



CENTRO DE CIÊNCIAS MATEMÁTICAS E DA NATUREZA

INSTITUTO DE QUÍMICA

CURSO DE BACHARELADO EM QUÍMICA

CAROLINA DOS REIS FARIAS

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DA
ORIGEM EXÓGENA DE METABÓLITOS DE 6-OXOANDROSTENODIONA EM
AMOSTRAS DE URINA HUMANA**

Rio de Janeiro

2024

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

CAROLINA DOS REIS FARIAS

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DA ORIGEM EXÓGENA DE METABÓLITOS DE 6-OXOANDROSTENODIONA EM AMOSTRAS DE URINA HUMANA

Projeto Final de Curso apresentado ao Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Química, sob orientação da Prof^a. Dr^a. Monica Costa Padilha e do Dr. Fábio Azamor de Oliveira.

Rio de Janeiro

2024

CAROLINA DOS REIS FARIAS

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DA ORIGEM EXÓGENA DE METABÓLITOS DE 6-OXOANDROSTENODIONA EM AMOSTRAS DE URINA HUMANA

Projeto Final de Curso apresentado ao Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Química, sob orientação da Prof^a. Dr^a. Monica Costa Padilha e do Dr. Fábio Azamor de Oliveira.

Aprovado por:

Prof^a. Dr^a. Monica Costa Padilha - IQ/UFRJ

Dr. Fábio Azamor de Oliveira - IQ/UFRJ

Prof^a. Dr^a. Fernanda Veronesi Marinho Pontes - IQ/UFRJ

Dr. Gustavo de Albuquerque Cavalcanti - IQ/UFRJ

Dedico esse trabalho aos meus pais e familiares por todo o apoio, renúncias e motivações para que pudesse me tornar a junção do melhor de cada um.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, a quem tive a honra de reencontrar nos últimos anos de graduação, que me guardou e sustentou até aqui. Obrigada por ter sido meu refúgio em tempos de angústia e me mostrado que todas as coisas acontecem no tempo certo.

Aos meus pais, por todo o investimento educacional e emocional durante todos esses anos. Vocês foram essenciais para a minha formação, obrigada por todo o apoio nos momentos de pressão e por me lembrarem que tudo acontece no tempo certo. Levarei o legado de vocês para sempre! Amo vocês!

Aos meus avós, tios, primos por todo o apoio durante essa jornada e por estarem presentes em todos os momentos importantes, apoiarem todas as minhas escolhas, e me prestigiarem em todas as conquistas sempre sentados na primeira fileira. Muito obrigada!

Ao meu noivo, que reencontrei quase no final dessa jornada, mas foi essencial para manter a motivação. Obrigada pelos incentivos e, principalmente, por sempre me lembrar que eu era capaz. Te amo!

À minha orientadora Monica pela oportunidade, pela total disponibilidade sempre e por todas as contribuições nesse trabalho. Muito obrigada!

Ao meu coorientador Fábio por toda a disponibilidade, mesmo em período de férias, para as últimas correções. Seus incentivos e todo o conhecimento foram fundamentais nesse estudo. Todos os treinamentos, reuniões e conversas foram de grande contribuição para o meu crescimento profissional e pessoal. Muito obrigada!

Agradeço à triagem TIX, Cristiane, Natasha, Mariana, Thaís e Fábio pela incrível recepção e apoio nessa reta final. Não consigo mensurar o quanto aprendi com vocês nesse período. Pude conhecer um pouco da história de cada um e, além de contribuírem e me ensinarem a como ser uma profissional melhor, com certeza saio uma pessoa melhor. Muito obrigada por tantos ensinamentos! Levarei para sempre.

Agradeço à toda equipe do LBCD pela contribuição para minha formação, em especial, Felipe, Bruna, Marcia que trouxeram tanto aprendizado e leveza para os meus dias nos intervalos descontraídos para almoço. Muito obrigada!

Aos meus amigos Anna, Ítalo e Catarina que me acompanham em todos os momentos desde o 9º ano do fundamental. Estavam presentes nos surtos de preparação para o vestibular e infinitas tardes de estudo, na alegria da aprovação para a faculdade, nas crises de idade e tantos outros primeiros marcos... Vocês são incríveis! Obrigada!

Aos amigos que me acompanharam nesses anos de faculdade, João Victor, Marcos, Cinthia, Natalia, Caio, Gabi, Maria Rita que foram essenciais nesses anos de fundão. Momentos de alegria, desespero, estudo coletivo, perrengue em viagens e festas. Obrigada pela parceria. Sem vocês não teria sido a mesma coisa.

Aos amigos que fiz na Igreja Mananciais, Natã, Joyce, Davi, Maíra, Matheus, Bruno que foram essenciais no meu processo, não desistiram e literalmente me pegaram pela mão e mostraram meus dons, identidade em Cristo e o quão capaz sou. Muito obrigada pelo investimento que vocês fizeram na minha vida.

“Não tenho te ordenado? Sê forte e de boa coragem; não temas, tampouco fiques desanimado, pois o SENHOR teu Deus é contigo, por onde quer que fores.”

(Josué 1:9 – BKJ1611)

RESUMO

A utilização de substâncias com o intuito de aprimorar e potencializar o desempenho atlético tem sido documentada no âmbito esportivo. O esteroide 6-Oxoandrostenediona (6-Oxo) é um suplemento nutricional disponível comercialmente, reconhecido por sua capacidade de inibir a aromatase. Os inibidores de aromatase, classificados como hormônios e moduladores metabólicos, estão incluídos na lista de substâncias proibidas no âmbito esportivo pela Agência Mundial Antidopagem (*World Anti-Doping Agency*, Wada). Conforme estabelecido pela Wada, a técnica de cromatografia gasosa acoplada a forno de combustão e a espectrometria de massas por razão isotópica (CG/C/EMRI) é utilizada para distinguir os esteroides produzidos na cadeia metabólica humana dos que possuem uma origem sintética através da análise e determinação da razão entre as abundâncias de carbonos ^{13}C e ^{12}C nos esteroides. Este trabalho consiste no desenvolvimento e validação de um método de análise para determinação da origem endógena ou exógena de metabólitos de 6-oxoandrostenediona em urina humana. O preparo de amostras envolve extração por fase sólida, extração líquido-líquido, hidrólise enzimática, fracionamento e purificação por cromatografia líquida preparativa, derivatização dos analitos e posterior análise por CG/C/EMRI. A validação do método foi conduzida em conformidade com as exigências do Documento Técnico emitido pela Wada para análise por CG/C/EMRI (TD2022IRMS) e englobou linearidade do instrumento, limite de quantificação, precisão intermediária, exatidão e incerteza combinada. O método desenvolvido apresentou um limite de quantificação correspondente a 50 % da concentração mínima requerida pela Wada e valores menores do que 1,0 % para a incerteza combinada. Os resultados obtidos nos ensaios de validação do método desenvolvido neste trabalho atenderam aos requisitos estabelecidos pela Agência Mundial Antidopagem para distinguir a origem endógena ou exógena de metabólitos de 6-Oxo na matriz urina.

Palavras-chave: controle de dopagem, inibidores de aromatase, CG/C/EMRI, validação, 6-oxoandrostenediona.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema do sistema CG/C/EMRI.....	20
Figura 2 - Formação da Adiona endógena e 6 α -OH a partir do colesterol.	24
Figura 3 - Degradação microbiana de DHEA endógeno durante a estocagem de amostras de urina.....	25
Figura 4 - Fluxograma do preparo de amostras para determinação do $\delta^{13}\text{C}$ de esteroides por CG/C/EMRI.....	37
Figura 5 - Comparação entre os cromatogramas dos STD MIX utilizados na primeira etapa de purificação por CLAE.....	46
Figura 6 - Comparação entre cromatograma do STD MIX1 e amostra real de urina no CLAE1.....	47
Figura 7 - Cromatograma do STD MIX1 no CLAE1B.	47
Figura 8 - Comparação entre cromatograma do STD MIX1 e amostra real de urina no CLAE1B.....	48
Figura 9 - Cromatograma do STD MIX2 no CLAE2.	49
Figura 10 - Comparação entre cromatograma do STD MIX2 e amostra real de urina na fração 6 α -OH_Ac no CLAE2.	49
Figura 11 - Comparação entre cromatograma do STD MIX2 e amostra real de urina na fração 6 β -OH_Ac no CLAE2.	50
Figura 12 - Cromatograma de análise do MRC CU/USADA 33-1 por CG/C/EMRI. ...	52
Figura 13 - Cromatograma CG/C/EMRI da análise do padrão de 6 α -OH_Ac.	54
Figura 14 - Cromatograma CG/C/EMRI da análise do padrão de 6 β -OH_Ac.	54
Figura 15 - Cromatograma CG/C/EMRI da análise de 6 α -OH_Ac proveniente da urina fortificada.....	55
Figura 16 - Cromatograma CG/C/EMRI da análise de 6 β -OH_Ac proveniente da urina fortificada.....	55
Figura 17 - Cromatograma obtido por CG/C/EMRI referente à análise da fração de 6 α -OH_Ac proveniente do branco de urina.	56
Figura 18 - Espectro de massas do 6 α -OH_Ac.....	57
Figura 19 - Espectro de massas do 6 β -OH_Ac.....	57
Figura 20 - Comparação entre o espectro de massas da substância presente na urina branco e a biblioteca de espectros.....	58

Figura 21 - Distribuição dos pontos em suas faixas lineares de amplitude de pico na análise por CG/C/EMRI.....61

LISTA DE TABELAS

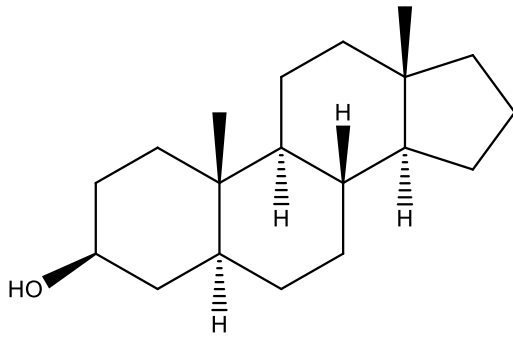
Tabela 1 - Gradiente de fase móvel para a purificação por CLAE1	38
Tabela 2 - Gradiente de fase móvel para a purificação por CLAE1B	38
Tabela 3 - Gradiente de fase móvel para a purificação por CLAE2	38
Tabela 4 - Composição e valores certificados de $\delta^{13}\text{C}$ e desvio-padrão do MRC CU/USADA 33-1.....	40
Tabela 5 - Variação do t_R do padrão interno durante a purificação de amostras em CLAE.....	51
Tabela 6 - Quintuplicata de análises do MRC CU/USADA 33-1.....	53
Tabela 7 - Resultados obtidos no experimento de linearidade do 6 α -OH_Ac.	59
Tabela 8 - Resultados obtidos no experimento de linearidade do 6 β -OH_Ac.	60
Tabela 9 - Determinação da faixa de trabalho para 6 α -OH_Ac.....	62
Tabela 10 - Determinação da faixa de trabalho para 6 β -OH_Ac.....	62
Tabela 11 - Determinação do limite de quantificação para 6 α -OH_Ac.....	63
Tabela 12 - Determinação do limite de quantificação para 6 β -OH_Ac.....	63
Tabela 13 - Precisão intermediária do método para 6 α -OH_Ac.....	64
Tabela 14 - Precisão intermediária do método para 6 β -OH_Ac.....	65
Tabela 15 - Incerteza combinada estimada a partir da exatidão e precisão intermediária do método para 6 α -OH_Ac e 6 β -OH_Ac.	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

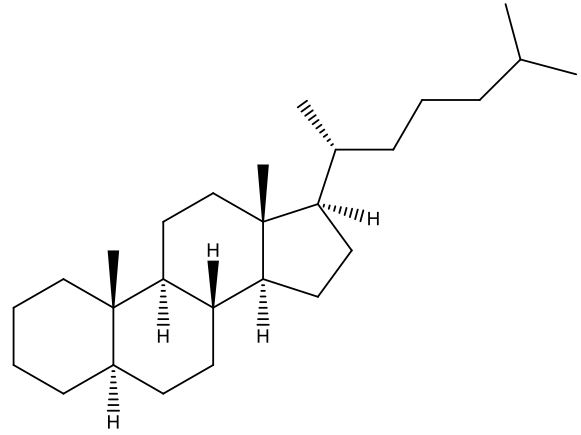
11K_Ac	Acetato de 11-cetoetilcolanolona
3 β -OH_Ac	Acetato de 5 α -androstan-3 β -ol
5 α -Col	5 α -colestano
6 β -OH	6 β -hidroxiandrostenodiona
6-Oxo	6-Oxoandrostenodiona; androst-4-eno-3,6,17-triona
6 α -OH	6 α -hidroxiandrostenodiona
6 α -OH_Ac	Acetato de 6 β -hidroxiandrostenodiona
6 α -OH_Ac	Acetato de 6 α -hidroxiandrostenodiona
A_Ac	Acetato de Androsterona
ACN	Acetonitrila
Adiona	Androstenodiona; androst-4-en-3,17-diona
C18	Octadecilsilano
CAM	Metabolismo do ácido crassuláceo
CG/C/EMRI	Cromatografia gasosa acoplada a forno de combustão e a espectrometria de massas por razão isotópica
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE1	Primeira etapa por CLAE, para recuperação dos esteroides na forma livre
CLAE1B	Segunda etapa por CLAE, para recuperação dos esteroides na forma livre
CLAE2	Terceira etapa por CLAE, para recuperação dos esteroides acetilados
CLAE-DAD	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detecção por arranjo de diodos

DAD	Detector por arranjo de diodos
DHEA	De-hidroepiandrosterona
EFS	Extração por fase sólida
LBCD	Laboratório Brasileiro de Controle de Dopagem
LQ	Limite de quantificação
MeOH	Metanol
MRC	Material de referência certificado
PI	Padrão interno
TBME	<i>tert</i> -butilmetiléter
t_R	Tempo de retenção
Tremb	17 β -Trembolona
u_c	Incerteza combinada da medição
USADA	Agência Antidopagem dos Estados Unidos
Wada	Agência Mundial Antidopagem, <i>World Anti-Doping Agency</i>

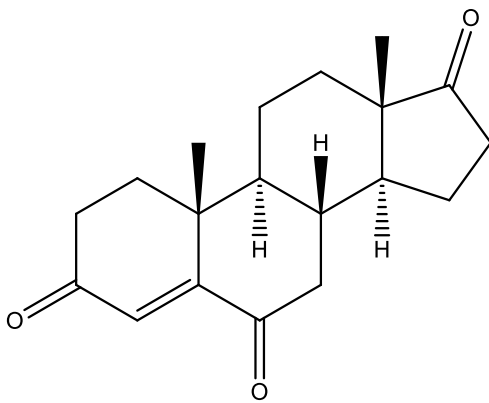
ESTRUTURAS QUÍMICAS DAS SUBSTÂNCIAS CITADAS



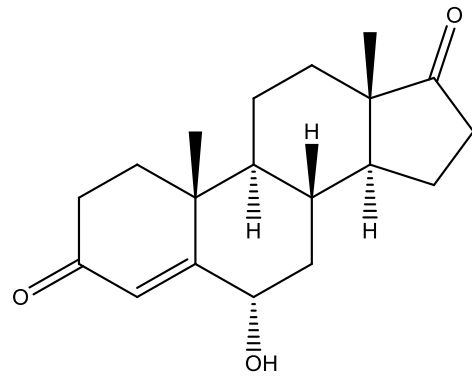
5 α -Androstan-3 β -ol



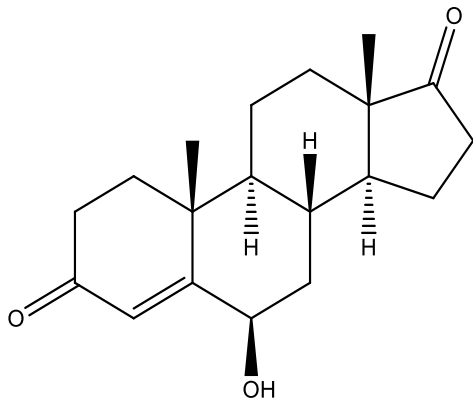
5 α -Colestano



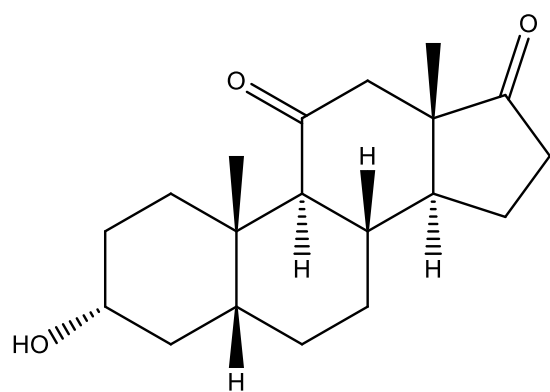
6-Oxoandrostenodiona



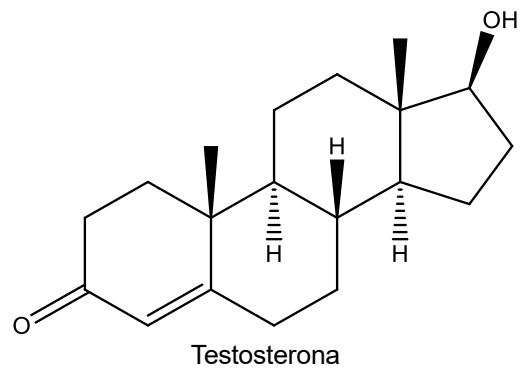
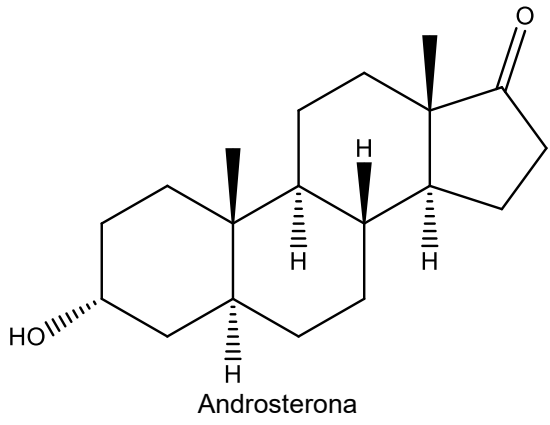
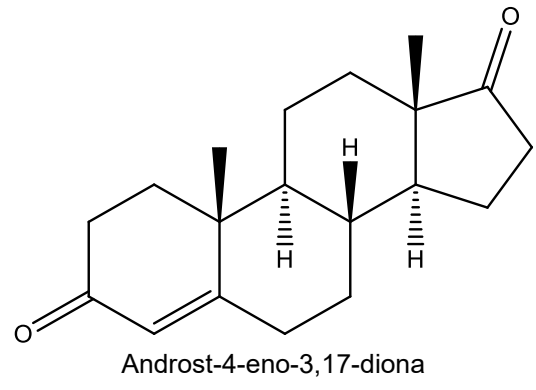
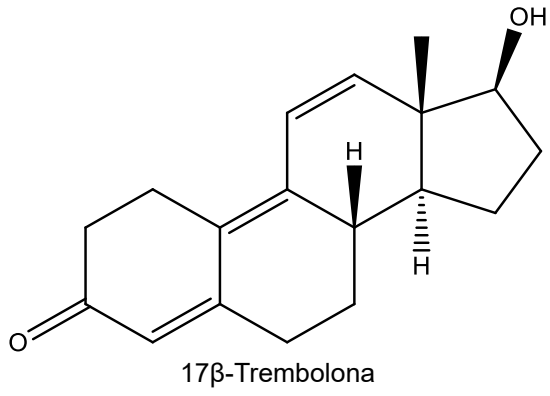
6 α -Hidroxiandrost-4-eno-3,17-diona



