

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
CENTRO DE CIÊNCIAS MATEMÁTICAS E DA NATUREZA  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
CURSO DE QUÍMICA COM ATRIBUIÇÕES TECNOLÓGICAS

**HYLANA PEREIRA SILVA**

ATUALIZAÇÃO DO MÉTODO DE CONFIRMAÇÃO DE  
SALBUTAMOL EM URINA HUMANA POR CROMATOGRAFIA  
GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Rio de Janeiro

2023

Hylana Pereira Silva

**ATUALIZAÇÃO DO MÉTODO DE CONFIRMAÇÃO DE SALBUTAMOL EM  
URINA HUMANA POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À  
ESPECTROMETRIA DE MASSAS**

Projeto Final de Curso apresentado ao Corpo Docente do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Químico com Atribuições Tecnológicas.

Orientadores: Dr<sup>a</sup>. Monica Costa Padilha

Dr. Gustavo de Albuquerque Cavalcanti

Rio de Janeiro, RJ - Brasil

2023

HYLANA PEREIRA SILVA

**ATUALIZAÇÃO DO MÉTODO DE CONFIRMAÇÃO DE SALBUTAMOL EM  
URINA HUMANA POR CROMATOGRÁFIA GASOSA ACOPLADA À  
ESPECTROMETRIA DE MASSAS**

Projeto Final de Curso apresentado ao Corpo Docente do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Químico com Atribuições Tecnológicas.

Aprovado por:

---

Dr<sup>a</sup>. Clarisse Lacerda Torres (IQ/UFRJ)

---

Dr. Gustavo Ramalho Cardoso dos Santos (IQ/UFRJ)

Rio de Janeiro

2023

#### Ficha catalográfica

SILVA, Hylana Pereira. Atualização do método de confirmação de salbutamol em urina humana por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. Hylana Pereira Silva. Rio de Janeiro: UFRJ/IQ, 2023.

vii, 133p.; il.

(Projeto Final de Curso) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química, 2023.

Orientador(es): Monica Costa Padilha e Gustavo de Albuquerque Cavalcanti.

1. Salbutamol. 2. Cromatografia gasosa. 3. Espectrometria de massas. 4. Antidopagem.

(Graduação – UFRJ/IQ). Nome(s) do(s) orientador(es). Monica Costa Padilha e Gustavo de Albuquerque Cavalcanti. I. Atualização do método de confirmação de salbutamol em urina humana por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas.



“Não basta saber, é preciso também aplicar; não basta querer, é preciso também fazer.”

Johann Wolfgang von Goethe

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por sempre segurar minha mão, nunca me deixar desistir e me fazer ver a luz no fim do túnel.

À minha mãe Iracy, que me apoia e me ama com maior amor do mundo, por sua atenção e dedicação, por me oferecer seu ombro e pelas suas palavras para me fazer seguir em frente.

Ao meu pai Josélio e meu irmão Igor, que me fizeram rir e aliviaram o peso da graduação, que me proporcionaram aprender assuntos não relacionados à química, me permitindo assim viver um pouco fora da minha bolha.

Ao meu amado Marc Wilburn, que mesmo a 10.000 km de distância nunca deixou de estar ao meu lado com todo o seu carinho. Ich liebe dich für immer und ewig!

À minha orientadora e professora Doutora Monica Costa Padilha, por sua orientação, suporte, incentivo e estar disposta a me ajudar no que fosse necessário.

Ao meu orientador Doutor Gustavo de Albuquerque Cavalcanti, por sua paciência ao me explicar o mesmo assunto até que eu entendesse perfeitamente.

Aos meus colegas estagiários, técnicos, mestres e doutores do LBCD, por compartilharem seus conhecimentos quando eu mais precisei, especialmente Márcio, Millena, Gabriel, Gustavo, Leonardo, Suanny, Débora, as Andressas, Rafael, Jéssica, Lucas, William, Mauro, Márcia, Rebecca e muitos outros.

Aos meus amigos do ICCP, que choraram comigo, se alegraram comigo e foram essenciais durante a minha jornada na UFRJ. Vocês me salvaram mais vezes do que imaginam.

Aos amigos que eu fiz durante o caminho, Victória, Thamiris, Laizi, Geovana, Luana, Yohana, Raquel, Markus, Gustavo, Gabrielle, Vinícius, Vitor, Rodrigo e muitos outros.

Aos professores, funcionários e técnicos e do Instituto de Química, por compartilharem seu conhecimento comigo e por cuidarem tão bem do meu segundo lar.

Aos Doutores Clarisse Lacerda Torres e Gustavo Ramalho Cardoso dos Santos por aceitarem o convite para participar da minha banca avaliadora.

A todos aqueles que oraram por mim, me desejaram o bem e sempre me colocaram em seus pensamentos.

## RESUMO

Silva, Hylana Pereira. **Atualização do método de confirmação de salbutamol em urina humana por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas**. Rio de Janeiro, 2023. TCC (Graduação em Química com Atribuições Tecnológicas) - Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2023.

O uso do salbutamol como substância de melhora de rendimento dos atletas nos esportes olímpicos não é permitido pelo Comitê Olímpico Internacional desde 1972. O seu uso é controlado pelos laboratórios de controle de dopagem ao redor do mundo devido ao seu potencial poder anabólico e lipolítico. Normalmente, seu uso é realizado para controle de asma e sua presença na urina é permitida em até  $1000 \text{ ng mL}^{-1}$ . Acima desse valor, é considerado um resultado analítico adverso e deve ser investigado. Assim, a busca por salbutamol em urinas de atletas se tornou parte do cotidiano dos laboratórios. Este trabalho buscou atualizar o procedimento de análise deste  $\beta 2$ -agonista no Laboratório Brasileiro de Controle de Dopagem. Para isso, a principal abordagem foi verificar se a etapa de extração do salbutamol da fase aquosa com NaCl poderia ser substituída por outro tipo de extração, reduzindo o tempo de trabalho em bancada e proporcionando ao analista um procedimento mais simples. A extração em fase líquida foi substituída pela extração em fase sólida com coluna de troca catiônica fraca. Outra mudança realizada foi trocar a solução de derivatização, que contém  $\text{NH}_4\text{I}$ , MSTFA e 2-mercaptoetanol, para apenas o MSTFA. Com essa nova abordagem, o procedimento de análise de salbutamol tornou-se mais simples, rápido e seguro do que o utilizado anteriormente. A extração com a coluna de troca catiônica fraca se mostrou mais eficaz do que a extração em fase líquida com sal. As amostras derivatizadas foram estudadas por meio de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas com analisador do tipo triplo quadrupolo.

Palavras-chave: salbutamol, extração, derivatização, cromatografia gasosa.

## ABSTRACT

Silva, Hylana Pereira. **Atualização do método de confirmação de salbutamol em urina humana por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas**. Rio de Janeiro, 2022. TCC (Graduação em Química com Atribuições Tecnológicas) - Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2023.

The use of salbutamol as a performance-enhancing substance for athletes in Olympic sports has not been allowed by the International Olympic Committee since 1972. Its use is controlled by doping control laboratories around the world due to its anabolic potential and lipolytic power. Normally, it's used to control asthma and its presence in the urine is allowed in up to 1000 ng mL<sup>-1</sup>. Above this value, it is considered an adverse analytical result and should be investigated. Thus, the search for salbutamol in the urine of athletes has become part of the laboratory routine. This work sought to update the procedure for analyzing this  $\beta_2$ -agonist at the Brazilian Laboratory for Doping Control. For this, the main approach was to verify if the extraction step of salbutamol from the aqueous phase with NaCl could be replaced by another type of extraction, reducing the time of work on the bench and providing the analyst with a more simple procedure. Liquid phase extraction was replaced by solid phase extraction with a weak cation exchange column. Another step was changing the derivatization solution, which contains NH<sub>4</sub>I, MSTFA and 2-mercaptoethanol, to just MSTFA. This replacement proved to be quite satisfactory. With this new approach, the salbutamol analysis procedure has become more simple, faster and safer than previously used. The extraction with the weak cation exchange column was more efficient than the liquid phase extraction with salt. Derivatized samples were studied using gas chromatography coupled to mass spectrometry with a triple quadrupole analyzer.

Keywords: salbutamol, extraction, derivatization, gas chromatography.

## ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES

### EQUAÇÕES

Equação 1. Equação de Henderson-Hasselbalch. ....	27
Equação 2. Razão da área. ....	43
Equação 3. Cálculo da eficiência de extração. ....	43
Equação 4. Desvio padrão experimental (S). ....	65
Equação 5. Desvio padrão relativo residual (DPR). ....	65
Equação 6. Teste de Grubbs. ....	71
Equação 7. Equação da reta. ....	72
Equação 8. Cálculo de y pela regressão linear. ....	73
Equação 9. Cálculo de resíduos. ....	73
Equação 10. Desvio padrão residual (Se). ....	73
Equação 11. Cálculo de x pela regressão linear. ....	73
Equação 12. Desvio padrão do coeficiente linear (Sb0). ....	73
Equação 13. Intervalo de confiança do coeficiente linear. ....	74
Equação 14. Teste de Cochran. ....	75
Equação 15. Desvio de repetitividade (Sr). ....	77
Equação 16. Erro relativo. ....	80

## FIGURAS

Figura 1. Atividade de $\beta$ -agonistas. ....	19
Figura 2. Efeitos de três subtipos de $\beta$ -adrenorreceptores. ....	20
Figura 3. Estrutura química do (R) e (S)-salbutamol. ....	20
Figura 4. Número de amostras “A” analisadas entre 2012 e 2020. ....	21
Figura 5. Esquema de glicuronidação. ....	25
Figura 6. Reação geral de hidrólise por $\beta$ -glicuronidase. ....	26
Figura 7. Grupos ionizáveis do salbutamol. ....	26
Figura 8. Estrutura do salbutamol. ....	27
Figura 9. Esquema de extração por fase sólida na coluna de troca catiônica fraca. ....	28
Figura 10. Formação de derivados TMS. ....	29
Figura 11. Estrutura química do MSTFA. ....	29
Figura 12. Representação esquemática de um sistema de CG. ....	30
Figura 13. Diagrama de um analisador Triplo Quadrupolo (TQ). ....	31
Figura 14. Diagrama de EM com analisador Triplo Quadrupolo – modo de aquisição SRM. ....	31
Figura 15. Estrutura química do salbutamol e salbutamol-d3. ....	32
Figura 16. Esquema de duas extrações para o mesmo grupo de tubos. ....	39
Figura 17. Série de Hofmeister. ....	45
Figura 18. Estrutura química de moléculas derivatizantes. ....	49

## TABELAS

Tabela 1. Resultados analíticos adversos em 2020. ....	22
Tabela 2. Substâncias identificadas como AAFs em cada classe de medicamentos. ....	23
Tabela 3. Substâncias identificadas como AAFs na classe S.3 $\beta$ 2-agonistas. ....	23
Tabela 4. Método vigente do salbutamol no LBCD. ....	43
Tabela 5. Extração em fase líquida e <i>salting out</i> . ....	45
Tabela 6. Derivados de $\beta$ 2-agonistas formados e suas abundâncias. ....	50
Tabela 7. Solvente MTBE. ....	51
Tabela 8. Solvente acetato de etila. ....	51
Tabela 9. Extração em fase sólida e em fase líquida. ....	54
Tabela 10. Coluna de troca catiônica fraca (XCW). ....	61
Tabela 11. Coluna de fase reversa (C18). ....	61
Tabela 12. Extração com coluna de troca catiônica fraca em triplicata. ....	65
Tabela 13. Dados para a curva analítica do primeiro dia. ....	72
Tabela 14. Dados para cálculos estatísticos. ....	74
Tabela 15. Resultados para linearidade da primeira curva. ....	74
Tabela 16. Resultado do teste de Cochran. ....	75
Tabela 17. Dados para a curva analítica do segundo dia. ....	75
Tabela 18. Resultados para a linearidade do segundo dia. ....	76
Tabela 19. Dados para cálculos estatísticos da repetitividade. ....	77

Tabela 20. Resultados da repetitividade. ....	77
Tabela 21. Resultado do arraste. ....	78
Tabela 22. Resultado da interferência de matriz. ....	79
Tabela 23. Resultado da precisão intermediária. ....	80
Tabela 24. Resultado da robustez. ....	81
Tabela 25. Extração por um segundo analista em coluna de troca catiônica fraca. ....	96
Tabela 26. Teste de Grubbs. ....	131
Tabela 27. Teste de Cochran. ....	132
Tabela 28. $t$ de Student. ....	133



**QUADROS**

Quadro 1. Concentração do salbutamol ( $\text{ng mL}^{-1}$ ) em cada nível da curva. ....	40
Quadro 2. Estrutura química de derivados tris-TMS e suas transições. ....	42
Quadro 3. Eficiência de extração com <i>salting out</i> .....	46
Quadro 4. Eficiência de extração com EFL.....	51
Quadro 5. Eficiência de extração de EFS e EFL. ....	55
Quadro 6. Eficiência de extração de XCW e C18 .....	62
Quadro 7. Eficiência de extração de XCW.....	65
Quadro 8. Eficiência de extração de todos os experimentos. ....	70

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AAF – Resultado Analítico Adverso (*Adverse Analytical Findings*)
- ABP – Passaporte Biológico do Atleta (*Athlete Biological Passport*)
- AC – Adenilato Ciclase
- ADAMS – Sistema de Administração e Gerenciamento Antidopagem (*The Anti-Doping Administration and Management System*)
- ADO – Organização Antidopagem (*Anti-Doping Organization*)
- ADRV – Violação de Regras Antidopagem (*Anti-Doping Rule Violations*)
- AMA – Agência Mundial Antidopagem
- ATF – Resultado Atípico (*Atypical Findings*)
- BU – Branco de Urina
- cAMP – AMP cíclico
- CBF – Confederação Brasileira de Futebol
- CG-TQ – Cromatografia Gasosa com Detector de Massas Triplo Quadrupolo
- CM – Comissão Médica
- CODE – Código Mundial Antidopagem (*The World Anti-Doping Code*)
- COI – Comitê Olímpico Internacional
- CON – Comitê Olímpico Nacional
- CQN – Controle de Qualidade Negativo
- CRM – Material de Referência Certificado (*Certified Reference Material*)
- EE – Eficiência de Extração
- EFS – Extração em Fase Sólida
- EFL – Extração em Fase Líquida
- EM – Espectrometria de Massas
- EQAS – Programa de Avaliação Externa da Qualidade (*Educational External Quality Assessment Scheme*)
- FE – Fase estacionária
- FM – Fase móvel
- IE – Impacto de elétrons
- ISL – Padrão Internacional de Laboratórios (*International Standard for Laboratories*)

IUPAC – União Internacional de Química Pura e Aplicada (*International Union of Pure and Applied Chemistry*)

LABA –  $\beta$  agonista de longa duração (*Long acting  $\beta$  agonist*)

LABDOP – Laboratório de Controle Antidopagem

LADETEC – Laboratório de Apoio ao Desenvolvimento Tecnológico

LBCD – Laboratório Brasileiro de Controle de Dopagem

PKA – Proteína Quinase A

PP – Precipitação de Proteínas

MSTFA – N-metil-N-trimetilsilil-trifluoroacetamida

MTBE – Metil-terc-butil éter

$m/z$  – Razão massa/carga

N/F – não encontrado (*not found*)

SABA –  $\beta$  agonista de curta duração (*Short acting  $\beta$  agonist*)

S<sub>N</sub>2 – Substituição Nucleofílica de Segunda Ordem

SRM – Monitoramento da Reação Seleccionada (*Selected Reaction Monitoring*)

t<sub>R</sub> – Tempo de Retenção

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	17
1.1. Dopagem .....	17
1.2. Salbutamol .....	18
1.3. A luta antidopagem em números .....	21
1.4. Metabolismo do salbutamol .....	23
1.5. Conjugação e remoção da parte conjugada .....	24
1.6. Separação do analito da matriz .....	26
1.7. Derivatização .....	28
1.8. Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-TQ) .....	29
2. OBJETIVOS .....	33
2.1. Objetivo Geral .....	33
2.2. Objetivos Específicos .....	33
3. METODOLOGIA.....	34
3.1. Preparação de soluções .....	34
3.2. Materiais .....	35
3.3. Condições instrumentais CG-TQ.....	36
3.4. Método vigente do salbutamol no LBCD.....	36
3.5. Extração em fase líquida com <i>salting out</i> .....	37
3.6. Extração em fase líquida.....	37
3.6.1. Solvente MTBE .....	37
3.6.2. Solvente acetato de etila .....	38
3.7. Extração em fase sólida e em fase líquida concomitantemente.....	38
3.8. Extração em fase sólida .....	39
3.8.1. Coluna de troca catiônica fraca XCW .....	39
3.8.2. Coluna de fase reversa C18 .....	39
3.9. Análise em triplicata .....	40
3.10. Validação .....	40
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	42
5. CONCLUSÕES .....	82
6. PERSPECTIVAS FUTURAS .....	84
7. REFERÊNCIAS .....	85
8. APÊNDICES .....	90

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Dopagem

O Comitê Olímpico Internacional (COI), criado em 1894, é uma organização não governamental com sede na Suíça. O COI possui 205 Comitês Olímpicos Nacionais (CON) pelo mundo, que promovem o Movimento Olímpico. Seu objetivo é contribuir para a construção de um mundo melhor, educando jovens através do esporte, promover os valores dos Jogos Olímpicos, como excelência, respeito e amizade, além de selecionar a cidade-sede e coordenar a realização dos Jogos (CHAPPELET, 2008).

A luta contra a dopagem no esporte começou com a criação da Comissão Médica (CM) do COI em 1961, após a morte de um ciclista dinamarquês durante os Jogos Olímpicos de Roma no ano anterior. Durante a corrida de estrada de 100 km, as temperaturas chegaram a mais de 40°C e o atleta Knud Enemark Jensen desmaiou e morreu. Outros participantes da corrida também sentiram mal-estar devido ao calor e a desidratação. Porém, o treinador do time, Oluf Jorgensen, admitiu ter fornecido o vasodilatador  $\beta$ -piridil-carbinol ao atleta (LJUNGQVIST, 2017).

Ainda há controvérsias quanto o estimulante ter sido o causador da morte de Jensen. Porém, como os Jogos Olímpicos de Roma foram os primeiros a serem transmitidos ao vivo internacionalmente, o escândalo causado foi o suficiente para que debates acerca de drogas no esporte comesçassem, apesar da morte de Knud não ser comprovadamente relacionada ao uso do vasodilatador (MØLLER, 2005).

O uso de substâncias e métodos de aumento que promovam o desempenho se tornou proibido e passou a ser conhecido como dopagem (MÜLLER, 2009). Na sessão do COI de 1967, a Comissão foi encarregada de criar testes médicos para os Jogos Olímpicos de 1968. A primeira pessoa a ser desqualificada foi o sueco Hans-Gunnar Liljenwallto, membro da equipe de pentatlo moderno, que testou positivo para álcool depois de ter consumido cerveja antes da competição e teve sua medalha de bronze retirada (KREMENIK, 2007).

Após os Jogos de 1968, a CM publicou sua primeira lista oficial de classes de substâncias proibidas e os procedimentos de teste tornaram-se cada vez mais padronizados. Em 1972, um programa oficial de controle de dopagem foi publicado pela primeira vez, para os Jogos Olímpicos de Verão na Alemanha. Mais de sete mil atletas competiram e no total, 2.079 amostras de urinas e 65 amostras de sangue foram colhidas e analisadas pelo laboratório de Munique (KRÜGER, 2012).

Em 1999, o COI convocou sua Primeira Conferência Mundial, o que resultou na Declaração de Lausanne, um documento que previa a criação de uma agência internacional independente para funcionar nas olimpíadas. A Agência Mundial Antidoping (AMA) foi criada em 1999. O uso de substâncias proibidas ou procedimentos para melhorar o desempenho é prejudicial ao espírito do esporte, ferindo a sua imagem e integridade. Todas as regras são projetadas para evitar que qualquer participante tenha vantagem injusta sobre outro e para aperfeiçoar a segurança e o bem-estar dos atletas (Who We Are, 2022).

Os laboratórios que analisam as amostras devem alcançar e manter o credenciamento da AMA. O Código Internacional de Laboratórios (ISL), seus documentos e notas técnicas especificam os critérios que devem ser cumpridos para credenciamento, bem como normas para a produção de resultados de testes e dados válidos. Atualmente, há 29 laboratórios acreditados pela AMA, sendo um deles no Brasil (Laboratories, 2022).

Em 1989, a Confederação Brasileira de Futebol (CBF) solicitou apoio para o controle de dopagem como requisito para realizar, no Brasil, a Copa América de Futebol. A necessidade de análises de xenobióticos em fluídos biológicos levou a criação do Laboratório de Controle de Dopagem (LABDOP). Os Jogos Pan-Americanos de 2007 aconteceram no Brasil e o LABDOP participou ativamente do controle de dopagem, realizando cerca de 1300 análises de urina em 15 dias (CONEXÃO, 2022).

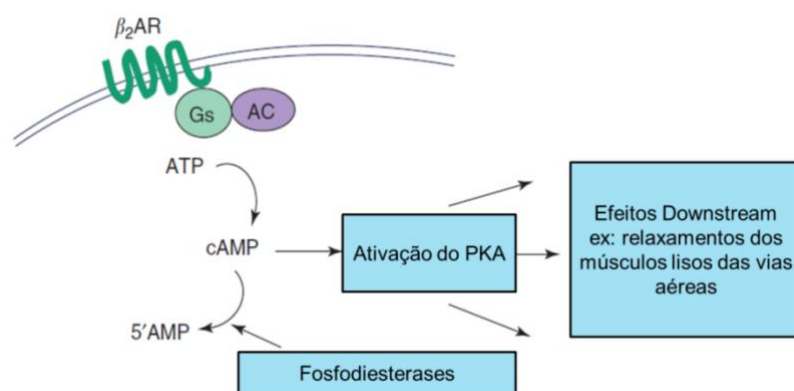
O Rio de Janeiro foi escolhido como cidade sede dos Jogos Olímpicos e Paralímpicos de 2016 e o esforço para o controle de dopagem durante esse período levou a transformação do LABDOP em Laboratório Brasileiro de Controle de Dopagem (LBCCD), laboratório do Instituto de Química que compõe o Laboratório de Apoio ao Desenvolvimento Tecnológico (LADETEC) (Nossa História, 2022).

## 1.2. Salbutamol

De acordo com a lista de substâncias proibidas da AMA para 2022/2023, o salbutamol pertence ao grupo S3, correspondente a classe dos  $\beta_2$ -agonistas que não são permitidos dentro ou fora de competição por apresentarem potenciais efeitos estimulantes e anabólicos (Prohibited List, 2022). A CM do COI proibiu o uso de salbutamol em forma inalável pela primeira vez nos Jogos de 1972. No entanto, ocorreram diversas mudanças nas condições em que o salbutamol poderia ser utilizado pelos atletas nas diferentes eras do COI e da AMA (FITCH, 2017).

Um agonista é uma substância que se liga a um receptor dentro de uma célula ou em sua superfície e inicia uma resposta fisiológica. Esses fármacos foram desenvolvidos para se ligar especificamente aos receptores adrenérgicos  $\beta$  e relaxar o músculo liso das vias aéreas, possibilitando que pessoas com doenças respiratórias possam ter um alívio imediato ou duradouro (CAZZOLA, 2013). Esses agentes são geralmente compostos por um anel benzênico com uma cadeia de dois átomos de carbono e um grupo amina ou amina substituída (LAURENT, 2006).

Figura 1. Atividade de  $\beta$ -agonistas.



Fonte: Adaptado de LAURENT, 2006.

