

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

INSTITUTO DE QUÍMICA

LAIZI CHAVES NEIFE DOS SANTOS

**OTIMIZAÇÃO DE MÉTODO DE *DRIED BLOOD SPOT* (DBS) PARA O
CONTROLE DE DOPAGEM DE ESTIMULANTES E GLICOCORTICOIDES
POR TÉCNICA DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA
ACOPLADA A ESPECTROMÉTRIA DE MASSAS (CLAE-EM)**

Rio de Janeiro

2023

LAIZI CHAVES NEIFE DOS SANTOS

**OTIMIZAÇÃO DE MÉTODO DE *DRIED BLOOD SPOT* (DBS) PARA O
CONTROLE DE DOPAGEM DE ESTIMULANTES E GLICOCORTICÓIDES
POR TÉCNICA DE CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA
ACOPLADA A ESPECTROMÉTRIA DE MASSAS (CLAE-EM)**

Projeto final de curso apresentado ao Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de bacharel em Química com Atribuições Tecnológicas.

Orientadores: Dra. Carina de Souza Anselmo

Prof. Dr. Henrique Marcelo Gualberto Pereira

Rio de Janeiro

2023

**OTIMIZAÇÃO DE MÉTODO DE *DRIED BLOOD SPOT* (DBS) PARA O
CONTROLE DE DOPAGEM DE ESTIMULANTES E GLICOCORTICOIDES
POR TÉCNICA DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA
ACOPLADA A ESPECTROMÉTRIA DE MASSAS (CLAE-EM)**

LAIZI CHAVES NEIFE DOS SANTOS

Projeto Final de Curso submetido ao Corpo Docente do Instituto de Química, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Químico com Atribuições Tecnológicas.

Data da Aprovação: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA:

CIP - Catalogação na Publicação

C237o Chaves Neife dos Santos, Laizi
OTIMIZAÇÃO DE MÉTODO DE DRIED BLOOD SPOT (DBS)
PARA O CONTROLE DE DOPAGEM DE ESTIMULANTES E
GLICOCORTICÓIDES POR TÉCNICA DE CROMATOGRAFIA
LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA A
ESPECTROMÉTRIA DE MASSAS (CLAE-EM) / Laizi Chaves
Neife dos Santos. -- Rio de Janeiro, 2023.
55 f.

Orientador: Henrique Marcelo Gualberto Pereira.
Coorientadora: Carina de Souza Anselmo.
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto
de Química, Bacharel em Química, 2023.

1. dopagem. 2. DBS. 3. Cromatografia. 4. sangue.
I. Marcelo Gualberto Pereira, Henrique, orient. II.
de Souza Anselmo, Carina, coorient. III. Título.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha mãe e minha irmã, Vera e Tais, pelo apoio dado durante toda minha graduação, por terem acreditado no meu potencial e nos meus sonhos.

Aos meus orientadores, Dra. Carina Anselmo e Prof. Henrique Pereira, que me ensinaram muito sobre a pesquisa, a profissão, o controle antidopagem, e que tiveram paciência e disponibilidade de me auxiliar na reta final da minha graduação.

À Mariana Vaz cuja amizade encontrei de forma inesperada, porém muito natural. Agradeço por ter me escutado, rido comigo e me ajudado sempre, minha passagem pelo LBCD não teria sido o mesmo sem a sua pessoa.

A todo corpo docente do Instituto de Química da UFRJ, em especial ao professor Rodolfo Barbosa que em momentos difíceis forneceu palavras de apoio, aconselhou da melhor maneira possível, foi um exemplo de profissional e me ensinou que nem tudo precisa ser imediato.

Aos meus amigos, Hylana Pereira e Gustavo Oliveira, que ouviram minhas preocupações, piadas, alegrias e decepções ao longo dos anos, e que me impulsionaram para terminar essa etapa com o apoio que me dão e deram desde sempre. À Luan de Holanda, Lucas Raggio, Lucas Cavalvanti, Karoline Silva, Hiasmin Sodré, Nichollas Gomes, João Meirelles, Flavia Rodrigues e Vitor Bakker, meu muitíssimo obrigada, nada teria sido igual sem vocês como meus amigos. Aos meus amigos do ICCP, obrigada por me ensinarem a levar a vida de forma mais leve.

À Geovana, que com pouco tempo deu carinho, luz e paz a preocupações velhas e novas que surgiram ao fim desse novo ciclo, e que me fez ter esperanças de que esse é só o começo de algo muito melhor, obrigada pelo amor e companheirismo, espero compartilhar muitas coisas boas com você de agora em diante.

A todo grupo do LADETEC, em especial William Ribeiro, Danielly Oliveira, Ana Carolina Duarte, Juliana Castro e Gabriel Carneiro pela paciência em me ensinar tudo sobre o laboratório. Ao grupo de pesquisa do LPDI que me ajudou sempre. A todos não citados aqui, mas que estiveram comigo nesse caminho meu muito obrigada.

RESUMO

PROJETO DE CURSO

TÍTULO: OTIMIZAÇÃO DE MÉTODO DE *DRIED BLOOD SPOT* (DBS) PARA O CONTROLE DE DOPAGEM DE ESTIMULANTES E GLICOCORTICOIDES POR TÉCNICA DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA A ESPECTROMETRO DE MASSAS (CLAE-EM)

ALUNA: Laizi Chaves Neife dos Santos

ORIENTADORES: Carina de Souza Anselmo (LBCD – UFRJ) e Henrique Marcelo Gualberto Pereira (DQA – UFRJ)

A técnica de *Dried Blood Spot* (DBS) utiliza de quantidades pequenas de amostra de sangue, que são aplicadas a um cartão celulósico, para sua análise. Nos últimos anos a sua utilização no controle de dopagem tem sido frequentemente estudada por iniciativa da Agência Mundial Antidopagem (WADA), cujas atribuições incluem a definição de quais substâncias são proibidas e harmonizar os parâmetros de detecção dos laboratórios por ela acreditados. Com a vigência de documento técnico (TD) publicado pela WADA que prevê o uso de DBS, criou-se a necessidade do desenvolvimento de um método com tal abordagem no Laboratório Brasileiro de Controle de Dopagem (LBCD). Portanto, com o objetivo de incluí-lo no escopo de métodos acreditados do LBCD, foi desenvolvido um método na matriz DBS visando a detecção de glicocorticoides e dos estimulantes por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (CLAE-EM). Para isso foram avaliados parâmetros do procedimento de extração como: solução de extração, tempo de banho de ultrassom e influência do hematócrito. Além disso, foi também realizada a validação do método de acordo com critérios definidos pelo *International Standard for Laboratories*. Como resultado foi desenvolvido e validado um método eficiente para a detecção das substâncias estudadas, sem a influência de hematócrito e com média de rendimento de extração de 83%. O procedimento desenvolvido, e os resultados gerados pela aplicação deste, agrega informações sobre o comportamento de estimulantes e glicocorticoides na matriz DBS, corroborando para a geração de critérios na aplicação este tipo de análise no monitoramento de substâncias proibidas em competição.

ABSTRACT

TITLE: OPTMIZATION OF A DRIED BLOOD SPOT (DBS) ASSAY FOR THE ANALYSIS OF STIMULANTS AND GLUCOCORTICOIDS USING HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY MASS SPECTROMETRY (HPLC-MS)

AUTHOR: Laizi Chaves Neife dos Santos

THESIS ADVISORS: Carina de Souza Anselmo (LBCD – UFRJ) and Henrique Marcelo Gualberto Pereira (DQA - UFRJ)

Having been used for clinical purposes for a long time, the Dried Blood Spot (DBS) technique uses small amounts of sample, which are applied to a cellulosic card, for its analysis. In recent years its application on doping control has been frequently developed at the initiative of the World Anti-Doping Agency (WADA). WADA is the agency responsible for the establishment of which methods and substances are prohibited, and for the harmonization of the detection parameters of the laboratories accredited worldwide. The publishing of the technical document (TD) and its authorization for accredited laboratories on the use of DBS has made the development of a method essential for the Laboratório Brasileiro de Controle de Dopagem (LBCD). Therefore, a DBS method for the analysis of some glucocorticoids and stimulants was developed with the goal to include it in the scope of methods used at LBCD on routine analysis. With that objective, some parameters of the extraction procedure were investigated, such as: extraction solution, ultrasonic bath time, influence of hematocrit. Furthermore, the validation of the method was performed according to the International Standard for Laboratories (ISL) by WADA. As a result, an efficient method was developed and validated for an evaluation of the studied substances, without influence of hematocrit and with a mean yield of 83%.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Substâncias proibidas em estudo da classe dos estimulantes.	21
Figura 2. Substâncias proibidas em estudo da classe dos Glicocorticóides.	23
Figura 3. Esquema de componentes de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). (Adaptada de: "Preparative HPLC.svg" de GYassineMrabetTalk).....	24
Figura 4. Etapas do processo de ionização por eletrospray (ESI) (FENN et al., 1989).	26
Figura 5. Esquema do analisador Q-Exactive Quadrupolo: 1) Fonte de ESI; 2) Cone de Skimmer; 3) Lentes focalizadoras; 4) Sistema condutor curvo; 5) Quadrupolo; 6) Célula de colisão; 7) C-Trap; 8) Analisador de massas Orbitrap. (Adaptado de: Creative Proteomics)..	27
Figura 6. Procedimento de extração para método de DBS.....	33
Figura 7. Procedimento de mimetização de hematócritos para teste de Influência de Hematócrito.	34
Figura 8. Gráfico do ensaio de recuperação prévia (n=3).	37
Figura 9. Resultados de recuperação para tempo de banho de ultrassom de 10 e 30 minutos (n=4).	39
Figura 10. Ensaio de rendimento de extração com soluções de extração: (Sol 1) metanol:acetonitrila: água acidificada a 2% por ácido acético (1:1:1); (Sol 2) metanol:acetonitrila (1:1) e (Sol 3) metanol:éter metil terc-butilico (1:1) (n=4).	40
Figura 11. Valores de hematócrito de 60, 50, 40 e 30% aplicados em papel Whatman 903 TM	42
Figura 12. Comparação de desvio padrão relativo (DPR) para furador e tesoura.	44
Figura 13. Cromatogramas de controle negativo (CN1 à CN3) e controle positivo (LOD1_1 à LOD1_3) da substância N,N-didesmetilsibutramina para teste de seletividade. .	46
Figura 14. 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) branco de urina.	47

Figura 15. Estruturas moleculares do Isometepteno Mucato e do Isometepteno Aranthol.