6 β -Hidroxiandrost-4-eno-3,17-diona



11-Cetoetilcolanolona



SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
1.1	Dopagem no esporte	18
1.2	Cromatografia gasosa acoplada a forno de combustão e a espectrometria de massas por razão isotópica aplicada ao controle de dopagem	19
1.3	Discriminação isotópica	21
1.4	6-Oxoandrostenediona	22
1.4.1	Desenvolvimento de método de análise	25
1.5	Validação do método	27
1.5.1	Linearidade do instrumento	27
1.5.2	Limite de quantificação	27
1.5.3	Incerteza combinada	28
2	OBJETIVO	31
2.1	Objetivo geral	31
2.2	Objetivos específicos	31
3	MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1	Reagentes	32
3.2	Equipamentos	32
3.3	Preparo das Soluções	33
3.3.1	Preparo das soluções iniciais	34
3.3.2	Preparo de STD MIX	34
3.3.3	Preparo de solução de fortificação	34
3.3.4	Preparo de tampão fosfato de sódio 0,8 M.....	35
3.3.5	Preparo de tampão carbonato/bicarbonato 20 %	35
3.4	Preparo de amostras	35
3.5	Condições de análise	37
3.5.1	Cromatografia líquida de alta eficiência.....	37
3.5.2	Cromatografia gasosa acoplada a forno de combustão e espectrometria de massas por razão isotópica	39
3.5.3	Calibração do gás de referência para análise por CG/C/EMRI	40
3.6	Validação do método analítico	41

3.6.1	Linearidade do instrumento	41
3.6.2	Limite de quantificação	42
3.6.2.1	<i>Faixa de trabalho</i>	42
3.6.2.2	<i>Determinação do limite de quantificação</i>	42
3.6.3	Precisão intermediária	43
3.6.4	Incerteza da medição	43
3.6.4.1	<i>Exatidão</i>	44
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
4.1	Cromatografia líquida preparativa	44
4.1.1	Uso de Tremb_Ac como padrão interno	50
4.2	Calibração do gás de referência para a análise por CG/C/EMRI	51
4.3	Cromatografia gasosa acoplada a forno de combustão e espectrometria de massas por razão isotópica	53
4.4	Validação	58
4.4.1	Linearidade do instrumento	58
4.4.2	Limite de quantificação	61
4.4.3	Precisão.....	63
4.4.3.1	<i>Precisão intermediária</i>	64
4.4.3.2	<i>Exatidão e incerteza combinada</i>	65
5	CONCLUSÃO	67
	REFERÊNCIAS	68

1 INTRODUÇÃO

1.1 Dopagem no esporte

Visando a uma melhora em seu rendimento físico ou psíquico, muitos atletas fazem o uso indevido de substâncias consideradas ilícitas no esporte, o que caracteriza a dopagem. Diante do aumento da utilização de substâncias que ampliam o rendimento físico por atletas profissionais, tornou-se essencial estabelecer mecanismos para monitorar o uso inapropriado de anabolizantes, estimulantes, entre outros, em competições. Isso visa a assegurar a justiça e a equidade entre os atletas que competem de maneira limpa e aqueles que poderiam obter vantagens indevidas pelo consumo dessas substâncias (AQUINO NETO, 2001).

Como consequência, o uso de anabolizantes foi proibido em 1976 pelo Comitê Olímpico Internacional (COI), o que levou ao desenvolvimento de vários estudos para detectar o uso indevido dessas substâncias, que podem ser de origem endógena ou exógena. Substâncias endógenas são aquelas produzidas pelo metabolismo humano, enquanto as exógenas são decorrentes de substâncias externas e não são produzidas naturalmente pelo corpo humano. No caso de controle de dopagem por esteroides exógenos, apenas sua presença é suficiente para caracterizar em um resultado analítico adverso, ao contrário de esteroides endógenos (a exemplo da testosterona), presentes em qualquer amostra de urina, com enorme variação na excreção em diferentes atletas, não sendo, por isso, possível delimitar uma concentração para atestar um resultado analítico adverso ou negativo (CUNHA *et al.*, 2004).

Portanto, a confirmação do abuso de esteroides que são naturalmente produzidos pelo metabolismo humano depende de um método em que seja possível a distinção entre a origem endógena ou exógena dessas substâncias (WADA, 2021a).

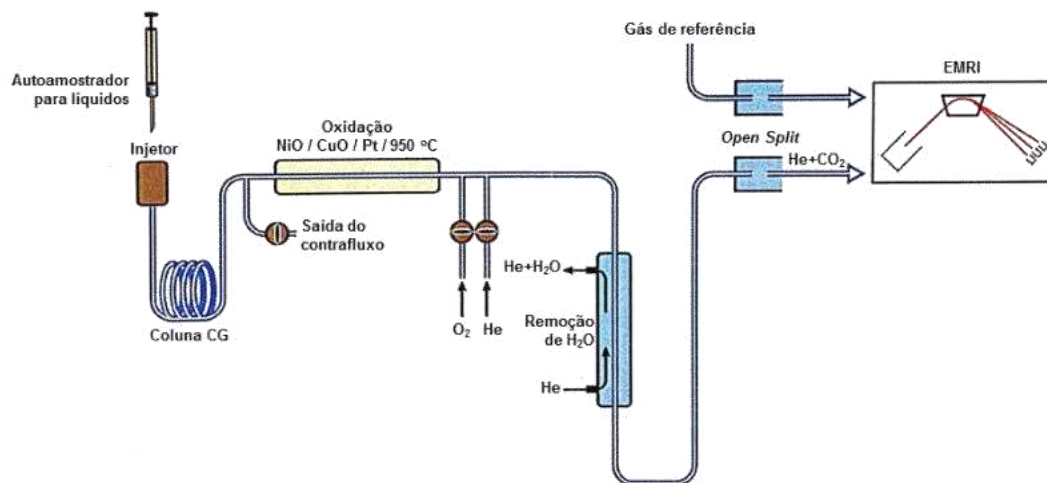
1.2 Cromatografia gasosa acoplada a forno de combustão e a espectrometria de massas por razão isotópica aplicada ao controle de dopagem

Na técnica de cromatografia gasosa acoplada a forno de combustão e a espectrometria de massas por razão isotópica (CG/C/EMRI) é feita uma análise capaz de distinguir os esteroides produzidos na cadeia metabólica humana dos que possuem uma origem sintética. Essa distinção é possível pois avalia-se a abundância relativa dos isótopos de carbono ^{13}C e ^{12}C , que estão presentes em diferentes proporções, a depender de sua origem.

A espectrometria de massas por razão isotópica (EMRI) é uma técnica de análise usada para determinação da razão dos isótopos de hidrogênio (H), carbono (C), oxigênio (O), nitrogênio (N) e enxofre (S), em que ocorre queima total das moléculas orgânicas e conversão aos gases H_2 , CO_2 , CO , N_2 , SO_2 , respectivamente (MEIER-AUGENSTEIN, 1999).

Esse sistema, conforme esquematizado na Figura 1, utiliza a coluna cromatográfica para a separação, seguida da interface de combustão, onde, no caso de análise de isótopos de carbono, a amostra sofre oxidação em forno de cerâmica a $950\text{ }^\circ\text{C}$ e ocorre a conversão dos analitos a CO_2 , que é direcionado para o espectrômetro de massas pelo gás de arraste (MEIER-AUGENSTEIN, 1999; ZHANG *et al.*, 2012). O CO_2 formado é introduzido na fonte de íons e as espécies são ionizadas, aceleradas e separadas por um analisador de massas que utiliza um campo magnético para detectar partículas. Os detectores são coletores do tipo copo de Faraday que são posicionados e dedicados para a análise dos íons formados de m/z 44 ($^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{16}\text{O}$), m/z 45 ($^{13}\text{C}^{16}\text{O}^{16}\text{O}$) e m/z 46 ($^{12}\text{C}^{18}\text{O}^{16}\text{O}$) e ($^{12}\text{C}^{17}\text{O}^{17}\text{O}$) (ZHANG *et al.*, 2012).

Figura 1 - Esquema do sistema CG/C/EMRI.



Adaptado de Thermo Scientific©

A razão dos isótopos de carbono é relatada utilizando a notação padrão com valores de $\delta^{13}\text{C}$, expressos pela unidade “por mil” (‰), calculados frente à escala do padrão primário, de origem calcária e rico em ^{13}C , Vienna Pee Dee Belemnita, que corresponde ao zero da escala de delta (‰ = 0,0 ‰) (VAN RENTERGHEM *et al.*, 2012). O valor de $\delta^{13}\text{C}$ em uma amostra é calculado conforme a Equação 1.

$$\delta^{13}\text{C}(\text{‰}) = \left[\frac{(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{amostra}} - (^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{padrão}}}{(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{padrão}}} \right] \times 1000 \quad \text{Equação 1}$$

Onde:

$(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{amostra}}$ = razão isotópica entre ^{13}C e ^{12}C na amostra;

$(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{padrão}}$ = razão isotópica entre ^{13}C e ^{12}C no padrão.

1.3 Discriminação isotópica

Becchi e colaboradores (1994) foram os primeiros a propor a caracterização da testosterona presente no organismo do indivíduo quanto à sua origem endógena ou sintética através da razão entre os isótopos estáveis de carbono 13 e 12 ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$). Essas substâncias apresentam diferentes razões isotópicas, com valores divergentes, conforme a sua origem endógena ou exógena (BECCHI *et al.*, 1994). Essa diferenciação quanto à origem do esteroide está associada ao ciclo de carbono na natureza (CAWLEY *et al.*, 2009).

As plantas, ao realizarem a fotossíntese, captam o carbono atmosférico na forma de CO_2 e é durante esse processo de fixação do carbono atmosférico que ocorre a variação na abundância dos isótopos de carbono por consequência do fracionamento isotópico que ocorre durante o processo de fotossíntese. Existem três tipos de vias para a fotossíntese, a depender do tipo de planta: C_3 , C_4 ou CAM. O ciclo de Calvin-Benson é feito por plantas C_3 , em que as reações são catalisadas por enzimas que possuem uma maior capacidade de fixação de ^{12}C , o que resulta em valores mais baixos de $\delta^{13}\text{C}$ nessas plantas. Cerca de 85 % das plantas são C_3 , como arroz, soja, aveia, cevada e feijão (CAWLEY *et al.*, 2009; JANSSENS *et al.*, 2013; KUMAR *et al.*, 2017).

Plantas do tipo C_4 reduzem CO_2 através do ciclo de Hatch-Slack e discriminam menos o ^{13}C , resultando em maiores valores de $\delta^{13}\text{C}$, por terem um maior teor de ^{13}C quando comparadas com as plantas C_3 . Gramíneas, milho e cana-de-açúcar são exemplos de planta C_4 . Já as do tipo CAM usam a via metabólica do ácido crassuláceo e seguem ambas as rotas metabólicas (Calvin-Benson e de Hatch-Slack) e resultam em $\delta^{13}\text{C}$ maior que o das plantas C_3 . Abacaxi e cacto são exemplos de plantas CAM (CAWLEY *et al.*, 2009; JANSSENS *et al.*, 2013; KUMAR *et al.*, 2017).

As cópias semissintéticas de esteroides provenientes da indústria farmacêutica são sintetizadas a partir de plantas, em sua maioria do tipo C_3 . Portanto, a distinção entre os esteroides naturais e os de origem farmacêutica é possível pois estes possuem menor concentração relativa de ^{13}C do que os que são provenientes do

metabolismo do colesterol humano e, portanto, possuem valores mais negativos de $\delta^{13}\text{C}$ (DE LA TORRE *et al.*, 2012).

A diferença entre o hormônio endógeno ou exógeno é dada pela diferença de delta ($\Delta\delta^{13}\text{C}$) entre a referência endógena e a substância-alvo. As referências endógenas são esteroides produzidos a partir do colesterol, porém possuem rotas metabólicas diferentes das dos analitos-alvo. Essa comparação é necessária pois a razão isotópica dos carbonos dos hormônios de um humano é dependente de sua dieta e é sujeita a variações individuais (DE OLIVEIRA *et al.*, 2019; PIPER *et al.*, 2008).

Assim, a técnica de cromatografia gasosa acoplada a forno de combustão e a espectrômetro de massas por razão isotópica (CG/C/EMRI) é capaz de detectar o abuso de esteroides baseado nessa diferença de abundância relativa dos isótopos de carbono na amostra analisada (CAWLEY e FLENKER, 2008).

1.4 6-Oxoandrostenediona

A substância 4-androsteno-3,6,17-triona, ou 6-oxoandrostenediona (6-Oxo), é um esteroide comercializado como suplemento nutricional e possui atividade para a inibição da aromatase. A aromatase é uma enzima que converte andrógenos, como a testosterona, em estrogênio e, com a sua inibição, essa conversão é impedida, o que resulta em uma redução dos níveis de estrogênio após sua administração. Os inibidores de aromatase são uma classe de medicamento utilizada clinicamente para ajudar na manutenção de níveis baixos de estrogênio em mulheres pós menopausa com câncer de mama, que é sensível ao estrogênio, e para o tratamento da síndrome do ovário policístico, o que inibe o crescimento de tumores dependentes de estrogênio (NUMAZAWA *et al.*, 1996).