Os  $\beta_2$ -agonistas atuam como mediador dos efeitos clínicos pela estimulação do  $\beta_2$ -adrenoceptor. Os receptores adrenérgicos são acoplados à proteína G, que é vinculado à adenilato ciclase (AC). Aumentos na atividade de AC resultam na elevação do conteúdo de AMP cíclico intracelular (cAMP) e subsequente ativação da proteína quinase A (PKA). Os eventos que ocorrem em seguida, estimulados por  $\beta_2$ -agonistas, são uma consequência da ativação da PKA. No músculo liso das vias aéreas, esses efeitos incluem fosforilação de alvos-chave, incluindo de miosina quinase de cadeia leve e canais de potássio ativados por cálcio, aumento do sequestro de cálcio e/ou remoção e inibição de vias de sinalização contráteis (FORSDAHL, 2004).

Estudos feitos desde 1980 demonstram as propriedades anabólicas e lipolíticas dos  $\beta_2$ -agonistas, como provocar hipertrofia muscular, aumentar a força muscular e reduzir a massa gorda em uma variedade de espécies de mamíferos. Devido a esses efeitos, o abuso dessas substâncias na esfera esportiva é comum (HOSTRUP, 2020).

Figura 2. Efeitos de três subtipos de  $\beta$ -adrenorreceptores.

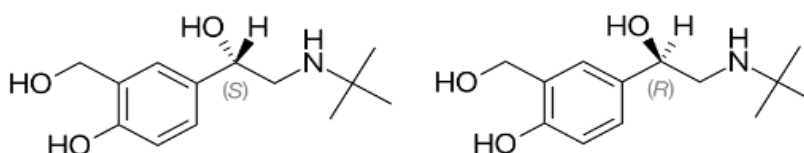
$\beta_1$ -Adrenoceptor	$\beta_2$ -Adrenoceptor	$\beta_3$ -Adrenoceptor
Taquicardia	Broncodilatação Inibição da liberação de mediador de mastócitos Aumento da frequência de batimentos ciliares Secreção de muco Relaxamento do músculo liso uterino Dilatação venosa e arterial	Lipólise

Fonte: Adaptado de Laurent, 2006.

Os  $\beta_2$ -agonistas mais usados estão divididos em: curta duração (*Short acting  $\beta$  agonist* –  $\beta$  agonista de curta duração - SABA) como salbutamol, terbutalina, levalbuterol e pirbuterol; longa duração (*Long acting  $\beta$  agonist* –  $\beta$  agonista de longa duração - LABA) como salmeterol e formoterol ou ultralonga duração (ultra-LABA) como o indacaterol (HSU, 2022).

No entanto, todos são racematos, ou seja, compostos de isômeros (R) e (S) em uma mistura com quantidades iguais de cada isômero. O (R)-salbutamol tem 150 vezes mais afinidade com o  $\beta_2$ -adrenoceptor do que (S)-salbutamol. Então, (R)-salbutamol é o principal responsável pelos efeitos terapêuticos (HANDLEY, 2001). Aparentemente, o isômero (S) não provoca efeitos benéficos nem maléficos nos seus usuários, então a separação racêmica não é feita, pois demandaria um maior custo de produção e, consequentemente, maior custo do produto ao consumidor (BAKALE, 1996).

Figura 3. Estrutura química do (R) e (S)-salbutamol.



Fonte: Autoria própria, 2022.



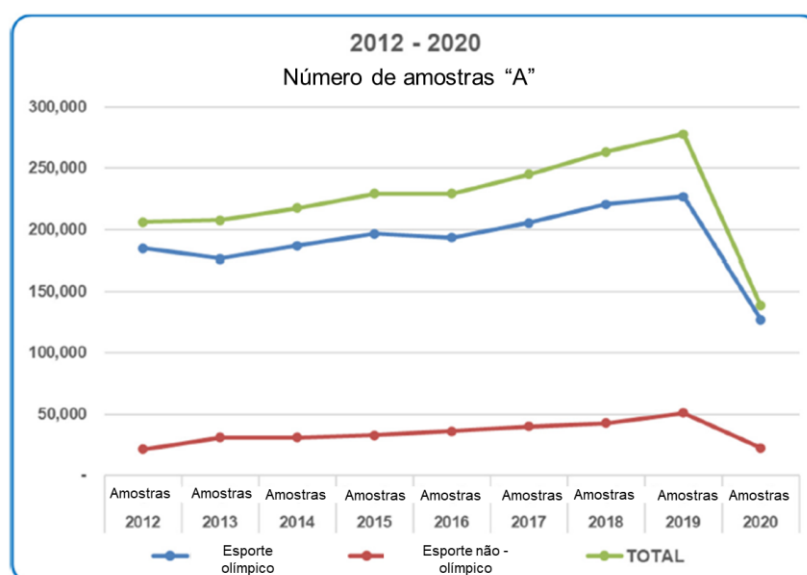
Dos  $\beta$ -agonistas comercializados, o salbutamol é o medicamento mais amplamente prescrito para o tratamento da asma, sendo o décimo mais usado nos Estados Unidos em 2018. Além dos pacientes, esse também é o  $\beta$ 2-agonista mais usado pelos atletas (FUENTES, 2018).

Os  $\beta$ 2-agonistas representam um risco real ou potencial para a saúde do atleta. Os efeitos colaterais comuns incluem tonturas, dor de cabeça, níveis baixos de potássio no sangue, náusea, taquicardia, alterações no intervalo cardíaco e efeitos no sistema nervoso central, como nervosismo e dificuldade para dormir. Em doses muito altas, foram relatados efeitos adversos graves, incluindo parada cardíaca e rabdomiólise. Quando usado cronicamente, ocorre o desenvolvimento da tolerância (HOSTRUP, 2020).

### 1.3. A luta antidopagem em números

De acordo com o relatório de substâncias analisadas pelos laboratórios acreditados pela AMA em 2020, 149.758 amostras “A” foram analisadas ao redor do mundo. Os dados de 2020 mostram uma redução de 46,1% no número de amostras de urina analisadas: de 278.047 em 2019 para 149.758 em 2020. A pandemia do COVID-19 impactou as competições esportivas em 2020 e, portanto, a oportunidade para as Organizações Antidopagem (ADO) coletarem amostras foi mais focada em testes fora de competição. Consequentemente, todos os laboratórios credenciados pela AMA tiveram uma redução no número total de amostras registradas em 2020 em relação a 2019 (Anti-Doping Testing Figures Report, 2021).

Figura 4. Número de amostras “A” analisadas entre 2012 e 2020.



Fonte: Anti-Doping Testing Figures Report, 2021.

Resultado atípico é definido no Código como uma amostra que requer investigação adicional, conforme fornecido pelo ISL ou Documentos Técnicos relacionados antes da determinação de um Resultado Analítico Adverso.

Resultado analítico adverso (AAF) é definido no Código como a presença de uma substância proibida ou seus metabólitos ou marcadores, incluindo quantidades elevadas de substâncias endógenas ou evidência do uso de um método proibido.

Foi demonstrada uma redução no percentual total de AAF, de 0,97% em 2019 (2.702 AAF de 278.047 amostras) para 0,67% em 2020 (1.009 AAF de 149.758 amostras). Enquanto a quantidade de Resultados Atípicos (ATF) caiu de 319 em 278.047 amostras para 217 ATF em 149.758 amostras.

Tabela 1. Resultados analíticos adversos em 2020.

<b>Esporte</b>	<b>Análises</b>	<b>AAFs</b>	<b>(%)</b>	<b>ATFs</b>	<b>(%)</b>	<b>Resultados totais</b>	<b>(%)</b>
Olímpico	127.483	612	0,48%	168	0,13%	780	0,61%
Não olímpico	22.275	397	1,78%	49	0,22%	446	2,0%
<b>TOTAL</b>	<b>149.758</b>	<b>1.009</b>	<b>0,67%</b>	<b>217</b>	<b>0,14%</b>	<b>1.226</b>	<b>0,82%</b>

Fonte: Anti-Doping Testing Figures Report, 2021.

As AAFs e ATFs do Relatório 2020 também podem corresponder a múltiplos achados sobre o mesmo atleta, ou medidas realizadas no mesmo atleta, como através dos módulos hematológicos e esteroides da ABP, ao longo de um período. Assim, um número maior de amostras foi identificado como AAF, totalizando 1513 amostras. E destas, 67 ocorrências correspondem à categoria S3, o que significa 4% de todas das descobertas reportadas pelo Sistema de Administração e Gerenciamento Antidopagem (ADAMS). Dentre essas 67 amostras, três correspondem ao salbutamol, o que significa 4% dentre os  $\beta$ 2-agonistas (Anti-Doping Testing Figures Report, 2021).

Tabela 2. Substâncias identificadas como AAFs em cada classe de medicamentos.

Grupos de substâncias	Ocorrências	% das ocorrências reportadas no ADAMS
S1 Agentes anabólicos	704	47%
S6 Estimulantes	225	15%
S5 Diuréticos e outros agentes mascarantes	213	14%
S4 Hormônios e moduladores metabólicos	127	8%
S9 Glicocorticosteróides	69	5%
S3 Beta-2 agonistas	67	4%
S8 Canabinoides	42	3%
S2 Hormônios peptídicos, fatores de crescimento e substâncias relacionadas	48	3%
S7 Narcóticos	4	0,3%
P1 Beta bloqueadores	14	0,9%
M1 Melhora da transferência de oxigênio	0	0%
M2 Manipulação química ou física	0	0%
<b>TOTAL</b>		1.513

Fonte: Anti-Doping Testing Figures Report, 2021.

Tabela 3. Substâncias identificadas como AAFs na classe S.3  $\beta$ 2-agonistas.

S.3 Beta-2 agonistas	Ocorrências	% no grupo de substâncias
Terbutalina	28	42%
Higenamina	26	39%
Vilanterol	8	12%
Salbutamol	3	4%
Fenoterol	1	1%
Procaterol	1	1%
<b>TOTAL</b>		67

Fonte: Anti-Doping Testing Figures Report, 2021.

#### 1.4. Metabolismo do salbutamol

O metabolismo do salbutamol no corpo humano ocorre, principalmente, através da formação dos conjugados sulfato e glicuronídeo. Esse processo ocorre no fígado, através da ação das enzimas hepáticas. O salbutamol é rapidamente absorvido após a administração oral ou inalação. Cerca de 60 a 90% da dose é excretada na urina em 24h, das quais cerca de 50% é salbutamol não conjugado (SALEH, 2000).

O salbutamol é identificado em uma amostra de urina em laboratórios de controle de dopagem por meio de procedimentos iniciais de análise (análise de triagem) do LBCD. Caso detectado, esta amostra precisa passar por uma etapa de confirmação, onde o analito procurado será especificamente o agonista. O salbutamol é uma substância que depende da concentração para

que seja considerado um resultado analítico adverso ou não, sendo assim conhecido como uma substância *threshold*. Urge a necessidade de separar aqueles que usam o salbutamol clinicamente e aqueles que abusam de seus efeitos. Atualmente, a concentração máxima para o salbutamol em urina se encontra em  $1,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ , com limite de decisão igual a  $1,20 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Assim, para confirmação da concentração de salbutamol, faz-se necessária uma abordagem quantitativa através de curva de calibração (TD2022DL, 2022).

### 1.5. Conjugação e remoção da parte conjugada

A remoção de uma droga no corpo pode ser realizada pela excreção do fármaco biotransformado ou não metabolizado. A excreção é realizada principalmente pelos rins, e o fígado é o principal local de biotransformação. As drogas hidrofílicas são normalmente excretadas diretamente, enquanto as drogas hidrofóbicas sofrem alteração antes da sua eliminação (GARZA, 2022).

Existem duas fases metabólicas de transformação hepática de drogas. A fase I é a modificação direta da molécula alvo, enquanto a fase II envolve a conjugação do alvo a uma molécula polar (POLETTINI, 1996).

A fase I envolve oxidação, redução e hidrólise do fármaco original. Essas reações são realizadas por enzimas do retículo endoplasmático liso dos hepatócitos. As substâncias geradas podem ser inativas, semelhantes ou diferentes do medicamento original em atividade terapêutica ou toxicidade (LU, 2019).

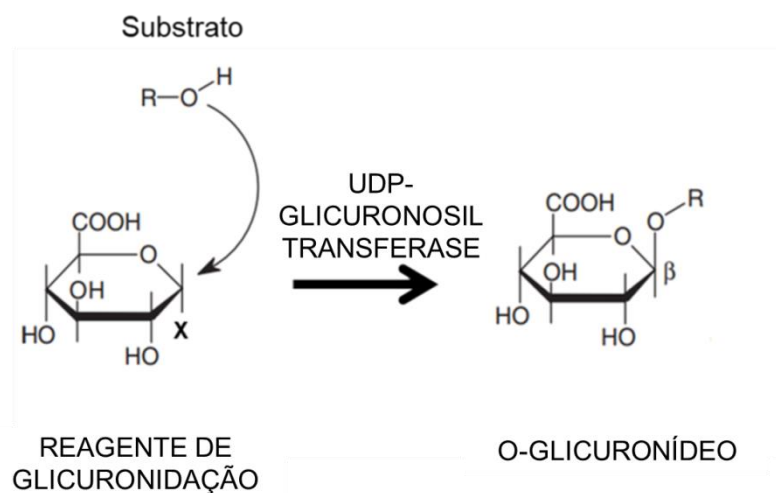
A fase II consiste em torná-las solúveis em água para melhorar a eliminação renal. Diversos grupos podem ser transferidos, incluindo ácido glicurônico, acetato e sulfato (GARZA, 2022).

A glicuronidação é uma das principais vias de biotransformação de fase II e seu esquema pode ser visto na Figura 5 para um fármaco qualquer (a) e para o salbutamol (b).

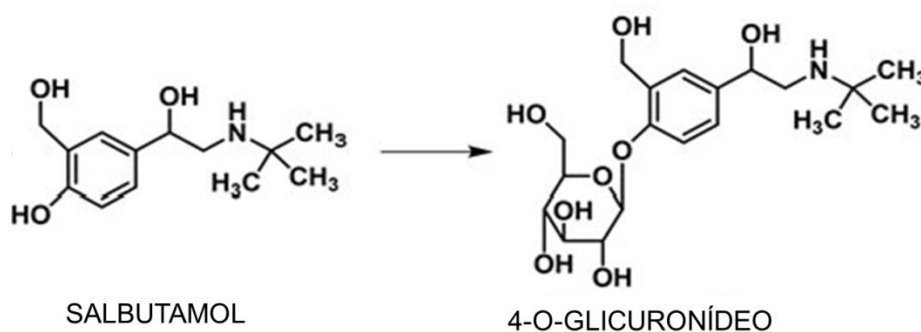
A glicuronidação consiste na transferência do ácido glicurônico para o substrato e a reação é catalisada por UDP-glicuronosiltransferase (AL-ZOUGHLOO, 2006). A conjugação envolve substituição nucleofílica no átomo de carbono  $C_1$  do ácido glicurônico pelo átomo de oxigênio, enxofre ou nitrogênio do substrato. As substâncias resultantes da glicuronidação são conhecidas como glicuronídeos (BANES, 2021).

Figura 5. Esquema de glicuronidação.

## a) Reação geral



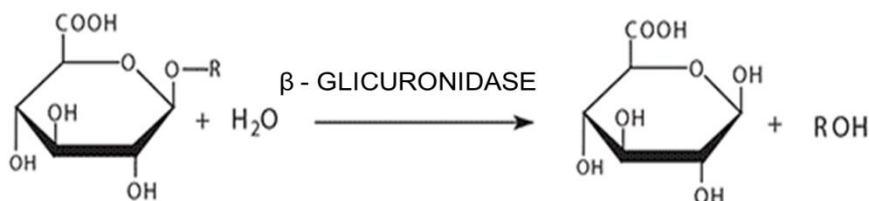
## b) Reação com salbutamol



Fonte: Adaptado de Testa, 2007.

Para garantir que moléculas conjugadas sejam extraídas completamente da urina e possam ser determinadas pela cromatografia gasosa com detector de massas triplo quadrupolo (CG-TQ), uma etapa de desconjugação enzimática é necessária (COLLINS, 1994). Os glicuronídeos dessas drogas têm uma configuração  $\beta$  e, portanto, são substratos para a  $\beta$ -glicuronidase (DE GRAAF, 2002).

Figura 6. Reação geral de hidrólise por  $\beta$ -glicuronidase.

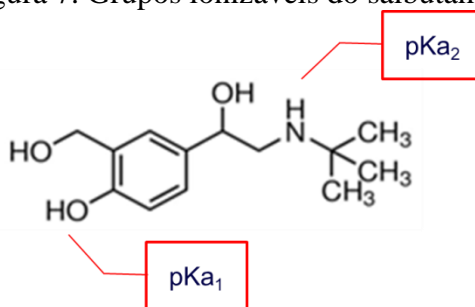


Fonte: Adaptado de McCarter, 1994.

#### 1.6. Separação do analito da matriz

Muitas análises para fins de controle de dopagem são conduzidas usando metodologias de separação, como extração em fase líquida (EFL), precipitação de proteínas (PP) ou extração em fase sólida (EFS), de modo que o analito é desassociado da fase aquosa (urina) para uma fase orgânica idealmente volatilizável, podendo então ser analisado por CG-TQ (KIM, 2018). Foi escolhida a EFS utilizando uma coluna de troca catiônica fraca, observando que o salbutamol possui dois grupos ionizáveis: o grupo hidroxila fenólico com  $pK_a$  9,3 e o grupo amina secundária com  $pK_a$  10,3 (MAMLOUK, 2013).

Figura 7. Grupos ionizáveis do salbutamol.



Fonte: Elaboração própria.

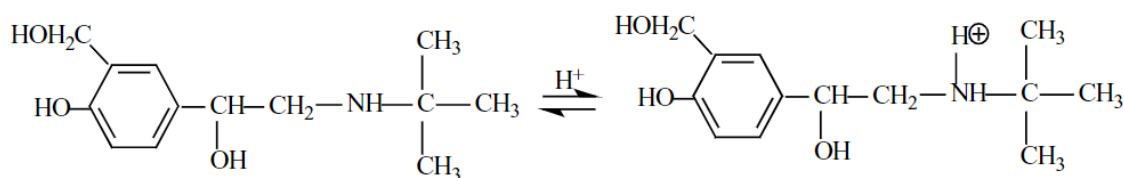
De acordo com a equação de Henderson-Hasselbalch (Equação 1), se o pH for igual ao  $pK_a$ , a concentração de moléculas protonadas ( $[HA]$ ) e desprotonadas ( $[A^-]$ ) é igual. Se o pH for menor que o  $pK_a$ , a  $[HA]$  é maior. Quando o pH é maior que o  $pK_a$ , mais ácido será convertido no estado desprotonado, ou seja, a  $[A^-]$  é maior. Desse modo, foi escolhido o valor de pH entre 6 e 7 para a utilização da coluna de troca catiônica para garantir que o analito estivesse protonado.

Equação 1. Equação de Henderson-Hasselbalch.

$$\text{pH} = \text{p}K_a + \log \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]}$$

Assim, espera-se que essas moléculas possam ser separadas em uma coluna de troca catiônica usando apenas solvente orgânico como fase móvel. Por outro lado, os compostos hidrofóbicos, presentes na matriz, possuem baixa retenção no modo de troca iônica, portanto sua interferência poderia ser eliminada (MENG, 2012). O salbutamol pode ser protonado em meio ácido. Isto pode fazer com que sua retenção na coluna seja aumentada (OUYANG, 2005).

Figura 8. Estrutura do salbutamol.



Fonte: Adaptado de Ouyang, 2005.

A explicação da cromatografia de troca iônica é baseada na atração de moléculas com cargas opostas. A molécula possui cargas diferentes dependendo do pH do meio. O trocador de íons é composto de uma base onde um ligante carregado negativamente ou positivamente é imobilizado. Trocadores de cátions são carregados negativamente e trocadores de ânions são carregados positivamente. Trocadores de carga fortes se comportam como um ácido ou base forte e não alteram a carga dentro de uma ampla faixa de pH. As fases de troca iônica fraca têm ácidos ou bases fracas como seu grupo de troca iônica e são carregadas apenas sob determinadas condições de pH (MARIN, 2020).

Figura 9. Esquema de extração por fase sólida na coluna de troca catiônica fraca.

### Strata-X-CW

Para bases com  $pK_a > 8$

**Condicionamento**  
1 mL metanol

**Equilíbrio**  
1 mL água, pH 6-7

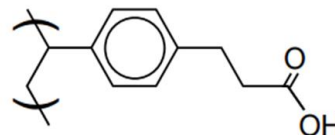
**Percolar amostra**  
pH 6-7

**Primeira lavagem**  
1 mL água, pH 6-7

**Segunda lavagem**  
1 mL metanol  
Coletar essa fração para analisar substâncias neutras/ácidas

**Eluir qualquer base**  
2 x 500  $\mu$ L 5% ácido fórmico em metanol

### Troca catiônica fraca: Ligante ácido carboxílico



**Eluir bases fracas**  
2 x 500  $\mu$ L 5%  $NH_4OH$  em metanol

Fonte: Adaptado de Phenomenex, 2022.

## 1.7. Derivatização

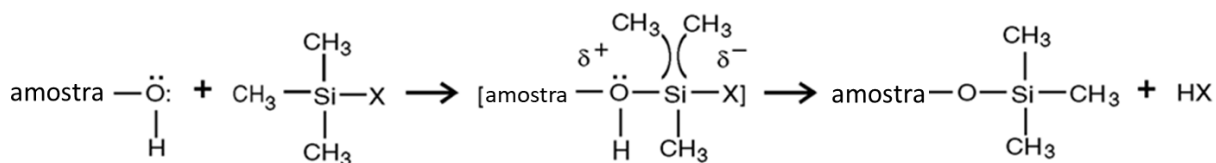
A derivatização tem um papel importante na detecção de  $\beta$ 2-agonistas por CG-TQ. O objetivo principal em realizar reações de derivatização é tornar as moléculas volatilizáveis e termicamente estáveis de modo a permitir sua análise por cromatografia gasosa (CG). Idealmente, um único derivado deve ser formado para cada composto, com rendimento alto e reprodutível, sem formação de produtos secundários.

Os métodos de derivatização mais utilizados são a sililação, acilação e alquilação. Entre as metodologias aplicadas, a formação de trimetilsilil (TMS), perfluoroacil ou derivados metilados, respectivamente, são amplamente utilizados (MONTRADE, 1995).

No presente trabalho, a estratégia de derivatização utilizada foi a sililação. O mecanismo envolve a substituição dos hidrogênios ativos (grupos -OH, -COOH, -NH, -NH<sub>2</sub> e -SH), que podem formar ligações de hidrogênio entre as moléculas, por um grupo silil. Essa reação ocorre em uma única etapa, onde os sítios próticos são bloqueados, o que diminui as interações do tipo dipolo-dipolo, aumentando a volatilidade das moléculas (BLAU, 1993).



Figura 10. Formação de derivados TMS.

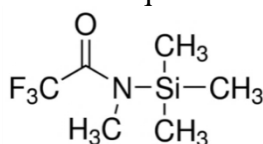


Fonte: Adaptado de MOHD, 2012.

A sililação ocorre através do ataque nucleofílico ( $S_N2$ ), e o par de elétrons do átomo mais eletronegativo irá atacar o átomo de silício, resultando na produção de um estado de transição bimolecular na etapa intermediária do mecanismo de reação. Quanto melhor o grupo de saída, melhor a sililação, o que implica em um grupo de saída mais básico que o grupo que está sendo introduzido (MOHD, 2012).

O reagente utilizado para a derivatização com reação de sililação neste trabalho foi o N-metil-N-trimetilsilil-trifluoroacetamida (MSTFA) para serem obtidos derivados TMS.

Figura 11. Estrutura química do MSTFA.



Fonte: Sigma Aldrich, 2022.