.....49

LISTA DE SIGLAS

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

COI – Comitê Olímpico Internacional

DBS – *Dried Blood Spot*

EM – Espectrometria de Massas

EMAR – Espectrometria de Massas de Alta Resolução

ESI – *Electron Spray Ionization*

ISL – *International Standards for Laboratories*

LOD – Limite de Detecção

MRL – *Minimum Reporting Levels*

MRPL - *Minimum Required Performance Levels*

PI – Padrão Interno

TDAH - Transtorno do Déficit de Atenção com Hiperatividade

WADA – *World Anti-Doping Agency*

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	13
1.1.	Controle de Dopagem.....	13
1.2.	Tipos de amostragem no Controle de Dopagem	14
1.3.	<i>Dried Blood Spot</i> (DBS).....	16
1.4.	Influência do Hematócrito.....	17
1.5.	<i>Status</i> atual da análise de agentes dopantes no Laboratório Brasileiro de Controle de Dopagem	18
1.6.	Substâncias proibidas em competição	19
1.6.1.	Estimulantes	20
1.6.2.	Glicocorticoides.....	22
1.7.	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	23
1.8.	Espectrometria de Massas de Alta Resolução (EMAR).....	25
1.9.	Validação	28
1.9.1.	Seletividade	28
1.9.2.	Estabilidade das amostras extraídas	28
1.9.3.	Arraste	29
1.9.4.	Rendimento de Extração.....	29
1.9.5.	Limite de Detecção (LOD).....	29
2.	OBJETIVO	30
2.1.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
3.	MATERIAL E MÉTODOS.....	31
3.1.	Solventes e Reagentes	31
3.2.	Procedimento de Extração.....	31
3.3.	Análise Estatística	33

3.4.	Análise Instrumental.....	34
3.5.	Avaliação da Influência do Hematócrito	34
3.6.	Validação	35
3.6.1.	Seletividade	35
3.6.2.	Estabilidade da amostra extraída	36
3.6.3.	Arraste	36
3.6.4.	Rendimento de Extração.....	36
3.6.5.	Limite de Detecção (LOD).....	36
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1.	Teste prévio do Procedimento de Extração	37
4.2.	Otimização dos parâmetros	38
4.2.1.	Tempo de Banho de Ultrassom	38
4.2.2.	Soluções de Extração.....	40
4.2.3.	Influência do Hematócrito e forma de corte.....	41
4.3.	Validação	46
4.3.1.	Seletividade	46
4.3.2.	Estabilidade das amostras extraídas	47
4.3.3.	Arraste	47
4.3.4.	Rendimento de Extração.....	48
4.3.5.	Limite de Detecção (LOD).....	49
5.	CONCLUSÃO.....	51
6.	REFERÊNCIAS	52

1. INTRODUÇÃO

1.1. Controle de Dopagem

O termo “dopagem” é definido como a violação de uma ou mais regras definidas pelo Código Internacional Antidopagem (WADA, 2021a), incluindo a presença de substâncias proibidas ou seus metabólitos na amostra de um atleta, a recusa em fornecer amostras, uso ou tentativa de uso de métodos proibidos (WADA, 2021a). A geração da evidência da dopagem no esporte é usualmente obtida pela análise de fluidos dos atletas, a fim de detectar a presença dos agentes dopantes ou de seus metabólitos (LUIZ *et al.*, 2019). A prática da dopagem é bastante difundida em competição de diversos níveis, e em vários países, sendo alvo de preocupação da comunidade internacional.

Com a constatação da 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 combate à dopagem. Uma das missões da WADA é harmonizar os esforços de controle de dopagem a nível mundial, 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, credenciações de laboratórios de dopagem e, principalmente, por estabelecer anualmente a lista de substâncias e métodos proibidos, denominada *The Prohibited List* (WADA, 2022a). Este documento determina quais substâncias e métodos são proibidos para os atletas, sendo estas monitoradas pelos laboratórios acreditados pela entidade, através da análise de amostra de sangue ou urina, coletados nos períodos em competição e fora de competição (LUIZ *et al.*, 2019).

A lista de substâncias proibidas da WADA é organizada por classes de acordo com a ação farmacológica. Como mencionado acima, dentro das classificações existem ainda as substâncias que são proibidas em competição, ou seja, cujo uso é vedado no intervalo de tempo a partir das vinte e três horas e cinquenta e nove minutos (23:59 h) do dia anterior à competição até a coleta. Alternativamente, determinadas classes de agentes dopantes proibidas permanentemente. Ou seja, o uso é proibido nos períodos denominados “dentro” ou “fora” de competição (WADA, 2022a).

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

Substâncias *threshold* são aquelas que precisam ser analisadas por um método quantitativo, com incerteza de medição definida, e cuja concentração do analito será o 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 na amostra.

Substâncias *non-threshold* sofrem ainda uma subclassificação, em um conjunto definido como um “Limite Mínimo para ser Reportada” (*Mimumun Reporting Levels*, MRL). O MRL é a concentração estimada do analito, avaliada por um método sem incerteza de medição definida. Deste modo, o método é classificado, a rigor, como qualitativo. O RAA é configurado apenas se a concentração estimada do analito estiver acima do MRL. Já substâncias que não possuem MRL devem ser reportadas sempre que identificadas, independente da sua concentração estimada, desde que atendam aos requisitos presentes nos documentos técnicos da WADA.

Para assegurar que todos os laboratórios acreditados consigam detectar e reportar as substâncias *non-threshold*, a WADA estabelece o Nível Mínimo de Desempenho Requerido (*Minimum Required Performance Levels*, MRPL), que deve ser entendido como a concentração mínima que os laboratórios precisam ser capazes de detectar por métodos cromatográficos associados a espectrometria de massas para manter suas creditações. O MRL, quando existente, poderá ser igual ou maior que o MRPL, porém nunca menor (WADA, 2022b).

Cabe ainda considerar o tempo de transporte até o laboratório, 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).

1.2. Tipos de amostragem no Controle de Dopagem

A forma de coleta de uma amostra biológica do atleta é um fator importante do processo de amostragem. Seguindo padrões internacionais determinados pela WADA, as amostras coletadas devem ser separadas de forma duplicada, denominadas amostras A e B, que serão

encaminhadas simultaneamente para os laboratórios acreditados. Essa dupla amostragem é realizada para que, em casos de Resultados Analíticos Adversos (RAA), uma amostra ainda lacrada (Amostra B) possa ser usada em um procedimento de contraprova, caso solicitado pelo atleta como confirmação da suspeita de dopagem.

Em tese, o controle de dopagem pode ter várias fontes de material biológico do atleta, tais como sangue, saliva, cabelo e urina. Porém, do ponto de vista operacional, apenas amostras de sangue e urina são hoje adotadas. Outro parâmetro a ser considerado é o alvo analítico do método em questão, já que algumas substâncias podem estar presentes na matriz biológica escolhida na forma inalterada, enquanto outras são metabolizadas totalmente ou parcialmente, 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, dentre os quais se destacam 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: 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.

1.3. Dried Blood Spot (DBS)

Dried blood spot (DBS), ou mancha de sangue seco, é uma forma de micro-amostragem existente a 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 pode-se citar: procedimento simples; demanda condições de transporte mais econômicas; não necessita de refrigeração; coleta menos invasiva 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 interferências 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).

Por conta das diversas vantagens da técnica de DBS citadas anteriormente e com o objetivo de utilizá-la no controle de dopagem, a WADA têm incentivado nos últimos anos o desenvolvimento de um método de análise por DBS pelos laboratórios acreditados. Atualmente, existe um documento técnico vigente desde setembro de 2021 (WADA, 2021b) que permite a análise por DBS dos laboratórios que possuem essa técnica.

Usualmente, os documentos técnicos da WADA versam sobre a harmonização de 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 Tóquio (2020) e Pequim (2022), sua primeira aplicação em eventos oficiais de grande porte. A inclusão de análises por DBS nos Jogos Olímpicos evidencia 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.

1.4. Influência do Hematócrito

Apesar de todas as vantagens do DBS, esta abordagem 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 à viscosidade do sangue, e logo inversamente proporcionais ao espalhamento das gotas de sangue no papel de DBS (O'MARA *et al.*, 2011).

Devido às diferenças de valores de hematócrito entre as amostras de sangue, *spots* de DBS de mesmo volume podem possuir áreas diferentes. Sangue com valores de hematócritos maiores tendem a ter um diâmetro menor de *spot*, em relação ao de hematócritos menores, devido a menor viscosidade destes últimos, o que leva a uma maior tendência de espalhamento na superfície do papel. Com isso, caso analisado uma área fixa de *spots* de hematócritos diferentes, é possível que haja uma diferença intrínseca de quantidade de matéria analisada

(KUMAR *et al.*, 2019). Sendo assim, para o desenvolvimento de um método de DBS é importante garantir condições que permitam a diminuição ou ausência da influência do hematócrito, de forma a garantir a confiabilidade da medição.

Atualmente, do ponto de vista prático, as análises por DBS implementadas em laboratórios acreditados pela WADA têm como escopo de análise a detecção de ésteres da testosterona, onde as possíveis variações interindivíduos dos valores de hematócritos não impactarão nos resultados das análises. No entanto, o documento técnico do DBS preconiza que todas as substâncias *non-threshold* sem MRL poderiam ser analisadas por DBS.