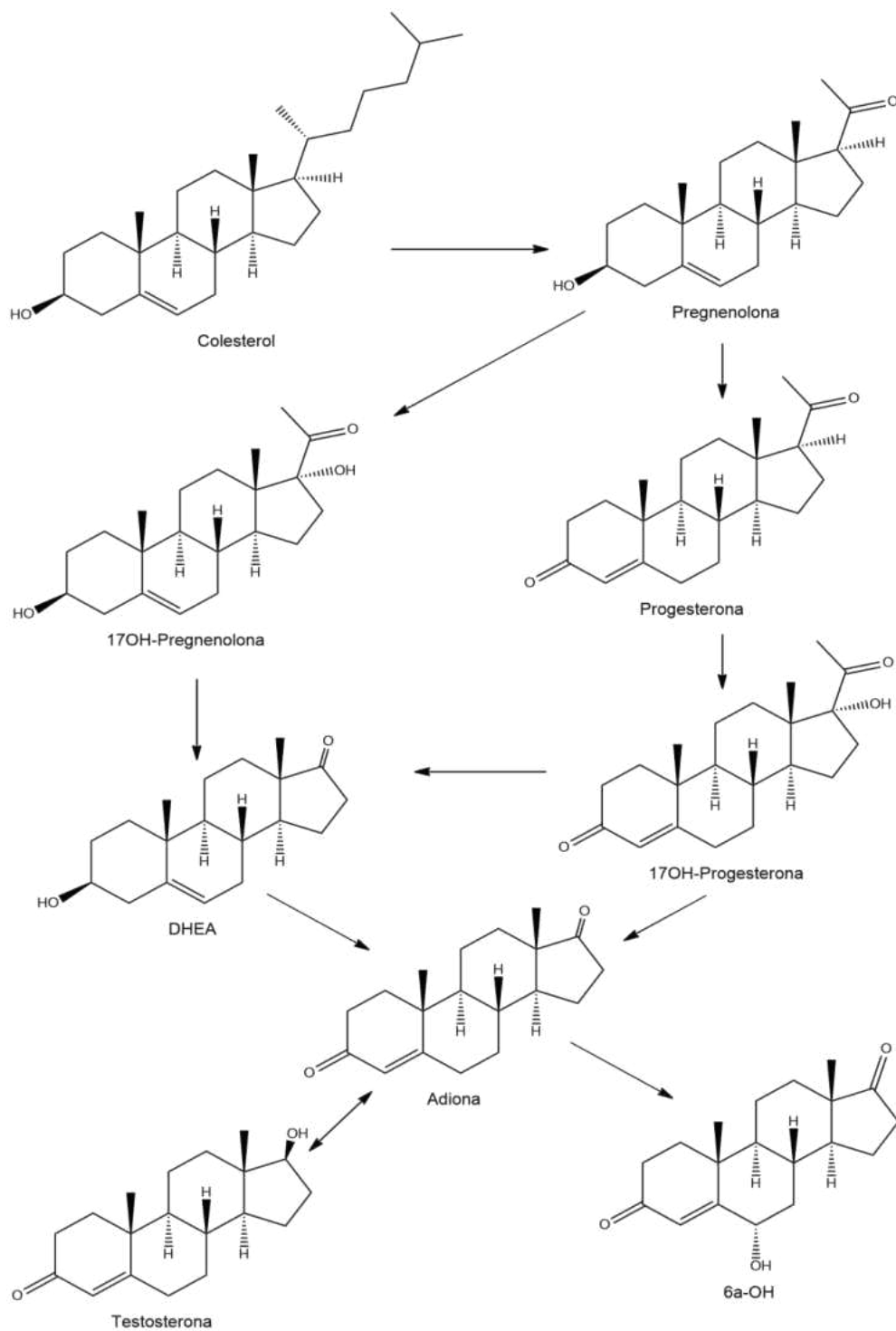
Os principais relatos de usos *off-label* dos inibidores de aromatase são para minimização e/ou prevenção de efeitos colaterais causados pelo abuso de esteroides andrógenos, como o desenvolvimento da mama em homens (VARI *et al.*, 2016). Além disso, essa classe de medicamentos também vem sendo utilizada para o aumento dos

níveis de testosterona em homens, em que acontece dopagem indireta por bloqueio do hormônio estrogênio, causando um aumento da secreção de testosterona endógena (DE RONDE e DE JONG, 2011; VARI *et al.*, 2016).

Portanto, por manter artificialmente um nível alto de andrógenos no corpo, acarretando melhorias no desempenho, e minimizar efeitos colaterais indesejados provenientes do uso de esteroides anabolizantes, os inibidores de aromatase são classificados como hormônios e moduladores metabólicos e fazem parte das substâncias proibidas no esporte pela Agência Mundial Antidopagem (*World Anti-Doping Agency, Wada*).

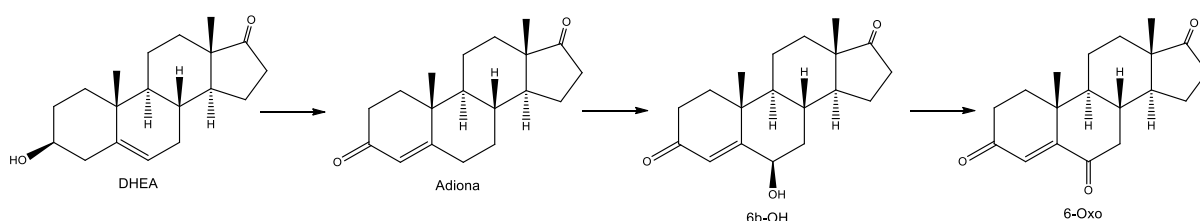
Após administração do suplemento 6-Oxo, o metabólito 6 α -hidroxiandrostenediona (6 α -OH) é detectado em níveis elevados em amostras de urina, com origem exógena (DEVENTER *et al.*, 2005). 6 α -OH é uma substância que, de acordo com a literatura, possui um tempo de detecção de 37 horas no organismo após ingestão do suplemento. Quando comparado com a 6-Oxo e 6 α -hidroxitestosterona, que são detectadas por até 24 horas, possui um tempo de detecção elevado, como consequência de seu maior tempo de metabolização (VAN THUYNE *et al.*, 2005). Sendo assim, por ser o metabólito de detecção mais longa, 6 α -OH é considerado um bom marcador para análise de controle de dopagem de 6-Oxo.

Embora a detecção de 6 α -OH em amostras de urina possa ser um indicativo do uso exógeno do suplemento 6-Oxo, existem outras vias de formação desse metabólito. 6 α -OH pode ser detectado em baixas concentrações em decorrência da metabolização da androst-4-en-3,17-diona (Adiona) endógena (POLET *et al.*, 2014; WADA, 2021b), formada a partir do colesterol no organismo humano, ou administrada em sua forma sintética como hormônio precursor da testosterona (CAWLEY; FLENKER, 2008), conforme esquematizado na Figura 2.

Figura 2 - Formação da Adiona endógena e 6 α -OH a partir do colesterol.

6-Oxo também pode ser formada em amostras de urina, durante o armazenamento, como resultado da degradação bacteriana de de-hidroepiandrosterona (DHEA) endógena, tendo a substância 6 β -OH como um dos intermediários nessa reação (KOZŁOWSKA *et al.*, 2017; WADA, 2021b). A Figura 3 apresenta a via de formação de 6-Oxo a partir de DHEA endógeno durante a estocagem de amostras.

Figura 3 - Degradação microbiana de DHEA endógeno durante a estocagem de amostras de urina.



Por isso, a Wada determina que seja realizada a análise confirmatória do metabólito 6 α -OH em amostras de urina por CG/C/EMRI para inferir a origem endógena ou sintética da molécula e garantir se é o metabólito é proveniente de uma produção endógena ou administração ilícita de 6-Oxo ou de um precursor de testosterona (PIPER e THEVIS, 2022; WADA, 2022).

1.4.1 Desenvolvimento de método de análise

Um estudo recente de Piper e colaboradores (2022) apresenta um método de análise para 6 α -OH, 6 β -OH e outros esteroides relacionados a diferentes suspeitas. Ao comparar com os esteroides envolvidos na confirmação do abuso de testosterona e substâncias relacionadas, 6 α -OH e 6 β -OH são mais polares e, conseqüentemente, requerem de um gradiente de fase móvel na etapa de purificação por cromatografia líquida que seja mais polar, o que impede o isolamento dessas substâncias em um método de preparo para confirmação dos marcadores clássicos para confirmação de

testosterona (DE OLIVEIRA *et al.*, 2019), exigindo um uso de uma alíquota de urina dedicada a esta confirmação, em um preparo também dedicado a essa análise.

No método proposto por Piper e colaboradores em 2022, as amostras são extraídas em bancada e os extratos são submetidos a duas etapas consecutivas de fracionamento por CLAE, uma antes e outra após a acetilação das amostras, utilizando acetonitrila e água como fase móvel em fase reversa e uma coluna C₁₈. Seu método obteve LQ igual a 10 ng/mL e u_C igual a 0,9 ‰ para 6 α -OH e 6 β -OH e não demonstrou ser um método adequado para a análise dos marcadores de testosterona utilizando a mesma alíquota de urina.

Polet e colaboradores em 2014 também propuseram um método para análise de 6 α -OH, em que as amostras também são extraídas em bancada e os extratos são submetidos a duas etapas consecutivas de fracionamento por CLAE, uma antes e outra após a acetilação das amostras, utilizando acetonitrila e água como fase móvel em fase reversa e uma coluna C₁₈ no primeiro fracionamento e metanol e água como fase móvel no segundo fracionamento. Seu método obteve LQ igual a 5 ng/mL para 6 α -OH e não demonstrou ser um método adequado para a análise dos marcadores de testosterona utilizando a mesma alíquota de urina. Além disso, esse método provavelmente não atende aos requisitos atuais da Wada, já que foram restringidos e ampliados várias vezes após a publicação do artigo em 2014.

O documento técnico da Wada (WADA, 2022) recomenda que, sendo 6 α -OH também um marcador da administração de testosterona e substâncias relacionadas, para amostras contendo esse metabólito a concentrações maiores que 10 ng/mL e sem sinais de degradação, os laboratórios podem analisar os marcadores do perfil endógeno antes de realizar a análise de 6 α -OH por CG/C/EMRI. Nesse sentido, cabe ressaltar que a análise isotópica de esteroides em urina requer volumes grandes de amostra (DE OLIVEIRA *et al.*, 2019; PIPER *et al.*, 2022; WADA, 2022), e duas análises desse tipo em uma mesma amostra podem demandar um volume superior ao disponível.

1.5 Validação do método

Para a validação de um método para confirmar a origem exógena de substâncias por CG/C/EMRI, os critérios a serem atendidos são os exigidos pela Wada em seu documento técnico (WADA, 2022), que requer a determinação da linearidade do equipamento, limite de quantificação e incerteza combinada.

1.5.1 Linearidade do instrumento

Corresponde à faixa de intensidades dos picos, expressa em mV, para a qual são obtidos valores repetitivos e consistentes de $\delta^{13}\text{C}$ a partir da análise de soluções padrão do analito que está sendo validado. Devem ser analisadas de 6 a 10 diluições dessas soluções de um material de referência acetilado, com $n \geq 3$ (WADA, 2022).

Os critérios exigidos são:

- O desvio-padrão entre as replicatas de cada diluição ($n \geq 3$) deve ser menor ou igual a 0,5 ‰;
- A diferença entre o valor médio de $\delta^{13}\text{C}$ entre as replicatas ($n \geq 3$) em cada diluição e a média geral da faixa linear não deve ser maior do que 0,5 ‰.

1.5.2 Limite de quantificação

Corresponde à menor concentração, em urina, utilizando um volume de alíquota menor ou igual a 25 mL, que produz um pico com amplitude dentro da linearidade do instrumento com um desvio-padrão ($n \geq 3$) menor ou igual a incerteza combinada determinada para o analito. Para 6 α -OH, o limite de quantificação (LQ) não deve ser maior que 10 ng/mL (WADA, 2022).

1.5.3 Incerteza combinada

Considera todas as contribuições do método analítico para a incerteza, desde o preparo das amostras até a determinação da razão isotópica. Para tanto, a precisão intermediária e a exatidão são utilizadas como componentes para o cálculo da incerteza combinada.

A incerteza combinada máxima aceita para 6 α -OH é de 1,0 ‰ (WADA, 2022). A incerteza combinada é calculada conforme a Equação 2.

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

Onde:

u_c = incerteza combinada

P = precisão intermediária

E = exatidão

1.5.3.1 Precisão e exatidão

Na precisão intermediária, é considerada a variação nos resultados quando a análise é feita sob diferentes condições, como modificando analistas e dias. Esse parâmetro é calculado pela análise de variância (ANOVA) de um fator. Primeiramente, calcula-se a variância, a variância dentro do grupo e assim pode-se obter a repetibilidade, conforme Equação 3, Equação 4 e Equação 5.

$$s^2 = \sum_{i=1}^n \frac{(x - \bar{x})^2}{n - 1} = \text{var}_1 \dots \text{var}_n \quad \text{Equação 3}$$

Onde:

s^2 = variância;

n = número de replicatas;

x = valor medido;

\bar{x} = valor médio.

$$\text{var}_{\text{dentro do grupo}} = \frac{\text{var}_1 + \dots + \text{var}_n}{n} \quad \text{Equação 4}$$

$$S_r = \sqrt{\text{var}_{\text{dentro do grupo}}} \quad \text{Equação 5}$$

Onde:

S_r = repetibilidade.

Então, é calculada a variância entre os grupos e a precisão intermediária, conforme mostrado na Equação 6, Equação 7 e Equação 8.

$$\text{var}_{\text{entre os grupos}} = \frac{n \cdot \sum (x - \bar{x})^2}{p} \quad \text{Equação 6}$$

$$S_b = \sqrt{\frac{\text{var}_{\text{entre os grupos}} - \text{var}_{\text{dentro do grupo}}}{n}} \quad \text{Equação 7}$$

$$S_w = \sqrt{S_r^2 + S_b^2} \quad \text{Equação 8}$$

Onde:

p = número de variações;

S_b = precisão entre os grupos;

S_w = precisão intermediária.

A exatidão de um método de análise é calculada pela diferença absoluta entre o valor obtido experimentalmente e o valor esperado. Portanto, para determinação desse parâmetro, as alíquotas de urina são fortificadas com os padrões da substância e submetidas a todo o processo de extração e análise. Ao final, compara-se com valores de $\delta^{13}\text{C}$ da análise direta do padrão dos analitos e os que estavam presentes

na matriz. A Equação 9 representa o cálculo da exatidão do método para cada esteroide (DE OLIVEIRA *et al.*, 2019).

$$\text{Exatidão} = |\delta^{13}\text{C}_{\text{esperado}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{observado}}| \quad \text{Equação 9}$$

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Desenvolver e validar um método de análise dos metabólitos 6 α -hidroxiandrostenediona e 6 β -hidroxiandrostenediona em urina humana por cromatografia gasosa acoplada a forno de combustão e a espectrometria de massas por razão isotópica (CG/C/EMRI) para confirmação do abuso de 6-Oxoandrostenediona.

2.2 Objetivos específicos

- Desenvolvimento das condições de análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) de 6 α -hidroxiandrostenediona e 6 β -hidroxiandrostenediona, a partir da mesma alíquota de urina usada para a confirmação dos marcadores do abuso de esteroides endógenos;
- Desenvolvimento das condições de análise por cromatografia gasosa acoplada a forno de combustão e a espectrometria de massas por razão isotópica (CG/C/EMRI);
- Validação do método conforme os critérios estabelecidos pela Wada, consistindo na determinação da linearidade do instrumento, do limite de quantificação, da precisão intermediária, da exatidão e da incerteza combinada.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Reagentes

Os padrões de referência de esteroides 6 α -hidroxiandrostenediona e 6 β -hidroxiandrostenediona foram adquiridos de LGC GmbH (Luckenwalde, Alemanha); 17 β -trembolona (Tremb) foi adquirido de Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Alemanha); 5 α -androstan-3 β -ol (3 β -OH) foi adquirido de Toronto Research Chemicals (Toronto, Canadá).

A mistura de padrões CU/USADA 33-1 (MRC) foi adquirida de *National Measurement Institute* (North Ride, Austrália).

Os solventes acetonitrila (ACN) grau HPLC, metanol (MeOH) grau GC e *tert*-butilmetiléter (TBME) grau HPLC foram adquiridos de Tedia (Fairfield, Estados Unidos). Anidrido acético foi adquirido de Sigma-Aldrich (Saint Louis, Estados Unidos). Fosfato de sódio monobásico e fosfato dissódico anidro foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha). Piridina anidra, bicarbonato de potássio e carbonato de potássio foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Saint Louis, Estados Unidos). Enzima β -glicuronidase de *Escherichia coli*, a 500 kU/mL foi obtida da Roche (Basel, Suíça).

Gases He 5.0 (99,999 %), O₂ 6.0 (99,9999 %) e CO₂ 4.5 (99,995 %) foram adquiridos da Air Products (Rio de Janeiro, Brasil).

Água ultrapura foi obtida através de sistema de purificação presente no Laboratório Brasileiro de Controle de Dopagem (LBCD; Millipore Corporation, Billerica, MA, Estados Unidos).

3.2 Equipamentos

Pesagens de padrões foram feitas em balança de precisão ME5 Sartorius (Gottingen, Alemanha), com 6 casas decimais e massa mínima igual a 0,992 mg.

Pesagens de reagentes foram feitas em balança de menor precisão TE6101 Sartorius (Gottingen, Alemanha), com 1 casa decimal e massa mínima de 5,0 g.

Para preparação e extração das amostras foram utilizados centrífuga Multifuge X3R, agitador orbital 4625 e concentrador a vácuo SpeedVac Savant SPD 2010 adquiridos de ThermoFisher Scientific, Estados Unidos; evaporador com banho termostaticado e corrente de nitrogênio TurboVap adquirido de Biotage, Suécia; estufa a vácuo Isotemp Vacuum Oven 280A adquirida de Fisher Scientific, Estados Unidos; banho seco para aquecimento Reach-Therm III adquirido Pierce.

A purificação das amostras foi feita em cromatógrafo a líquido de alta eficiência acoplado a detector por arranjo de diodos com coletor de frações Dionex Ultimate™ 3000, bomba quaternária LPG- 3400RS e forno de coluna TCC3000RS, detector DAD – 3000RS (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Estados Unidos).

A análise por razão isotópica das substâncias foi realizada em cromatógrafo a gás Trace 1310 acoplado a espectrômetro de massas por razão isotópica Delta V Plus, controlador de forno GC Isolink, controlador de fluxo CONFLO IV adquirido de Thermo Fisher Scientific, Waltham, Estados Unidos. A avaliação da pureza e identificação das substâncias foi efetuada em um espectrômetro de massas com filtro de massas do tipo quadrupolo simples ISQ adquirido de Thermo Fisher Scientific, Waltham, Estados Unidos e que está conectado ao fim da coluna do CG.