#### 1.8. Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-TQ)

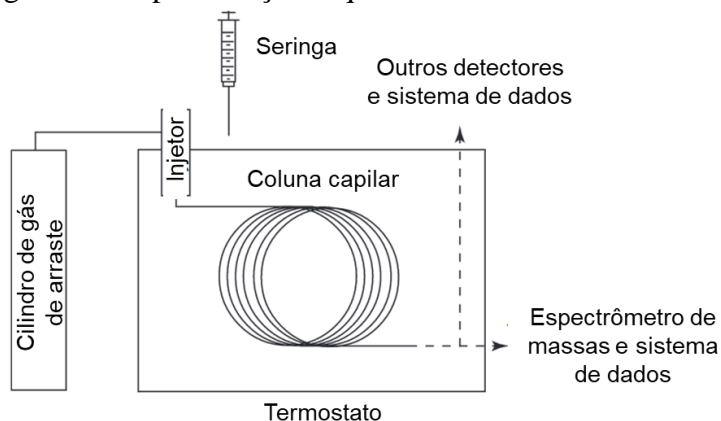
Cromatografia é um método de separação de misturas que percorrem uma fase móvel (FM) e uma fase estacionária (FE), e a separação se dá através da diferença de interação dos analitos com o componente da FE, por ocorrências de interações moleculares. Na CG, a FM é um gás inerte e a sua principal função é carrear os analitos que foram inseridos na coluna pelo sistema de injeção.

A FE é a responsável pelas interações físico-químicas que ocorrem entre a FM e o analito. Essas interações podem influenciar a retenção do analito de acordo com suas características físico-químicas e, conseqüentemente, a força das interações intermoleculares. O ponto de ebulição do analito e a sua pressão de vapor também são parâmetros importantes na cromatografia gasosa.

Resumidamente, a amostra é vaporizada no *liner* e o gás de arraste carrega a amostra pela coluna até o detector. A coluna está em um forno que é operado com temperatura controlada,

que pode inclusive apresentar diferentes temperaturas durante a corrida para melhorar a separação dos analitos da amostra. Na Figura 12, uma representação do equipamento de CG.

Figura 12. Representação esquemática de um sistema de CG.



Fonte: Adaptado de NAGY, 2008.

Um cromatograma é um gráfico que relaciona o tempo de retenção dos analitos em uma amostra, com sua área ou abundância. O tempo de retenção ( $t_R$ ) é o tempo decorrido entre a introdução da amostra e o sinal máximo do composto no detector. O  $t_R$  está fortemente correlacionado com as propriedades físico-químicas do analito, fornecendo informações qualitativas sobre o composto. O  $t_R$  de um analito pode ser influenciado pelo fluxo de gás, diferenças de temperatura no forno e na coluna, degradação e comprimento da coluna (NAGY, 2008).

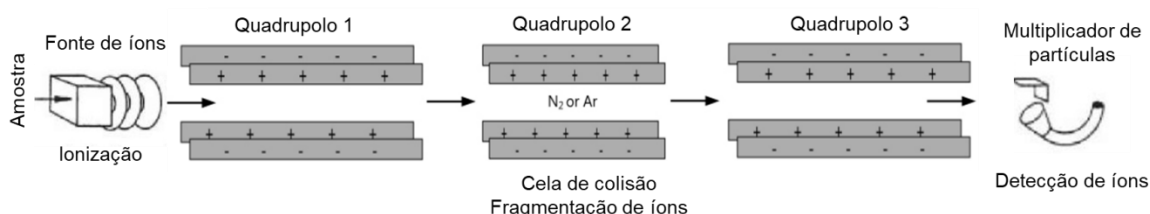
A cromatografia pode ser combinada a diferentes sistemas de detecção. O acoplamento da cromatografia com a espectrometria de massas (EM) é frequentemente utilizado em laboratórios de análise forense para identificar e quantificar substâncias proibidas.

A EM tem como base a produção de íons em fase gasosa. Um dos métodos de ionização mais empregados em CG-TQ é a ionização por impacto de elétrons (IE), recentemente nomeada de ionização eletrônica. No IE, o analito de interesse é bombardeado com feixes de elétrons de alta energia (em geral, 70eV), em fase gasosa. As moléculas do analito absorvem esta energia desencadeando vários processos, como a remoção de um único elétron ou a fragmentação dos analitos, gerando cátions radicais ( $M^+$ ). Estes são separados por um analisador de massas de acordo com a sua razão massa-carga ( $m/z$ ), gerando um espectro (WU, 2015).

O analisador de massa utilizado foi o triplo quadrupolo, que é constituído por dois quadrupolos separados por uma câmara de colisão, na qual ocorre a fragmentação dos íons

selecionados no primeiro quadrupolo, frequentemente por dissociação induzida por colisão (DIC) com um gás inerte, em geral argônio ou nitrogênio.

Figura 13. Diagrama de um analisador Triplo Quadrupolo (TQ).

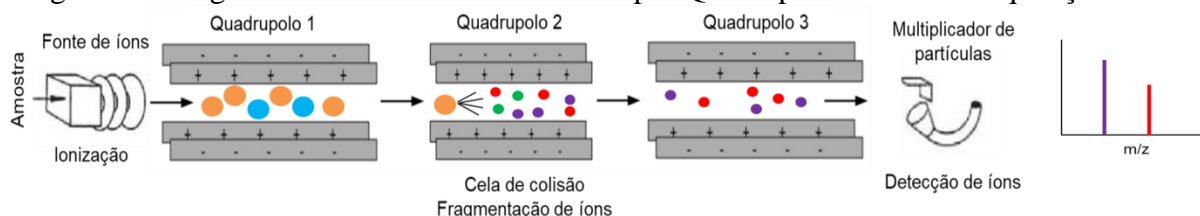


Fonte: Adaptado de WU, 2015.

O íon precursor proveniente do primeiro quadrupolo é acelerado por um potencial elétrico para uma região de alto vácuo no interior do segundo quadrupolo, onde sofre repetidas colisões com o gás inerte de elevada energia, o que leva a um aumento na energia potencial deste íon até ocasionar sua fragmentação, conduzindo à formação dos íons produto. Os quadrupolos são controlados para transmitir íons de uma única razão  $m/z$  ou de um intervalo de razões  $m/z$  (CHIARADIA, 2008).

No modo varredura total (*Full Scan*), a aquisição do espectro de massa total é programada para analisar todas as massas do seu espectro de operação ou dentro de uma determinada faixa de  $m/z$ . O triplo quadrupolo também pode operar em modo Monitoramento da Reação Seleccionada (SRM), onde o primeiro e o terceiro quadrupolo atuam como filtros de massa para o íon precursor e o íon produto, respectivamente. Na câmara de colisão ocorre a fragmentação do íon precursor em íon produto (CROOTE, 2016).

Figura 14. Diagrama de EM com analisador Triplo Quadrupolo – modo de aquisição SRM.



Fonte: Adaptado de WU, 2015.

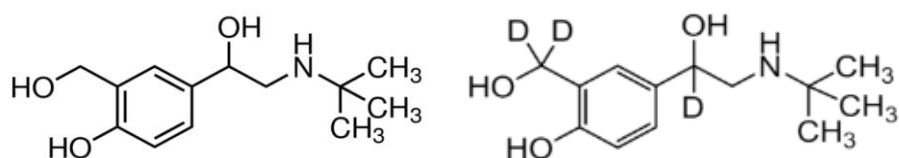
Um padrão interno (PI) é usado para auxiliar na quantificação de um analito, especialmente na preparação de amostra em várias etapas, quando é possível que, devido às manipulações sucessivas, ocorra perda de amostra. É adicionada uma quantidade constante do padrão

interno a cada amostra e, em vez de acompanhar a área ou altura absoluta do pico para fins de calibração, usa-se a razão entre a área ou altura do analito e o padrão interno.

O PI ideal deve comportar-se de forma semelhante ao analito, mas fornecer um sinal que possa ser distinguido dele. Idealmente, qualquer fator que afete o sinal de analito também afetará o sinal do padrão interno no mesmo grau. Assim, a razão dos dois sinais exibirá menos variabilidade do que o sinal de analito. O método de adição de PI é utilizado para melhorar a precisão da análise quantitativa.

Foi utilizado o salbutamol-d3 (três deutérios no lugar de três hidrogênios) como padrão interno devido a sua semelhança estrutural e características físico-químicas semelhantes ao salbutamol, além de não ser encontrado na urina (MARECK, 2011). As estruturas podem ser comparadas na Figura 15.

Figura 15. Estrutura química do salbutamol e salbutamol-d3.



Fonte: Adaptado de Sigma Aldrich, 2022.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral

O trabalho tem como objetivo geral atualizar o método analítico quantitativo para a detecção de salbutamol na matriz urina humana visando a sua implementação na rotina do Laboratório Brasileiro de Controle de Dopagem conforme as orientações da AMA.

### 2.2. Objetivos Específicos

- Aprimorar as etapas de preparação do analito para o CG-TQ de forma a diminuir o tempo de análise;
- Verificar qual forma de extração do salbutamol, em fase sólida ou em fase líquida é a mais adequada para uso em rotina;
- Aumentar a eficiência de extração através de diferentes solventes ou sais;
- Avaliar o uso de MSTFA como agente de derivatização ao invés de uma mistura de derivatizantes;
- Validar o método através dos seguintes parâmetros: linearidade, repetitividade, seletividade, arraste, interferência de matriz, precisão intermediária e robustez.

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1. Preparação de soluções

Branco de urina (BU): O branco de urina utilizado consistiu em um *pool*, ou seja, a mistura de urinas de voluntários que não fazem o uso de salbutamol. Foi armazenado a -20 °C.

Branco: água deionizada, recolhida no dia de cada análise.

Controle de qualidade negativo (CQN): Branco de urina fortificado com salbutamol-d3. Armazenado a -20 °C.

KOH 1 mol L<sup>-1</sup>: 5,6 g de KOH foram pesados em um vidro de relógio. O sólido foi transferido para um béquer e dissolvido com água deionizada. A solução foi transferida quantitativamente para um balão volumétrico e avolumado a 100 mL. A solução foi transferida para um frasco e armazenada à temperatura ambiente.

Salbutamol: A partir de uma solução inicial de salbutamol de concentração de 1000 ng µL<sup>-1</sup> foi retirada uma alíquota de 1 mL e adicionada a um balão volumétrico de 5,00 mL. O balão foi avolumado com metanol e a solução final teve concentração de 200 ng µL<sup>-1</sup>. Foi armazenado a -20 °C.

Salbutamol-d3: A partir de uma solução inicial de salbutamol-d3 de concentração de 400 ng µL<sup>-1</sup> foi retirada uma alíquota de 1,25 mL e adicionada a um balão volumétrico de 5,00 mL. O balão foi avolumado com metanol e a solução final teve concentração de 100 ng µL<sup>-1</sup>. Armazenado a -20 °C.

Solução derivatizante: foram pesados 300 mg de NH<sub>4</sub>I, que foi transferido para um frasco de 50 mL de MSTFA. Então, 600 µL de 2-mercaptoetanol foram adicionados. A concentração final dos componentes segue a proporção 500:3:6 v:m:v em MSTFA, NH<sub>4</sub>I e 2-mercaptoetanol. Armazenada à temperatura ambiente.

Tampão fosfato de sódio 0,8 mol L<sup>-1</sup> (pH 7,0): Foram pesados 17,6 g de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e 36,4 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> em uma balança analítica calibrada. Adicionaram-se 460,0 g de água deionizada à temperatura ambiente aos sólidos. A solução foi homogeneizada com agitação magnética e armazenada à temperatura ambiente.

Tampão carbonato/bicarbonato 20% (pH 10,0): Foram pesados 60,0 g de  $K_2CO_3$  e 60,0 g de  $KHCO_3$  em uma balança analítica calibrada. Adicionaram-se 480,0 g de água destilada à temperatura ambiente aos sólidos. A solução foi homogeneizada com agitação magnética e armazenada à temperatura ambiente.

Tampão carbonato/bicarbonato 10% (pH 10,5): Foram pesados 20 g de  $K_2CO_3$  e 6,32 g de  $KHCO_3$  em uma balança analítica calibrada. Foram adicionados 173,68 g de água destilada à temperatura ambiente. A solução foi homogeneizada com agitação magnética e armazenada à temperatura ambiente.

### 3.2. Materiais

Acetato de etila ( $CH_3COOC_2H_5$ ) 99,8%, Merck KGaA

Ácido fórmico ( $CH_2O_2$ ) 98-100%, Merck KGaA

Beta-glicuronidase de *E. coli* K12, Roche Diagnostics GmbH

Dihidrogenofosfato de sódio monoidratado ( $NaH_2PO_4$ ), Merck KGaA

Éter metil-t-butílico 99,8% (MTBE). Tedia Company, Inc.

Hidrogenofosfato dissódico anidro ( $Na_2HPO_4$ ), Merck KGaA

Hidróxido de potássio (KOH), Biograde

Hidróxido de amônio 25% ( $NH_4OH$ ), Merck KGaA

Metanol ( $CH_3OH$ ) 99,9%, Tedia Company, Inc.

N-metil-N-trimetilsilil-trifluoroacetamida ( $CF_3CON(CH_3)Si(CH_3)_3$ ), (MSTFA), Chemische Fabrik Karl Bucher

Strata-XCW – Weak Cation Exchange & Reversed Phase, Phenomenex.

Salbutamol sulfato,  $(C_{13}H_{21}NO_3)_2 \times H_2SO_4$ , 1.000 mg  $mL^{-1}$ , LGC Quality

Salbutamol-d3,  $C_{13}H_{18}D_3NO_3$ , 938ug por ampola.

Sulfato de amônio 99%, PA,  $((NH_4)_2SO_4)$ , Biograde

Spe-ed SPE Cartridges, Octadecyl C18/18%, 200mg/6mL, Applied Separations

Sulfato de sódio anidro ( $Na_2SO_4$ ), Tedia Company, Inc.

### 3.3. Condições instrumentais CG-TQ

Cromatógrafo a gás Thermo Trace 1310 Series acoplado a espectrômetro de massas do tipo quadrupolo – Thermo TSQ 8000 EVO, com injetor automático Triplus RSH. Os solventes usados para limpeza foram acetona e acetato de etila. Coluna analítica tipo 100% dimetilpolisiloxano, 17m de comprimento, espessura de filme 0,11 $\mu$ m e diâmetro de coluna 0,20mm. Hélio ultrapuro (99,9999%) foi usado como gás de arraste, com fluxo constante de 1.129 mL min<sup>-1</sup>. As amostras foram injetadas no modo *split*, com razão de 100.0 para 1.0, com temperatura do injetor a 280°C e fluxo *split* de 112,9 mL min<sup>-1</sup>. O volume da seringa foi de 10,0  $\mu$ L e o volume de amostra injetado foi de 2,0  $\mu$ L. A coluna cromatográfica estava em temperatura inicial de 160,0 °C. A temperatura aumentou a uma taxa de 60,0 °C por minuto até chegar a 195,0 °C. Então, com uma taxa de 5,0°C min<sup>-1</sup>, a temperatura foi aumentada até 205,0 °C. Por fim, a temperatura subiu até 300,0 °C, a 100,0 °C por 2,5 min. Cada corrida durou cerca de 6 minutos.

### 3.4. Método vigente do salbutamol no LBCD

**Preparação:** Foram preparadas três categorias em triplicata: CQN, amostra e eficiência de extração (EE). O CQN equivaleu a apenas o branco de urina, a amostra consistiu em fortificar o branco de urina com o analito e a eficiência de extração foi verificada pela adição do analito somente após a etapa de extração.

Analito: salbutamol, 1000 ng mL<sup>-1</sup>.

PI: salbutamol-d3, 500 ng mL<sup>-1</sup>.

**Hidrólise:** Os tubos foram agitados em *vórtex* por 2 segundos e receberam 750  $\mu$ L de tampão fosfato de sódio. Foram pipetados 30  $\mu$ L de enzima *E. coli* e o tubo foi novamente agitado por 2 segundos. Vedaram-se os tubos com papel alumínio para serem levados a banho-maria termostaticado à 50 °C por 1 hora.

**Extração em fase líquida:** Foram adicionados 500  $\mu$ L de tampão carbonato/bicarbonato de sódio 10%. O pH foi ajustado para 11 com KOH 1 M. A extração foi feita com 2 g de NaCl, adicionados a um grupo de três tubos de cada vez. Então, 5 mL de solução de extração acetato de etila e MTBE (90:10) foram pipetados.

**Separação de fases:** Os tubos são agitados em agitador orbital por 15 minutos. São centrifugados a 3000 rpm por 5 minutos. A fase orgânica é separada para tubos limpos com



auxílio de uma pipeta Pasteur e é evaporada completamente com fluxo de N<sub>2</sub> em banho-maria a 40 °C. As amostras são mantidas no dessecador à vácuo por 30 minutos.

**Derivatização e injeção:** Para a derivatização, são adicionados 100 µL de solução derivatizante. Os tubos são agitados em vórtex por 10 segundos, aquecidos a 60 °C por 20 minutos e transferidos para *vials* de 2 mL. Por fim, ocorre a injeção no CG-TQ.

### 3.5. Extração em fase líquida com *salting out*

**Preparação:** 12 tubos foram separados igualmente em quatro grupos. Cada grupo contém um CQN, uma amostra e EE. O PI foi adicionado a todos os tubos.

Analito: salbutamol, 1000 ng mL<sup>-1</sup>.

PI: salbutamol-d3, 500 ng mL<sup>-1</sup>.

**Hidrólise:** Ver 3.4.

**Extração em fase líquida:** Ver 3.4. No lugar do NaCl foram usados diferentes sais (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), um em cada grupo.

**Separação de fase:** Os tubos passaram 15 minutos no agitador orbital e foram centrifugados a 3000 rpm por 5 minutos. A fase orgânica foi separada para tubos limpos com auxílio de uma pipeta Pasteur. Após a extração, o analito foi adicionado a EE. A fase orgânica evaporou completamente em fluxo de N<sub>2</sub> em banho-maria a 40 °C. As amostras foram mantidas no dessecador à vácuo por 30 minutos.

**Derivatização e injeção:** Ver 3.4.

### 3.6. Extração em fase líquida

#### 3.6.1. Solvente MTBE

**Preparação:** Foram preparados três tubos, denominados CQN, amostra e eficiência de extração, de acordo com 3.5.

Analito: salbutamol, 1000 ng mL<sup>-1</sup>.

PI: salbutamol-d3, 500 ng mL<sup>-1</sup>.

**Hidrólise:** Ver 3.4.

**Extração em fase líquida:** Foram adicionados 500 µL de tampão carbonato/bicarbonato 20% e a extração foi feita com 5 mL de MTBE.

**Separação de fase:** Ver 3.5.

**Derivatização e injeção:** Para a derivatização, foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de MSTFA. Os tubos foram agitados em vórtex por 10 segundos, aquecidos a 60 °C por 20 minutos e transferidos para *vials* de 2 mL, fechados com tampa magnética e as amostras injetadas no CG-TQ.

### 3.6.2. Solvente acetato de etila

A principal diferença deste teste para o procedimento em 3.6.1 consistiu em utilizar somente 3 mL de acetato de etila para realizar a extração. O restante do procedimento utilizado foi o mesmo do tópico 3.6.1.

### 3.7. Extração em fase sólida e em fase líquida concomitantemente

**Preparação:** Foram preparados 12 tubos, sendo quatro CQN, quatro amostras e quatro EE.

Analito: salbutamol, 1000 ng mL<sup>-1</sup>.

PI: salbutamol-d3, 500 ng mL<sup>-1</sup>.

**Extração em fase sólida:** Foi feita uma extração em fase sólida usando a coluna de troca catiônica fraca XCW. A coluna foi condicionada com 1 mL de metanol, 1 mL de água deionizada e o conteúdo de cada tubo foi percolado em sua respectiva coluna. Lavou-se uma vez com 1 mL de água. Nesse momento, o tubo de descarte foi trocado por um tubo limpo, para recolher a primeira eluição, lavando a coluna com 1 mL de metanol.

Os 12 tubos foram divididos em dois grupos. Um grupo foi eluído com 5% de ácido fórmico em metanol e o outro foi eluído com 5% de NH<sub>4</sub>OH em metanol. A fase orgânica foi evaporada completamente com fluxo de N<sub>2</sub> em banho-maria a 40 °C. As amostras foram mantidas no dessecador a vácuo por 30 minutos.

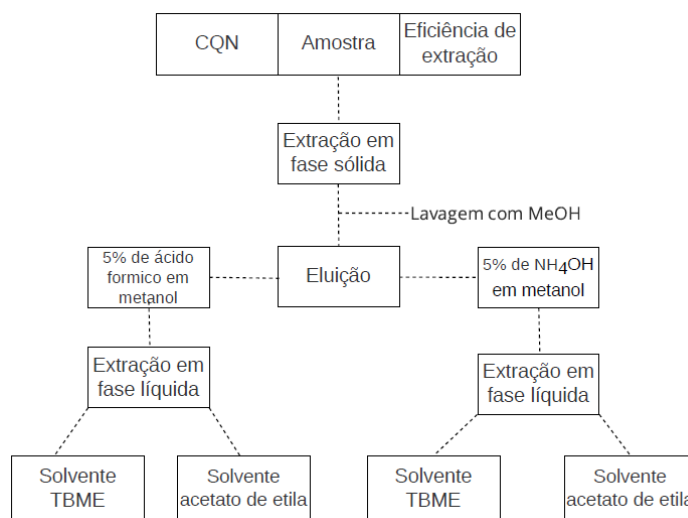
**Hidrólise:** A hidrólise foi feita adicionando-se 250  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato e 750  $\mu\text{L}$  de água deionizada. 30  $\mu\text{L}$  de enzima *E. coli* foram pipetados em cada tubo, que foram agitados em vórtex por 2 segundos e vedados com papel alumínio. A hidrólise levou 1h na estufa a 50°C.

**Extração em fase líquida:** Todos os 12 tubos receberam 500  $\mu\text{L}$  de tampão carbonato/bicarbonato 20%. Para a extração, metade desses tubos receberam 3 mL de acetato de etila e a outra metade recebeu 5 mL de MTBE.

**Separação de fase:** Ver 3.5.

**Derivatização e injeção:** Ver 3.4.

Figura 16. Esquema de duas extrações para o mesmo grupo de tubos.



Fonte: Elaboração própria

### 3.8. Extração em fase sólida

Nesse experimento, apenas a extração em fase sólida foi realizada.

#### 3.8.1. Coluna de troca catiônica fraca XCW

**Preparação:** Foram preparados três tubos, CQN, amostra e EE, de acordo com 3.5.

**Hidrólise:** Ver 3.4.

**Extração em fase sólida:** O condicionamento para esse tipo de coluna foi feito com 1 mL de metanol, 1 mL de água, a amostra em questão foi percolada e lavada com 1 mL de água deionizada e 1 mL de metanol, e finalmente, foi eluída com 2 x 500 µL de NH<sub>4</sub>OH 5% em metanol. O salbutamol foi pipetado no tubo de EE. Os tubos foram agitados por 2 segundos. A fase orgânica foi evaporada completamente com fluxo de N<sub>2</sub> em banho-maria a 40 °C. As amostras foram mantidas no dessecador a vácuo por 30 minutos.

**Derivatização e injeção:** Ver 3.6.1.

#### 3.8.2. Coluna de fase reversa C18

**Preparação:** Foram preparados três tubos, CQN, amostra e EE, de acordo com 3.5.

**Hidrólise:** Ver 3.6.1.

**Extração em fase sólida:** O condicionamento dessa coluna é feito por meio da adição de 2 mL de metanol, 4 mL de água deionizada, agitar a amostra e percolar em sua respectiva coluna, lavar com 2 mL de água deionizada e eluir com 2 mL de metanol. O salbutamol foi

pipetado no tubo de recuperação. Os tubos foram agitados por 2 segundos. A fase orgânica foi evaporada completamente com fluxo de N<sub>2</sub> em banho-maria a 40 °C. As amostras foram mantidas no dessecador a vácuo por 30 minutos.

