado adversos pelo abuso de Cobalto.

Com o desenvolvimento do subprojeto, o LBCD fica vanguarda da comunidade científica antidopagem, sendo capaz de oferecer a ABCD análises de cobalto em urina, de forma eficiente e observando a necessária economicidade.

Produtos derivados da realização do subprojeto

Produto 1: Apresentação do projeto em formato poster: "Detection of cobalt in human urine by liquid chromatography coupled with high resolution mass spectrometry for anti-doping control purposes" - XXII Brazilian Congress of Toxicology – CBTox, Balneário Camboriú, Santa Catarina, Maio de 2022.

Produto 2: Apresentação do projeto em formato poster: "Cobalt(III) 1,1-dithiolate complexes: a DFT study of their spectroscopic and structural properties" – 45ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química – 45ª RASBQ, Maceió, Alagoas, Junho de 2022.

Produto 3: Apresentação do projeto em formato poster: "Structural and spectroscopic properties of nickel(II) and palladium(II) diethyldithiocarbamates complexes: a DFT study" – XX Brazilian Meeting on Inorganic Chemistry, XX BMIC, Bento Gonçalves, Rio Grande do Sul, Setembro de 2022.

Produto 4: Apresentação do projeto em formato poster: "Validation of an analytical method to confirm the presence of cobalt in human urine by LC-MS for anti-doping

purposes” – 20º Encontro Nacional de Química Analítica, 20º ENQA, Bento Gonçalves, Rio Grande do Sul, Setembro de 2022. Contemplado com o prêmio de melhor trabalho na categoria “*Sample Preparation*”.

Produto 5: Apresentação do projeto em formato oral: Detecção de Cobalto em urina humana na forma de complexos dietilditiocarbamato por espectrometria de massas de alta resolução” – I Encontro de Pesquisadores Antidopagem, virtual, Novembro de 2022.

Produto 6: Apresentação do projeto em formato poster: “How can Design of Experiments help in the development of analytical methods? An application for detection of cobalt in urine by liquid chromatography-mass spectrometry” – 35º Congresso Latinoamericano de Química e 61º Congresso Brasileiro de Química, Rio de Janeiro, Novembro de 2022.

Produto 7: Apresentação do projeto em formato poster: “Density Functional Theory as a powerful tool for predicting structures and properties of inorganic complexes: application to tris(diethyldithiocarbamate)rhodium(III)” – 35º Congresso Latinoamericano de Química e 61º Congresso Brasileiro de Química, Rio de Janeiro, Novembro de 2022.

Produto 8: Apresentação do projeto em formato poster: “Digestão assistida por micro-ondas aplicada à quantificação de cobalto em urina humana por CL-EM com enfoque no controle de dopagem” – I Encontro do Programa de Pós-Graduação em Química, Rio de Janeiro, Dezembro de 2022.

Produto 9: Apresentação do projeto em formato poster: “Microwave-assisted digestion for cobalt quantification as diethyldithiocarbamate derivatives in human urine by LC-MS: an application in doping control” – 3rd Iberoamerican Conference on Mass Spectrometry, Rio de Janeiro, Dezembro de 2022.

Produto 10: 41th Cologne Workshop on Dope Analysis – Colônia, Alemanha> Planejado: Fevereiro de 2023.



UFRJ - INSTITUTO DE QUÍMICA

LABORATÓRIO DE APOIO AO
DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO



Produto 11: Desenvolvimento de tese de Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Química, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Discente: Vanessa Santos Farelo.

Status: Concluído.

SUBPROJETO 10. Aumento da sensibilidade de métodos de detecção. Ionização por elétrons avançada, como estratégia analítica para o aumento da sensibilidade na análise de esteroides anabólicos por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

Produtos derivados da realização do subprojeto

Produto 1: Método com maior sensibilidade já implementado, validado e acreditado para uso no LBCD. Agrada-se o recebimento de outras fontes de ionização para que todos os sistemas de CG-EM-EM do LBCD sejam contemplados com o método.

Status: Concluído.

A Coordenação Geral está a disposição, caso alguma informação adicional seja necessária.



Prof. Henrique Marcelo Gualberto Pereira, DSc.
Coordenador Geral do Projeto
Diretor – Laboratório Brasileiro de Controle de Dopagem
Universidade Federal do Rio de Janeiro