3.3 Preparo das Soluções

Armazenamento

Todas as soluções preparadas em MeOH ou ACN foram estocadas em freezer a -30 °C até sua utilização. As soluções aquosas foram estocadas a temperatura ambiente.

3.3.1 *Preparo das soluções iniciais*

Foram preparadas soluções iniciais a 1000 ng/ μ L de Tremb, 6 α -OH e 6 β -OH, em MeOH para a realização dos experimentos. Foi utilizada uma balança analítica previamente calibrada para pesagem das substâncias.

3.3.2 *Preparo de STD MIX*

Uma mistura de padrões (STD MIX) foi utilizada para definir o tempo de retenção das substâncias nas etapas de purificação por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detecção por arranjo de diodos (CLAE-DAD). Essas soluções foram feitas a partir das soluções iniciais previamente preparadas, misturadas, evaporadas à secura e avolumadas com ACN.

Para as etapas de purificação por CLAE1 e CLAE1B, em que os esteroides estavam em sua forma livre, o STD MIX1 foi composto por 40 ng/ μ L de 6 α -OH e 6 β -OH, e 32 ng/ μ L de Tremb previamente acetilada (Tremb_Ac).

Para a etapa de CLAE2, a purificação foi feita com os esteroides acetilados. Assim, o STD MIX2 foi composto por 40 ng/ μ L de 6 α -OH e 6 β -OH, e 16 ng/ μ L de Tremb. Após evaporação e desumidificação, a mistura foi acetilada com piridina e anidrido acético (ver item 3.4), avolumada com ACN.

3.3.3 *Preparo de solução de fortificação*

Para fortificação das urinas, a partir das soluções iniciais de 6 α -OH e 6 β -OH foi feita uma mistura com concentração de 25 ng/ μ L de ambas as substâncias em MeOH.

3.3.4 *Preparo de tampão fosfato de sódio 0,8 M*

Com o auxílio de uma balança analítica previamente calibrada, foram pesados 4,4 g de NaH_2PO_4 , 8,6 g de Na_2HPO_4 e 115 g de água deionizada a temperatura ambiente de 22 °C. A solução foi mantida sob agitação até homogeneização completa.

3.3.5 *Preparo de tampão carbonato/bicarbonato 20 %*

Com o auxílio de uma balança analítica previamente calibrada, foram pesados 15 g de K_2CO_3 e 15 g de KHCO_3 e 120 g de água deionizada a temperatura ambiente de 22 °C. A solução foi mantida sob agitação até homogeneização completa.

3.4 **Preparo de amostras**

Os volumes das alíquotas de amostras de urina foram de 25 mL. Cada amostra foi levada à centrífuga a 3000 rpm por 5 min para deposição de possíveis partículas sólidas. Em seguida, foi realizada extração por fase sólida com cartucho de C_{18} de 500 mg de fase estacionária e com capacidade de 3 mL. O cartucho foi previamente ativado com 5 mL de MeOH e 5 mL de H_2O ultrapura, a amostra foi eluída e lavada com 5 mL de água ultrapura. Após, as substâncias de interesse foram eluídas com 3 mL de MeOH. O solvente foi evaporado até a secura sob fluxo de N_2 a 60 °C.

O extrato foi reconstituído em 1,5 mL de tampão fosfato 0,2 M (pH 7), que foi preparado no momento do uso por diluição da solução de tampão fosfato 0,8 M em água à proporção de 1:3. Foram adicionados 4 mL de TBME, e a mistura foi submetida a agitação mecânica por 5 min para extração líquido-líquido e posterior centrifugação a 3000 rpm por 5 minutos para separação das fases. Em seguida, a fração orgânica (contendo esteroides em sua forma livre e outras impurezas menos polares) foi removida, e o resíduo de TBME da fase aquosa foi evaporado sob fluxo de N_2 a 60 °C.

Para hidrólise enzimática das substâncias glicoconjugadas, foram adicionados 100 μL da enzima β -glicuronidase de *Escherichia coli* à amostra, que foi incubada em seguida por 1 hora a 50 °C.

Após a hidrólise enzimática, foram adicionados 500 μL de tampão carbonato 20 %, pH 9-10. Em seguida, a amostra foi fortificada com 10 μL da mistura de 6 α -OH e 6 β -OH a 25 ng/ μL , e uma extração líquido-líquido das substâncias hidrolisadas foi feita por duas vezes com 4 mL de TBME, agitação por 5 minutos e centrifugação a 3000 rpm por 5 minutos. As duas frações orgânicas foram reunidas e o solvente foi evaporado sob fluxo de N_2 a 60 °C. O extrato foi ressuscitado com 100 μL de MeOH, transferido para *insert* de fundo cônico e evaporado em concentrador a vácuo a 60 °C sob vácuo nominal de 5,1 mbar.

Após evaporação do solvente, o extrato foi ressuscitado em 67,5 μL de solução de Trem (utilizada como padrão interno) a 32 ng/ μL em ACN e 67,5 μL de água ultrapura para a primeira etapa de purificação por CLAE preparativa (CLAE1).

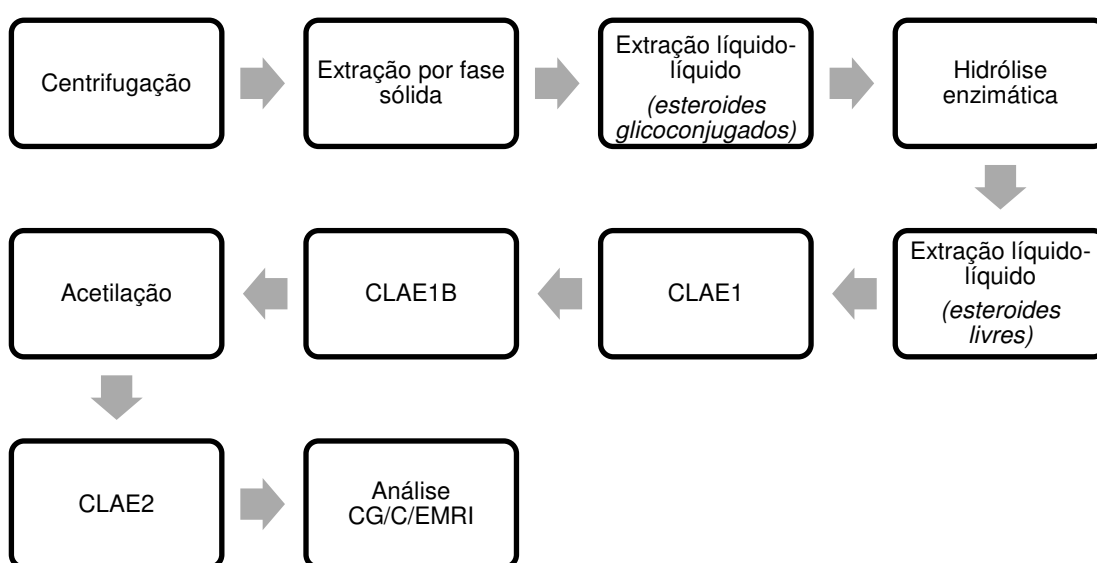
Foi coletada uma fração contendo as substâncias 6 α -OH e 6 β -OH, que foi evaporada em concentrador a vácuo a 60 °C sob vácuo nominal de 5,1 mbar e transferida para *insert* de fundo cônico com 100 μL de MeOH. O solvente foi evaporado e o extrato foi ressuscitado em 135 μL de ACN/ H_2O em proporção 1:4. Em seguida, a fração foi submetida à segunda etapa de purificação por CLAE preparativa (CLAE1B).

Então, foram coletadas separadamente as substâncias-alvo, evaporadas à secura em concentrador a vácuo a 60 °C sob vácuo nominal de 5,1 mbar e estocadas em estufa a vácuo por 1 hora para desumidificação. Após, foram adicionados 50 μL de piridina e 50 μL de anidrido acético para acetilação e os frascos foram incubados, lacrados, a 70 °C por 1 hora. A seguir, os reagentes foram evaporados em concentrador a vácuo a 60 °C sob vácuo nominal de 5,1 mbar, o extrato seco foi ressuscitado em 135 μL de ACN/ H_2O em proporção 1:1 e purificado novamente por CLAE preparativa para purificação das substâncias acetiladas (CLAE2).

Em seguida, a fase móvel das frações foi evaporada até a secura em concentrador a vácuo a 60 °C sob vácuo nominal de 5,1 mbar, e os resíduos foram

ressuspendidos em acetato de etila e analisados por CG/C/EMRI. A Figura 4 apresenta o fluxograma do método de extração e purificação para análise por CG/C/EMRI.

Figura 4 - Fluxograma do preparo de amostras para determinação do $\delta^{13}\text{C}$ de esteroides por CG/C/EMRI.



3.5 Condições de análise

3.5.1 Cromatografia líquida de alta eficiência

Foi utilizada uma coluna analítica XBridge™ Shield RP18 da Waters, fase estacionária C₁₈, 250 mm x 4,6 mm x 5 µm de diâmetro de partícula, sendo protegida por uma pré-coluna XBridge™ Shield RP18 de 20 mm x 4,6 mm x 5 µm de tamanho de partícula, também do fabricante Waters. A temperatura da coluna foi de 25 °C. A fase móvel foi composta de H₂O e ACN, respectivamente como A e B, com vazão de 1,0 mL/min; o volume de injeção foi de 125 µL; o comprimento de onda para detecção dos analitos foi de 195 nm e para detecção do padrão interno, 345 nm.

Antes de cada sequência de injeção, a coluna foi lavada por 30 min com 98 % ACN / 2 % H₂O e, após, foi realizada uma corrida em branco sob as mesmas condições de análise, para condicionar a coluna.

As Tabela 1 e Tabela 2 apresentam os gradientes de eluição utilizados para a separação dos esteroides livres (CLAE1 e CLAE1B, respectivamente), e a Tabela 3 apresenta o gradiente para purificação dos esteroides acetilados (CLAE2).

Tabela 1 - Gradiente de fase móvel para a purificação por CLAE1

Tempo (min)	% H₂O	% ACN
0,00	60,0	40,0
18,00	40,0	60,0
19,00	2,0	98,0
30,00	2,0	98,0
30,01	60,0	40,0
35,00	60,0	40,0

Tabela 2 - Gradiente de fase móvel para a purificação por CLAE1B

Tempo (min)	% H₂O	% ACN
0,00	78,0	22,0
15,00	63,0	37,0
15,01	40,0	60,0
25,00	40,0	60,0
25,01	78,0	22,0
30,00	78,0	22,0

Tabela 3 - Gradiente de fase móvel para a purificação por CLAE2

Tempo (min)	% H₂O	% ACN
0,00	75,0	25,0
18,00	48,0	52,0
19,00	2,0	98,0
24,00	2,0	98,0
24,01	75,0	25,0
29,00	75,0	25,0

Para a marcação do tempo de coleta das frações, três injeções do STD MIX correspondente foram feitas. O sistema foi considerado estável quando a variação dos

tempos de retenção de cada pico entre as injeções não excedeu 0,05 min. Para definição dos intervalos de coleta, foram considerados o início e final do pico de interesse na injeção com valor de mediana dos tempos de retenção. Uma margem de segurança foi aplicada, igual a 0,20 min antes do início e após o fim do pico de interesse no CLAE1, e igual a 0,15 min no CLAE1B e CLAE2. Assim, foram demarcadas janelas de coleta satisfatórias para eliminar os interferentes de matriz e purificar a substância-alvo.

3.5.2 Cromatografia gasosa acoplada a forno de combustão e espectrometria de massas por razão isotópica

O método utilizado foi baseado no descrito por DE OLIVEIRA *et al.*, 2019.

A coluna usada foi a coluna capilar VF-17ms J&W (50 % fenil, 50 % metilsiloxana, 30 m, 0,25 mm D. I., espessura de filme 0,25 μm), com He 6.0 como gás de arraste a fluxo constante de 1,4 mL/min.

A temperatura do injetor foi de 280 °C, com volume de injeção de 1, 2 ou 3 μL , sem divisão de fluxo (*splitless*); abertura do *split* após 1,20 min com fluxo de 50 mL/min; purga do septo de 50 mL/min, com pausa de 1,20 min. Injeção com pressão de 45 psi e com duração de 1,20 min.

A programação de temperatura do cromatógrafo a gás foi de temperatura inicial do forno de 100 °C (temperatura mantida por 2 min), seguida de aquecimento até 270 °C a uma taxa de aquecimento de 25 °C/min, depois até 290 °C a 2 °C/min e em seguida, 300 °C a 30 °C/min (mantida por 7 min). A temperatura do reator de oxidação foi de 950 °C.

Pulsos do gás de referência CO₂ foram aplicados com intensidades de 2500 mV, durante 20 s nos intervalos: 100 s, 200 s, 300 s, 400 s, 500 s, 1380 s e 1440 s. O quinto e o sétimo pulsos de CO₂ são usados como pulsos de referência.

O contrafluxo de He foi desativado (*Backflush OFF*) aos 530 s e reativado (*Backflush ON*) aos 1420 s.

Os parâmetros de integração dos picos foram: inclinação inicial: 0,2 mV/s; inclinação final: 0,4 mV/s; altura mínima de pico: 50 mV; resolução de pico: 50 %; largura máxima de pico: 50 s. Tipo de linha de base: individual; intervalo: 5 s.

As condições de operação do espectrômetro de massas foram: temperatura da interface de 250 °C; temperatura da fonte iônica de 230 °C; temperatura do quadrupolo de 150 °C; energia de ionização, 70 eV. Os espectros de massas foram obtidos no modo de varredura de m/z 50 a 500, com tempo de aquisição de 20 ms.

3.5.3 Calibração do gás de referência para análise por CG/C/EMRI

A calibração do gás de referência deve ser feita periodicamente ou após notar uma variação fora do aceitável nas medições, religamento do equipamento, troca da fonte iônica, reator de oxidação ou do cilindro de CO₂, conforme requerido pelo TD2022IRMS (WADA, 2022).

Para essa calibração, foi feita a análise, em quintuplicata, de solução em acetato de etila do material de referência certificado CU/USADA 33-1 a 25 ng/μL para verificação da exatidão da calibração, estabilidade do sistema e recalibração do gás de referência quando necessário.

O material de referência certificado CU/USADA 33-1 consiste em uma mistura de esteroides com valores de $\delta^{13}\text{C}$ certificados. A Tabela 4 apresenta a composição da mistura e os valores de $\delta^{13}\text{C}$ certificados.

Tabela 4 - Composição e valores certificados de $\delta^{13}\text{C}$ e desvio-padrão do MRC CU/USADA 33-1

Substância	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	Desvio-padrão (‰)
Acetato de 5 α -androstan-3 β -ol (3 β -OH_Ac)	-30,61	0,14
5 α -colestano (5 α -Col)	-24,77	0,13
Acetato de Androsterona (A_Ac)	-33,04	0,02
Acetato de 11-cetoetilcolanolona (11K_Ac)	-16,69	0,06

Para recalibração do gás de referência, foi calculado o valor médio de $\delta^{13}\text{C}$ de cada esteroide na quintuplicada do material certificado e, em seguida, a diferença entre o valor médio e o valor certificado em cada esteroide. A média dessas diferenças calculadas foi aplicada ao valor de $\delta^{13}\text{C}$ do gás de referência. Essa calibração foi considerada válida quando os valores de $\delta^{13}\text{C}$ obtidos para a quintuplicata após a recalibração estiveram dentro do intervalo compreendido como o respectivo valor certificado $\pm 0,5 \text{ ‰}$.

Para a avaliação da estabilidade do sistema durante a calibração, o desvio-padrão do $\delta^{13}\text{C}$ de cada esteroide em quintuplicada foi calculado e considerado aceitável quando menor ou igual a $0,4 \text{ ‰}$.

Antes de cada sequência de análise por CG/C/EMRI, a calibração do sistema foi verificada por meio da análise de materiais de referência internos, ou seja, soluções de padrões acetilados a $25 \text{ ng}/\mu\text{L}$ em acetato de etila e cujos valores de $\delta^{13}\text{C}$ eram conhecidos. Essa análise permitiu avaliar a estabilidade, calibração e desempenho de todo o sistema.

3.6 Validação do método analítico

3.6.1 Linearidade do instrumento

Foram feitos 10 pontos de diluição, em triplicata, para cada analito. Uma alíquota de $200 \mu\text{L}$ de uma solução inicial com concentração de $1000 \text{ ng}/\mu\text{L}$ foi transferida para um frasco de 2 mL , evaporada até a secura. Em seguida, acetilada e ressuspensa em $1000 \mu\text{L}$ de MeOH (Solução I, $C = 200 \text{ ng}/\mu\text{L}$).

Então, $50 \mu\text{L}$ da Solução I foram transferidos para outro frasco de 2 mL e foram adicionados $350 \mu\text{L}$ de MeOH (Solução II, $C = 25 \text{ ng}/\mu\text{L}$). A partir das soluções obtidas, diferentes volumes foram transferidos para frascos de 2 mL com *insert* de fundo cônico e foram diluídas com acetato de etila, de modo a se obterem concentrações finais de $1,5 \text{ ng}/\mu\text{L}$, $2,5 \text{ ng}/\mu\text{L}$, $5,0 \text{ ng}/\mu\text{L}$, $10 \text{ ng}/\mu\text{L}$, $20 \text{ ng}/\mu\text{L}$, $40 \text{ ng}/\mu\text{L}$, $80 \text{ ng}/\mu\text{L}$, $120 \text{ ng}/\mu\text{L}$, $250 \text{ ng}/\mu\text{L}$ e $400 \text{ ng}/\mu\text{L}$.