1.5. Status atual da análise de agentes dopantes no Laboratório Brasileiro de Controle de Dopagem

No controle de dopagem atual para as chamadas “pequenas moléculas”, que compreende os agentes dopantes de até 800 Da, o monitoramento é feito por meio da análise destas substâncias na matriz urina. Por se tratar de uma 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 (LBCD), a análise dessas substâncias nos procedimentos iniciais de análise (triagem) é realizada a partir da extração em fase sólida (SPE) para concentração e limpeza da amostra seguida de análise por CLAE-EM (OLIVEIRA, 2021).

O método de triagem do LBCD é bastante abrangente realizando o monitoramento de mais de 450 substâncias dopantes (dentre substâncias proibidas e seus metabólitos). Esse grupo de substâncias inclui tanto substâncias proibidas em competição quanto proibidas a todo tempo para os atletas, algumas das quais foram escolhidas para serem monitoradas pela técnica de DBS nesse estudo.

Para o desenvolvimento de um método de DBS para pequenas moléculas no LBCD é necessário o desenvolvimento de uma técnica de preparo de amostra considerando as especificidades desta amostragem e as diferenças entre as duas matrizes, urina e sangue seco.

1.6. 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, intervalo de tempo que se inicia as vinte e três horas e cinquenta e nove minutos (23:59 h) do dia anterior à competição até a coleta. As substâncias em competição aqui 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 conseqüentemente, uma forma de correlacionar as concentrações dessas substâncias na urina com os efeitos farmacológicos. Entretanto, os critérios para este diagnóstico ainda não estão estabelecidos justamente pela falta de dados que correlacionem os valores urinários aos plasmáticos.

Neste trabalho, foram abordadas substâncias *non-threshold* com MRL, apesar do documento técnico publicado pela WADA contemplar apenas a análise por DBS de substâncias *non-threshold* sem MRL, até o presente momento. A 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).

A falta de dados que comparem as concentrações plasmáticas e urinárias para essas substâncias servirão de motivador adicional.

Uma vez não se tendo critérios definidos para a análise por DBS, optou-se por extrapolar para essa matriz os valores de MRPL já estabelecidos para a matriz urina (Tabela 1). 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.

Tabela 1. Valores de MRPL determinados de cada substância pela WADA em urina (adaptada de TD2022MRPL).

Substância	MRPL (ng/mL)
Isometepteno	50
Isometepteno M1	50
<i>N,N</i> -didesmetilsibutramina	50
OH-bisdesmetilsibutramina	50
<i>N</i> -Desmetilsibutramina	50
Sibutramina	50
Metilfenidato	50
Ácido Ritalínico	50
Prednisona	300
Prednisolona	100
20 β -dihidroprednisolona	30
6 β -OH-prednisolona	30

1.6.1. 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 atlético. 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 1.

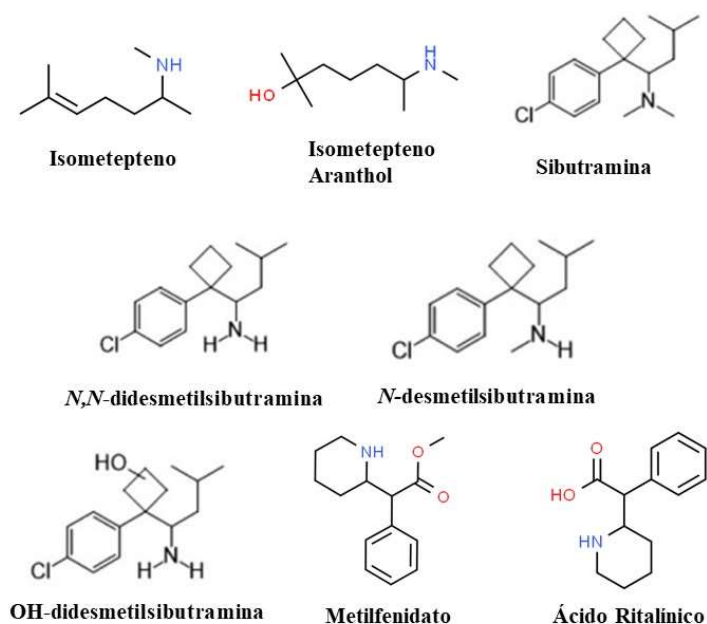


Figura 1. Substâncias proibidas em estudo da classe dos estimulantes.

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 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*-desmetil e a *N*-didesmetil-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, por vezes comercializado na forma de 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).

1.6.2. 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, tais como asma, questões da tireoide e artrites. 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 2.

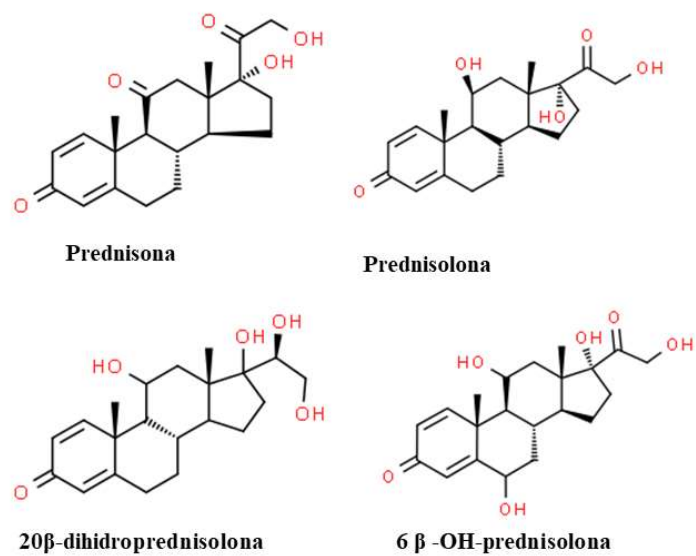


Figura 2. Substâncias proibidas em estudo da classe dos Glicocorticóides.

1.7. 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 3.

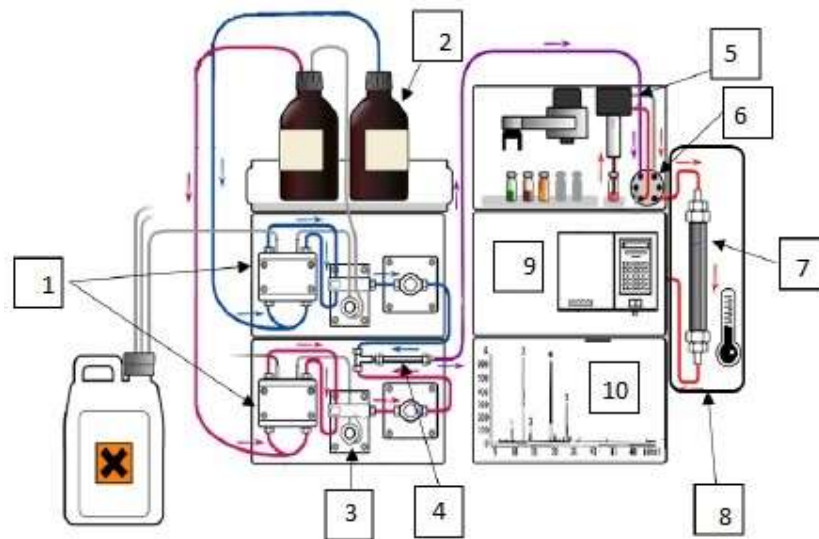


Figura 3. Esquema de componentes de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). (Adaptada de: "Preparative HPLC.svg" de GYassineMrabetTalk).

Dentre os componentes do CLAE, podemos enumerar: Bomba de alta pressão (Figura 3.1) é o sistema composto pela bomba e controladores de pressão e vazão, que são essenciais para que se mantenha o tempo de retenção, reprodutibilidade e sensibilidade entre as análises; Fases móveis (Figura 3.2) estão presentes normalmente em reservatórios de vidro com os solventes que constituem a fase móvel; Degaseificador (Figura 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 3.4) é o homogeneizador da mistura de fases móveis; Sistema de injeção da amostra (Figura 3.5 e 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 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 3.8) é o responsável por manter a temperatura da coluna constante; e o Detector (Figura 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 3.10).

1.8. 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).

A detecção por essa técnica, no entanto, exige que a amostra esteja em fase gasosa, o que foi uma vantagem para o seu emprego como detector na cromatografia gasosa. 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. 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).

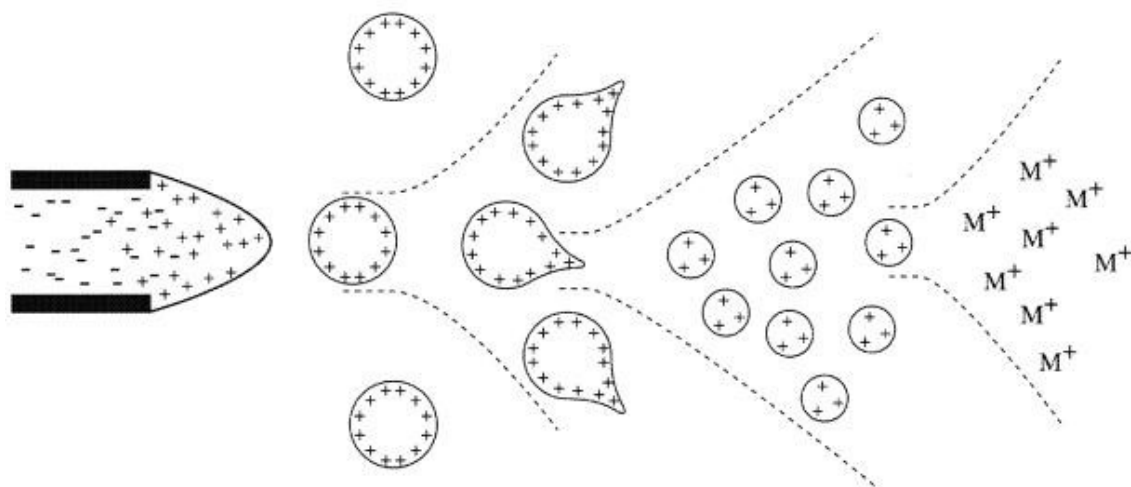


Figura 4. Etapas do processo de ionização por eletrospray (ESI) (FENN et al., 1989).