**Derivatização e injeção:** Ver 3.6.1.

### 3.9. Análise em triplicata

O procedimento realizado em 3.8.1 foi repetido com todos os parâmetros considerados em triplicata.

### 3.10. Validação

O procedimento de validação utilizado para o primeiro dia levou em consideração os seguintes parâmetros: linearidade, repetitividade, arraste, interferência de matriz. Após a preparação dos tubos, o procedimento realizado foi o mesmo do tópico 3.8.1.

**Linearidade:** Foram preparados 18 tubos, consistindo em uma curva analítica com seis níveis de concentração em triplicata.

Analito: salbutamol em diferentes concentrações, de acordo com o quadro.

Quadro 1. Concentração do salbutamol (ng mL<sup>-1</sup>) em cada nível da curva.

Substância	Nível 1	Nível 2	Nível 3	Nível 4	Nível 5	Nível 6
Salbutamol	500	750	1000	1250	1500	2000

PI: salbutamol-d3, 500 ng mL<sup>-1</sup>

**Repetitividade:** foram preparados 10 tubos com urinas do mesmo *pool*.

PI: salbutamol-d3, 500 ng mL<sup>-1</sup>

Analito: salbutamol, 1000 ng mL<sup>-1</sup>

**Arraste:** Foram preparados dois tubos de ensaio, ambos com PI salbutamol-d3 500 ng mL<sup>-1</sup>.

Um dos tubos não possuía analito e o outro recebeu 2000 ng mL<sup>-1</sup> de salbutamol.

**Interferência de matriz:** 10 tubos utilizando BU de dez voluntários diferentes.

PI: salbutamol-d3, 500 ng mL<sup>-1</sup>

Analito: salbutamol, 1000 ng mL<sup>-1</sup>

**Seletividade:** 10 tubos utilizando BU de dez voluntários diferentes, sem padrão interno ou analito. 1 tubo contendo como PI salbutamol-d3, 500 ng mL<sup>-1</sup> e analito salbutamol, 1000 ng mL<sup>-1</sup>

O procedimento de validação utilizado para o segundo dia levou em consideração os seguintes parâmetros: linearidade, precisão intermediária e robustez.

**Linearidade:** Foram preparados seis tubos, consistindo em uma curva analítica simples com seis níveis de concentração.

Analito: salbutamol em diferentes concentrações, de acordo com o Quadro 1.

PI: salbutamol-d3, 500 ng mL<sup>-1</sup>

**Precisão intermediária:** O parâmetro foi executado por outra analista do laboratório, injetado em dia diferente do restante das análises, utilizando todos os mesmos instrumentos empregados. Foram preparados 10 tubos com urinas do *pool*.

PI: salbutamol-d3, 500ng mL<sup>-1</sup>

Analito: salbutamol, 1000 ng mL<sup>-1</sup>.

**Robustez:** Seis tubos foram preparados. Três desses tubos foram hidrolisados por 1h30min enquanto os outros três por apenas 1h.

PI: salbutamol-d3, 500 ng mL<sup>-1</sup>

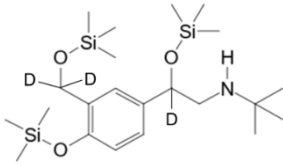
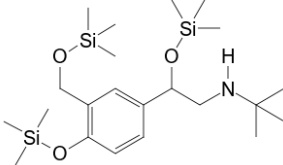
Analito: salbutamol, 1000 ng mL<sup>-1</sup>.

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa é uma técnica aprovada pela AMA no controle de dopagem. Tanto o tempo de retenção cromatográfico quanto os íons gerados na espectrometria de massas são necessários para a identificação de um composto (DOMÍNGUEZ-ROMERO, 2013).

Para verificar a presença de derivados de salbutamol e salbutamol-d3 na CG-TQ, as seguintes transições de massa foram acompanhadas, onde as transições quantitativas foram marcadas em vermelho.

Quadro 2. Estrutura química de derivados tris-TMS e suas transições.

Analito	Estrutura do derivado tris-TMS	Transições ( $m/z$ )
Salbutamol-d3		372.2 → 165.1 372.2 → 193.1 <b>372.2 → 210.1</b>
Salbutamol		369.3 → 163.0 369.3 → 191.1 <b>369.3 → 207.1</b>

Os experimentos foram realizados de modo a melhorar determinadas etapas da análise. O primeiro experimento constituiu-se em reproduzir o método vigente e verificar a quantidade de salbutamol que é efetivamente extraída da amostra. Para simular a urina contendo o broncodilatador, salbutamol foi adicionado a um branco de urina na concentração de corte ( $1000 \text{ ng mL}^{-1}$ ). Já a eficiência de extração desse método foi averiguada com um branco de urina no qual o salbutamol foi adicionado somente após a etapa de extração. Dessa forma, considera-se que nenhuma parte do analito foi perdida durante a extração, correspondendo assim a 100% de analito na amostra.

Tabela 4. Método vigente do salbutamol no LBCD.

Nome	T <sub>R</sub>	Área do pico	Área PI	Razão entre áreas
CQN 1	N/F	0	1015089	N/F
CQN 2	N/F	0	1363761	N/F
CQN 3	N/F	0	1077312	N/F
Amostra 1	2,31	2831284	1560620	1,814
Amostra 2	2,31	1742098	1159561	1,502
Amostra 3	2,31	2421162	1801596	1,344
EE 1	2,31	11597163	2656745	4,365
EE 2	2,31	5261138	1461754	3,599
EE 3	2,31	5262436	1378623	3,817

Para a análise dos dados, foi utilizado o *software* da Thermo Fisher Scientific, chamado TraceFinder, versão 5.1. Quando o *software* não consegue integrar o pico com sucesso por algum motivo, é exibido na coluna N/F (*not found* – não encontrado).

O cálculo do padrão interno determina a quantidade absoluta do analito alvo na amostra corrigida para eventuais desvios de instrumentos e interações químicas durante a preparação da amostra. Uma concentração conhecida e constante de padrão interno é adicionada a todos os brancos, controle de qualidade e amostras. Os resultados são calculados com base na razão das respostas para os picos do padrão e composto desconhecido. Esse resultado é conhecido como resposta relativa ou razão da área.

Equação 2. Razão da área.

$$\text{Razão de área} = \frac{\text{área do analito}}{\text{área do PI}}$$

O cálculo da eficiência de extração foi feito considerando a média das razões de área.

Equação 3. Cálculo da eficiência de extração.

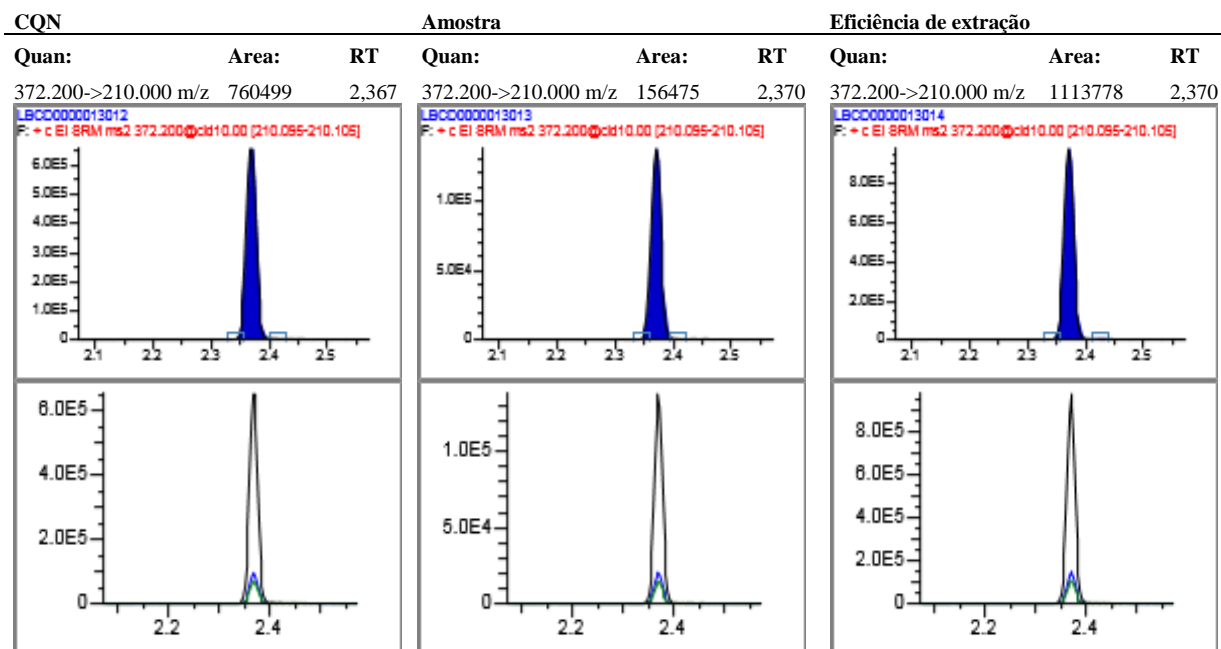
$$\text{Eficiência de extração} = \frac{\text{razão de área amostra}}{\text{razão de área EE}} * 100$$

$$\text{Eficiência de extração NaCl} = \frac{1,553}{3,927} * 100 \approx 40\%$$

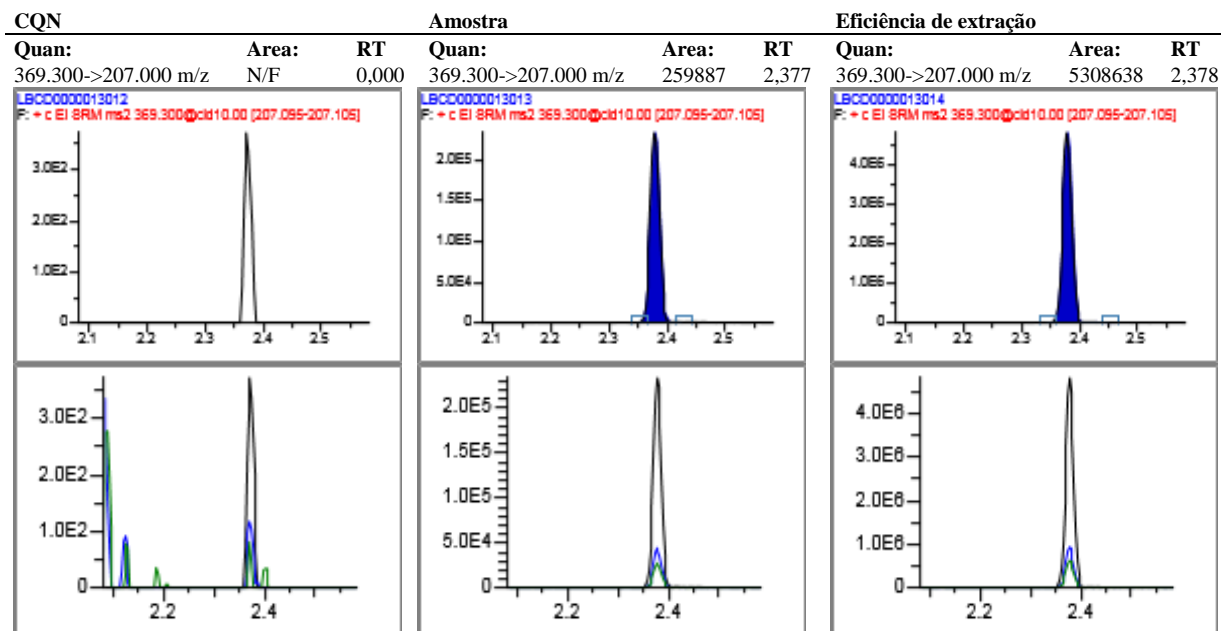
Assim, a eficiência da extração com NaCl é de cerca de 40%.

Resultados obtidos quando NaCl foi utilizado para realizar a extração:

Salbutamol-d3



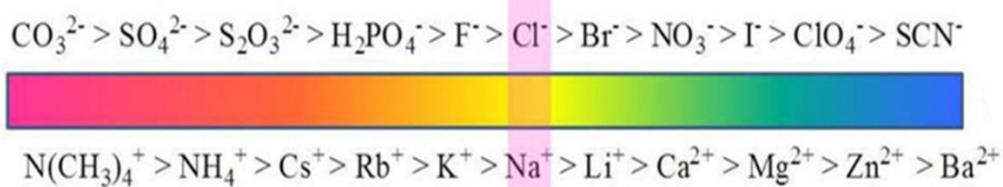
Salbutamol





Esse experimento buscou fazer a investigação da melhora na eficiência de extração ao utilizar diferentes sais para a extrair o analito, de acordo com o seu poder de *salting out*. Foram testados quatro sais diferentes, que foram escolhidos de acordo com a Série de Hofmeister. Tem sido observado, na maioria dos casos, que o ânion tem um efeito muito maior do que o cátion na extração da molécula (KANG, 2020). Conforme a Série, buscando utilizar os cátions e ânions mais fortes e de acordo com a disponibilidade do laboratório, foram utilizados  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  e  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ .

Figura 17. Série de Hofmeister.



Fonte: KANG, 2020.

Tabela 5. Extração em fase líquida e *salting out*.

Nome	T <sub>R</sub>	Área do pico	Área PI	Razão entre áreas
CQN - $\text{Na}_2\text{SO}_4$	N/F	0	588834	N/F
Amostra - $\text{Na}_2\text{SO}_4$	2,38	983470	658625	1,493
EE - $\text{Na}_2\text{SO}_4$	2,38	4039861	2061834	1,959
CQN - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	N/F	0	500986	N/F
Amostra - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2,38	633045	419514	1,509
EE - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	N/F	0	N/F	N/F
CQN - $\text{NaH}_2\text{PO}_4$	2,23	1451	13460	0,108
Amostra - $\text{NaH}_2\text{PO}_4$	2,38	15747	13377	1,177
EE - $\text{NaH}_2\text{PO}_4$	2,38	4193231	52365	80,078
CQN - $\text{Na}_2\text{HPO}_4$	N/F	0	817702	N/F
Amostra - $\text{Na}_2\text{HPO}_4$	2,38	1101150	770938	1,428
EE - $\text{Na}_2\text{HPO}_4$	2,38	3402103	833567	4,081

$$\text{Eficiência de extração Na}_2\text{SO}_4 = \frac{1,493}{1,959} * 100 \approx 76\%$$

$$\text{Eficiência de extração (NH}_4\text{)}_2\text{SO}_4 = \frac{1,509}{\text{não encontrado}} * 100 = \text{não encontrado}$$

$$\text{Eficiência de extração NaH}_2\text{PO}_4 = \frac{1,177}{80,078} * 100 \approx 1\%$$

$$\text{Eficiência de extração Na}_2\text{HPO}_4 = \frac{1,428}{4,081} * 100 \approx 35\%$$

O  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  apresentou o pior desempenho entre os quatro sais selecionados, e seus resultados de extração foram tão baixos que não foi possível calcular a razão da área. O  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  apresentou baixíssima extração comparado ao  $\text{NaCl}$ , com cerca de 1%. O  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  extraiu o analito de forma semelhante ao cloreto de sódio, com 35%. O sal que apresentou melhor resultado foi o  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , com cerca de 80% de eficiência de extração.

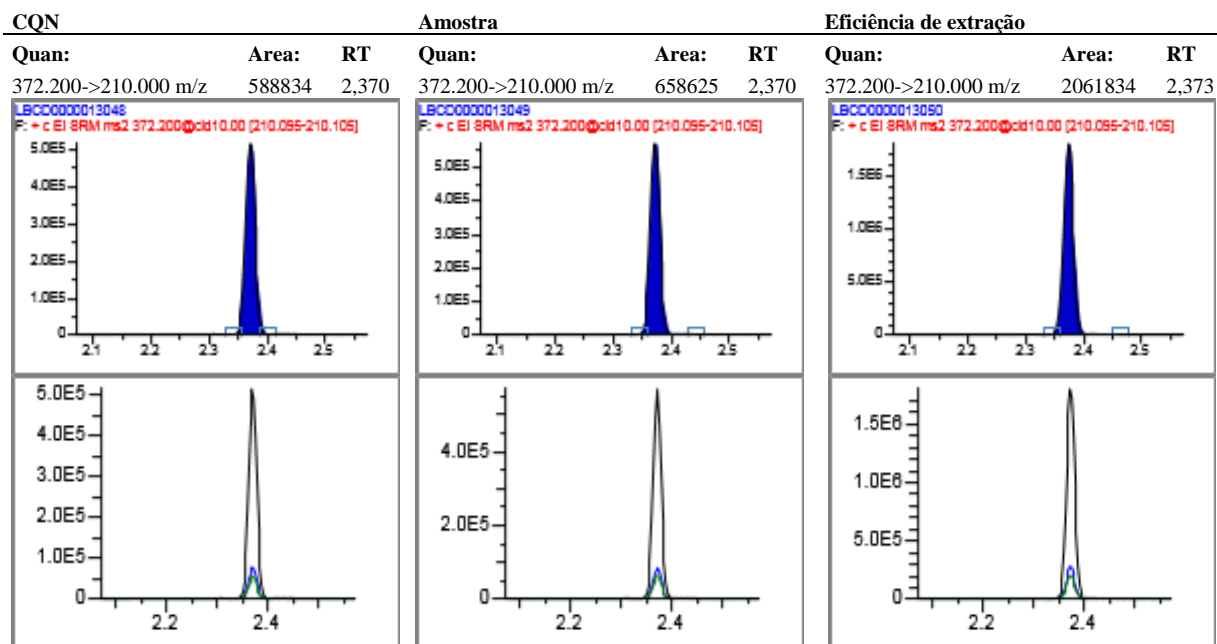
Com exceção do  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , que praticamente dobrou a quantidade de salbutamol extraído da matriz, o uso dos sais não causou uma mudança significativa em comparação ao método já utilizado no LBCD. Não houve redução no número de etapas ou o processo foi facilitado de alguma forma. Os cromatogramas para  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  e  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  encontram-se no Apêndice.

Quadro 3. Eficiência de extração com *salting out*.

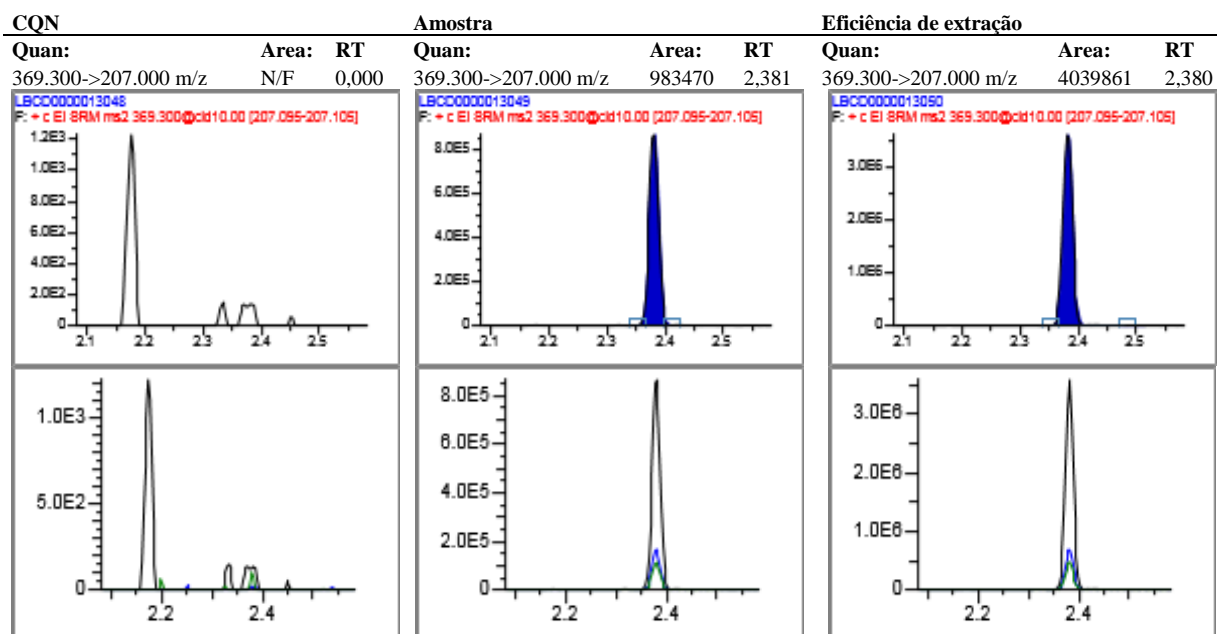
<b>Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	<b>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	<b>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>
76%	Não encontrado	1%	35%

Resultados obtidos quando Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> foi utilizado para realizar a extração:

### Salbutamol-d3

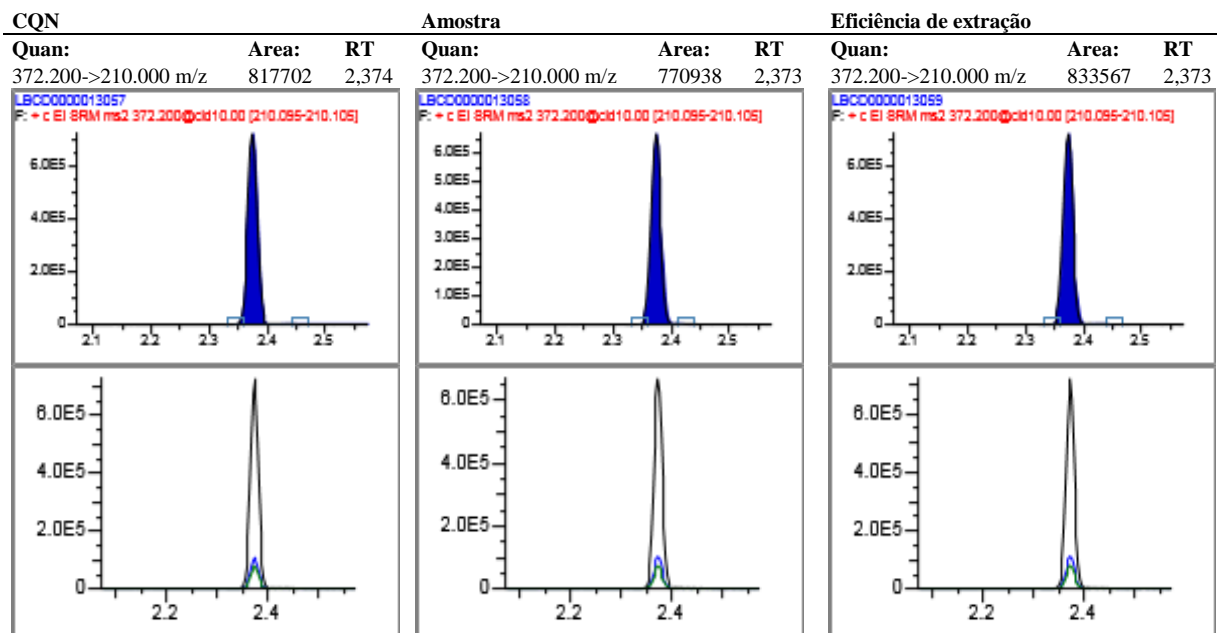


### Salbutamol

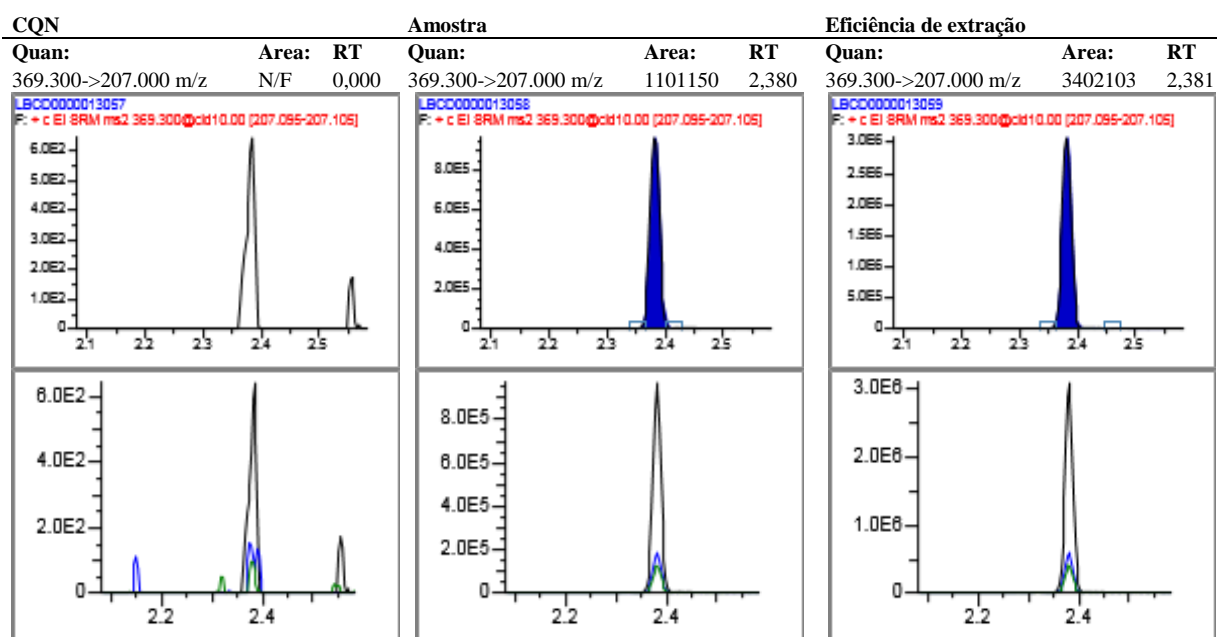


Resultados obtidos quando  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  foi utilizado para realizar a extração:

### Salbutamol-d3

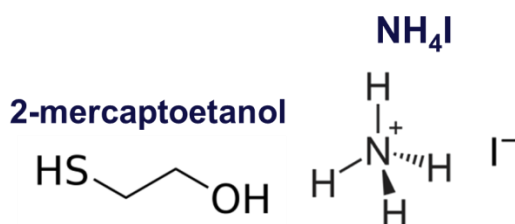


### Salbutamol



Os experimentos realizados até então utilizaram como forma de derivatização uma solução contendo MSTFA,  $\text{NH}_4\text{I}$  e 2-mercaptoetanol. Um dos objetivos deste trabalho é usar somente uma substância para a derivatização, eliminando a etapa de preparação da solução derivatizante. A estrutura do MSTFA é mostrada na figura 11.