Todas as soluções do padrão de diferentes concentrações foram analisadas em triplicata (volume de injeção de 1 μL) por CG/C/EMRI e a faixa de intensidade dos picos (mV) foi determinada. O desvio-padrão entre as replicatas a cada nível ($n \geq 3$) foi calculado, e foram considerados aprovados os níveis cujos desvios-padrão foram menores ou iguais a 0,5 ‰. O valor médio de $\delta^{13}\text{C}$ entre as replicatas ($n \geq 3$) em cada concentração foi calculado, e foram considerados aprovados os níveis em que o valor médio não excedeu a média geral da faixa linear $\pm 0,5$ ‰, conforme os critérios exigidos pela Wada (WADA, 2022).

3.6.2 *Limite de quantificação*

3.6.2.1 Faixa de trabalho

Foram preparadas 5 alíquotas de 25 mL de urina, de acordo com o método de extração e análise descrito no item 3.4. As alíquotas foram fortificadas após a hidrólise com diferentes volumes, utilizando uma solução de uso contendo os analitos com concentração de 30 ng/ μL para que se obtivessem as concentrações de 5 ng/mL, 10 ng/mL, 20 ng/mL, 40 ng/mL e 60 ng/mL em cada alíquota. Foi avaliada a faixa de concentrações em urina na qual foi determinado o valor de $\delta^{13}\text{C}$ de forma consistente, ou seja, com desvio-padrão menor ou igual a 0,5 ‰.

O volume de urina determinado para a análise corresponde ao volume máximo de urina estabelecido pela Wada para determinação dos LQ (WADA, 2022).

3.6.2.2 Determinação do limite de quantificação

Os pontos de concentração 5 ng/mL e 10 ng/mL foram preparados em triplicata, utilizando alíquotas de 25 mL de urina de acordo com o método de extração e análise descrito no item 3.4 e foram fortificadas utilizando uma solução de uso contendo os analitos com concentração de 30 ng/ μL . Assim, foi determinada a concentração

mínima em que os analitos podem ser detectados e analisados de acordo com o método analítico desenvolvido. Essa concentração mínima, ou seja, o limite de quantificação, foi aquela que produziu uma amplitude de pico dentro da faixa linear e cujo desvio-padrão da triplicata não excedeu a respectiva incerteza combinada do método, em atendimento aos critérios estabelecidos pela Wada (WADA, 2022).

3.6.3 *Precisão intermediária*

Nesta etapa, a precisão foi avaliada variando-se o analista, o dia de preparo e a urina. Foram usadas duas urinas, sendo uma feminina fortificada à concentração de 10 ng/mL e uma masculina fortificada à concentração de 25 ng/mL. Quatro alíquotas de cada urina foram preparadas por vez. No total, foram feitos 2 preparos em dias diferentes pelo analista A e 2 preparos, também em dias diferentes, pelo analista B, contabilizando 16 alíquotas para cada concentração definida. As replicatas foram analisadas por CG/C/EMRI, tendo como variáveis dia, analista e urina (ou concentração).

A precisão intermediária, além da repetibilidade (ou precisão intraensaio) e a precisão interensaio, foi calculada por ANOVA.

3.6.4 *Incerteza da medição*

A incerteza combinada (u_c) foi calculada como a raiz quadrada da soma dos quadrados da precisão intermediária e da exatidão. Seu valor deve ser igual menor ou igual a 1,0 % para os analitos, conforme requisito estabelecido pela Wada (WADA, 2022).

3.6.4.1 Exatidão

A exatidão foi calculada como a diferença entre o valor de $\delta^{13}\text{C}$ dos padrões utilizados no experimento de linearidade instrumental e o valor de $\delta^{13}\text{C}$ obtido no experimento de precisão através da fortificação das urinas com o padrão do analito. Essa diferença expressa o valor de exatidão do método.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na última revisão do documento técnico da Wada que trata da análise isotópica de esteroides, o TD2022IRMS, a substância $6\alpha\text{-OH}$ foi incluída como um dos analitos cuja análise por CG/C/EMRI é requerida para determinação de sua origem exógena ou endógena, o que exige o desenvolvimento de um método analítico. Amostras que contenham uma concentração maior do que 10 ng/mL dessa substância, estimada na análise de triagem dos laboratórios de controle de dopagem, devem ser consideradas suspeitas e encaminhadas para a análise confirmatória por CG/C/EMRI (WADA, 2022).

4.1 Cromatografia líquida preparativa

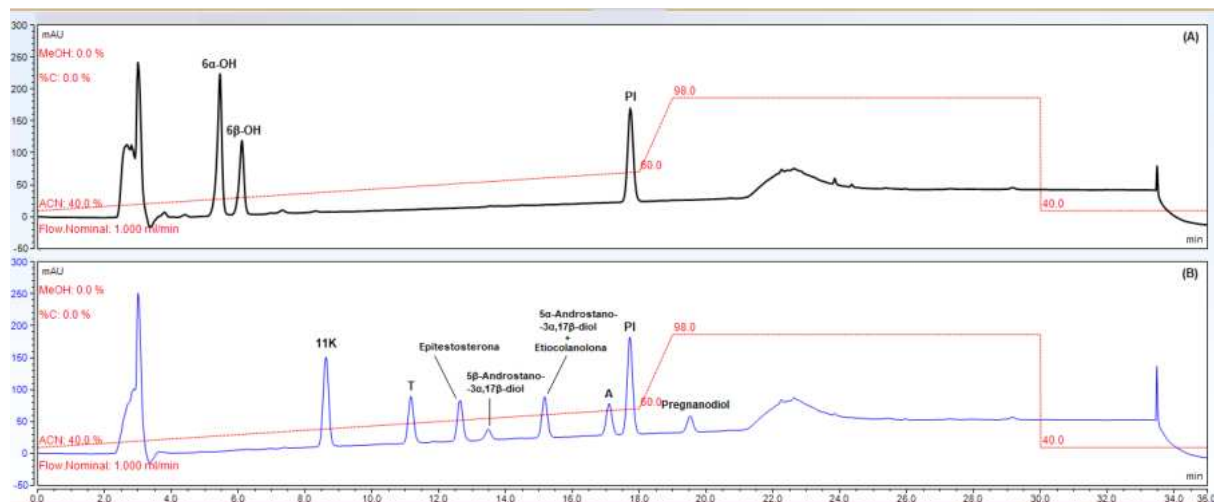
Por ser uma técnica delicada e suscetível a interferentes, a análise de esteroides por CG/C/EMRI requer um preparo de amostras com a maior eliminação possível de interferentes em uma matriz complexa como a urina, a fim de evitar uma provável interferência de matriz. Essa etapa requer cuidado e deve ser bem controlada para evitar a ocorrência de fracionamento isotópico, que poderia afetar a determinação da razão isotópica, ou seja, do $\delta^{13}\text{C}$ dos esteroides. O fracionamento isotópico pode ocorrer durante a coleta das frações no CLAE ou na ausência de controle das reações químicas durante o processo e, assim, a amostra é enriquecida

com um dos isótopos, o que provoca uma alteração na composição isotópica (DE OLIVEIRA *et al.*, 2019).

No método proposto, o preparo de amostras envolveu as etapas de extração por fase sólida, extração líquido-líquido, hidrólise enzimática com *E. coli*, purificação das amostras por CLAE preparativa em três etapas e acetilação dos analitos. A princípio, três etapas por CLAE preparativa seriam um cuidado demasiado, visto que diversos trabalhos publicados apresentam protocolos de preparo de amostras que contêm duas etapas de purificação por CLAE para diversos esteroides nas mais variadas concentrações em urina (DE LA TORRE *et al.*, 2012; DE OLIVEIRA *et al.*, 2019; PIPER *et al.*, 2008), inclusive para 6 α -OH e 6 β -OH (PIPER e THEVIS, 2022); porém, conforme mencionado anteriormente, a presença de 6 α -OH em uma amostra pode ocorrer em razão da administração de um precursor de testosterona, um anabolizante endógeno (POLET *et al.*, 2014; WADA, 2021b).

Portanto, se 6 α -OH for detectada em uma amostra, pode-se determinar a razão isotópica dos outros marcadores do perfil endógeno, e a Wada recomenda, especialmente aos laboratórios que não tenham um método validado para confirmação de 6 α -OH, que, em caso de tais suspeitas, realizem a confirmação dos marcadores do perfil endógeno antes de enviar a amostra para outro laboratório com capacidade analítica para confirmar o metabólito de 6-Oxo (WADA, 2022). Então, a fim de minimizar o consumo de amostras e realizar as duas confirmações a partir de uma mesma alíquota, a primeira etapa de CLAE preparativa é a mesma já implementada pelo LBCD (DE OLIVEIRA *et al.*, 2019) para confirmação de testosterona e metabólitos (o que inclui a análise das referências endógenas). Por serem moléculas mais polares, 6 α -OH e 6 β -OH não apresentam uma boa retenção pela coluna empregada mediante o gradiente de fase móvel aplicado quando comparado com as demais substâncias (Figura 5), sendo coletadas em uma fração muito impura e exigindo uma melhor purificação.

Figura 5 - Comparação entre os cromatogramas dos STD MIX utilizados na primeira etapa de purificação por CLAE.



Para a análise de confirmação de 6α-OH (A) e para confirmação de testosterona e metabólitos (B). Em vermelho, o percentual de ACN no gradiente.

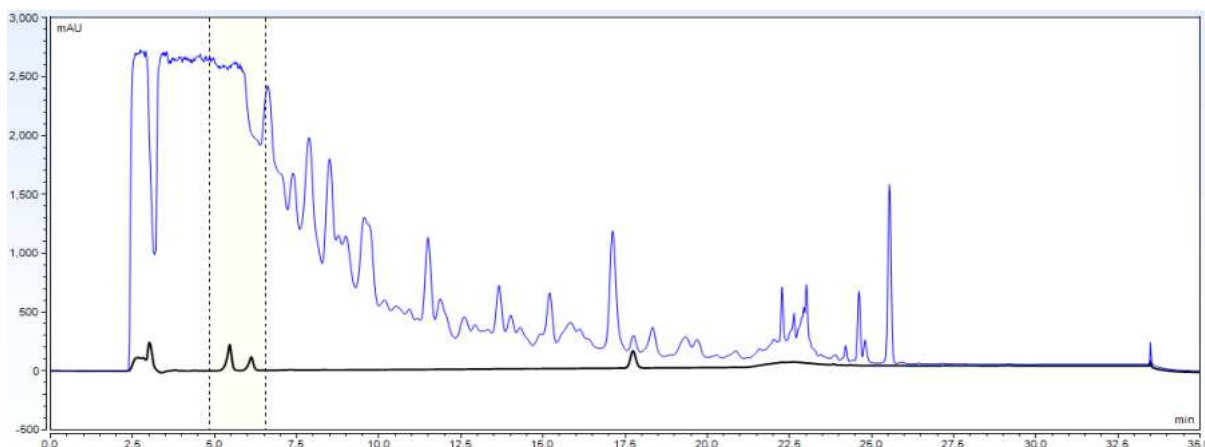
A primeira etapa foi proveniente da injeção dos extratos puros obtidos na etapa de extração da alíquota de urina, em que os analitos são obtidos em sua forma livre. Por meio dessa primeira etapa por CLAE, foi obtida uma fração contendo 6α-OH e 6β-OH.

A marcação dos intervalos de coleta dos extratos foi estabelecida a partir da análise do STD MIX1, conforme mostrado na Figura 5.

As substâncias 6α-OH e 6β-OH apresentaram picos cromatográficos com resolução próxima a linha de base, 6α-OH com tempo de retenção (t_R) de 5,453 min, 6β-OH com t_R de 6,110 min; Tremb_Ac (padrão interno) apresentou t_R de 17,733 min.

Após a injeção do STD MIX1, o intervalo de coleta das substâncias de interesse foi estabelecido, conforme apresentado na Figura 6.

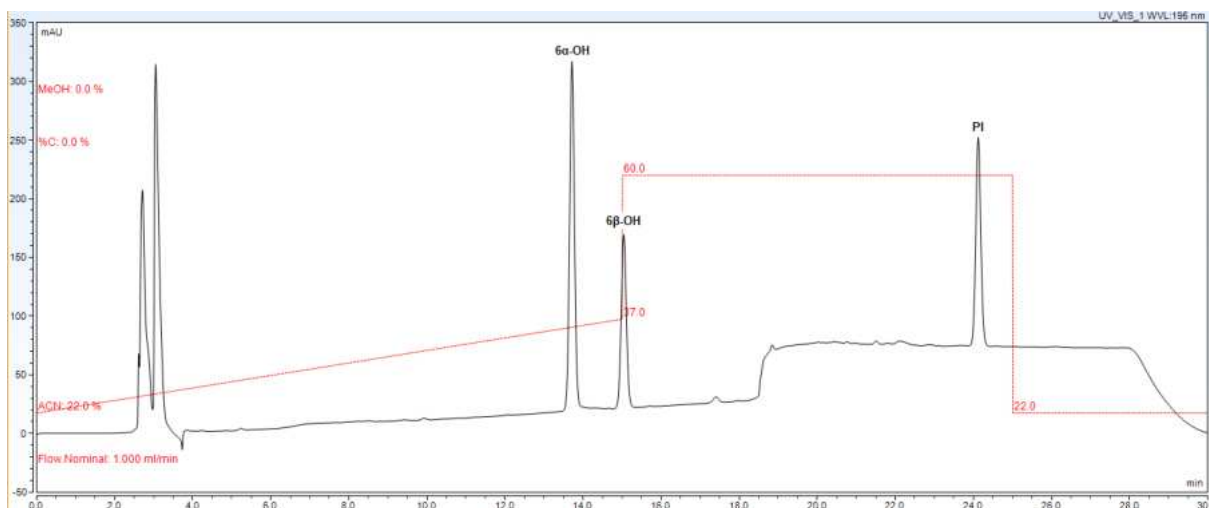
Figura 6 - Comparação entre cromatograma do STD MIX1 e amostra real de urina no CLAE1.



Cromatograma do STD MIX (em preto) sobreposto ao cromatograma de uma amostra real de urina (em azul), com os intervalos de coleta demarcados na linha pontilhada.

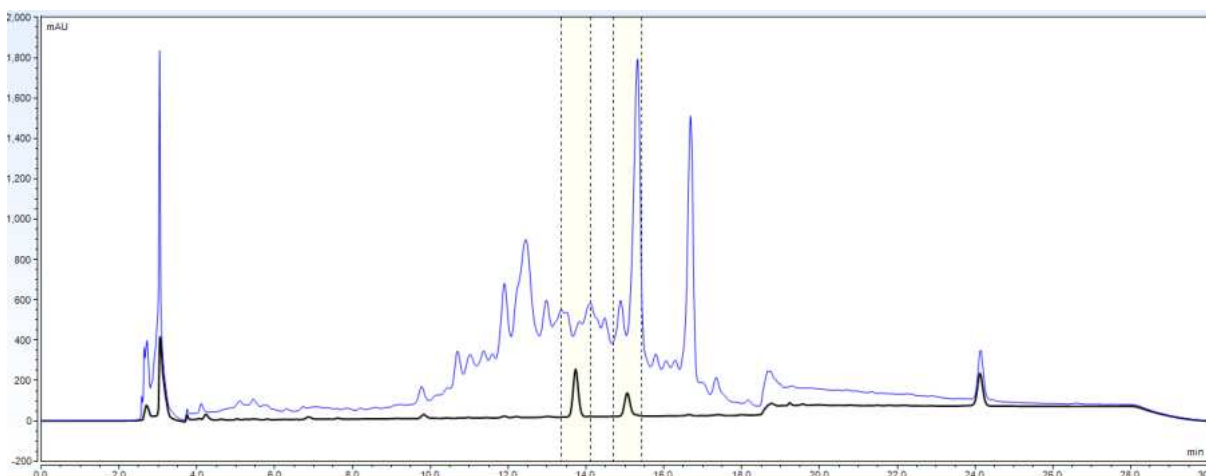
A fração coletada por CLAE1 foi submetida a uma nova separação cromatográfica (CLAE1B), com um gradiente de % ACN menor e com rampa menos inclinada, para purificação dos dois analitos, conforme apresentado na Figura 7. A Figura 8 apresenta a coleta dos analitos 6α -OH e 6β -OH separadamente.

Figura 7 - Cromatograma do STD MIX1 no CLAE1B.



Em vermelho, o percentual no gradiente de ACN.

Figura 8 - Comparação entre cromatograma do STD MIX1 e amostra real de urina no CLAE1B.