Na espectrometria de massas de alta resolução (EMAR), algumas tecnologias, como o QExactive permitem a detecção de moléculas com alta precisão de massa, chegando a cinco casas decimais. Este tipo de técnica consiste na utilização de quadropolos onde ocorre a aplicação de uma energia potencial nas barras paralelas oscilando de forma a carregar os íons a velocidade constante (SILVERSTEIN *et al.*, 2000), seguido da análise pelo sistema Orbitrap.

Inicialmente, após ionizados pela fonte ESI (Figura 5.1), os analitos são carregados pela diferença de pressão para dentro do cone de *Skimmer* (Figura 5.2). Após adentrarem no sistema os íons são conduzidos por lentes focalizadoras (Figura 5.3) (GROSS, 2011), seguido de um sistema condutor curvo, para remover quaisquer resíduos não ionizados (Figura 5.4). Em seguida o fluxo de íons chegará ao quadropolo (Figura 5.5). A oscilação da polaridade das barras do quadropolo realiza a condução e separação dos íons ao carregá-los ao longo do caminho a velocidade constante. Essa movimentação ordenada dos íons se dá pela aplicação simultânea de uma voltagem de corrente contínua e de radiofrequência (MARAKOV *et al.*, 2010).

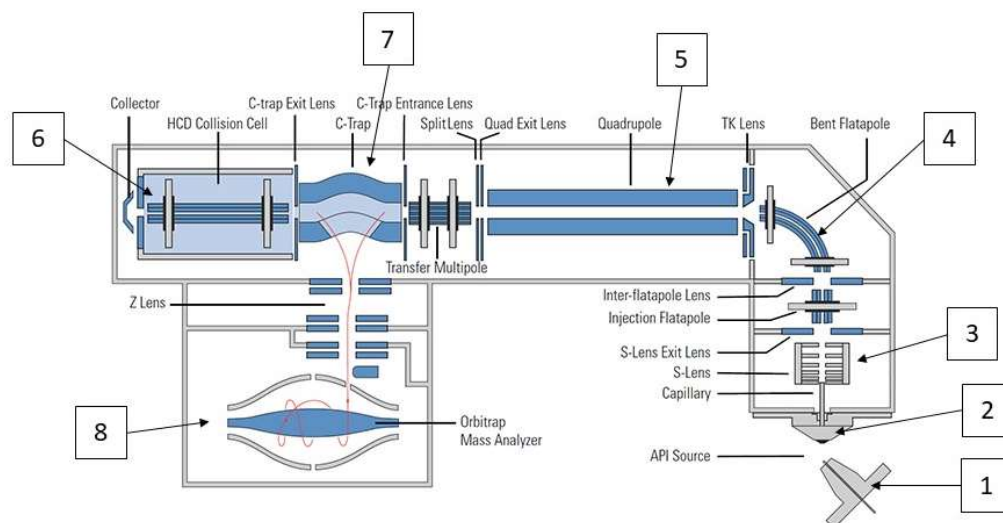


Figura 5. Esquema do analisador Q-Exactivo Quadrupolo: 1) Fonte de ESI; 2) Cone de Skimmer; 3) Lentes focalizadoras; 4) Sistema condutor curvo; 5) Quadrupolo; 6) Célula de colisão; 7) C-Trap; 8) Analisador de massas Orbitrap. (Adaptado de: Creative Proteomics).

Devido a aplicação de uma energia branda, esse tipo de análise não costuma promover a fragmentação dos íons até esta região do analisador. Por isso, para a realização da fragmentação é adicionada ao sistema uma célula de colisão (Figura 5.6) que realiza experimentos específicos de fragmentação de moléculas selecionadas para posterior detecção no analisador Orbitrap. Estes experimentos, normalmente utilizados para fins de elucidação e confirmação estrutural, geram um espectro de fragmentação.

Independente do emprego de experimentos de fragmentação ou apenas da leitura dos íons moleculares, em ambos os casos, antes da análise por meio do sistema Orbitrap os íons são acumulados na região chamada de C-trap (Figura 5.7). Esta tem por objetivo armazenar e acumular os íons para subsequente envio deles para o Orbitrap.

Devido ao emprego de um campo eletroestático no sistema do Orbitrap (Figura 5.8), ocorre a rotação dos íons em torno do eletrodo central de forma a gerar oscilações harmônicas a depender da massa do analito. A detecção ocorre então pela correlação entre a frequência das oscilações harmônicas e a razão de m/z dos analitos. A partir de uma transformada de Fourier, o sinal de frequência lido é correlacionado com um espectro de m/z de alta resolução (MARAKOV *et al.*, 2010).

1.9. 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, 2021), 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.

Logo, os parâmetros e critérios abordados nesse trabalho são: seletividade, estabilidade de amostra extraída, arraste, rendimento de extração 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).

1.9.1. 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).

1.9.2. 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).

1.9.3. 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.

1.9.4. 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 utilizado. 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 relação existente entre a resposta de uma quantidade de analito conhecida e presente na amostra que sofre procedimento de extração correlacionada com uma amostra em que a quantidade de analito é adicionada após a extração.

1.9.5. 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).

2. OBJETIVO

O objetivo geral do trabalho foi otimizar um método de análise por DBS utilizando CLAE-EM para a detecção de substâncias proibidas para atletas em competição para possível aplicação nas análises de rotina no controle de dopagem do esporte.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver de método de DBS com análise por CLAE-EM;
- Verificar da recuperação do método de DBS com análise por CLAE-EM;
- Verificar do potencial influência do hematócrito nas amostras de DBS;
- Validar o método de DBS de acordo com os requisitos exigidos pela WADA.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Solventes e Reagentes

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).

As substâncias de referência: Isometepteno Mucato, isometepteno M1 (2-metil-6-metilaminohept-2-ol), *N,N*-didesmetilsibutramina, OH-bisdesmetilsibutramina, *N*-desmetilsibutramina, sibutramina, metilfenidato, ácido ritalínico, prednisona, prednisolona, 20 β -dihidroprednisolona e 6 β -OH-prednisolona foram em sua maioria fornecidas pela *Sigma Aldrich* (St. Louis, EUA) e/ou pela *Logical* (Luckenwalde, Alemanha).

Os padrões internos utilizados para o pré-tratamento das amostras: 7-propil-teofilina (98%), cortisona-D8 e a efedrina-D3 foram obtidos respectivamente da *Life Chemicals* (Washington DC, EUA), pela *Toronto Research Chemicals* (Toronto, Canadá) e pela *Logical* (Luckenwalde, Alemanha). O cartão de aplicação do DBS, Whatman 903TM foi obtido da Whatman GE (Uppsala, Suécia).

3.2. Procedimento de Extração

Para a realização dos ensaios foi adaptado o procedimento de DBS descrito por Thomas e colaboradores (THOMAS *et al.*, 2011). Foram 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 de 195 μL foram transferidas para microtubos de 1,5 mL, correspondendo aos controles positivos e negativos. Os controles positivos foram preparados pela adição de 5 μL solução mix padrão dos analitos presentes na Tabela 1 em sangue total.

Os valores apresentados na Tabela 1 correspondem a concentração dos analitos em cada *spot* de 20 uL de DBS. Os controles negativos foram preparados pela adição de 20 uL sangue total, sem os analitos.

Em seguida, foram feitos *spots* desses controles nos cartões, Whatman 903TM, utilizando pipeta automática calibrada com um volume de 20µL. Os cartões foram deixados em repouso à temperatura ambiente para secagem por duas horas. Após secagem, os *spots* foram cortados dos cartões de coleta do DBS e transferidos para um microtubo de 1,5 mL, onde foram adicionados 5µL solução de padrão interno, 7-propilteofilina, cortisona-D8 e efedrina-D3 de concentração, 2 ng/µL, 3 ng/µL e 5 ng/µL, e em seguida adicionados 400µL da solução de extração de metanol:acetonitrila:água acidificada a 2% com ácido acético (1:1:1). Os tubos foram submetidos ao banho de ultrassom por 30 minutos. Após a retirada do banho de ultrassom 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 50µL da fase móvel aquosa/orgânica 80:20 (água/metanol). Esse extrato foi transferido para um vial e que foi injetado por método de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS). Uma representação do procedimento experimental pode ser encontrada na Figura 6.

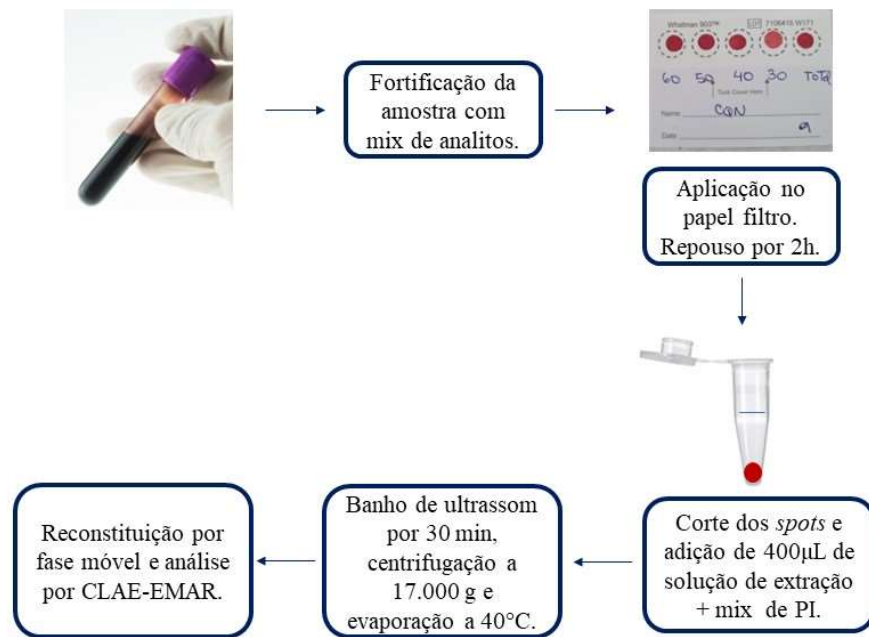


Figura 6. Procedimento de extração para método de DBS.