Figura 18. Estrutura química de moléculas derivatizantes.



Fonte: Sigma Aldrich, 2022

Um trabalho publicado em 2000 comparou o poder de derivatização de diversos agentes de derivatização sozinhos e combinações desses agentes em moléculas de  $\beta 2$ -agonistas, incluindo o salbutamol. A formação de derivados TMS com diferentes reagentes está descrita na Tabela 6.

Buscou-se um método de formação de derivados que fosse seletivo e eficaz na determinação do salbutamol, formando o tris-TMS-salbutamol. Quando a solução derivatizante contendo MSTFA,  $\text{NH}_4\text{I}$  e 2-mercaptoetanol é utilizada, 100% dos derivados de salbutamol são tris-O-TMS. A mesma molécula é gerada quando somente o MSTFA é usado, o que indica que o uso do MSTFA sozinho é capaz de derivatizar o salbutamol com a mesma eficácia da solução derivatizante. Os próximos experimentos terão apenas o MSTFA como agente derivatizante.

Tabela 6. Derivados de  $\beta$ 2-agonistas formados e suas abundâncias.

Derivatizing agents	Salmeterol <sup>a</sup>	Fenoterol <sup>b</sup>	Formoterol <sup>b</sup>	Compound Bambuterol <sup>c</sup>	Clenbuterol <sup>c</sup>	Salbutamol <sup>c</sup>	Terbutaline <sup>c</sup>
MSTFA	Tris- <i>O</i> -TMS (1%) <i>N</i> -TMS-tris- <i>O</i> -TMS (100%)	Tetrakis- <i>O</i> -TMS (100%) <i>N</i> -TMS-tetrakis- <i>O</i> -TMS (2%)	Bis- <i>O</i> -TMS (<1%) Tris- <i>O</i> -TMS (100%) <i>N</i> -TMS-tris- <i>O</i> -TMS (<1%)	<i>O</i> -TMS (100%)	<i>O</i> -TMS (100%) <i>N</i> , <i>O</i> -TMS (30%)	Tris- <i>O</i> -TMS (100%)	Tris- <i>O</i> -TMS (100%)
BSTFA	Tris- <i>O</i> -TMS (100%) <i>N</i> -TMS-tris- <i>O</i> -TMS (30%)	Tetrakis- <i>O</i> -TMS (100%)	Bis- <i>O</i> -TMS (10%) Tris- <i>O</i> -TMS (100%)	<i>O</i> -TMS (100%)	<i>O</i> -TMS (100%) <i>N</i> , <i>O</i> -TMS (<1%)	Tris- <i>O</i> -TMS (100%)	Tris- <i>O</i> -TMS (100%)
MSTFA–TMCS	Tris- <i>O</i> -TMS (5%) <i>N</i> -TMS-tris- <i>O</i> -TMS (100%)	Tetrakis- <i>O</i> -TMS (100%) <i>N</i> -TMS-tetrakis- <i>O</i> -TMS (15%)	Bis- <i>O</i> -TMS (5%) Tris- <i>O</i> -TMS (100%) <i>N</i> -TMS-tris- <i>O</i> -TMS (5%)	<i>O</i> -TMS (100%) Second TMS derivative (30%) <sup>d</sup>	<i>O</i> -TMS (100%) <i>N</i> , <i>O</i> -TMS (20%)	Tris- <i>O</i> -TMS (100%)	Tris- <i>O</i> -TMS (100%)
BSTFA–TMCS	Tris- <i>O</i> -TMS (100%) <i>N</i> -TMS-tris- <i>O</i> -TMS (20%)	Tetrakis- <i>O</i> -TMS (100%) <i>N</i> -TMS-tetrakis- <i>O</i> -TMS (2%)	Bis- <i>O</i> -TMS (25%) Tris- <i>O</i> -TMS (100%)	<i>O</i> -TMS (100%) Second TMS derivative (5%) <sup>d</sup>	<i>O</i> -TMS (100%) <i>N</i> , <i>O</i> -TMS (5%)	Tris- <i>O</i> -TMS (100%)	Tris- <i>O</i> -TMS (100%)
MSTFA–NH <sub>4</sub> I–2-mercaptoethanol	Tris- <i>O</i> -TMS (30%) <i>N</i> -TMS-tris- <i>O</i> -TMS (100%)	Tetrakis- <i>O</i> -TMS (100%) <i>N</i> -TMS-tetrakis- <i>O</i> -TMS (100%)	Bis- <i>O</i> -TMS (10%) Tris- <i>O</i> -TMS (100%) <i>N</i> -TMS-tris- <i>O</i> -TMS (50%)	<i>O</i> -TMS (100%)	<i>O</i> -TMS (10%) <i>N</i> , <i>O</i> -TMS (100%)	Tris- <i>O</i> -TMS (100%)	Tris- <i>O</i> -TMS (100%)
MSTFA–TMSIm	Tris- <i>O</i> -TMS (80%) <i>N</i> -TMS-tris- <i>O</i> -TMS (100%)	Tetrakis- <i>O</i> -TMS (100%) <i>N</i> -TMS-tetrakis- <i>O</i> -TMS (40%)	Bis- <i>O</i> -TMS (2%) Tris- <i>O</i> -TMS (70%) <i>N</i> -TMS-tris- <i>O</i> -TMS (100%)	<i>O</i> -TMS (20%) Second TMS derivative (100%) <sup>d</sup>	<i>O</i> -TMS (80%) <i>N</i> , <i>O</i> -TMS(100%)	Tris- <i>O</i> -TMS (100%)	Tris- <i>O</i> -TMS (100%)
MSHFBA–TMSIm	Tris- <i>O</i> -TMS (100%) <i>N</i> -TMS-tris- <i>O</i> -TMS (60%)	Tetrakis- <i>O</i> -TMS (5%) <i>N</i> -TMS-tetrakis- <i>O</i> -TMS (100%)	Bis- <i>O</i> -TMS (<1%) Tris- <i>O</i> -TMS (20%) <i>N</i> -TMS-tris- <i>O</i> -TMS (100%)	<i>O</i> -TMS (100%)	<i>O</i> -TMS (100%) <i>N</i> , <i>O</i> -TMS (60%)	Tris- <i>O</i> -TMS (100%)	Tris- <i>O</i> -TMS (100%)
MSTFA–MBTFA	<i>N</i> -TFA-tris- <i>O</i> -TMS (100%)	<i>N</i> -TFA-tetrakis- <i>O</i> -TMS (100%) <i>N</i> -TMS-tetrakis- <i>O</i> -TMS (5%)	Two different derivatives	<i>O</i> -TMS (100%) <i>O</i> -TMS- <i>N</i> -TFA (60%)	Six different derivatives	Tris- <i>O</i> -TMS (100%) <i>N</i> -TFA-tris- <i>O</i> -TMS (80%)	Tris- <i>O</i> -TMS (100%) <i>N</i> -TFA-tris- <i>O</i> -TMS (40%)
MSTFA–TMSIm–MBTFA	<i>N</i> -TFA-tris- <i>O</i> -TMS (100%)	<i>N</i> -TFA-tetrakis- <i>O</i> -TMS (100%) <i>N</i> -TMS-tetrakis- <i>O</i> -TMS (10%)	Three different derivatives	<i>O</i> -TMS (100%) <i>O</i> -TMS- <i>N</i> -TFA (20%)	Non-identified derivative (100%) <i>N</i> , <i>O</i> -TMS (15%)	Tris- <i>O</i> -TMS (100%) <i>N</i> -TFA-tris- <i>O</i> -TMS (60%)	Tris- <i>O</i> -TMS (100%) <i>N</i> -TFA-tris- <i>O</i> -TMS (40%)
TMB	Bis (methyl boronate) derivative	Does not form suitable methyl boronate derivative	Bis (methyl boronate) derivative and three minor non-identified derivatives	Methyl boronate derivative	Methyl boronate derivative	Bis (methyl boronate) derivative	Does not form suitable methyl boronate derivative

<sup>a</sup> Substituent with a primary carbon atom linked to the nitrogen atom of the  $\beta$ -ethanolamine lateral chain.<sup>b</sup> Substituent with a secondary carbon atom linked to the nitrogen atom of the  $\beta$ -ethanolamine lateral chain.<sup>c</sup> Substituent with a tertiary carbon atom linked to the nitrogen atom of the  $\beta$ -ethanolamine lateral chain.<sup>d</sup> See text, Influence of catalyst in trimethylsilylation.

Fonte: Retirado de DAMASCENO, 2000.

Neste experimento, foi verificado o efeito da extração em fase líquida utilizando dois solventes muito utilizados em procedimentos na Triagem IV, o MTBE e o acetato de etila, separadamente e sem adição de sal.

Tabela 7. Solvente MTBE.

Nome	T <sub>R</sub>	Área do pico	Área PI	Razão entre áreas
CQN	N/F	0	112641	N/F
Amostra	2,38	185760	118873	1,563
EE	2,38	3517292	156743	22,44

$$\text{Eficiência de extração MTBE} = \frac{1,563}{22,44} * 100 \approx 7\%$$

Tabela 8. Solvente acetato de etila.

Nome	T <sub>R</sub>	Área do pico	Área PI	Razão entre áreas
CQN	N/F	0	302967	N/F
Amostra	2,39	399221	249193	1,602
EE	2,39	6841780	451061	15,168

$$\text{Eficiência de extração acetato de etila} = \frac{1,602}{15,168} * 100 \approx 11\%$$

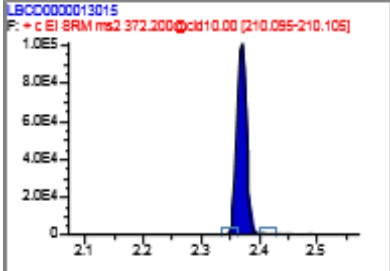
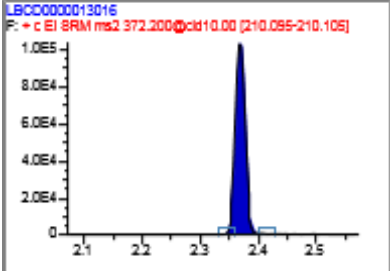
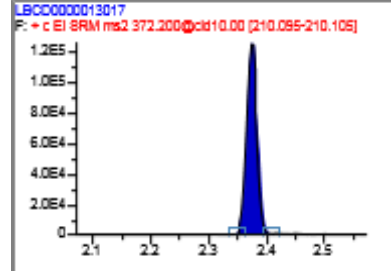
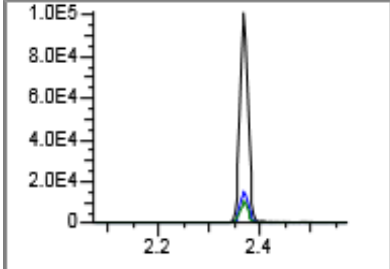
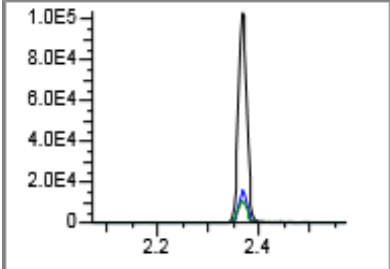
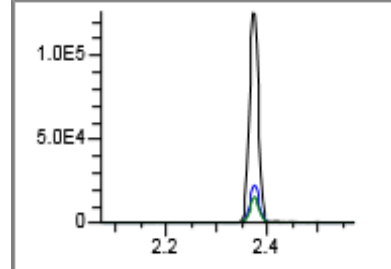
Nenhum dos dois solventes apresentou melhora na extração em comparação ao método vigente, porém, ao remover a etapa de adição do sal, pelo menos uma etapa é excluída, reduzindo o tempo de preparo da amostra. Contudo, ambos apresentaram uma eficiência de extração próxima a 10%, menor do que a extração do procedimento atual.

Quadro 4. Eficiência de extração com EFL

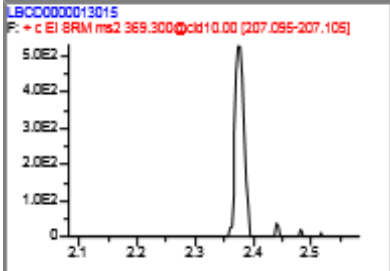
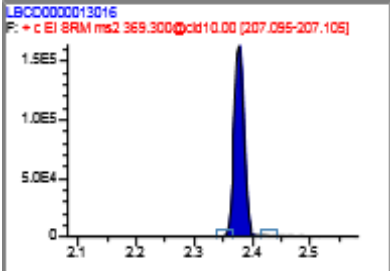
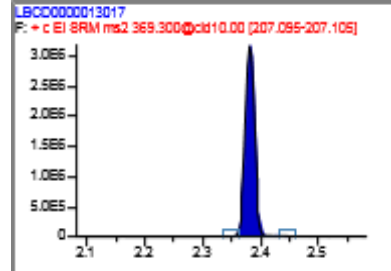
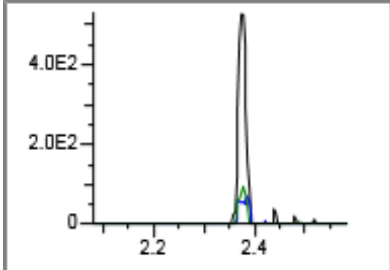
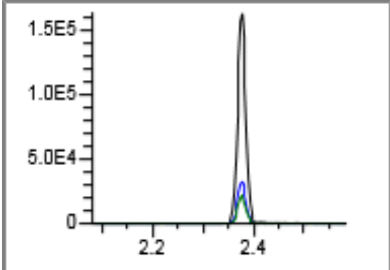
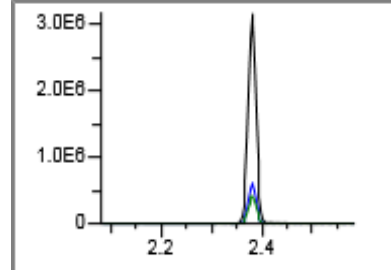
MTBE	Acetato de etila
7%	11%

Resultados obtidos para o solvente MTBE:

Salbutamol-d3

CQN			Amostra			Eficiência de extração		
Quan:	Area:	RT	Quan:	Area:	RT	Quan:	Area:	RT
372.200->210.000 m/z	112641	2,370	372.200->210.000 m/z	118873	2,367	372.200->210.000 m/z	156743	2,373
								
								

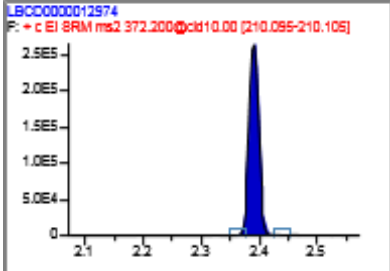
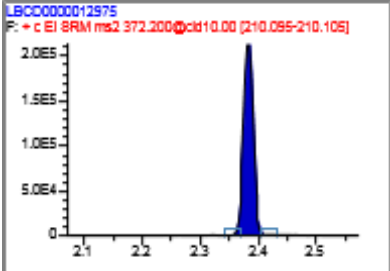
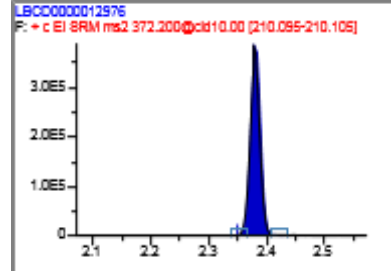
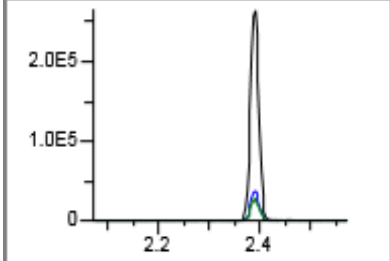
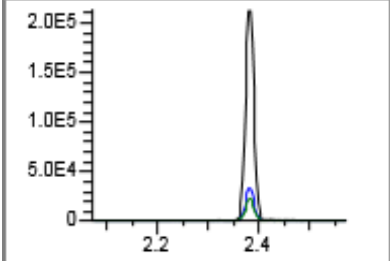
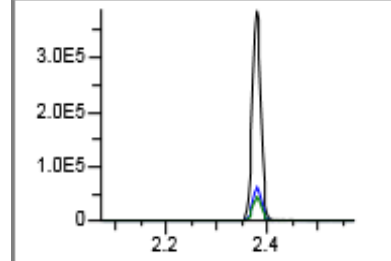
Salbutamol

CQN			Amostra			Eficiência de extração		
Quan:	Area:	RT	Quan:	Area:	RT	Quan:	Area:	RT
369.300->207.000 m/z	N/F	0,000	369.300->207.000 m/z	185760	2,377	369.300->207.000 m/z	3517292	2,380
								
								

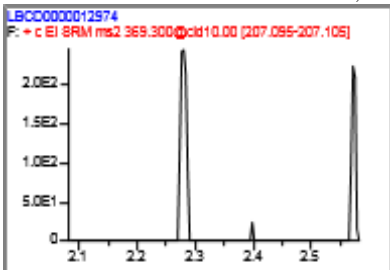
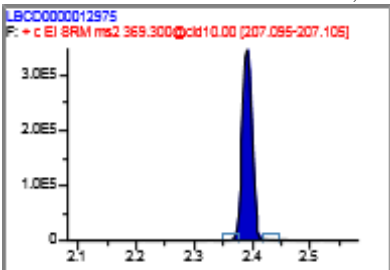
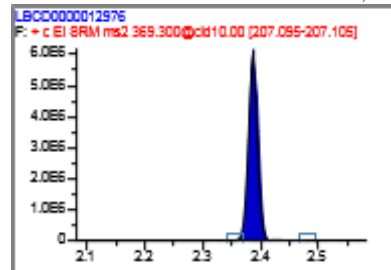
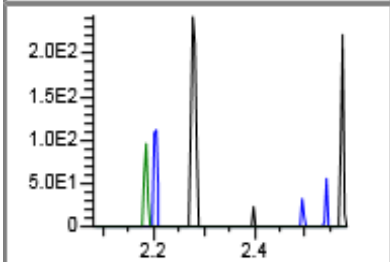
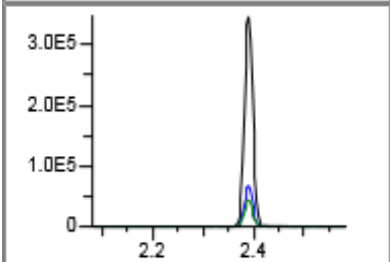
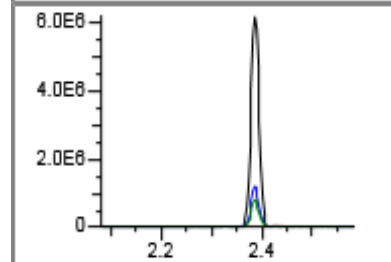


Resultados obtidos para o solvente acetato de etila:

### Salbutamol-d3

CQN			Amostra			Eficiência de extração		
Quan:	Area:	RT	Quan:	Area:	RT	Quan:	Area:	RT
372.200->210.000 m/z	302967	2,391	372.200->210.000 m/z	249193	2,384	372.200->210.000 m/z	451061	2,379
								
								

### Salbutamol

CQN			Amostra			Eficiência de extração		
Quan:	Area:	RT	Quan:	Area:	RT	Quan:	Area:	RT
369.300->207.000 m/z	N/F	0,000	369.300->207.000 m/z	399221	2,391	369.300->207.000 m/z	6841780	2,386
								
								

O próximo experimento consistiu em realizar a extração em fase sólida e extração em fase líquida na mesma amostra para observar quais seriam os efeitos observados na eficiência de extração.

Tabela 9. Extração em fase sólida e em fase líquida.