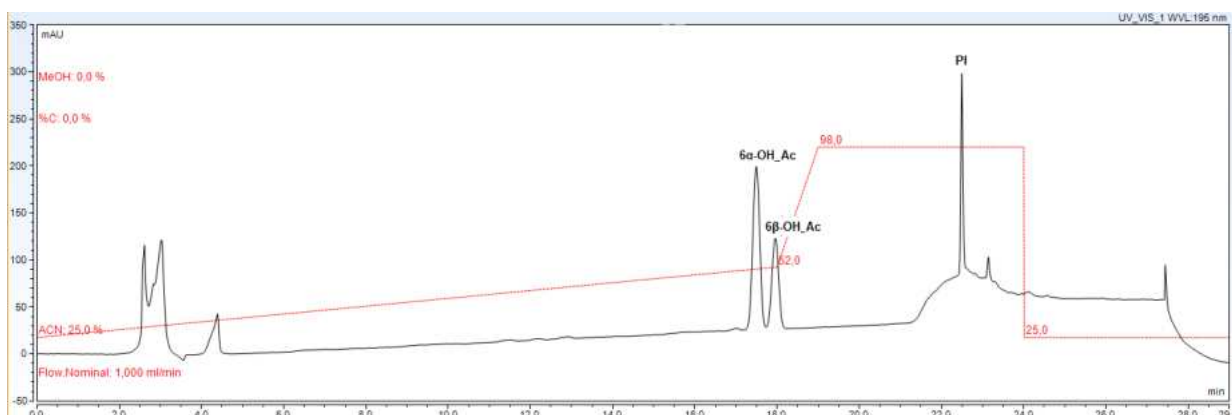


Cromatograma do STD MIX (em preto) sobreposto ao cromatograma de uma amostra real de urina (em azul), com os intervalos de coleta demarcados na linha pontilhada.

As substâncias apresentaram um pico cromatográfico com forma gaussiana e uma boa separação entre os picos, o que é ideal já que no CLAE1 as substâncias interagem pouco com a fase estacionária e o CLAE1B tem o objetivo de purificação e isolamento das substâncias. Os t_R obtidos foram de 13,733 min para 6 α -OH, 15,060 min para 6 β -OH e 24,130 min para Tremb_Ac.

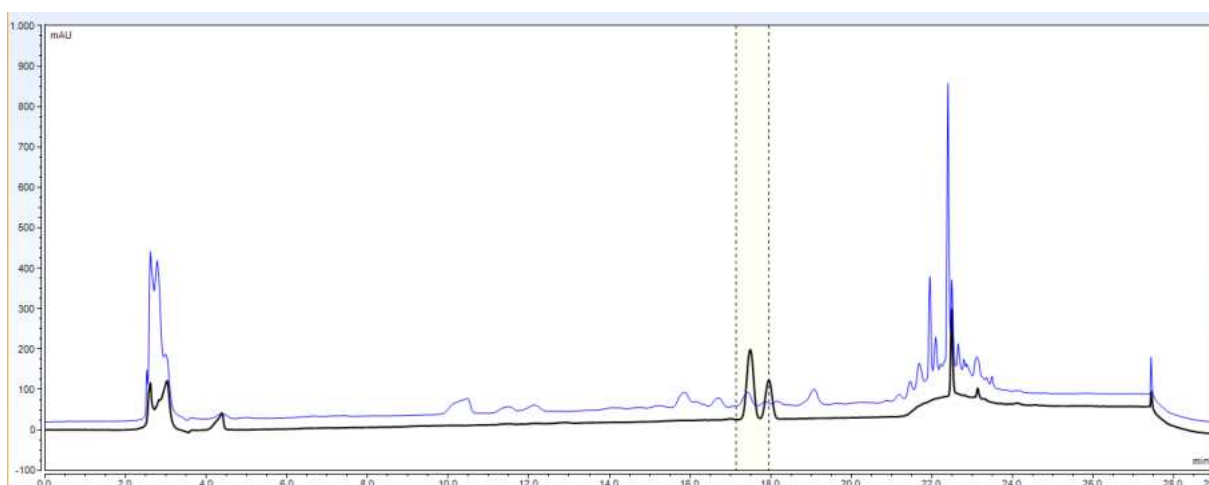
Após separação por CLAE1B, as amostras foram acetiladas com piridina e anidrido acético e levadas para o CLAE2 para uma etapa de purificação adicional dos analitos. O STD MIX2 foi injetado para demarcação dos intervalos de coleta, conforme demonstrado na Figura 9.

Figura 9 - Cromatograma do STD MIX2 no CLAE2.



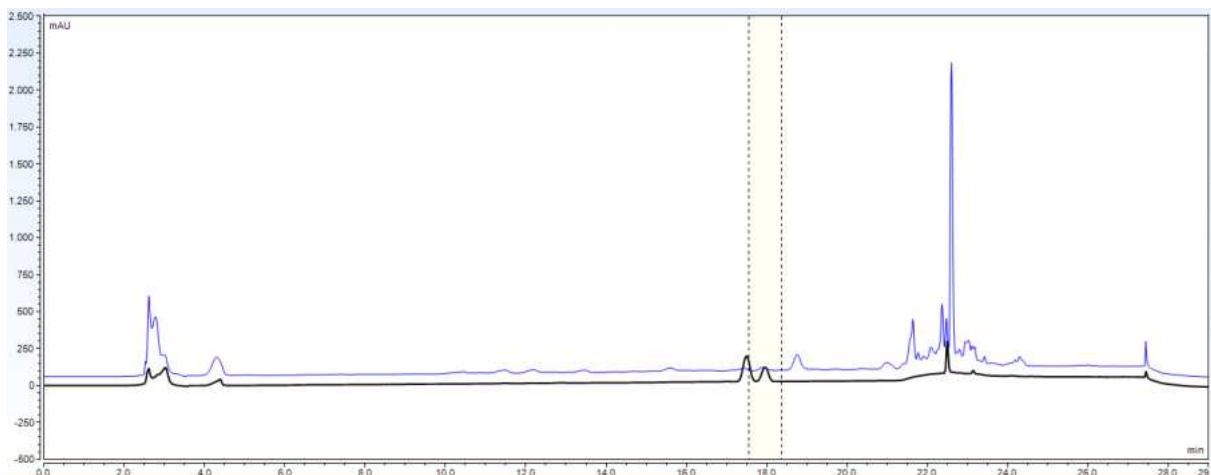
Em vermelho, o percentual no gradiente de ACN.

Após definição dos intervalos de coleta, as frações foram injetadas separadamente para obtenção de uma fração ainda mais pura das substâncias, conforme demonstrado na Figura 10 e Figura 11.

Figura 10 - Comparação entre cromatograma do STD MIX2 e amostra real de urina na fração 6 α -OH_Ac no CLAE2.

Cromatograma do STD MIX (em preto) sobreposto ao cromatograma de uma amostra real de urina (em azul), com o intervalo de coleta de 6 α -OH_Ac demarcado na linha pontilhada.

Figura 11 - Comparação entre cromatograma do STD MIX2 e amostra real de urina na fração 6 β -OH_Ac no CLAE2.



Cromatograma do STD MIX (em preto) sobreposto ao cromatograma de uma amostra real de urina (em azul), com o intervalo de coleta de 6 β -OH_Ac demarcado na linha pontilhada.

As substâncias apresentaram picos cromatográficos com forma gaussiana e resolução próxima a linha de base, o que é ideal em termos de purificação. Os t_R obtidos foram de 17,493 min para 6 α -OH, 17,957 min para 6 β -OH e 22,493 min para Tremb_Ac.

4.1.1 *Uso de Tremb_Ac como padrão interno*

Em geral, o uso do padrão interno é requerido em análises de quantificação. Porém, nesse caso, a Tremb_Ac é utilizada como padrão interno nas análises por CLAE para avaliar a repetibilidade do tempo de retenção entre as injeções e garantir a estabilidade do sistema.

A Tabela 5 ilustra a avaliação da repetibilidade ao longo de uma sequência de cada CLAE.

Tabela 5 - Variação do t_R do padrão interno durante a purificação de amostras em CLAE.

Análise	t_R (min)		
	CLAE1	CLAE1B	CLAE2
STDMIX	17,73	24,13	22,51
STDMIX	17,74	24,13	22,51
STDMIX	17,75	24,14	22,51
1	17,75	24,15	22,51
2	17,76	24,16	22,51
3	17,74	24,17	22,51
4	17,73	24,18	22,51
5	17,72	24,19	22,51
6	17,70	24,20	22,51
7	17,70	24,20	22,51
8	17,70	24,19	22,51
9	17,70	24,18	22,51
10	17,69	24,18	22,51
11	17,70	24,17	22,51
12	17,69	24,17	22,51
13	17,69	24,17	22,51
14	17,68	24,17	22,51
15	17,68	24,17	22,51
Média STDMIX	17,74	24,13	22,51
Δ máx	0,06	0,07	0,00

Observou-se, para a sequência avaliada, uma variação máxima entre a média do t_R do PI na análise em triplicada do STDMIX e na sequência correspondente igual a 0,06 para CLAE1, 0,07 para CLAE1B e 0,00 para CLAE2, o que indica uma variação satisfatória e repetitiva entre as medições do t_R ao longo de uma sequência.

4.2 Calibração do gás de referência para a análise por CG/C/EMRI

O Documento Técnico emitido pela Wada em 2022 para análise por CG/C/EMRI exige que o sistema seja calibrado periodicamente com materiais de referências certificados, que consistam de uma mistura de esteroides com valores de $\delta^{13}\text{C}$ certificados (WADA, 2022).

A calibração do gás de referência CO₂ foi feita através da análise em quintuplicata do material de referência certificado (MRC) CU/USADA 33-1 e o $\delta^{13}\text{C}$ do gás de referência foi considerado calibrado quando os valores de $\delta^{13}\text{C}$ medidos para cada esteroide não variaram mais do que 0,5 ‰ em relação aos valores certificados. Quando essa variação excedeu o limite de aceitação, a calibração foi corrigida através da média das diferenças entre o valor medido e o valor certificado dos esteroides presentes no MRC.

Para garantir a estabilidade, o desvio-padrão entre os valores de $\delta^{13}\text{C}$ de cada esteroide foi considerado adequado quando menor do que 0,4 ‰ na análise em quintuplicata.

A Figura 12 apresenta um cromatograma da análise de CU/USADA 33-1. Tabela 6 apresenta a avaliação da calibração e estabilidade do sistema por uma análise em quintuplicata do MRC.

Figura 12 - Cromatograma de análise do MRC CU/USADA 33-1 por CG/C/EMRI.

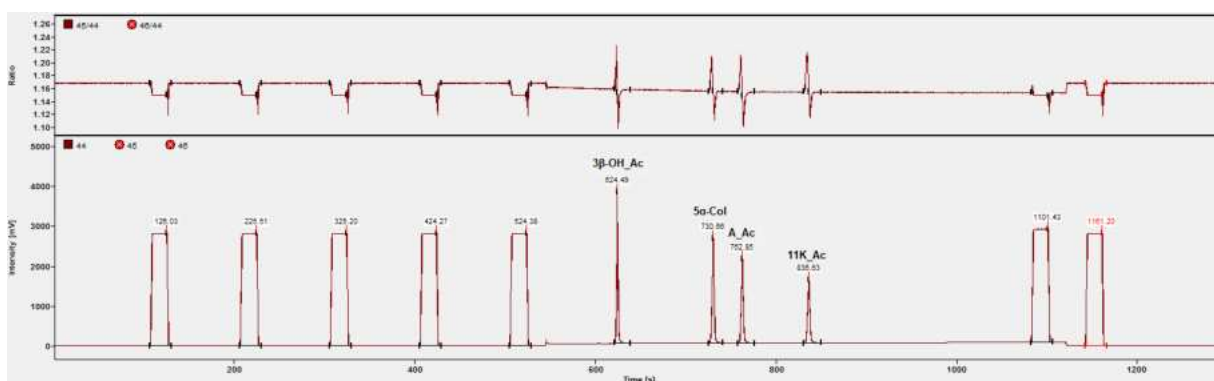


Tabela 6 - Quintuplicata de análises do MRC CU/USADA 33-1.

Replicata	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)			
	3 β -OH_Ac	5 α -Col	A_Ac	11K_Ac
1	-30,99	-24,55	-32,62	-16,95
2	-30,79	-24,76	-32,73	-16,96
3	-30,57	-24,81	-32,59	-17,16
4	-30,78	-24,64	-32,57	-17,12
5	-30,53	-24,72	-32,74	-17,01
Média (‰)	-30,73	-24,70	-32,65	-17,04
Desvio-padrão (‰)	0,18	0,10	0,08	0,09
Valor certificado (‰)	-30,61	-24,77	-33,04	-16,69
Certificado + 0,50 (‰)	-30,11	-24,27	-32,54	-16,19
Certificado - 0,50 (‰)	-31,11	-25,27	-33,54	-17,19
Certificado - Média (‰)	0,12	-0,07	-0,39	0,35

Conforme demonstrado, os valores estão dentro dos limites de aceitação. Portanto, o sistema está devidamente calibrado.

4.3 Cromatografia gasosa acoplada a forno de combustão e espectrometria de massas por razão isotópica

Após a etapa de purificação por CLAE2, as amostras seguiram para análise por CG/C/EMRI. Para obter o tempo de retenção dos analitos, foi injetado o padrão acetilado de 6 α -OH e 6 β -OH, separadamente, em concentração de 80 ng/ μL em acetato de etila, conforme apresentado na Figura 13 e Figura 14. Nessa análise, foi feita uma injeção sanduíche - em que o autoamostrador adiciona o padrão interno e a amostra na mesma injeção - compreendendo 1-3 μL da amostra e 0,2 μL de 5 α -androstano-3 β -ol (3 β -OH_Ac; utilizado como padrão interno) com concentração de 30 ng/ μL .

Figura 13 - Cromatograma CG/C/EMRI da análise do padrão de 6 α -OH_Ac.

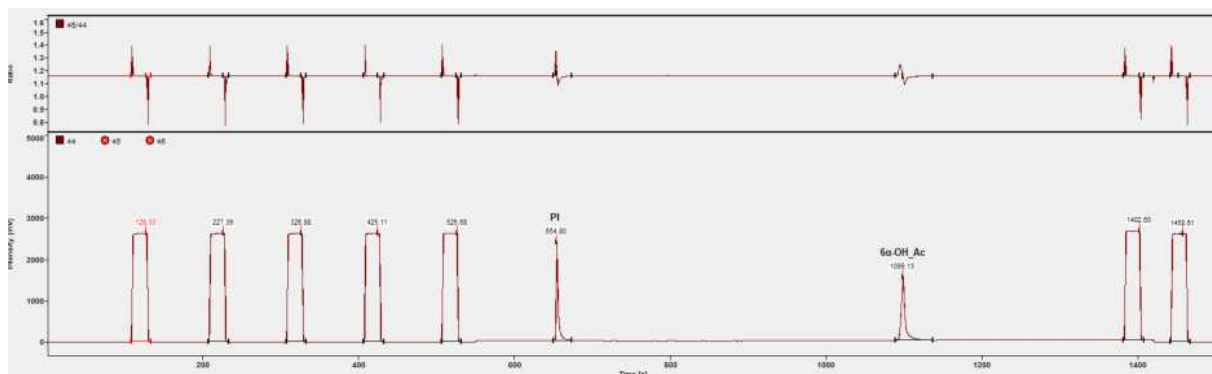
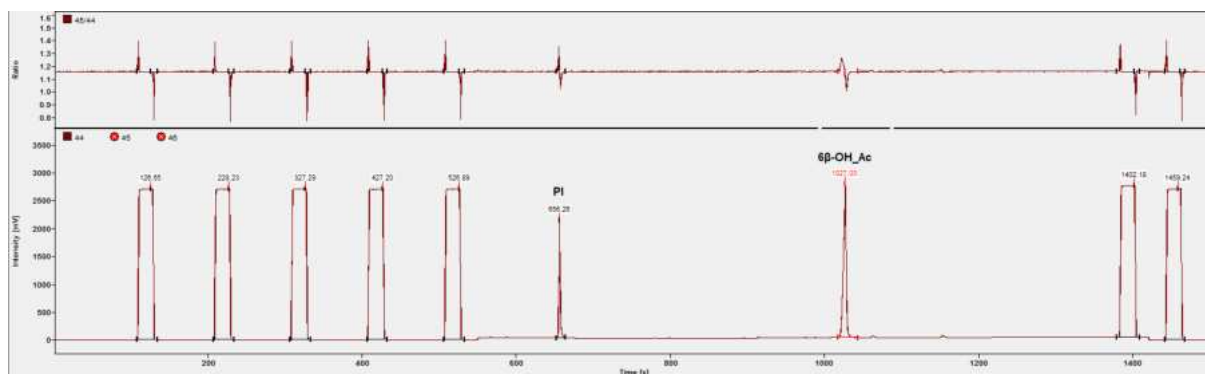


Figura 14 - Cromatograma CG/C/EMRI da análise do padrão de 6 β -OH_Ac.



Os t_R obtidos foram iguais a 1099,1 s para 6 α -OH_Ac, 1027,0 s para 6 β -OH_Ac e de 654,8 s - 656,3 s para 3 β -OH_Ac.

Para verificar a ausência de interferentes nas frações analisadas e avaliar a purificação dos analitos após o preparo de amostras, foi preparada uma urina fortificada com 6 α -OH e 6 β -OH com concentração de 60 ng/ μ L. Os resultados foram apresentados na Figura 15 e Figura 16.

Figura 15 - Cromatograma CG/C/EMRI da análise de 6α -OH_Ac proveniente da urina fortificada.