3.3. Análise Estatística

Para avaliação estatística de um dos ensaios de otimização foram realizados testes de análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de Tukey. A ANOVA é um teste de hipótese utilizado para comparar a variância entre as médias de grupos diferentes. Essa ferramenta pode ser usada para verificar se há diferença no resultado de diferentes cenários do mesmo experimento. Sua utilização foi feita pelo software *Past* (Oslo, Noruega), utilizando-se 5% de significância, caso o parâmetro p calculado seja menor que 0,05 existe diferença estatística entre as medições.

O teste de Tukey é utilizado para identificar através de múltiplas comparações entre quais grupos há diferença significativa, quando ela é detectada pela ANOVA. Esse teste também foi realizado pelo software *Past*. Para esse teste também é utilizado 5% de significância, e as amostras com $p < 0,05$ possuem diferença estatística entre si.

3.4. Análise Instrumental

O método instrumental utilizado 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 (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.

3.5. 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 (SYSMEX). Essa amostra em seguida passou por procedimento de mimetização de valores de hematócrito 30, 40, 50 e 60%, como descrito na Figura 7.

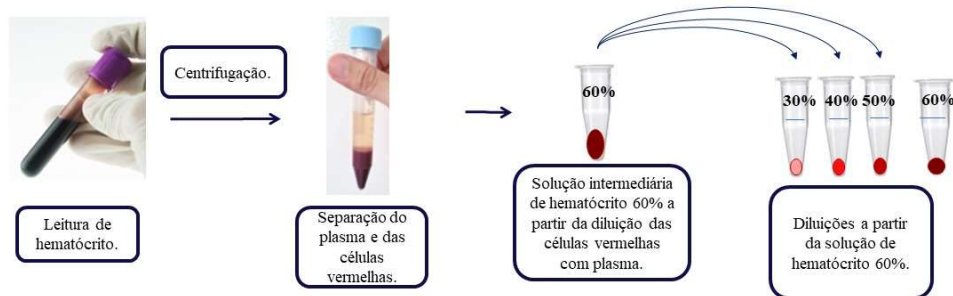


Figura 7. Procedimento de mimetização de hematócritos para teste de Influência de Hematócrito.

A mimetização dos valores de hematócrito se deu pela diluição das células vermelhas com o plasma para a formação de uma solução intermediária de hematócrito 60%. Dessa solução mãe foram retiradas alíquotas que foram novamente diluídas com plasma para que atingissem os valores de 30, 40 e 50% de hematócrito. Essas soluções passaram então pelo procedimento de extração. Brancos de sangue foram utilizados para cada valor de hematócrito.

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 esteja dentro da faixa de 85 a 115% (WAGNER *et al.*, 2016). Para o cálculo de acurácia foi também extraída uma amostra de sangue com valor de hematócrito não modificado, cujo resultado serviu como referência para a acurácia das outras substâncias.

3.6. Validação

Os ensaios de validação foram realizados utilizando dez amostras de sangue venoso fortificado com solução dos analitos de referência em concentração conhecida. Os padrões internos (PIs) utilizados foram a: Efedrina-D3, para os estimulantes e a Cortisona-D8, para os glicocorticoides.

O procedimento experimental foi utilizado para a validação foi baseado no documento *International Standards for Laboratories (ISL)* da WADA e nos parâmetros comumente abordados na literatura durante as validações de métodos de DBS com o objetivo de garantir resultados confiáveis para o controle de dopagem. Para isso, foram avaliados os parâmetros de: seletividade, estabilidade de amostra extraída, arraste, rendimento de extração e limite de detecção (LOD).

3.6.1. 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 os PIs para formar os controles positivos, e apenas com PIs para formar os controles negativos.

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

3.6.2. Estabilidade da amostra extraída

O teste de estabilidade de amostra extraída é realizado pela reinjeção das amostras do lote 24h 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.

3.6.3. Arraste

O arraste foi avaliado pela injeção de uma amostra fortificada com analitos a 400% da concentração correspondente ao MRPL (Tabela 1) precedida por uma amostra de controle negativo e seguida por outra amostra de controle negativo.

3.6.4. Rendimento de Extração

O rendimento de extração foi avaliado pelo preparo de três amostras fortificadas no MRPL cuja matriz foi extraída antes da adição das substâncias e três amostras que foram fortificadas antes do procedimento de extração.

3.6.5. Limite de Detecção (LOD)

Para cada uma das concentrações das substâncias de: 100, 70, 40, 20, 5 e 0,1% do MRPL foram preparadas 10 amostras. Essas amostras foram separadas em dois lotes de cinco amostras para serem preparados por analistas diferentes. A estimativa do LOD de cada substância é obtida a partir de uma curva de resposta de detecção, que é descrita por uma função, considerando 95% de detecção.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. 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. Como descrito em artigo (THOMAS *et al.*, 2011) esse procedimento utilizou 10 min de tempo de banho de ultrassom, solução padrão das substâncias em estudo e como solução de extração uma mistura de metanol:acetonitrila: água acidificada a 2% por ácido acético (1:1:1). Os analitos estudados foram, então, submetidos ao procedimento de preparo de amostra descrito na metodologia. Para o cálculo da recuperação foram extraídos dois lotes, um cuja fortificação com mistura de analitos ocorreu apenas após a sua extração, e outro cuja fortificação ocorreu antes. A fortificação realizada após a extração foi a considerada como 100% de referência da recuperação e como base para o cálculo da porcentagem de recuperação do procedimento. As suas porcentagens estão presentes na Figura 8.

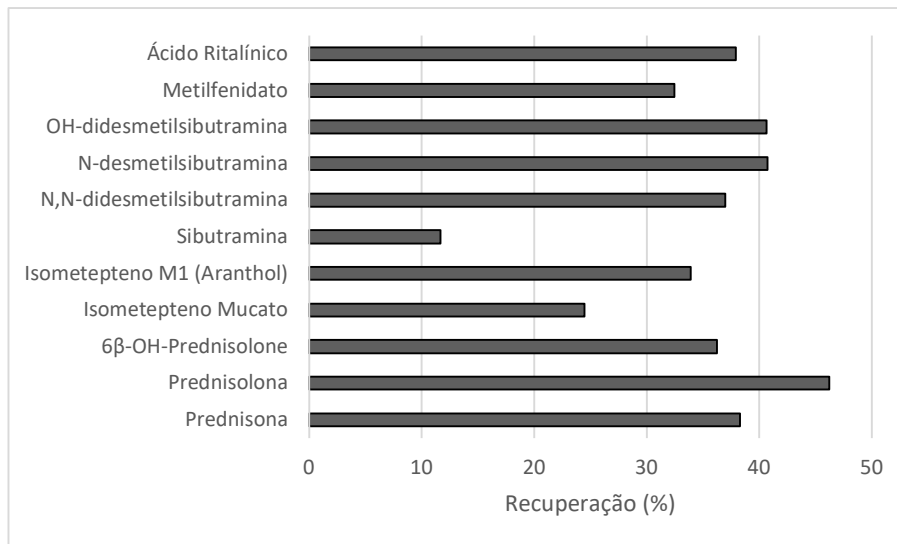


Figura 8. Gráfico do ensaio de recuperação prévia (n=3).

Com o método proposto por Thomas e colaboradores nenhuma das substâncias estudadas obteve recuperação superior a 50%. A sibutramina foi a que obteve menor valor de recuperação (12%).

Embora reconhecesse que não há ainda um critério de sensibilidade estabelecido, deve-se considerar que valores de recuperação inferiores a 50% podem, em tese, dificultar a detecção dos analitos em casos reais. A não detecção do analito no método inicial de análise implica, necessariamente, em um resultado falso negativo, já que a amostra poderia não ser considerada para a etapa de confirmação na qual seria detectada.

A fim de alcançar valores de maiores de recuperação, com conseqüente aumento da sensibilidade, foi proposta a otimização dos parâmetros: i) tempo de banho de ultrassom, e ii) composição da solução de extração.

A extração assistida por ultrassom é a forma utilizada de recuperação do sangue seco do papel filtro para o preparo da amostra. O ultrassom tem como meio extrator a criação de bolhas na superfície sólido-líquido do papel, que com sua implosão irão formar micro jatos, que ao atingirem a superfície do papel irão criar uma desagregação do material aderido à superfície (KRUG, 2019). O aumento no tempo do banho de ultrassom foi proposto com o objetivo de promover a desagregação desse material, permitindo uma maior concentração dos analitos em solução, e conseqüente aumento do rendimento de extração e a sensibilidade do método.

A solução de extração utilizada na desagregação do sangue seco do papel de filtro utiliza de afinidade química para conseguir solubilizar as substâncias em estudo. Com isso, foram propostas novas soluções de extração com diferentes composições com o objetivo de encontrar uma solução com mais alta afinidade e potencial de solubilização assim aumentando também o rendimento de extração.

4.2.Otimização dos parâmetros

4.2.1. 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. 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 sob o banho de ultrassom. O tempo de banho ultrassônico foi aumentado para 30 min. Esse valor foi estabelecido devido a necessidade de se obter uma maior extração e um tempo total de experimento comum a análises de rotina no LBCD. A recuperação de extração das substâncias em estudo em comparação com as do teste prévio consta na Figura 9.