Nome	T <sub>R</sub>	Área do pico	Área PI	Razão entre áreas
CQN – Ác. fórmico – MTBE	N/F	0	49507	N/F
Amostra – Ac. fórmico - MTBE	2,39	55653	70160	0,793
EE – Ac. fórmico – MTBE	2,38	1611731	150320	10,722
CQN - Ac. fórmico - Acet. etila	N/F	0	24944	N/F
Amostra - Ac. fórmico - Acet. etila	2,38	22085	32901	0,671
EE - Ac. fórmico - Acet. etila	2,38	1370499	46030	29,774
CQN - NH <sub>4</sub> OH - MTBE	N/F	0	119376	N/F
Amostra - NH <sub>4</sub> OH - MTBE	2,38	91469	112643	0,812
EE - NH <sub>4</sub> OH - MTBE	2,38	1599945	167607	9,546
CQN - NH <sub>4</sub> OH - Acet. etila	N/F	0	34373	N/F
Amostra - NH <sub>4</sub> OH – Acet. etila	2,38	21882	29567	0,74
EE - NH <sub>4</sub> OH - Acet. etila	2,38	1781293	54263	32,827
CQN - MeOH - MTBE	N/F	0	N/F	N/F
Amostra - MeOH - MTBE	N/F	0	N/F	N/F
EE - MeOH - MTBE	2,38	2138460	16595	128,858
CQN - MeOH - MTBE	N/F	0	N/F	N/F
Amostra - MeOH - MTBE	N/F	0	N/F	N/F
EE - MeOH - MTBE	2,38	1706757	12529	136,224
CQN - MeOH - Acet. etila	N/F	0	N/F	N/F
Amostra - MeOH - Acet. etila	N/F	0	N/F	N/F
EE - MeOH - Acet. etila	2,38	2256141	17719	127,329

CQN - MeOH - Acet. etila	N/F	0	N/F	N/F
Amostra - MeOH - Acet. etila	N/F	0	N/F	N/F
EE - MeOH - Acet. etila	2,38	1899992	14115	134,609

$$\text{Eficiência de extração ácido fórmico e MTBE} = \frac{0,793}{10,722} * 100 \approx 7\%$$

$$\text{Eficiência de extração ácido fórmico e acetato de etila} = \frac{0,671}{29,774} * 100 \approx 2\%$$

$$\text{Eficiência de extração NH}_4\text{OH e MTBE} = \frac{0,812}{9,546} * 100 \approx 8\%$$

$$\text{Eficiência de extração NH}_4\text{OH e acetato de etila} = \frac{0,740}{32,827} * 100 \approx 2\%$$

$$\text{Eficiência de extração metanol e MTBE} = \frac{\text{não encontrado}}{136,224} * 100 = \text{não encontrado}$$

$$\text{Eficiência de extração metanol e acetato de etila} = \frac{\text{não encontrado}}{127,329} * 100 = \text{não encontrado}$$

O quadro abaixo resume os resultados obtidos.

Quadro 5. Eficiência de extração de EFS e EFL.

Ác. fórmico + MTBE	Ác. fórmico + acetato de etila	NH <sub>4</sub> OH + MTBE	NH <sub>4</sub> OH + acetato de etila	Metanol + MTBE	Metanol + acetato de etila
7%	2%	8%	2%	Não encontrado	Não encontrado

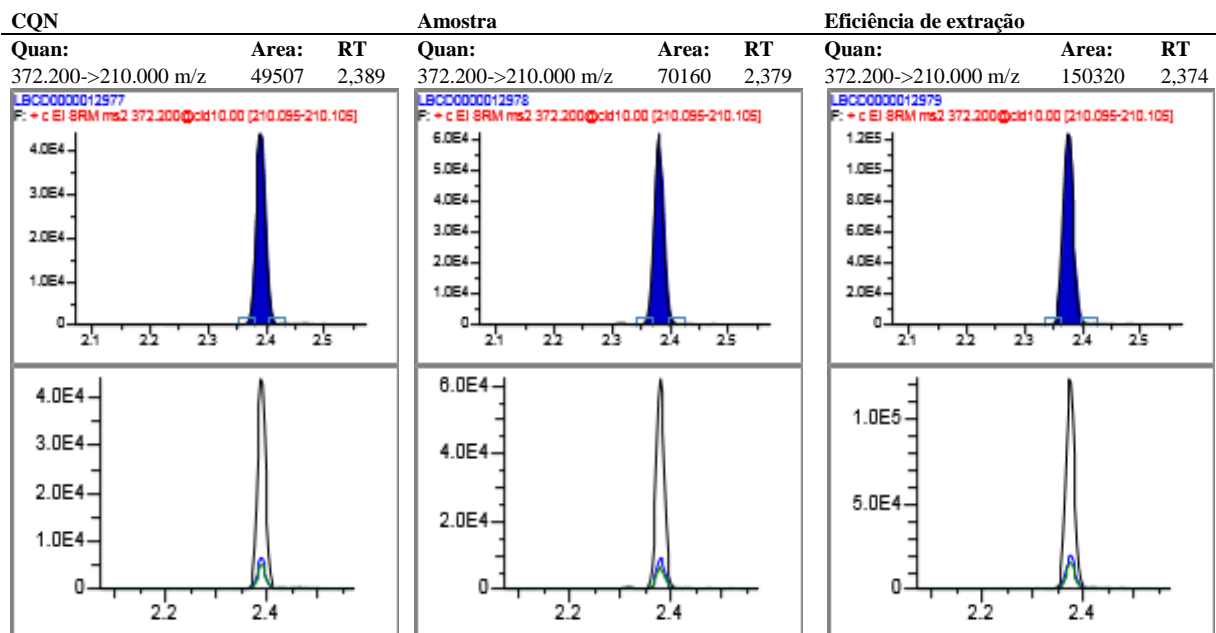
Ao utilizar a coluna de troca catiônica fraca (XCW), houve uma etapa de lavagem com metanol, fração que foi recolhida para observar se por acaso o analito não tinha sido eluído nessa etapa. Contudo, este não removeu nenhuma quantidade significativa do analito que pudesse ser detectado nas condições instrumentais. Desse modo, os cromatogramas referentes à eluição com metanol se encontram no Apêndice.

Os solventes utilizados para a eluição de acordo com o manual do usuário apresentado na Figura 9 poderiam ser com 5% de ácido fórmico em metanol ou 5% de NH<sub>4</sub>OH em metanol. As duas combinações de solventes foram testadas. A partir dos resultados apresentados, observa-se que a extração em fase sólida com 5% de NH<sub>4</sub>OH em metanol combinada com extração em fase líquida com MTBE extrai mais salbutamol da coluna neste experimento.

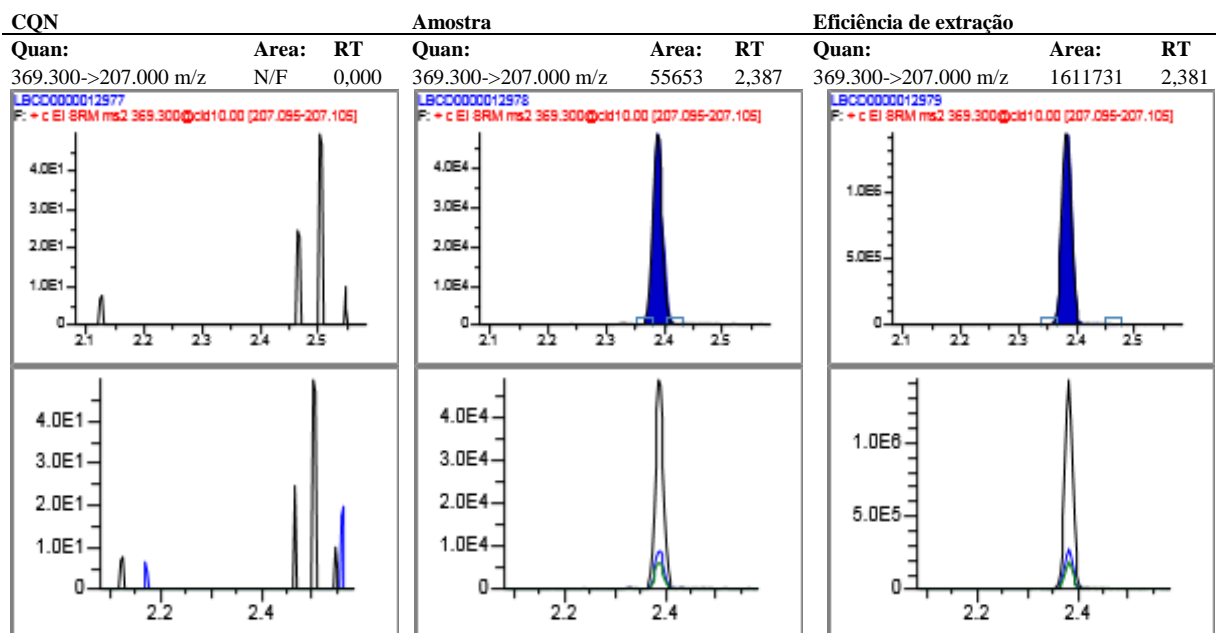
No entanto, a combinação de extração em fase sólida com extração em fase líquida apresentou as menores extrações do analito, além de ser mais demorada que a extração atual por adicionar mais uma etapa, o que torna o processo ainda mais demorado e cansativo. Conclui-se que não há nenhuma vantagem em utilizar dois processos de extração juntos.

Extração com ácido fórmico (EFS) e MTBE (EFL):

Salbutamol-d3

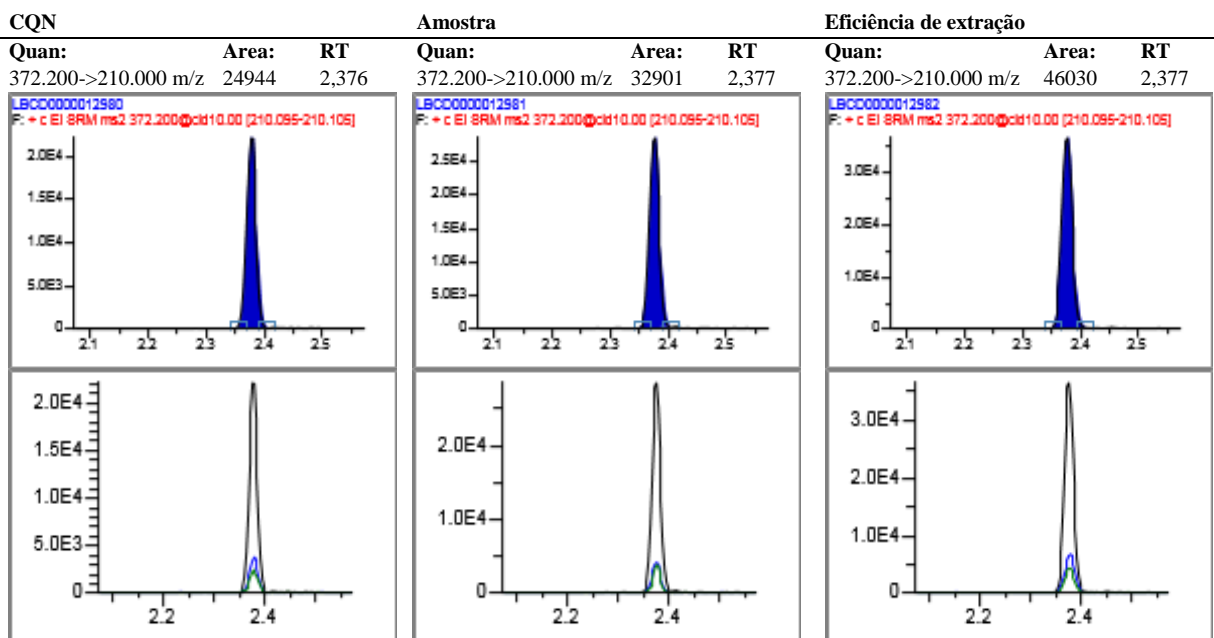


Salbutamol

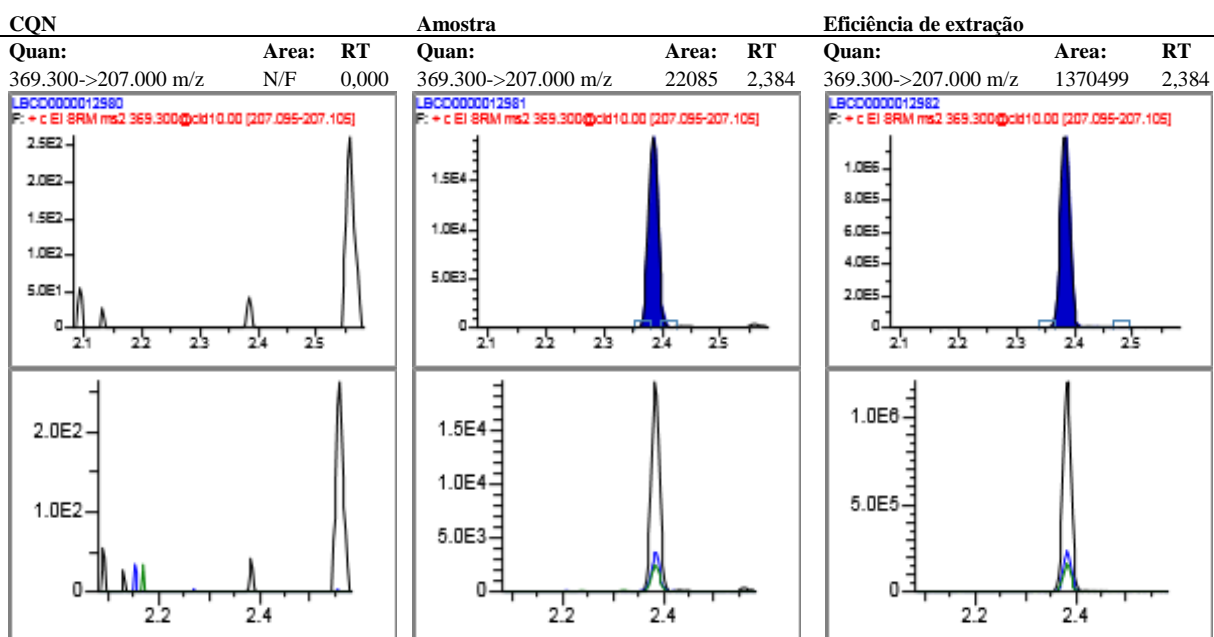


Extração com ácido fórmico (EFS) e acetato de etila (EFL):

### Salbutamol-d3

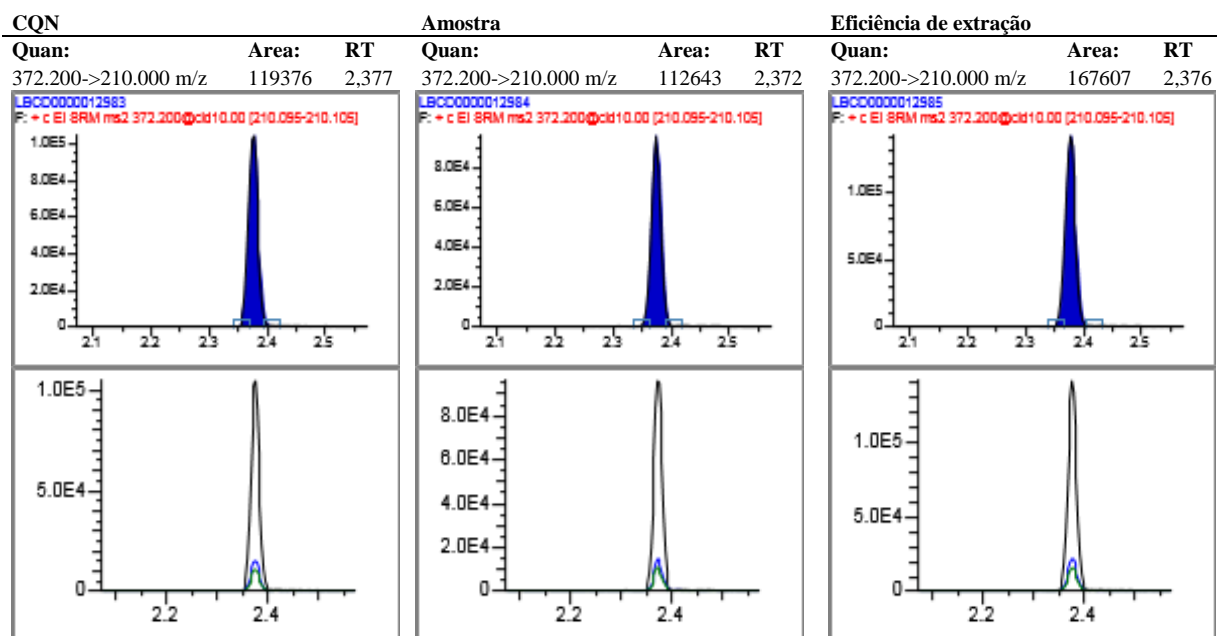


### Salbutamol

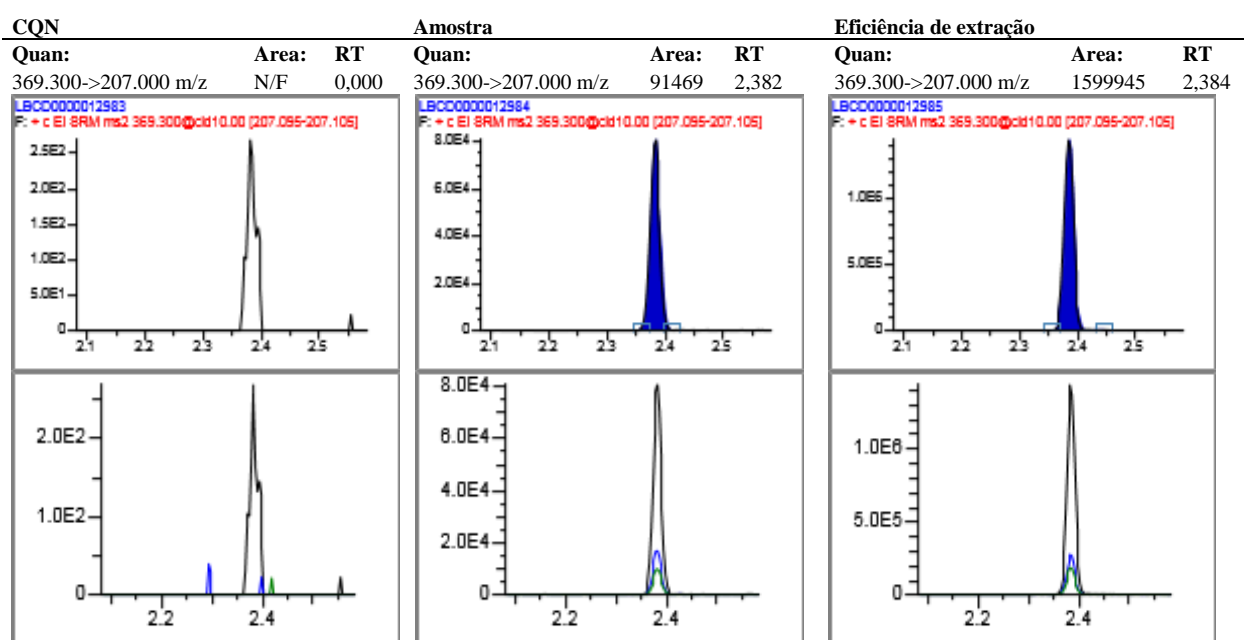


Extração com NH<sub>4</sub>OH (EFS) e MTBE (EFL):

### Salbutamol-d3

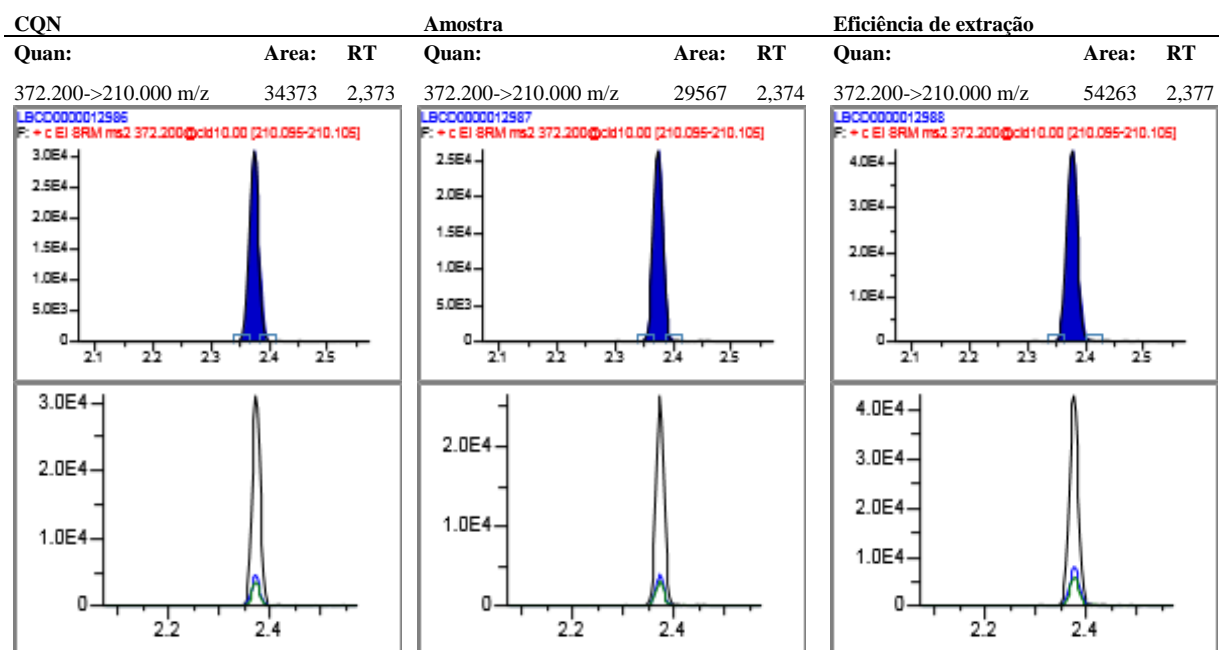


### Salbutamol

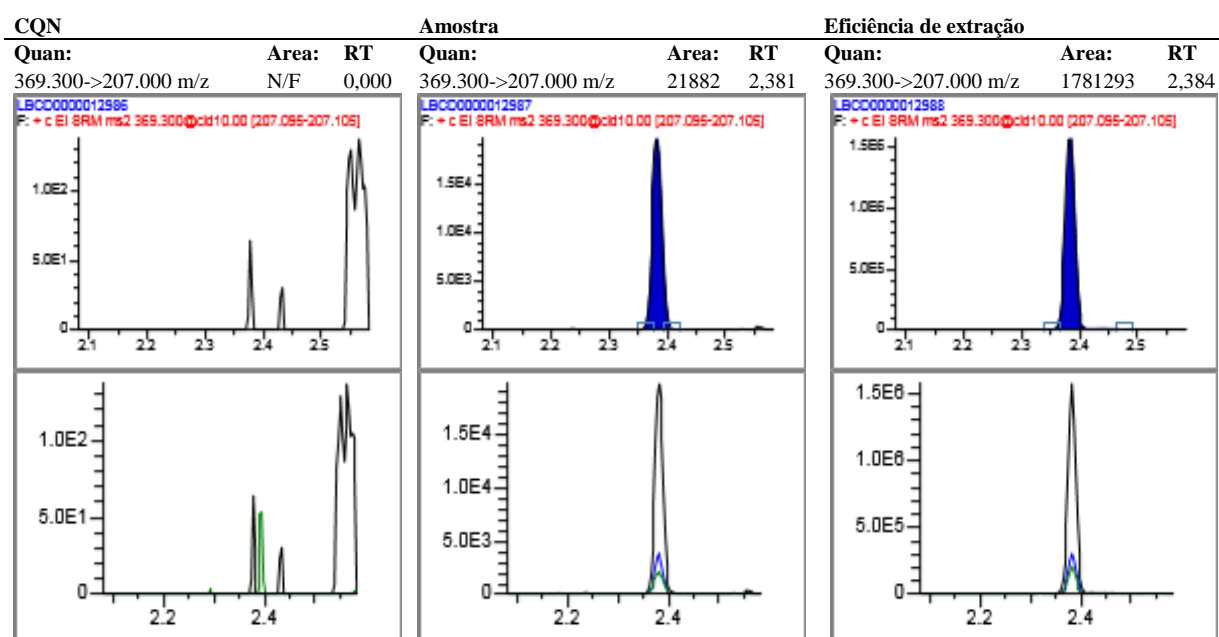


Extração com  $\text{NH}_4\text{OH}$  (EFS) e acetato de etila (EFL):

### Salbutamol-d3



### Salbutamol





Com o intuito de verificar a aplicabilidade da extração em fase sólida, o próximo experimento comparou as extrações feitas por dois tipos de coluna, troca catiônica fraca e fase reversa.