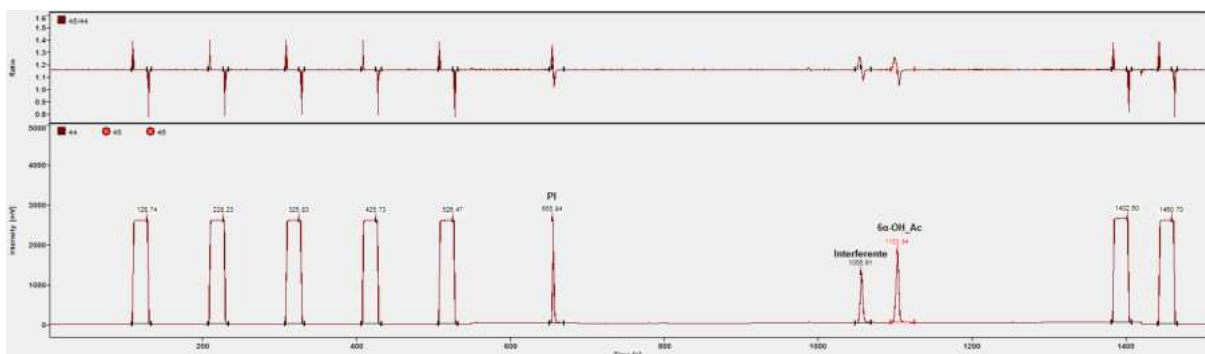
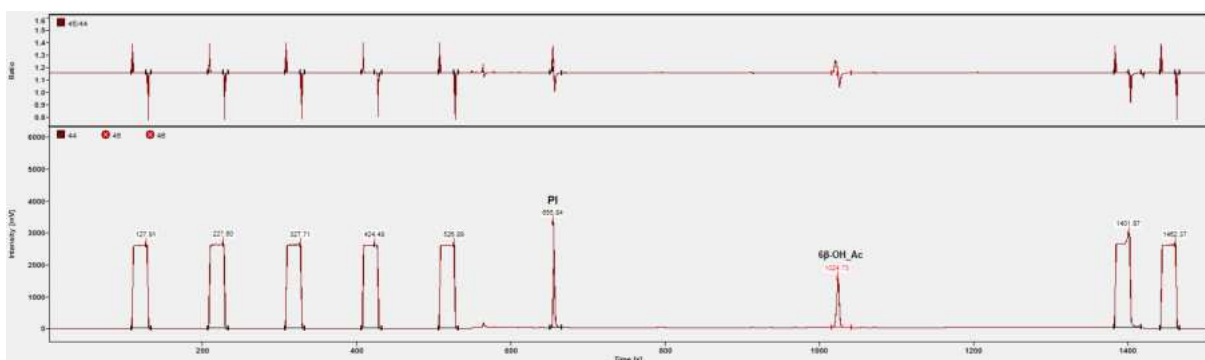
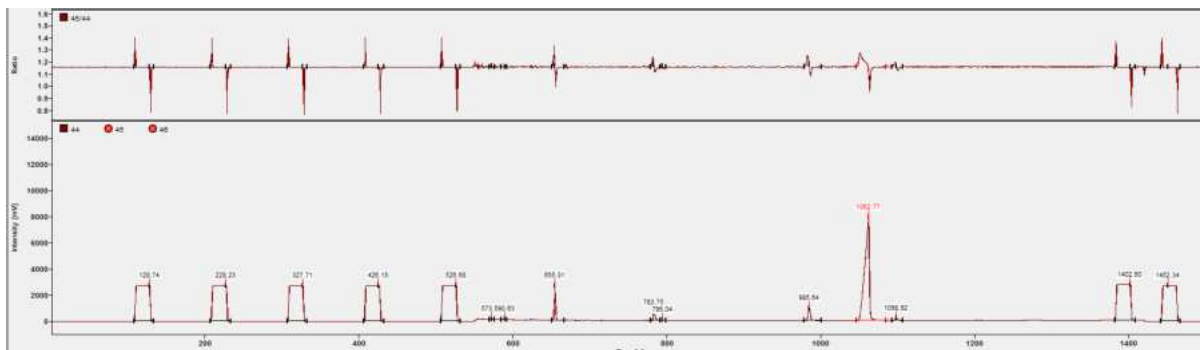


Figura 16 - Cromatograma CG/C/EMRI da análise de 6β -OH_Ac proveniente da urina fortificada.



Na Figura 15 foi observado um pico em 1103,9 s, que não foi observado na análise da injeção do padrão de 6α -OH, conforme demonstrado na Figura 13. Portanto, para confirmar que essa substância está presente na matriz e não era, por exemplo, um possível produto de degradação do padrão, foi feita a análise de um branco de urina, apresentado na Figura 17.

Figura 17 - Cromatograma obtido por CG/C/EMRI referente à análise da fração de 6 α -OH_Ac proveniente do branco de urina.



Foi observado o sinal do pico suspeito que apresentou $\delta^{13}\text{C}$ igual a $-18,8\text{‰}$ - sendo um valor de $\delta^{13}\text{C}$ próximo ao de esteroides endógenos (DE OLIVEIRA *et al.*, 2019) - e a ausência do pico de 6 α -OH_Ac, o que confirmou que essa substância é proveniente da matriz analisada. Para essa análise, a fim de evidenciar o sinal deste pico, foi utilizado um volume de ressuspensão menor do que o referente à análise da urina fortificada (ver Figura 15), o que resultou na diferença de intensidade deste sinal para as demais análises.

Como a análise por razão isotópica não fornece nenhum tipo de informação estrutural e para garantir que as substâncias isoladas foram as de interesse, foi analisado o espectro de massas dos picos das substâncias. Os espectros obtidos são apresentados na Figura 18, na Figura 19 e na Figura 20.

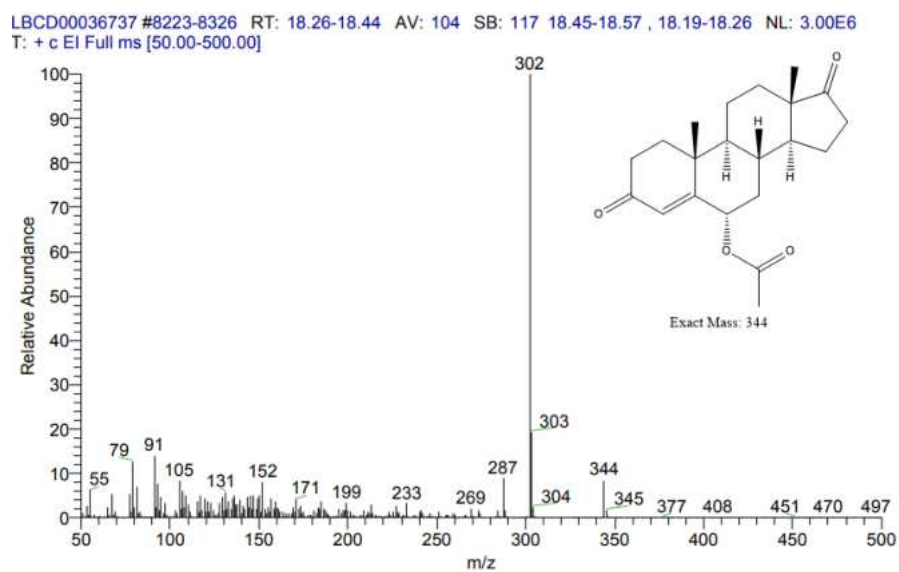
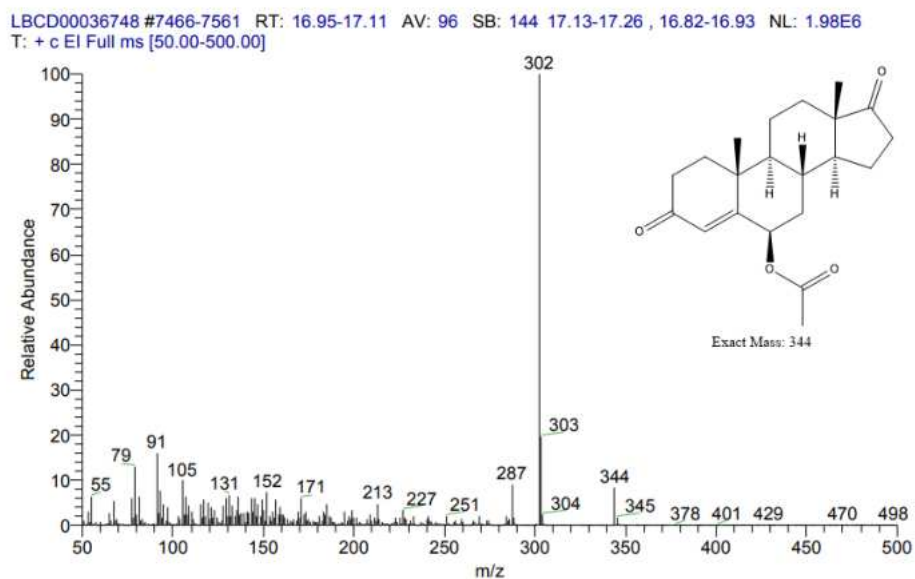
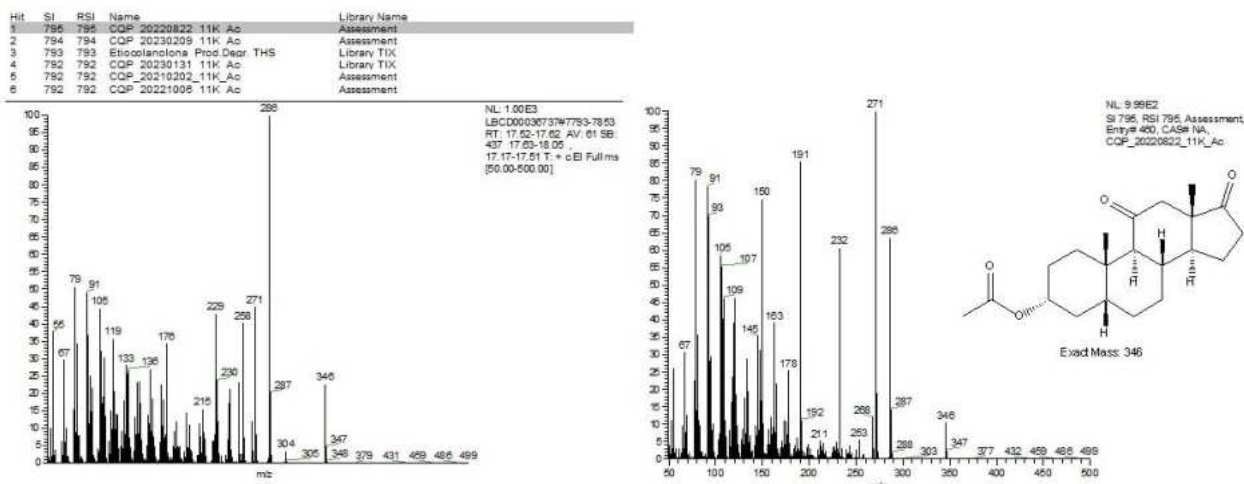
Figura 18 - Espectro de massas do 6 α -OH_Ac.Figura 19 - Espectro de massas do 6 β -OH_Ac

Figura 20 - Comparação entre o espectro de massas da substância presente na urina branco e a biblioteca de espectros.



Nos espectros de massas apresentados, foi possível identificar o íon molecular dos dois isômeros, m/z 344, e o pico base esperado em m/z 302, indicando a perda do grupo acetil. No espectro de massas do pico analisado, proveniente da urina em branco, foi possível notar que não tem o mesmo padrão de quebra que o apresentado nas substâncias de interesse neste trabalho. Porém, ao comparar o espectro obtido com a biblioteca de espectros, foi visto que o pico analisado possui fragmentos comuns a esteroides endógenos, como demonstrado na Figura 20, em que mostrou similaridade com o esteroide 11K_Ac. Isso indica a possibilidade de ser um esteroide endógeno pela similaridade de fragmentação encontrada; entretanto, investigações e análises adicionais seriam necessárias para caracterizar a estrutura do interferente.

4.4 Validação

4.4.1 Linearidade do instrumento

A linearidade é definida como uma faixa de amplitude de picos, expressa em mV, que produz um valor de $\delta^{13}\text{C}$ consistente e repetitivo.

Esse parâmetro de validação foi avaliado a partir da análise de soluções de padrões que foram preparadas e injetadas com diferentes massas – de 5 a 400 ng – e previamente acetiladas. O volume de injeção foi de 1 µL de solução preparada. A Tabela 7 apresenta os resultados obtidos para o analito 6α-OH_Ac. A faixa linear do instrumento foi determinada de 107 mV a 5787 mV. O desvio-padrão a cada nível foi menor do que 0,5 ‰, variando de 0,1 ‰ a 0,4 ‰, o que atendeu aos critérios de aceitação. A média dos valores de δ¹³C a cada nível variou menos que 0,5 ‰ em relação à média total.

Tabela 7 - Resultados obtidos no experimento de linearidade do 6α-OH_Ac.

Massa injetada (ng)	Amplitude média (mV)	δ ¹³ C (‰)				
		Curva 1	Curva 2	Curva 3	Média	Desvio-padrão
5	107	-33,7	-33,0	-33,0	-33,3	0,4
10	184	-33,3	-32,5	-33,1	-33,0	0,4
20	329	-33,4	-33,6	-33,3	-33,4	0,1
40	844	-33,0	-33,5	-33,7	-33,4	0,4
80	1613	-33,1	-33,0	-33,5	-33,2	0,3
120	2229	-32,9	-33,0	-33,2	-33,0	0,1
250	3854	-33,2	-32,9	-33,1	-33,0	0,2
400	5787	-33,4	-33,2	-33,4	-33,3	0,1
Média (‰)		-33,2				
Média - 0,5 (‰)		-33,7				
Média + 0,5 (‰)		-32,7				
Desvio-padrão (‰)		0,3				

A Tabela 8 apresenta os resultados obtidos para o analito 6β-OH_Ac, tendo como faixa linear 297 mV - 8965 mV e desvio-padrão menor do que 0,5 ‰, variando de 0,03 ‰ a 0,4 ‰, o que atendeu aos critérios de aceitação.

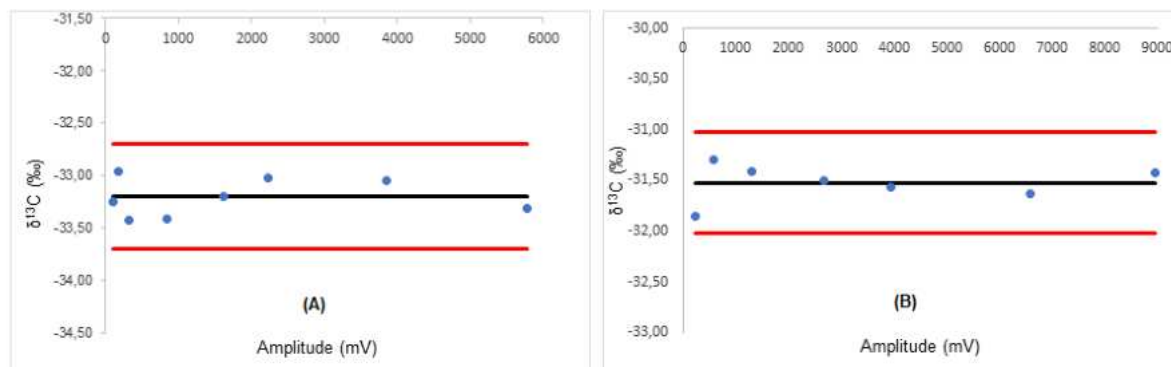
Tabela 8 - Resultados obtidos no experimento de linearidade do 6 β -OH_Ac.

Massa injetada (ng)	Amplitude média (mV)	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)				
		Curva 1	Curva 2	Curva 3	Média	Desvio-padrão*
10	297	-31,9	-31,8	-31,8	31,8	0,1
20	677	-31,0	-31,8	-31,1	31,3	0,4
40	1398	-31,4	-31,6	-31,2	31,4	0,2
80	2738	-31,3	-31,7	-31,5	31,5	0,2
120	4250	-31,6	-31,7	-31,5	31,6	0,1
250	6869	-31,6	-31,6	-31,7	31,6	0,04
400	8965	-31,5	-31,4	-31,4	31,4	0,03
Média (‰)		-31,5				
Média - 0,5 (‰)		-32,0				
Média + 0,5 (‰)		-31,0				
Desvio-padrão (‰)		0,2				

*Para os resultados que, arredondados para uma casa decimal, eram iguais a zero, foram apresentados resultados com duas casas decimais.

A Figura 21 apresenta a avaliação distribuição gráfica dos pontos analisados no experimento da linearidade. Diferentemente dos métodos de análise quantitativa convencionais, a linearidade do equipamento para análise isotópica avalia a faixa de amplitudes de pico que produz valores de $\delta^{13}\text{C}$ consistentes, ou seja, dentro do valor médio de $\pm 0,5$ ‰. Essa amplitude de pico, em amostras reais, é resultante não apenas da concentração do analito na amostra, mas também do volume de amostra extraído e do volume de injeção. A linearidade do equipamento foi testada para as duas substâncias e os resultados obtidos foram satisfatórios para ambas.

Figura 21 - Distribuição dos pontos em suas faixas lineares de amplitude de pico na análise por CG/C/EMRI.



A linha em preto representa o valor de $\delta^{13}\text{C}$ médio e as linhas em vermelho representam a faixa de média $\pm 0,5\%$. Em (A) 6 α -OH_Ac e em (B) 6 β -OH_Ac.