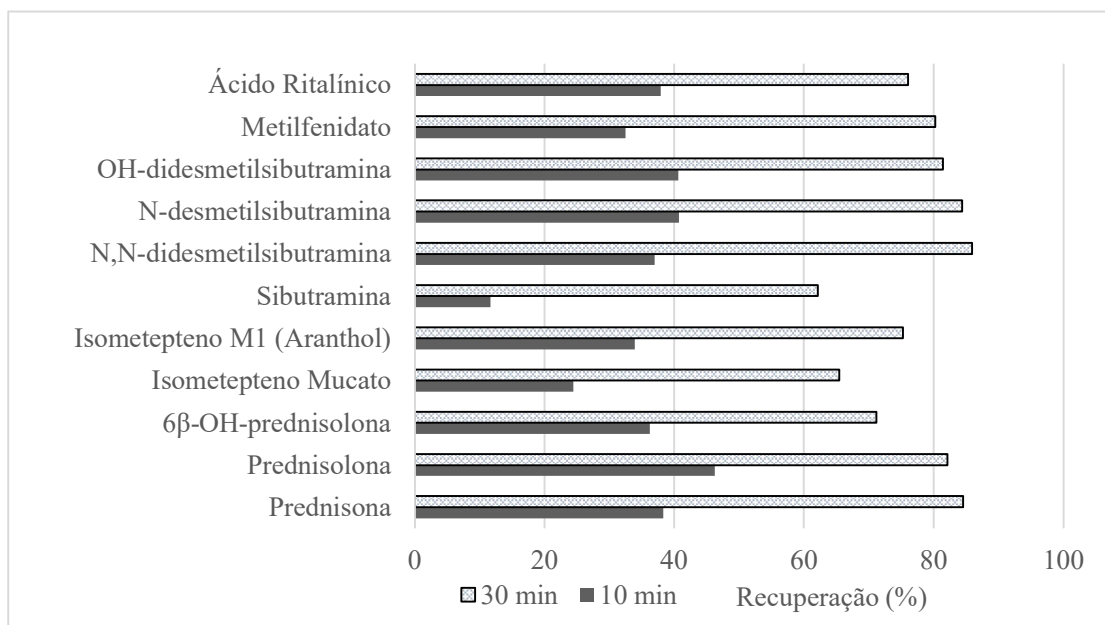


Figura 9. Resultados de recuperação para tempo de banho de ultrassom de 10 e 30 minutos (n=4).

Os resultados descritos na Figura 9 mostram que o aumento do tempo de banho de ultrassom promoveu o aumento dos valores de recuperações, chegando a 86%, sendo o rendimento obtido 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.

Com isso, infere-se que com o aumento do tempo de banho de ultrassom haja a uma desagregação de material do papel filtro superior a obtida com o tempo inicial de 10 minutos. 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. Por hipótese, os valores de recuperação obtidos com a adoção do protocolo sugerido, promove como consequência, o aumento da confiabilidade do método.

4.2.2. 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:água acidificada a 2% por ácido acético (1:1:1); metanol:acetonitrila (1:1); metanol:éter metil terc-butílico (1:1). Os resultados de rendimento da extração para cada uma das substâncias em estudo são apresentados na Figura 10.

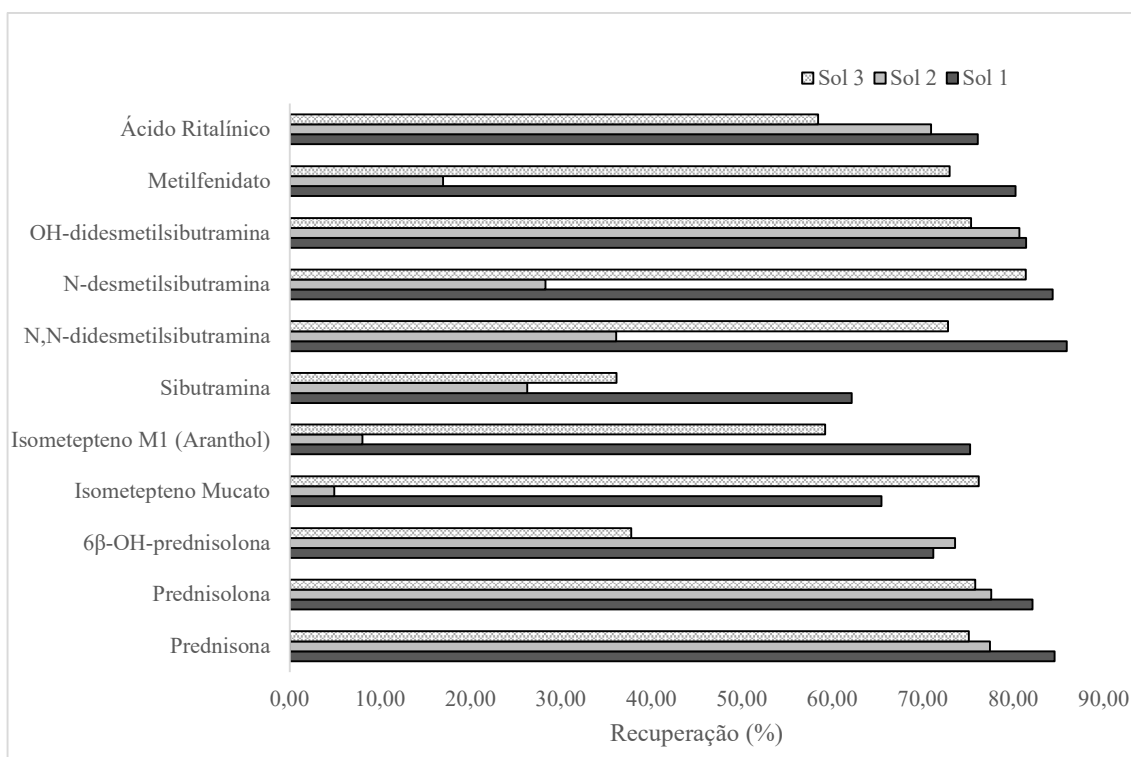


Figura 10. Ensaio de rendimento de extração com soluções de extração: (Sol 1) metanol:acetonitrila: água acidificada a 2% por ácido acético (1:1:1); (Sol 2) metanol:acetonitrila (1:1) e (Sol 3) metanol:éter metil terc-butílico (1:1) (n=4).

Analisando a Figura 10, pode-se observar que utilizando a solução de metanol: éter metil terc-butílico (1:1) o menor rendimento de extração obtido foi de 38% para a 6β-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 de metanol:acetonitrila (1:1), a média geral dos rendimentos foi a mais baixa entre todas as soluções com 45%. O menor rendimento de 5% ocorreu para o isometepteno mucato, e o maior rendimento para a OH-

disdesmetil-sibutramina de 81%. A solução de metanol:acetonitrila: água acidificada a 2% por ácido acético (1:1:1) apresentou os maiores valores gerais de rendimento. Seu menor rendimento ocorreu com a sibutramina com 62% e o maior 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 de forma objetiva os valores de recuperação de cada substância e foi determinada diferença estatística significativa entre as três soluções de extração na recuperação: da Sibutramina, Isometepteno Mucato, Isometepteno M1, *N*-desmetilsibutramina, Metilfenidato e Ácido Ritalínico. Com isso, é possível afirmar que, de forma geral, a solução de extração mais eficiente para o procedimento é a solução metanol:acetonitrila: água acidificada a 2% por ácido acético (1:1:1) que obteve maior recuperação para todas as substâncias.

A melhor recuperação observada por essa solução poderia ser explicada pelo fato das substâncias do estudo terem, em geral, afinidade com a água. Com isso a presença de água acidificada conseguiu solubilizar de forma mais efetiva as substâncias. O resultado expressivamente menor para a sibutramina em comparação as outras substâncias são devido a sua menor basicidade, já que os substituintes de alquila possuem causam uma baixa solvatação a solventes próticos.

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: água acidificada a 2% por ácido acético (1:1:1).

4.2.3. Influência do Hematócrito e forma de corte

O hematócrito é um dos fatores que possuem maior influência na análise de *spots* de sangue, devido a sua variedade e a sua influência na viscosidade do sangue. Com o objetivo de determinar se o método utilizado possuía influência de hematócrito foram feitas extrações com valores de hematócrito na faixa de 30 a 60% (Figura 11), mais frequentemente encontrada em humanos.

Na Figura 11 é possível observar que há uma diferença no espalhamento do sangue no papel Whatman 903™. Esse espalhamento é correlacionado com a viscosidade do material dependente da porcentagem de células vermelhas presentes no sangue, ou seja, do hematócrito. Abaixo é possível observar os valores de 30, 40, 50 e 60 que são referentes as porcentagens de hematócrito de cada amostra.



Figura 11. Valores de hematócrito de 60, 50, 40 e 30% aplicados em papel Whatman 903™.

A amostra de 30% apresenta o maior espalhamento e conseqüentemente maior área de *spot*, devido sua menor viscosidade. Já a amostra de 60% apresenta o menor espalhamento e conseqüentemente menor área, devido sua maior viscosidade. Essa maior viscosidade é consequencia de uma maior quantidade das células vermelhas em amostras com hematócrito mais alto.

Essa diferença de espalhamento do sangue pode ser um fator diferencial nas análises de acordo com a área analisada do *spot*, pois pode influenciar na quantidade de amostra analisada dependendo da técnica de recorte. Para isso foram utilizadas duas técnicas, com cortadores de área fixa ou o recorte da área total com o auxílio de uma tesoura.

Há vantagens e desvantagens no uso de ambas as técnicas como, por exemplo, no uso de cortadores, a estipulação de uma área de corte poderia levar ao corte do *spot* faltando parte do material caso este tenha se espalhado por uma área maior, mas tendo como vantagem a padronização e a realização mais rápida desta técnica. Já o recorte com tesoura da área total do *spot* é um processo mais lento e laborioso ao analista, além de ser menos reprodutível. Por outro lado, com o recorte do *spot* total toda a amostra é considerada na análise, diminuindo a variação de concentração condicionada a viscosidade do sangue, o hematócrito.

Dessa forma, como a área dos *spots* é um fator que varia dependendo do valor de hematócrito da amostra, a forma de recortar o *spot* precisa ser avaliada para mensurar a influência do hematócrito sobre o volume de amostra analisada caso os recortes sejam realizados com uma área fixa (cortador) ou com a área total (tesoura).