As faixas lineares obtidas foram comparáveis às de outros métodos reportados na literatura para análise de 6 α -OH_Ac, 6 β -OH_Ac e outros esteroides endógenos, cujos limites inferiores variam em torno de 200 mV a 500 mV para a análise de diferentes esteroides (DE OLIVEIRA *et al.*, 2019; PIPER; THEVIS, 2022; POLET *et al.*, 2014).

4.4.2 Limite de quantificação

A faixa de trabalho foi definida como a faixa de concentração em que o desvio-padrão de $\delta^{13}\text{C}$, na urina, deve ser menor o igual a 0,5 ‰. Além disso, foi definido que o método analítico desenvolvido deve gerar resultados que estão dentro da faixa linear, com exatidão e precisão para a faixa de concentração testada. A

Tabela 9 e Tabela 10 apresentam os resultados obtidos no experimento de faixa de trabalho.

Tabela 9 - Determinação da faixa de trabalho para 6 α -OH_Ac.

Concentração (ng/mL)	Amplitude (mV)	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)
5	1179	-33,4
10	2851	-33,1
20	2872	-33,7
40	2096	-34,2
60	1769	-34,1
Média (‰)		-33,7
Desvio-padrão (‰)		0,4

Tabela 10 - Determinação da faixa de trabalho para 6 β -OH_Ac.

Concentração (ng/mL)	Amplitude (mV)	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)
5	1081	-31,1
10	1745	-31,5
20	1963	-31,6
40	1529	-31,7
60	1524	-31,5
Média (‰)		-31,5
Desvio-padrão (‰)		0,2

Para os dois analitos, foram obtidos resultados satisfatórios e consistentes, com desvio-padrão dentro do limite de aceitação, menor do que 0,5 ‰.

A partir desses resultados, a concentração de 5 ng/mL foi considerada como possível limite de quantificação (LQ) para ambos os analitos, ou seja, a menor concentração presente na amostra cuja razão isotópica se pode determinar com precisão. Essa concentração corresponde a 50 % da concentração mínima a partir da qual a análise por CG/C/EMRI é requerida para confirmação de 6 α -OH.

A Wada define o LQ para a análise por CG/C/EMRI como a menor concentração do analito em urina que, analisada em triplicata, produz um pico com amplitude dentro da faixa linear do equipamento com um desvio-padrão entre os valores de $\delta^{13}\text{C}$ menor ou igual a incerteza combinada do método (WADA, 2022). As alíquotas analisadas foram de 25 mL. A Tabela 11 e a Tabela 12 apresentam os resultados de LQ. A concentração a 10 ng/mL também foi testada para ambos os

analitos para o caso de a concentração mais baixa não atender aos critérios estabelecidos.

Tabela 11 - Determinação do limite de quantificação para 6 α -OH_Ac.

Concentração (ng/mL)	Amplitude média (mV)	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)					
		Curva 1	Curva 2	Curva 3	Média	Desvio- padrão	u_c^*
5	1517	-32,3	-32,4	-33,3	-32,7	0,5	0,6
10	2812	-33,4	-33,7	-33,5	-33,5	0,1	0,6

*A obtenção deste dado será discutida no item 654.4.3.2.

Tabela 12 - Determinação do limite de quantificação para 6 β -OH_Ac.

Concentração (ng/mL)	Amplitude média (mV)	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)					
		Curva 1	Curva 2	Curva 3	Média	Desvio- padrão	u_c^*
5	1372	-31,7	-31,5	-31,6	-31,6	0,1	0,2
10	2545	-31,6	-31,5	-31,8	-31,6	0,1	0,2

*A obtenção deste dado será discutida no item 654.4.3.2.

Conforme os resultados apresentados para ambos os analitos, os desvios-padrão obtidos na triplicata foram menores do que as respectivas incertezas combinadas do método. Portanto, os LQ foram definidos a 5 ng/mL para 6 α -OH_Ac e 6 β -OH_Ac.

4.4.3 Precisão

Para a medição da razão isotópica, é essencial considerar a contribuição das incertezas atrelada a todo o método analítico para a interpretação de resultados. Portanto, é necessário utilizar a matriz de análise para incluir qualquer possível inferência de matriz, hidrólise, acetilação, separação e purificação cromatográfica em todo o procedimento.

Sendo assim, a precisão do método desenvolvido foi avaliada sob condições de precisão intraensaio (repetibilidade) e precisão interensaio e precisão intermediária.

4.4.3.1 Precisão intermediária

A precisão intermediária foi avaliada através do preparo de 16 replicatas de amostra de duas urinas diferentes (feminina e masculina) fortificadas com os analitos, por dois analistas e em dias diferentes. A repetibilidade, também chamada de precisão intraensaio, é avaliada através do mesmo experimento utilizado para determinar a precisão intermediária dos analitos, através do cálculo da raiz quadrada da variância dentro do grupo.

A Tabela 13 e a Tabela 14 apresentam os resultados obtidos. O valor de precisão intermediária obtido foi igual a 0,6 ‰ para o analito 6 α -OH_Ac e 0,1 ‰ para 6 β -OH_Ac e de repetibilidade igual a 0,3 ‰ para 6 α -OH_Ac e 0,1 ‰ para 6 β -OH_Ac.

Tabela 13 - Precisão intermediária do método para 6 α -OH_Ac.

$\delta^{13}\text{C}$ (‰)								
Urina	1 (feminina, C = 10 ng/mL)				2 (masculina, C = 25 ng/mL)			
Analista	1		2		1		2	
Dia	1	2	1	2	1	2	1	2
R1	-33,4	-34,1	-32,8	-33,3	-34,0	-33,6	-33,0	-33,6
R2	-33,4	-33,6	-32,3	-33,3	-34,1	-33,1	-33,6	-33,5
R3	-33,2	-34,3	-32,5	-33,3	-34,1	-32,9	-33,1	-33,6
R4	-33,8	-34,0	-32,1	-32,9	-34,0	-33,7	-33,5	-33,6
Média (‰)	-33,3				-33,6			
Repetibilidade (‰)	0,3				0,3			
Precisão Interensaio (‰)	0,6				0,3			
Precisão Intermediária (‰)	0,6							

Tabela 14 - Precisão intermediária do método para 6β-OH_Ac.

$\delta^{13}\text{C}$ (‰)								
Urina	1 (feminina, C = 10 ng/mL)				2 (masculina, C = 25 ng/mL)			
Analista	1		2		1		2	
Dia	1	2	1	2	1	2	1	2
R1	-31,1	-30,9	-31,1	-31,3	-31,5	-31,5	-31,4	-31,1
R2	-31,3	-31,3	-31,2	-31,3	-31,5	-31,5	-31,3	-31,6
R3	-31,2	-31,3	-30,9	-31,3	-31,5	-31,6	-31,5	-31,5
R4	-31,2	-31,3	-31,2	-31,2	-31,5	-31,4	-31,6	-31,6
Média (‰)	-31,2				-31,5			
Repetibilidade (‰)	0,1				0,1			
Precisão Interensaio (‰)	0,04				Insignificante			
Precisão Intermediária (‰)	0,1							

A precisão interensaio para a urina 2 não foi possível calcular pois, no caso dos dados obtidos para esse grupo, a variação entre os grupos foi menor do que a variação dentro do grupo. Sendo assim, a equação para o cálculo da precisão interensaio ($S_b = \sqrt{\frac{\text{var}_{\text{entre os grupos}} - \text{var}_{\text{dentro do grupo}}}{n}}$) não tem solução real. Essa exceção está descrita na Nota Técnica da Wada para Laboratórios que sugere, nesse caso, que a precisão intermediária deve ser igual a repetibilidade. (MAGNUSSON; ÖRNEMARK, 2014)

4.4.3.2 Exatidão e incerteza combinada

A incerteza da medição (u_c) é estimada para cada esteroide como a raiz quadrada da soma dos quadrados da precisão intermediária e da exatidão. O cálculo desse parâmetro envolve todo o procedimento de preparo de amostras.

Aplicado à técnica de CG/C/EMRI, a exatidão é um parâmetro associado à ausência de fracionamento isotópico, que pode ocorrer durante todo o processo de preparo de amostras e que influencia no valor obtido do $\delta^{13}\text{C}$.

A exatidão foi calculada através da diferença entre o valor de $\delta^{13}\text{C}$ dos padrões utilizados no experimento de linearidade instrumental ($\delta^{13}\text{C}$ esperado) e o obtido no experimento de precisão ($\delta^{13}\text{C}$ observado), através da análise de alíquotas de urina fortificadas com o padrão do analito e submetidas a todo o procedimento de preparo e análise das amostras. A Tabela 15 apresenta os resultados obtidos. A incerteza combinada obtida foi igual a 0,6 ‰ para o analito 6 α -OH_Ac e 0,2 ‰ para 6 β -OH_Ac.

Tabela 15 - Incerteza combinada estimada a partir da exatidão e precisão intermediária do método para 6 α -OH_Ac e 6 β -OH_Ac.

	6 α -OH_Ac	6 β -OH_Ac
Valor esperado (‰)	-33,2	-31,5
Valor observado (‰)	-33,4	-31,3
Exatidão (‰)	0,2	0,2
Precisão intermediária (‰)*	0,6	0,1
u_c (‰)	0,6	0,2

*Ver Tabelas 13 e 14.

5 CONCLUSÃO

Um método de análise para determinar a razão isotópica de carbonos de 6α -OH e 6β -OH foi desenvolvido e validado.

Foram desenvolvidas as condições de análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e cromatografia gasosa acoplada a forno de combustão e a espectrometria de massas por razão isotópica (CG/C/EMRI). O método desenvolvido utiliza a mesma alíquota de urina para a confirmação da origem exógena de 6-Oxo e confirmação de testosterona e seus marcadores endógenos.

A validação atendeu às exigências da Wada explicitadas no TD2022IRMS.

A linearidade do instrumento é comparável a de outros métodos reportados na literatura para análise de diferentes esteroides. Para ambos os analitos, foi obtido um LQ com concentração correspondente a 50 % da concentração mínima requerida pela Wada para análise por CG/C/EMRI na confirmação de 6α -OH. Foram obtidos valores de precisão e exatidão satisfatórios, a partir dos quais foram estimados os valores de incerteza combinada do método, que foram menores do que 1,0 ‰.

Os resultados obtidos nos ensaios de validação garantem a adequação do método para distinguir a origem endógena ou exógena de metabólitos de 6-Oxo na matriz urina.

Como perspectivas futuras, propõe-se a modificação do CLAE1 utilizado para a análise de confirmação de testosterona, a fim de melhorar a interação com a fase estacionária e a retenção de 6α -OH e 6β -OH e então eliminar a necessidade de três etapas de CLAE. Além disso, propõe-se a realização de um estudo de excreção para a avaliação da performance do método desenvolvido.

REFERÊNCIAS

AQUINO NETO, F. R. de. O papel do atleta na sociedade e o controle de dopagem no esporte. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 7, n. 4, p. 138–148, 2001.

BECCHI, M.; AGUILERA, R.; FARIZON, Y.; FLAMENT, M. -M; CASABIANCA, H.; JAMES, P. Gas chromatography/combustion/isotope-ratio mass spectrometry analysis of urinary steroids to detect misuse of testosterone in sport. **Rapid communications in mass spectrometry : RCM**, v. 8, n. 4, p. 304–308, 1994.

CAWLEY, A. T.; FLENKER, U. The application of carbon isotope ratio mass spectrometry to doping control. **Journal of mass spectrometry : JMS**, v. 43, n. 7, p. 854–864, jul. 2008.

CAWLEY, A. T.; TROUT, G. J.; KAZLAUSKAS, R.; HOWE, C. J.; GEORGE, A. V. Carbon isotope ratio ($\delta^{13}\text{C}$) values of urinary steroids for doping control in sport. **Steroids**, v. 74, n. 3, p. 379–392, 2009.

CUNHA, T. S.; CUNHA, N. S.; MOURA, M. J. C. S.; MARCONDES, F. K. Esteróides anabólicos androgênicos e sua relação com a prática desportiva. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, n. 2, p. 165–179, jun. 2004.

DE LA TORRE, X.; 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**, v. 756, p. 23–29, 5 dez. 2012.

DE OLIVEIRA, F. A.; CASILLI, A.; PIPER, T.; DA SILVA, T. R.; DA SILVA, C. A.; DA SILVA, R. V. S.; DAL SASSO, M. A.; SALGUEIRO, G. R. D. S. G.; PADILHA, M. C.; PEREIRA, H. M. G.; THEVIS, M.; DE 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**, v. 91, n. 18, p. 11747–11756, 2019.

DE RONDE, W.; DE JONG, F. H. Aromatase inhibitors in men: Effects and therapeutic options. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 9, n. January 2011, 2011.

DEVENTER, K.; VAN EENOO, P.; MIKULČÍKOVÁ, P.; VAN THUYNE, W.; DELBEKE, F. T. Quantitative analysis of androst-4-ene-3,6,17-trione and metabolites in human urine after the administration of a food supplement by liquid chromatography/ion trap-mass spectrometry. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 828, n. 1–2, p. 21–26, 2005.

JANSSENS, G.; COURTHEYN, D.; MANGELINCKX, S.; PRÉVOST, S.; BICHON, E.; MONTEAU, F.; DE POORTER, G.; DE KIMPE, N.; LE BIZEC, B. Use of isotope ratio mass spectrometry to differentiate between endogenous steroids and synthetic homologues in cattle: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 772, p. 1–15, 2013.

KOZŁOWSKA, E.; URBANIAK, M.; KANCELISTA, A.; DYMARSKA, M.; KOSTRZEWA-SUSŁOW, E.; STĘPIEŃ, Ł.; JANECZKO, T. Biotransformation of dehydroepiandrosterone (DHEA) by environmental strains of filamentous fungi. **RSC Advances**, v. 7, n. 50, p. 31493–31501, 2017.

KUMAR, V.; SHARMA, A.; KUMAR SONI, J.; PAWAR, N.; VIMAL KUMAR, C. Physiological response of C3, C4, and CAM Plants in Changeable Climate. **The Pharma Innovation Journal**, v. 6, n. 9, p. 70–79, 2017.

MAGNUSSON, B.; ÖRNEMARK, U. **Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics**. 2° ed. , 36–37 p, 2014.

MEIER-AUGENSTEIN, W. Applied gas chromatography coupled to isotope ratio mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 842, n. 1–2, p. 351–371, 1999.

NUMAZAWA, M.; MUTSUMI, A.; TACHIBANA, M. Mechanism for aromatase inactivation by a suicide substrate, androst-4-ene-3,6,17-trione. The 4 β ,5 β -epoxy-19-oxo derivative as a reactive electrophile irreversibly binding to the active site. **Biochemical Pharmacology**, v. 52, n. 8, p. 1253–1259, 1996.

PIPER, T.; MARECK, U.; GEYER, H.; FLENKER, U.; THEVIS, M.; PLATEN, P.; SCHÄNZER, W. Determination of ¹³C/¹²C ratios of endogenous urinary steroids: method validation, reference population and application to doping control purposes. **Rapid communications in mass spectrometry : RCM**, v. 22, n. 14, p. 2161–2175, 2008.

PIPER, T.; THEVIS, M. Addressing recent challenges in isotope ratio mass

spectrometry: Development of a method applicable to 1-androstene-steroids, 6 α -hydroxy-androstenedione, and androstatrienedione. **Drug Testing and Analysis**, v. 14, n. 11–12, p. 1891–1903, 2022.

POLET, M.; VAN RENTERGHEM, P.; VAN GANSBEKE, W.; VAN EENOO, P. Studies on the minor metabolite 6 α -hydroxy-androstenedione for doping control purposes and its contribution to the steroid profile. **Drug Testing and Analysis**, v. 6, n. 10, p. 978–984, 2014.

VAN RENTERGHEM, P.; POLET, M.; BROOKER, L.; VAN GANSBEKE, W.; VAN EENOO, P. Development of a GC/C/IRMS method – Confirmation of a novel steroid profiling approach in doping control. **Steroids**, v. 77, n. 11, p. 1050–1060, 2012.

VAN THUYNE, W.; VAN EENOO, P.; MIKULČIKOVÁ, P.; DEVENTER, K.; DELBEKE, F. T. Detection of androst-4-ene-3,6,17-trione (6-OXO®) and its metabolites in urine by gas chromatography-mass spectrometry in relation to doping analysis. **Biomedical Chromatography**, v. 19, n. 9, p. 689–695, 2005.

VARI, C. E.; ÓSZ, B. E.; MIKLOS, A.; BERBECARU-IOVAN, A.; TERO-VESCAN, A. Aromatase inhibitors in men – off-label use, misuse, abuse and doping. **Farmacia**, v. 64, n. 6, p. 813–818, 2016.

WADA, A. M. A. WADA Technical Document – TD2021EAAS - Measurement and Reporting of Endogenous Anabolic Androgenic Steroids (EAAS) Markers of the Urinary Steroid Profile. 2021a.

WADA, A. M. A. WADA Technical Letter – TL21 – In situ formation of 4-androstene-3,6, 17-trione (6-oxo) and metabolites. v. 2, 2021b.

WADA, A. M. A. WADA Technical Document – TD2022IRMS - Detection of Synthetic Forms of Prohibited Substances by GC/C/IRMS. v. 1, 2022.

ZHANG, Y.; TOBIAS, H. J.; SACKS, G. L.; THOMAS BRENNAN, J. Calibration and data processing in gas chromatography combustion isotope ratio mass spectrometry. **Drug Testing and Analysis**, v. 4, n. 12, p. 912–922, 2012.