De forma a averiguar uma possível influência de hematócrito no método desenvolvido e de abordar uma harmonização no padrão de corte dos *spots*, foi realizado o ensaio de influência de hematócrito. Visando abordar a faixa média de hematócrito de homens e mulheres foram abordadas concentrações de 30 a 60% na avaliação de influência de hematócrito.

Estes valores de hematócrito foram simulados com uma mesma amostra de sangue com hematócrito real de 38,6%. Essa amostra teve plasma e células separados a partir de centrifugação seguido do preparo de uma solução com valor de hematócrito mais alto (60%) e posteriormente as diluições necessárias para obter os valores de 50%, 40% e 30%.

Na Figura 12 constam os resultados de desvio padrão relativo (DPR) entre as amostras de valores de hematócrito considerados, para cada analito. É possível notar nos resultados presentes no gráfico que o DPR das amostras cortadas por furador foi maior do que nas amostras cortadas por tesoura, mostrando uma maior variabilidade entre a concentração dos analitos por influência do hematócrito quando utilizada a técnica de corte parcial (furador de área fixa). Esta maior variabilidade demonstrada pelo maior desvio padrão entre os resultados demonstra que esta técnica de corte sofre maior influência do hematócrito, induzindo menor precisão ao método e menor reprodutibilidade.

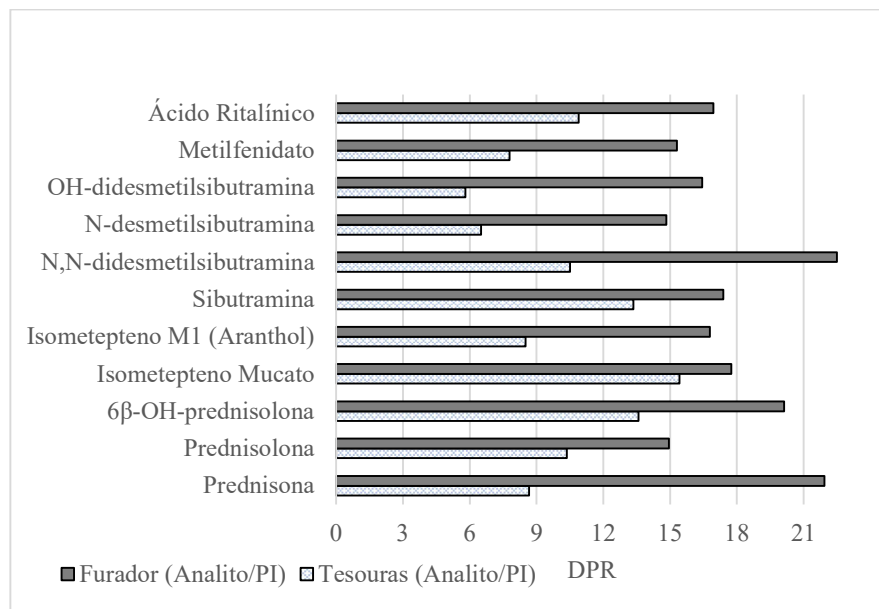


Figura 12. Comparação de desvio padrão relativo (DPR) para furador e tesoura.

Além disso, segundo o critério presente na literatura (WAGNER *et al.*, 2016; O'MARA *et al.*, 2011) a ausência de influência de hematócrito é determinada pelo conjunto de dois parâmetros: $DPR < 15\%$ e acurácia na faixa de 85-115%.

Ao se analisar o primeiro parâmetro, observa-se que as amostras de DBS cortadas por tesoura cumpriram esse requisito, apresentando um valor de $DPR \leq 15\%$ para todos os analitos, como consta no gráfico acima. Enquanto as amostras cortadas por furador tiveram valores de $DPR > 15\%$ para 9 dos 11 analitos, enquanto 2 apresentaram DPR de 15%. Portanto, considerando que não houve por parte da técnica de corte com furador o cumprimento do primeiro dos critérios que determina o baixo impacto da influência do hematócrito, levando a exclusão desta técnica de corte como alternativa para o método.

Para analisar o segundo parâmetro, a acurácia foi calculada utilizando-se da fortificação de uma amostra de sangue que não passou pela manipulação de seu hematócrito. A essa amostra foi então atribuído o valor de 100% (valor de referência) para todas as substâncias. Os valores de acurácia de cada hematócrito foram então calculados pela diferença entre o valor de referência e o valor medido.

Os valores de acurácia para cada analito utilizando a técnica de corte por tesoura (área total) constam na Tabela 2. Utilizando do critério determinado por WAGNER *et al.*, 2016 e

O'MARA *et al.*, 2011, os valores levam a não consideração da influência do hematócrito como significativa para análise, já que esses valores médios das substâncias nas amostras tiveram resultado na faixa de 85- 115%.

Tabela 2. Acurácia média do ensaio de influência do hematócrito.

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

Sendo assim, foi considerado que o impacto da influência do hematócrito sobre a precisão e a acurácia do método foi minimizada ao utilizar a técnica de corte das amostras de *spot* utilizando a tesoura, ou seja, considerando a área total do *spot*.

Esse resultado está de acordo com o que é estabelecido em documento técnico (WADA, 2021) em vigência para análise por DBS, que determina que seja analisado o *spot* de forma saturada, ou seja, por completo. Sendo assim, o método de DBS desenvolvido cortando a área total do *spot* é o que foi utilizado para a validação do experimento.

4.3. Validação

4.3.1. Seletividade

Analisando a seletividade como a ausência de interferentes no intervalo de tempo de retenção de um determinado analito, foram preparadas dez amostras fortificadas com a solução mix de analitos, padrões internos e seus controles negativos. Não foram encontrados interferentes no tempo de retenção de nenhuma das substâncias e metabólitos em estudo ou dos padrões internos utilizados no método, exceptuando-se a Sibutramina.

No caso da Sibutramina, devido um problema de contaminação cruzada no equipamento após uma análise de rotina essa substância apareceu em todas as amostras incluindo os brancos. Por isso, ela não foi considerada por não atender os requisitos das etapas de validação subsequentes. No entanto esse fato não é tão relevante para o monitoramento do fármaco, uma vez que é extensamente metabolizado quando ingerido e seus metabólitos são monitorados.

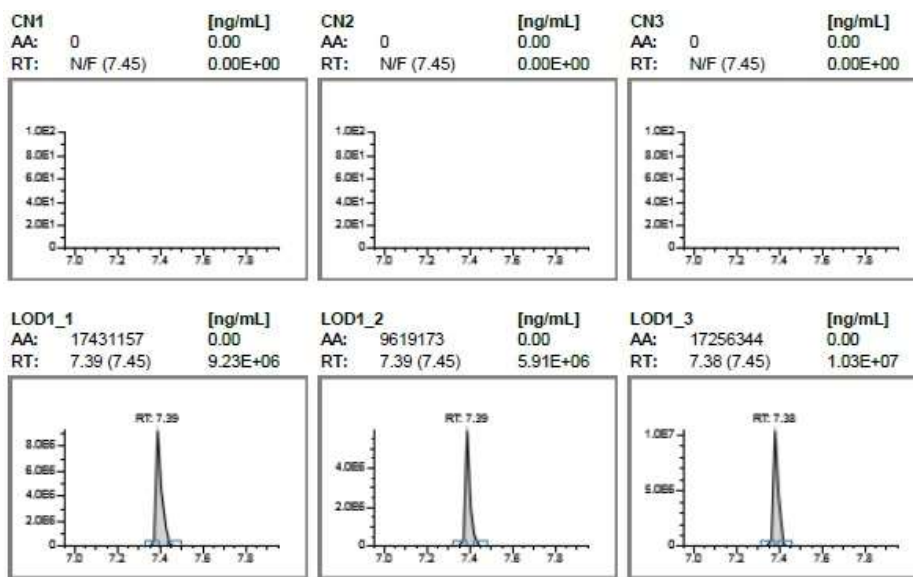


Figura 13. Cromatogramas de controle negativo (CN1 à CN3) e controle positivo (LOD1_1 à LOD1_3) da substância *N,N*-didesmetilsibutramina para teste de seletividade.

Como possível observar na Figura 13, onde constam os cromatogramas das amostras fortificadas de *N,N*-didesmetilsibutramina e seus respectivos controles negativos na janela de tempo de retenção determinada, não houveram sinais de interferentes que poderiam afetar a análise por esse método, o que também ocorreu para todas as outras substâncias em estudo,

exceto a Sibutramina. Com isso, pode-se considerar o método de DBS desenvolvido suficientemente seletivo para essas substâncias.

4.3.2. Estabilidade das amostras extraídas

Segundo critério estabelecido pela WADA para substâncias *non-threshold* sem MRL, a estabilidade das amostras extraídas é identificada pela detecção de todos os analitos 24h após a primeira injeção. Com esse fim, foram comparadas as amostras com elas mesmas reinjetadas 24h depois da primeira injeção. Todas os analitos foram identificadas em ambas as análises, o que satisfaz o critério da WADA, podendo ser considerado o método utilizado como estável para os analitos abordados, garantindo que em caso de reinjeção as amostras possuiriam estabilidade suficiente para não gerar resultados que diferissem dos iniciais.

4.3.3. Arraste

Na injeção de uma amostra de concentração em 400% do MRPL (CPA) precedida e seguida por duas amostras de controle negativo (CN2_1 e CN2_2), aonde não foram identificados arraste para nenhuma das substâncias ou padrões internos. Um exemplo pode ser visto na Figura 14 da substância 6 β -OH-prednisolona.

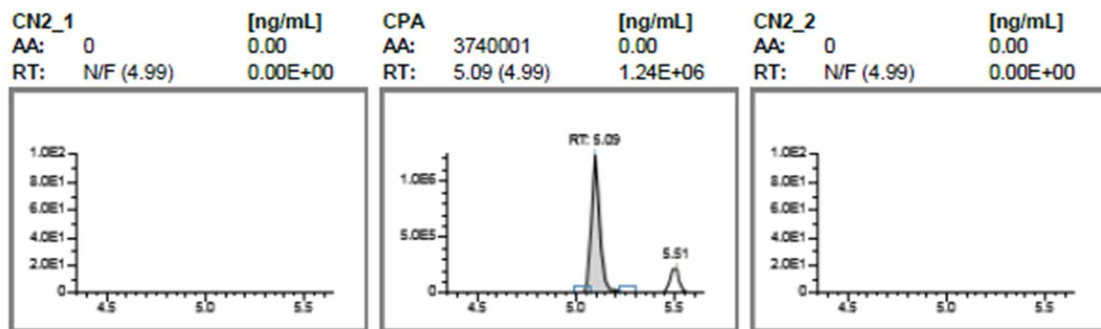


Figura 14. Cromatograma da substância 6 β -OH-prednisolona de sequência do parâmetro de arraste, onde: (CPA) amostra fortificada em 400% do MRPL; (CN2-1 e CN2-2) branco de urina.

A ausência de arraste, como demonstrado nesta validação, garante a segurança da aplicação do método como procedimento inicial de análise, permitindo afastar a hipótese de contaminações intra-lotes de análise quando do estabelecimento de rotina com amostras reais.

4.3.4. Rendimento de Extração

O rendimento de extração foi calculado utilizando comparação de resultados de extração da matriz fortificada antes e depois da extração. As porcentagens de recuperação de cada um dos analitos é descrito na Tabela 3. Para os resultados de rendimento de extração não há critério mínimo estabelecido, porém é comum de ser calculado para fins informativos.

Tabela 3. Medidas do ensaio de rendimento de extração (n=3).

Substâncias	Rendimento de extração (%)
Prednisona	96,4
Prednisolona	94,9
6 β -OH-prednisolona	90,9
Isometepteno mucato	62,7
Isometepteno M1 (Aranthol)	91,2
<i>N,N</i> -didesmetil-sibutramina	82,5
<i>N</i> -desmetil-sibutramina	95,0
OH-didesmetil-sibutramina	86,0
Metilfenidato	85,5
Ácido ritalínico	70,1

Analisando os resultados de rendimento de extração é possível notar uma diferença entre o rendimento de extração do isometepteno mucato e do aranthol, de quase 30%. Essa diferença pode ser atribuída a diferença de polaridade entre os analitos, justificada pela ligação dupla substituída por uma hidroxila. O isometepteno Aranthol apresenta maior polaridade que a droga-mãe (Isometepteno Mucato), facilitando sua solvatação na mistura solvente adotada (Figura 15).

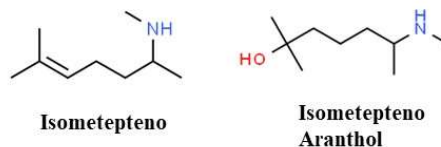


Figura 15. Estruturas moleculares do Isometepteno Mucato e do Isometepteno Aranthol.

Ainda que não haja critério de aceitabilidade de validação para determinar um rendimento de extração aceitável, considerando um número grande de analitos de diferentes estruturas é importante um olhar flexível sobre os rendimentos de extração de cada substância. Nesta análise, foi avaliado o rendimento de extração da solução com melhor resultado dentre as consideradas na otimização do método.

Apesar de para alguns analitos o rendimento de extração não ter sido superior a 80%, como no caso do Isometepteno Mucato (62,7%) e do Ácido Ritalínico (70,1%), em geral os valores foram bastante aceitáveis em um método de triagem de substâncias, que deve ser abrangente ao universo de alvos abordados.

Embora o aumento do rendimento de extração tenha impacto na sensibilidade do método, essa figura de mérito deve ser objetivamente mensurada através do parâmetro de validação Limite de Detecção.

4.3.5. Limite de Detecção (LOD)

Para a determinação dos valores de LOD de cada analito foram utilizadas dez amostras diferentes, em diferentes valores de concentração de porcentagem em relação ao MRPL definido para a matriz urina. Para o cálculo do LOD foram plotadas curvas de resposta da detecção dos analitos nos valores de concentração utilizados. Sendo assim, os valores de LOD obtidos encontram-se na Tabela 4.

Tabela 4. Medidas do ensaio de limite de detecção (LOD).

Substâncias	LOD (ng/mL)
Prednisona	13,16

Prednisolona	4,76
6 β -OH-prednisolona	5,55
Isometepteno	2,35
Isometepteno M1 (Aranthol)	2,38
<i>N,N</i> -didesmetil-sibutramina	17,5
<i>N</i> -desmetil-sibutramina	2,36
OH-didesmetil-sibutramina	2,36
Metilfenidato	2,38
Ácido ritalínico	2,38

Apesar de não estarem disponíveis valores de MRPL para as substâncias em análises na matriz DBS, e não estarem disponíveis na literatura formas de correlacionar as concentrações dessas substâncias no sangue e na urina, os valores de MRPL das substâncias em urina foram adotados como critério de validação em documentos técnicos.

Eventualmente, quando valores de MRPL estiverem estabelecidos para o DBS, caberá o juízo de valor em relação a aplicabilidade do método proposto, considerando os LODs alcançados.

No entanto, até o presente momento, os valores de MRPL de urina serão os utilizados para avaliar os critérios que dependem deste, como o LOD.

O critério de aceitação determinados para o LOD das substâncias, segundo as diretrizes técnicas da WADA é de 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 (WADA, 2022b).

Considerando os critérios de interpretação de resultados disponível, a validação do método permitiu a conclusão de que ele é adequado para o fim pretendido. Ou seja, em estudo futuros, onde o objetivo seja a comparação dos valores de concentração urinária e concentrações sanguíneas inferidas por DBS, o método proposto mostra-se aplicável.

5. CONCLUSÃO

De acordo com os ensaios realizados foi possível desenvolver uma otimização do procedimento para análise de DBS anteriormente descrito por Thomas e colaboradores para estimulantes e glicocorticóides. Foi estabelecido que o tempo de banho de ultrassom de 30 min aumentava de 34 a 76% a recuperação média dos analitos extraídos. E a partir de teste similar, que a solução de extração metanol:acetonitrila: água acidificada a 2% por ácido acético (1:1:1) seria a mais eficiente para a extração das substâncias analisadas neste trabalho.

Ainda no âmbito da otimização da análise por DBS foi averiguado que quando os *spots* têm sua área total analisada não há influência do hematócrito no método, o que não é valido para *spots* cuja área é parcialmente analisada.

O método de DBS desenvolvido neste trabalho foi validado podendo ser utilizado na análise qualitativa de triagem de algumas substâncias proibidas em competição no LBCD. Posteriormente, o método de DBS validado será utilizado para a análise de voluntários que ingerirão as substâncias avaliadas nesse estudo. Além disso, uma perspectiva do trabalho é ampliar o número de substâncias analisadas para outras classes, como substâncias proibidas dentro e fora de competição.

O método aqui apresentado pode ser usado em estudos futuros, comparando as concentrações sanguíneas obtidas por DBS, com aquelas estimadas na matriz urina, o que permitirá a geração de um critério objetivo para a avaliação se o agente dopante foi administrado no período em competição.

6. REFERÊNCIAS

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.

DE OLIVEIRA, Carolina Dizioli Rodrigues; DE BAIROS, 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.

GROSS, Jurgen H. **Mass Spectrometry: A textbook**. 2 ed., Alemanha. SPRINGER, 2011.

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.

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.

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.

MAKAROV, Alexander, SCIGELOVA, Michaela. Coupling liquid chromatography to Orbitrap mass spectrometry, Alemanha, **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 3938–3945, 2010.

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.

SADONES, Nele *et al.* Spot them in the spot: analysis of abused substances using dried blood spots. **Bioanalysis**, v. 6, n. 17, p. 2211-2227, 2014.

SILVERSTEIN, R. M. & WEBSTER, F. X., Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. 6a edição, **LTC – Livros Técnicos e Científicos**, 2000.

TSIVOU, Maria *et al.* Stabilization of human urine doping control samples: a current opinion. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 401, n. 2, p. 553-561, 2011.

TRETZEL, Laura *et al.* Dried blood spots (DBS) in doping controls: a complementary matrix for improved in-and out-of-competition sports drug testing strategies. **Analytical Methods**, v. 7, n. 18, p. 7596-7605, 2015.

KUMAR, Prasoon; AGRAWAL, Prashant; CHATTERJEE, Kaushik. Challenges and opportunities in blood flow through porous substrate: A design and interface perspective of dried blood spot. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 175, p. 112772, 2019.

WADA. **2020 ANTI-DOPING TESTING FIGURES**. Montreal, 2020. Disponível em: https://www.wada-ama.org/sites/default/files/2022-01/2020_anti-doping_testing_figures_en.pdf. Acesso em: 29/06/2022 às 22:20.

WADA. **International Standard: Prohibited List**. Montreal, 2022a. Disponível em: https://www.wada-ama.org/sites/default/files/2022-01/2022list_final_en_0.pdf. Acesso em: 29/06/2022 às 22:20.

WADA. **Technical Document – TD2021DBS**. Montreal, 2021b. Disponível em: https://www.wada-ama.org/sites/default/files/item_6_3_3_attach_1_finalversion_td2021dbs_final.pdf. Acesso em: 29/06/2022 às 22:10.

WADA. **Technical Document – TD2022MRPL**. Montreal, 2022b. Disponível em: https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/td2022mrpl_v1.0_final_eng.pdf. Acesso em: 29/06/2022 às 22:25.

WADA. **World Anti-Doping Code**. Montreal, 2021a. Disponível em: https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/2021_wada_code.pdf. Acesso em: 29/06/2022 às 22:30.

WAGNER, Michel *et al.* The use of mass spectrometry to analyze dried blood spots. **Mass spectrometry reviews**, v. 35, n. 3, p. 361-438, 2016.