Tabela 10. Coluna de troca catiônica fraca (XCW)

Nome	T <sub>R</sub>	Área do pico	Área PI	Razão entre áreas
CQN – SPE – XCW	N/F	0	1193942	N/F
Amostra – SPE – XCW	2,38	2801400	2001171	1,400
EE – SPE – XCW	2,38	2922297	1680131	1,739

$$\text{Eficiência de extração XCW} = \frac{1,400}{1,739} * 100 \approx 80\%$$

Tabela 11. Coluna de fase reversa (C18)

Nome	T <sub>R</sub>	Área do pico	Área PI	Razão entre áreas
CQN – SPE – C18	N/F	0	49257	N/F
Amostra – SPE – C18	2,38	117657	96520	1,219
EE – SPE – C18	2,38	9520	5728	1,662
CQN – SPE – C18	N/F	0	49257	N/F
Amostra – SPE – C18	2,38	117657	96520	1,219
EE – SPE – C18	2,38	9520	5728	1,662

$$\text{Eficiência de extração C18} = \frac{1,219}{1,662} * 100 \approx 73\%$$

O cartucho de extração em fase sólida C18 usa octadecil como fase estacionária para reter compostos não polares devido a sua forte interação hidrofóbica. A coluna XCW apresenta um sorvente polimérico funcionalizado por troca catiônica fraca que permite a retenção completa de compostos básicos com um pKa maior que 8. Esse sorvente é ideal, uma vez que os valores de pKa do salbutamol são 9,3 e 10,3.

Quadro 6. Eficiência de extração de XCW e C18

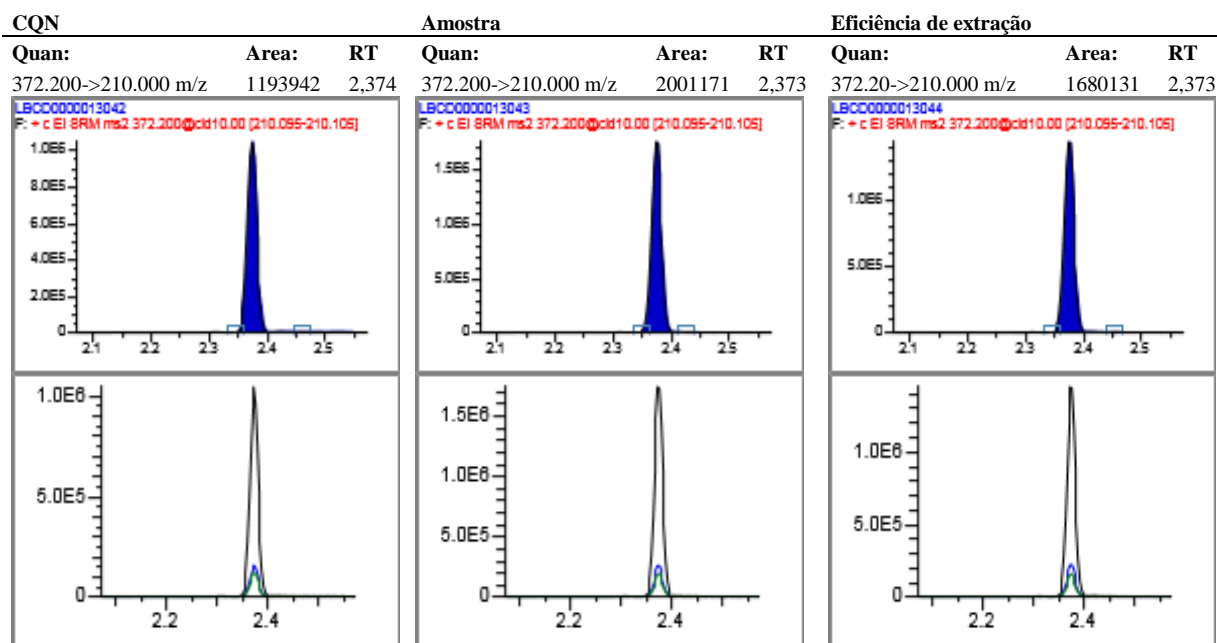
<b>Coluna de troca catiônica fraca</b>	<b>Coluna de fase reversa</b>
80%	73%

Os resultados mostram que a técnica que mais extraiu salbutamol da sua matriz e que ofereceu maior praticidade ao analista foi a extração em fase sólida, que pode ser feita com coluna de fase reversa ou de troca catiônica fraca.

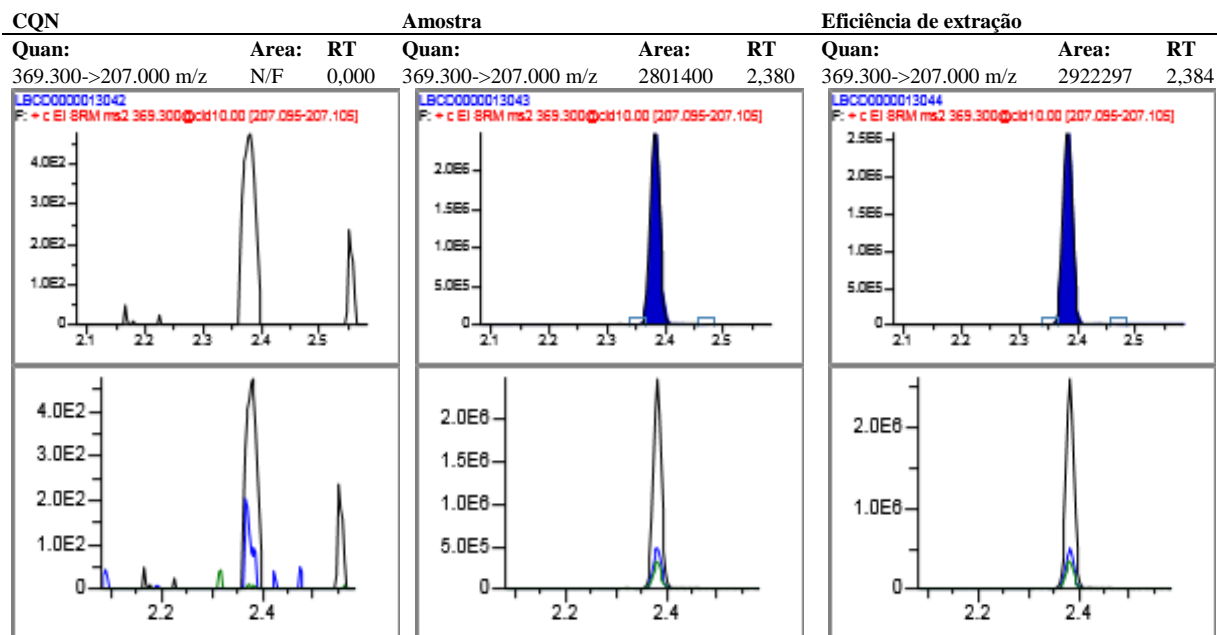
Ambos os cartuchos para extração em fase sólida são fáceis e rápidos de serem usados. Uma vez que a amostra é extraída, ela é levada para a evaporação com nitrogênio, armazenada no dessecador a vácuo, derivatizada e injetada. Ao utilizar a EFS, são excluídas as etapas de adição de sal, agitação orbital, centrifugação e transferência da fase orgânica a tubos de ensaio limpos. Este procedimento é menos demorado que a extração em fase líquida utilizando NaCl. Assim, por apresentar maior eficiência de extração, a coluna de troca catiônica fraca foi escolhida como substituta para a extração vigente.

Resultados obtidos para extração com coluna de troca catiônica fraca:

### Salbutamol-d3

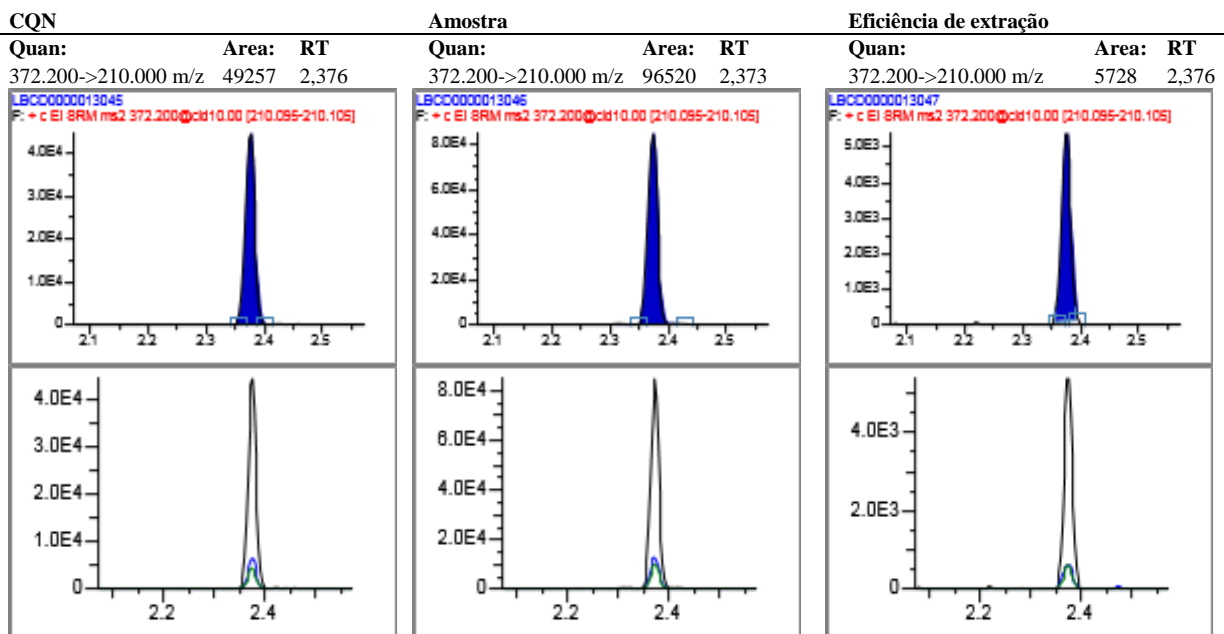


### Salbutamol

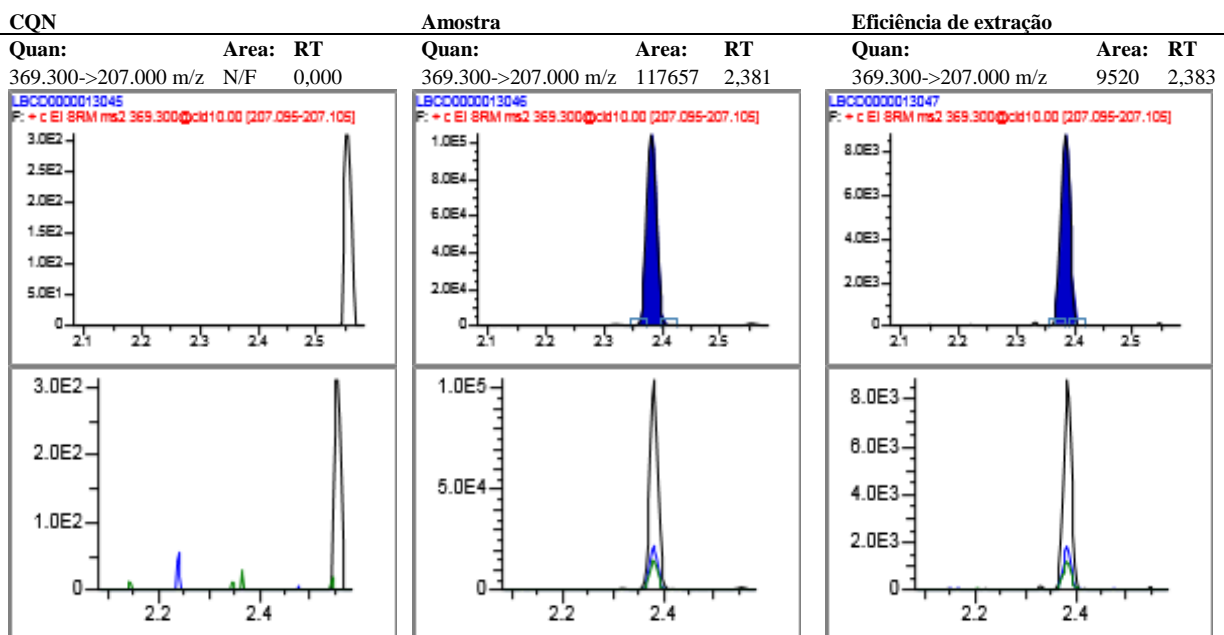


Resultados obtidos para extração com coluna de fase reversa:

### Salbutamol-d3



### Salbutamol



Para confirmação, a extração foi feita em triplicata com a coluna de troca catiônica fraca.

Tabela 12. Extração com coluna de troca catiônica fraca em triplicata.

Nome	T <sub>R</sub>	Área do pico	Área PI	Razão entre áreas
CQN 1	N/F	0	1479753	N/F
CQN 2	N/F	0	826834	N/F
CQN 3	N/F	0	856729	N/F
Amostra 1	2,38	1418052	918344	1,544
Amostra 2	2,38	1911452	1208545	1,582
Amostra 3	2,38	1769551	1117460	1,584
EE 1	2,38	1133000	698669	1,622
EE 2	2,38	2331283	1375428	1,695
EE 3	2,38	2156970	1325384	1,627

$$\text{Eficiência de extração XCW em triplicata} = \frac{1,570}{1,648} * 100 \approx 95\%$$

Quadro 7. Eficiência de extração de XCW

Coluna de troca catiônica fraca
95%

Como as medidas repetidas apresentaram resultados diferentes, é conveniente conhecer o quão disperso estão essas medições. Para isso, calcula-se o desvio padrão experimental, que mostra a dispersão das medidas individuais em relação à média do conjunto.

Equação 4. Desvio padrão experimental (S).

$$S = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

$$S_{\text{amostra}} = 0,023$$

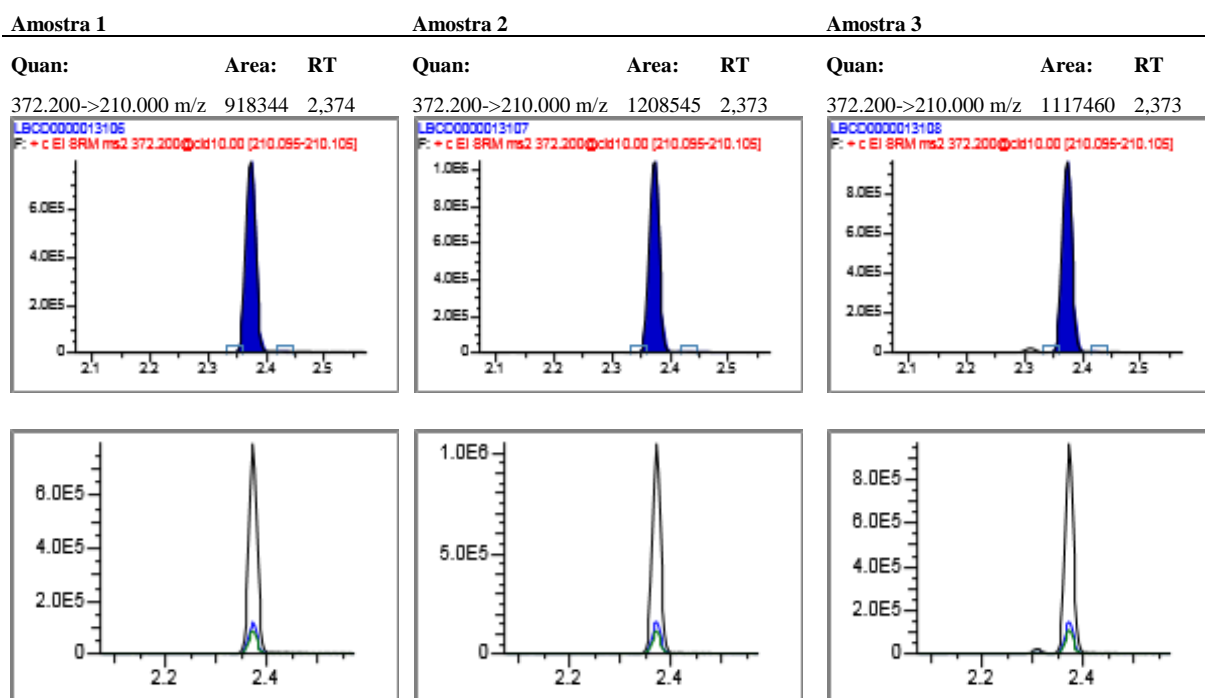
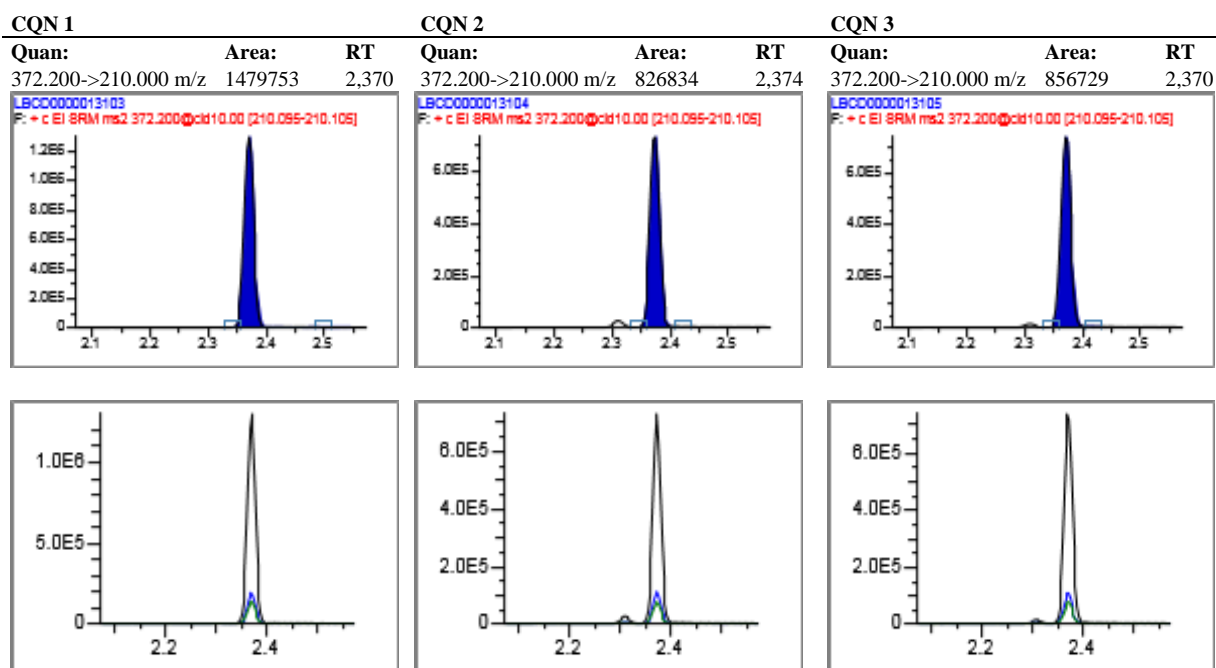
Equação 5. Desvio padrão relativo residual (DPR).

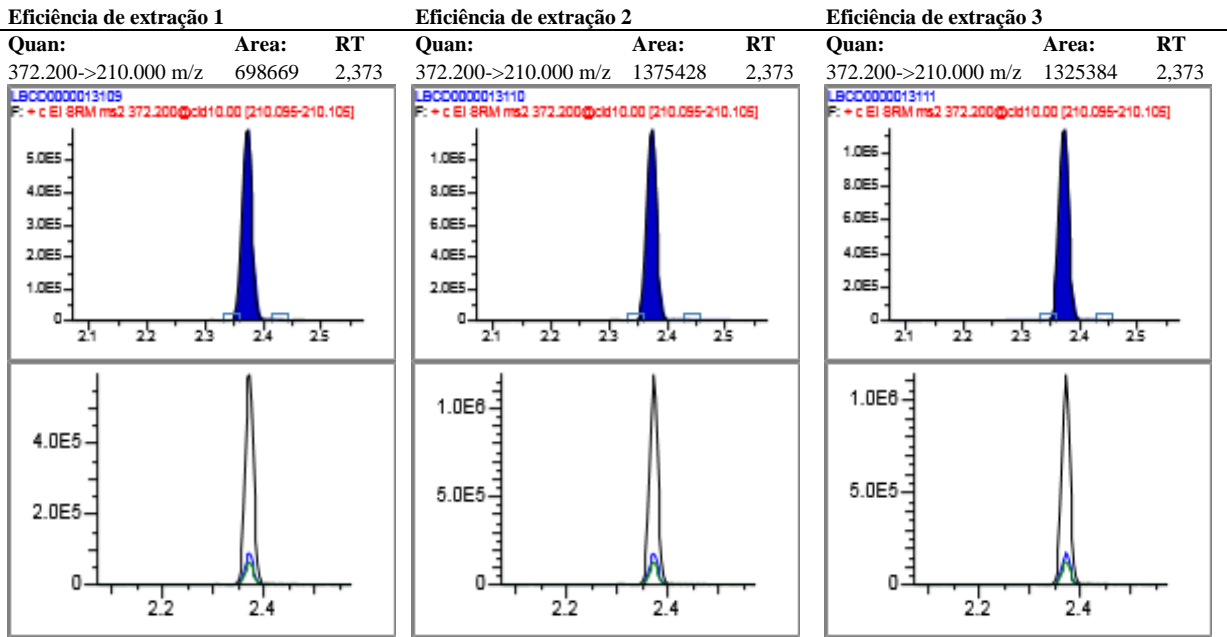
$$\text{DPR} = \frac{S}{\bar{x}} * 100$$

$$\text{DPR} = 1,46\%$$

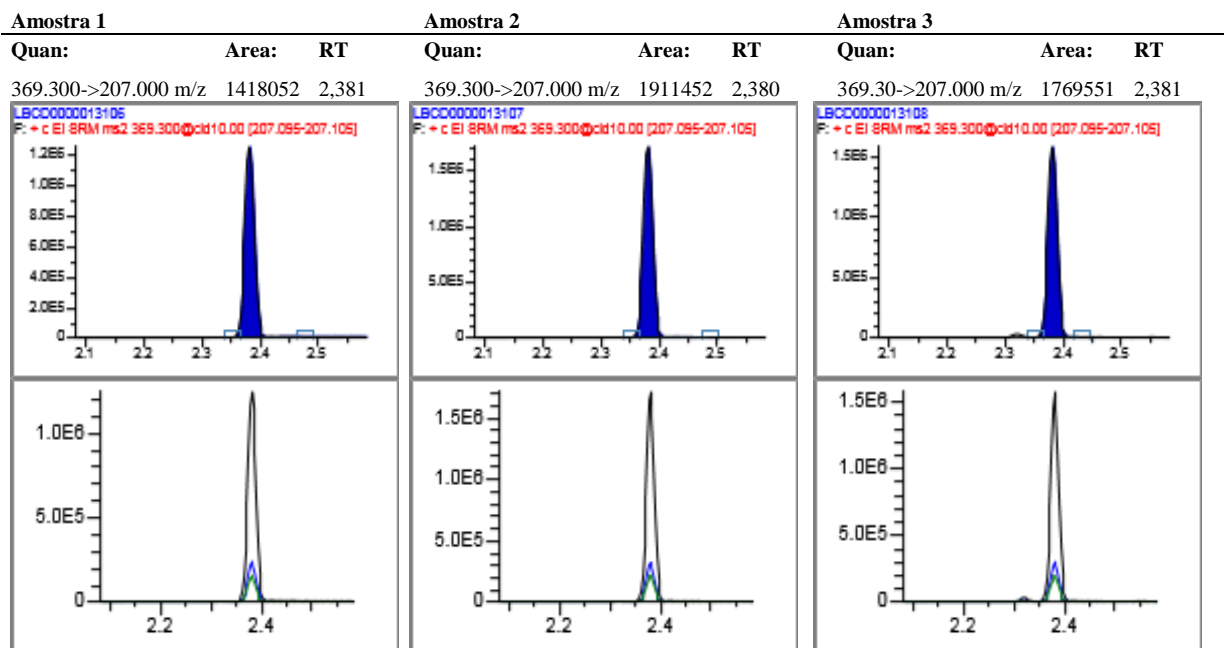
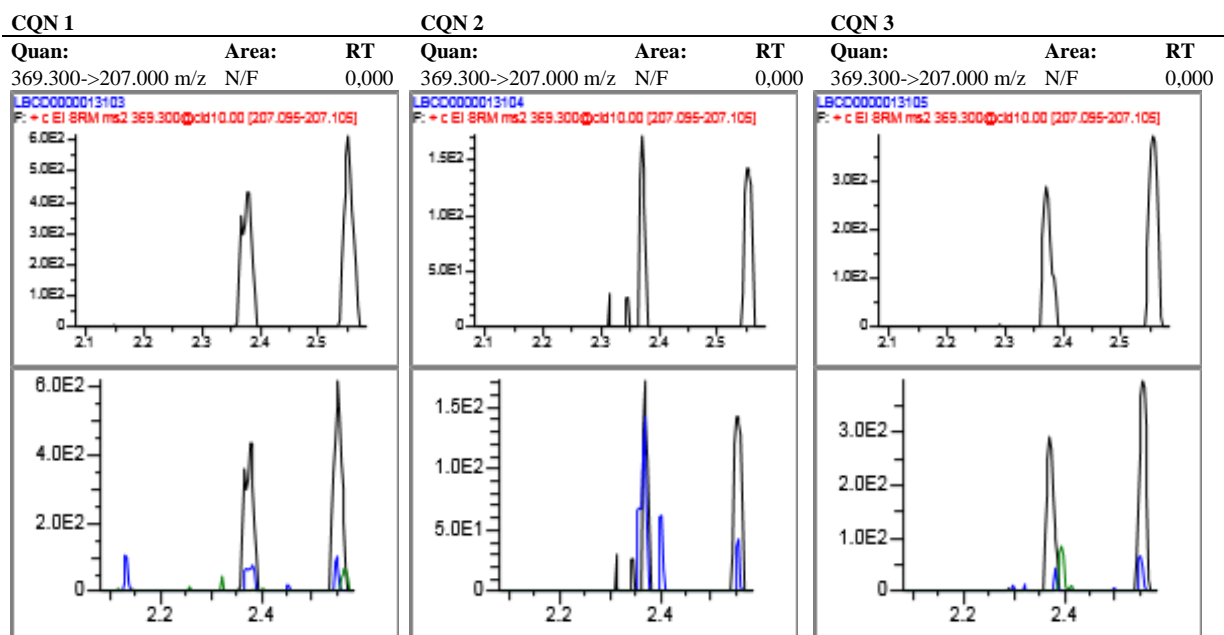
Resultados para extração com coluna de troca catiônica fraca em triplicata:

Salbutamol-d3





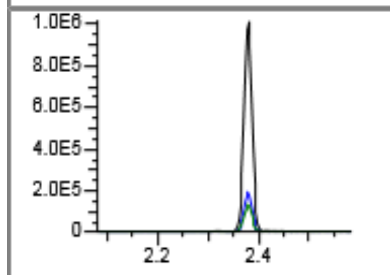
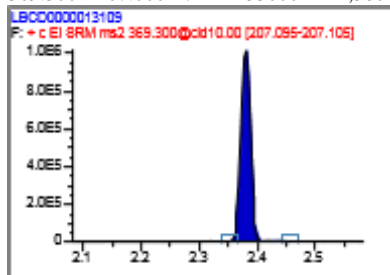
## Salbutamol





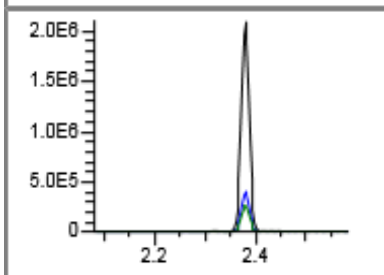
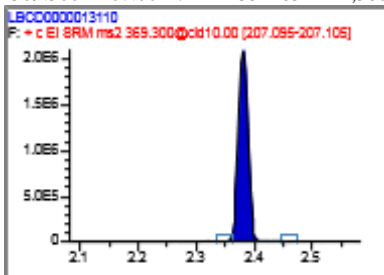
## Eficiência de extração 1

Quan: 369.300->207.000 m/z    Area: 1133000    RT 2,380



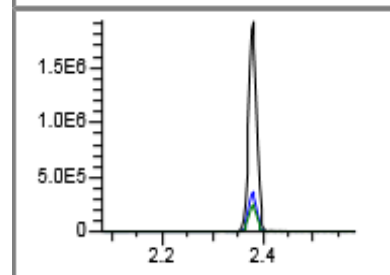
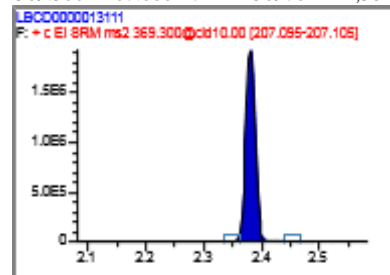
## Eficiência de extração 2

Quan: 369.300->207.00 m/z    Area: 2331283    RT 2,380



## Eficiência de extração 3

Quan: 369.300->207.000 m/z    Area: 2156970    RT 2,381



Quadro 8. Eficiência de extração de todos os experimentos.

Extração com <i>salting out</i>				
NaCl	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	NaHPO <sub>4</sub>
40%	78%	Não encontrado	2%	34%

Extração em fase líquida e em fase sólida					
Ácido fórmico + MTBE	NH <sub>4</sub> OH + MTBE	Ácido fórmico + acetato de etila	NH <sub>4</sub> OH + acetato de etila	Metanol + MTBE	Metanol + acetato de etila
7%	9%	2%	2%	Não encontrado	

Extração em fase líquida		Extração em fase sólida		
MTBE	Acetato de etila	Troca catiônica fraca	Fase reversa	Traca cationica fraca em triplicata
7%	11%	80%	73%	95%

## Resultados dos parâmetros de validação do método

O objetivo principal do ISL é garantir que os laboratórios acreditados pela AMA reportem resultados de ensaios válidos baseados em dados confiáveis. Desse modo, para a validação de um método de confirmação de uma substância com valor de corte, salbutamol, foram utilizados os procedimentos apresentados no ISL 2021. Deve ser demonstrado que o método quantitativo atende aos requisitos de sua aplicação pretendida, onde os seguintes critérios são avaliados: linearidade, repetitividade, arraste, interferência de matriz, precisão intermediária, seletividade e robustez. Quando aplicável, o desvio padrão relativo não deve exceder 10%, de acordo com o Protocolo de Validação de Métodos de Análise Quantitativa do LBCD.

**Linearidade:** A linearidade é a habilidade do método em produzir respostas diretamente proporcionais à concentração a ser medida. A curva de calibração possui seis pontos de concentração de forma a cobrir de 50% a 200% da concentração de corte. Cada nível de concentração da curva é preparado em triplicata.

Primeira curva analítica: Para o controle de qualidade dos dados utilizados, foi feita a avaliação de valores aberrantes pelo teste de Grubbs, onde S é o desvio padrão. O valor de G tabelado foi retirado do quadro que se encontra no Apêndice. Se o valor de G calculado for maior que G tabelado, o valor é considerado aberrante. Caso contrário, o valor não é aberrante. Foi utilizado o valor de G igual a 1,155 para n = 3 com intervalo de confiança de 95%.

Equação 6. Teste de Grubbs.

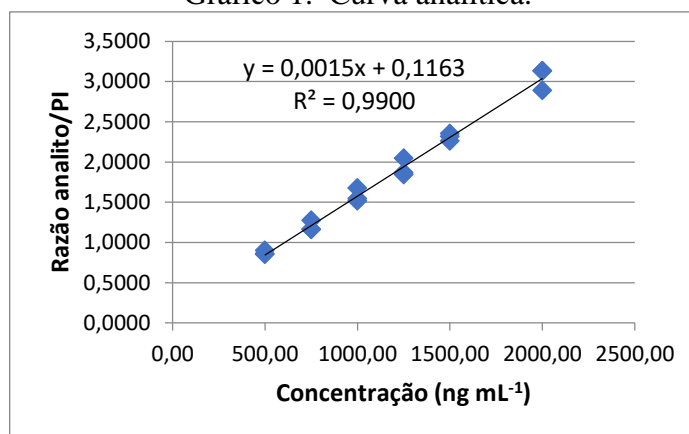
$$G \text{ calculado} = \frac{(x_i - \bar{x})}{S}$$

Tabela 13. Dados para a curva analítica do primeiro dia.

Concentração (ng mL <sup>-1</sup> )	Área analito	Área PI	Analito/PI (y)	Média A/PI	Desvio padrão A/PI	Gcalc	Conclusão
500,00	781478	911989	0,8569			0,427	OK
500,00	960598	1131111	0,8493	0,8682	0,0266	0,715	OK
500,00	1069421	1190110	0,8986			1,143	OK
750,00	736401	578687	1,2725			1,155	OK
750,00	935451	807196	1,1589	1,1975	0,0650	0,593	OK
750,00	776301	668655	1,1610			0,561	OK
1000,00	1304798	779130	1,6747			1,140	OK
1000,00	1397451	921203	1,5170	1,5786	0,0843	0,730	OK
1000,00	1804122	1168450	1,5440			0,410	OK
1250,00	2295197	1246391	1,8415			0,680	OK
1250,00	1792517	877448	2,0429	1,9164	0,1102	1,148	OK
1250,00	2339775	1254720	1,8648			0,468	OK
1500,00	1555125	688002	2,2604			1,063	OK
1500,00	2567910	1091814	2,3520	2,3094	0,0461	0,923	OK
1500,00	2682622	1158368	2,3159			0,140	OK
2000,00	3589244	1243315	2,8868			1,155	OK
2000,00	1569454	501562	3,1291	3,0489	0,1404	0,571	OK
2000,00	4441121	1418512	3,1308			0,583	OK

Como é possível observar na tabela acima, todos os valores foram considerados não aberrantes. O gráfico obtido através desses valores está representado abaixo:

Gráfico 1. Curva analítica.



Equação 7. Equação da reta.

$$y = ax + b$$

A partir da equação da reta é possível calcular o valor de y pela regressão linear ( $\hat{y}_i$ ):

Equação 8. Cálculo de y pela regressão linear.

$$\hat{y}_i = \text{coef angular} * \text{concentração} + \text{coef linear}$$

Para calcular os resíduos utiliza-se o valor de y medido menos o valor de y calculado pela regressão linear, ou seja:

Equação 9. Cálculo de resíduos.

$$\text{Resíduos} = (y_i - \hat{y}_i)$$

Calcula-se o desvio padrão residual (Se) considerando seis níveis de concentração (n = 6).

Equação 10. Desvio padrão residual (Se).

$$Se = \sqrt{\frac{\Sigma(\text{resíduos})^2}{n - 2}}$$

$$Se = 0,155$$

O cálculo de x pela regressão linear (xi) é realizado a partir da equação da reta (Equação 7):

Equação 11. Cálculo de x pela regressão linear.

$$xi = \frac{y - \text{coef linear}}{\text{coef angular}}$$

Para o cálculo do desvio padrão do coeficiente linear ( $Sb_0$ ), foi utilizada a seguinte equação, onde xi é o valor de x calculado pela regressão e  $\bar{x}$  é o valor médio de x calculado.

Equação 12. Desvio padrão do coeficiente linear ( $Sb_0$ ).

$$Sb_0 = Se * \sqrt{\frac{\Sigma x_i^2}{n \Sigma (x_i - \bar{x})^2}}$$

$$Sb_0 = 1,641$$

Tabela 14. Dados para cálculos estatísticos.

Analito/PI (y)	$\hat{y}_i$ calculado	Resíduos	$x_i$ calculado	x médio ( $\bar{x}$ )	$x_i - x$ médio	Variância
0,8569		0,01	507,194		-7,774	
0,8493	0,85	0,00	501,960	514,968	-13,008	330,7582
0,8986		0,05	535,749		20,782	
1,2725		0,06	791,849		51,409	
1,1589	1,21	-0,05	714,017	740,440	-26,424	1982,6968
1,1610		-0,05	715,455		-24,986	
1,6747		0,10	1067,263		65,828	
1,5170	1,58	-0,06	959,261	1001,436	-42,175	3335,7140
1,5440		-0,03	977,783		-23,653	
1,8415		-0,10	1181,489		-51,297	
2,0429	1,94	0,10	1319,420	1232,786	86,634	5692,7612
1,8648		-0,08	1197,449		-35,337	
2,2604		-0,05	1468,359		-33,587	
2,3520	2,31	0,05	1531,103	1501,946	29,156	998,9243
2,3159		0,01	1506,377		4,431	
2,8868		-0,15	1897,410		-111,014	
3,1291	3,04	0,09	2063,349	2008,424	54,925	9243,4092
3,1308		0,09	2064,513		56,089	

Equação 13. Intervalo de confiança do coeficiente linear.

$$b_0 \pm t_{0.025;n-2} \cdot S_{b_0}$$

$b_0$  é o valor do coeficiente linear da equação;

$t_{0.025;n-2}$  o valor de t-student para 95% de confiança bicaudal, com n igual a 6, que equivale a 2,7764 de acordo com o Apêndice.

A curva de calibração do salbutamol apresentou  $r^2$  igual ou superior a 0,99 e o intervalo de confiança do  $b_0$  contém zero. Desse modo, considerou-se a linearidade satisfatória dentro da faixa de trabalho estudada.

Tabela 15. Resultados para linearidade da primeira curva.

Salbutamol	
Coeficiente angular	0,001460
Coeficiente linear	0,116310
Coeficiente de correlação quadrático ( $r^2$ )	0,9900

Critério de aceitabilidade de $r^2$	> 0,99
Intervalo de confiança do coeficiente linear ( $b_0$ )	-4,439 a 4,672
Critério de aceitabilidade de $b_0$	Conter zero
Se residual	0,104

A homocedasticidade de variâncias dos dados foi avaliada através do teste de Cochram. A homocedasticidade implica que a variância se mantém constante ao longo da análise.

Equação 14. Teste de Cochram.

$$C \text{ calculado} = \frac{S_{\text{máx}}^2}{\sum S_j^2}$$

Onde:

$S_{\text{máx}}^2$  é a maior variância entre todos os níveis de concentração e

$\sum S_j^2$  é a soma das variâncias de todos os níveis.

Tabela 16. Resultado do teste de Cochram.

Substância	C calculado	C tabelado	Resultado
Salbutamol	0,4282	0,6161	Homocedástico

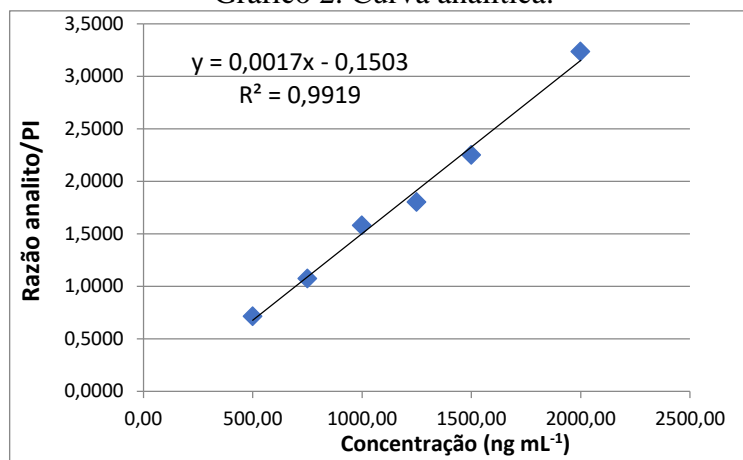
Segunda curva analítica: Os cálculos de y e x pela regressão linear e o cálculo do desvio padrão residual foram feitos utilizando as equações a, b e c.

Tabela 17. Dados para a curva analítica do segundo dia.

Concentração (ng mL <sup>-1</sup> )	Área analito	Área PI	Analito/PI (y)	$x_i$ calculado	Recuperação	$\hat{y}_i$ calculado	Resíduos
500,00	761386	1064857	0,7150	524,036	104,8	0,68	0,04
750,00	1543855	1436269	1,0749	741,994	98,9	1,09	-0,01
1000,00	1176177	745133	1,5785	1046,967	104,7	1,50	0,08
1250,00	2094178	1160895	1,8039	1183,507	94,7	1,91	-0,11
1500,00	3067487	1363269	2,2501	1453,711	96,9	2,33	-0,08
2000,00	3792469	1172565	3,2343	2049,784	102,5	3,15	0,08

O gráfico obtido através desses valores está representado abaixo:

Gráfico 2. Curva analítica.



A segunda curva de calibração do salbutamol apresentou  $r^2$  igual a 0,9919. Desse modo, considerou-se a linearidade satisfatória dentro da faixa de trabalho estudada.

Tabela 18. Resultados para a linearidade do segundo dia.

Salbutamol	
Coeficiente angular	0,001651
Coeficiente linear	-0,150278
Coeficiente de correlação quadrático ( $r^2$ )	0,9919
Critério de aceitabilidade de $r^2$	> 0,99
Linearidade	Conforme

**Repetitividade:** Medida do espalhamento de medidas realizadas em condição de repetitividade, ou seja, amostras analisadas simultaneamente por um mesmo analista. Foi utilizado o teste de Grubbs (Equação 6) para detectar a presença de pontos fora da curva.



Tabela 19. Dados para cálculos estatísticos da repetitividade.

Concentração (ng mL <sup>-1</sup> )	Área analito	Área PI	Analito/PI (y)	Média A/PI	Desvio padrão A/PI	G calculado	Conclusão
1000,00	1593576	1069603	1,4899	1,4238	0,1214	0,5447	OK
1000,00	1096983	725395	1,5123			0,7291	OK
1000,00	1998653	1334835	1,4973			0,6059	OK
1000,00	972790	864021	1,1259			2,4548	Aberrante
1000,00	1376191	977941	1,4072			0,1364	OK
1000,00	1394651	1031530	1,3520			0,5913	OK
1000,00	1829230	1295769	1,4117			0,0996	OK
1000,00	1264190	901423	1,4024			0,1759	OK
1000,00	1966957	1320740	1,4893			0,5398	OK
1000,00	3459930	2232497	1,5498			1,0385	OK

Um dos pontos se mostrou aberrante segundo o teste de Grubbs. Então, o valor de y de 1,1259 foi excluído, o teste de Grubbs foi realizado novamente (n = 9) e verificou-se que os pontos restantes não eram aberrantes. Assim, foi possível calcular o valor do desvio padrão de repetitividade (Sr) (Equação 15) e o desvio padrão relativo residual (Equação 5).

Equação 15. Desvio de repetitividade (Sr).

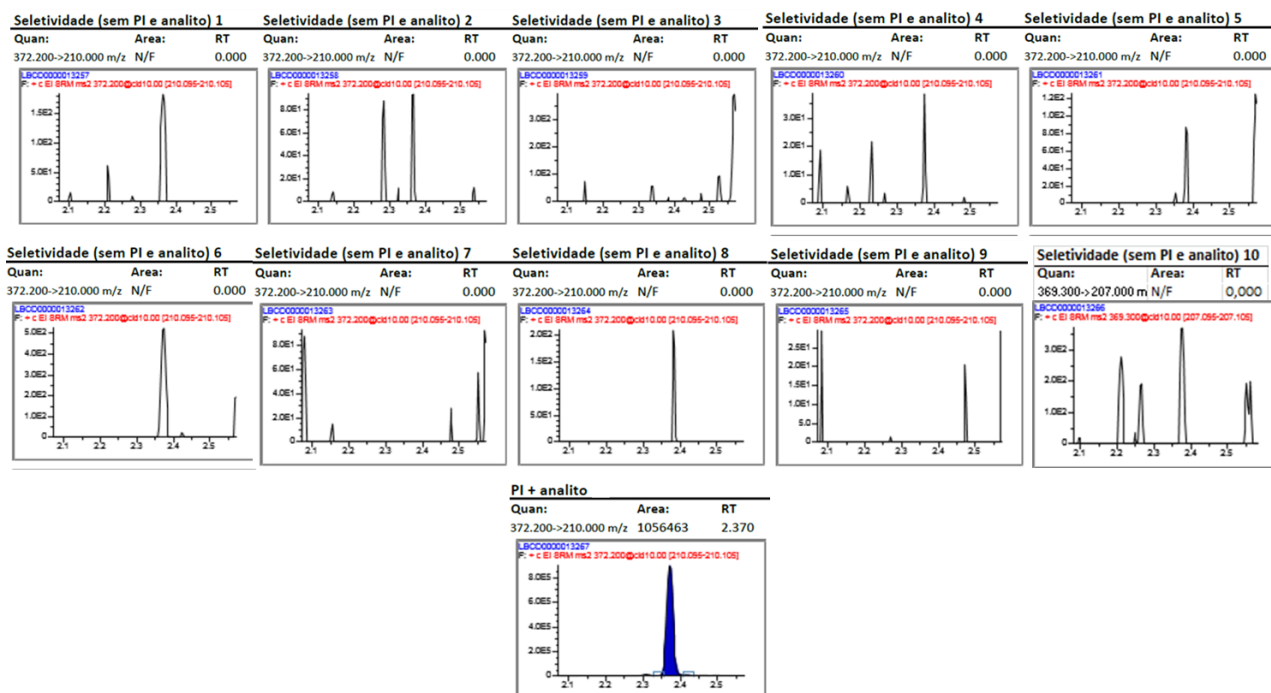
$$Sr = \sqrt{\frac{\sum (xi - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Tabela 20. Resultados da repetitividade.

Analito/PI (y)	xi calculado	Resultados
1,4899	940,695	Desvio de repetitividade (Sr)
1,5123	956,022	
1,4973	945,782	
1,1259	691,415	Desvio padrão relativo
1,4072	884,096	
1,3520	846,285	Excluindo o ponto aberrante:
1,4117	887,152	
1,4024	880,813	Desvio de repetitividade (Sr)
1,4893	940,290	
1,5498	981,736	
	x médio $\bar{x}$	Desvio padrão relativo
	895,428	

O desvio padrão relativo é menor do que 10%, o que indica que ocorreu a repetição confiável dos resultados em condições de repetitividade.

**Seletividade:** Para avaliar se o método é capaz de diferenciar as substâncias de interesse das demais substâncias presentes na matriz, foram analisados 10 brancos de urina de origens e características diferentes, sem nenhuma fortificação, seja de analito ou padrão interno. Como critério de aceitação, o método não deve apresentar picos cromatográficos com relação sinal/ruído maior do que três nos tempos de retenção de interesse.



A comparação entre os controles negativos e a urina fortificada confirmou que o método é capaz de distinguir entre compostos de interesse e compostos da matriz. O método é considerado seletivo para salbutamol e para o padrão interno salbutamol-d3.

**Arraste:** O objetivo do teste de arraste é observar se, depois de injetada uma alta concentração de salbutamol, seria possível observar algum resquício do analito na próxima injeção. O sinal cromatográfico do branco injetado após a amostra cromatográfica deve ser menor ou igual a 1% do sinal da amostra fortificada em concentração no dobro do valor de corte.

Tabela 21. Resultado do arraste.

Analito	Área do controle positivo	Área do controle negativo	Porcentagem
Salbutamol	4932143,80	2846,65	0,0577

Como a porcentagem obtida foi de, aproximadamente, 0,06%, não foi considerado arraste para a concentração testada na validação.

**Interferência de matriz:** A interferência de matriz é a avaliação do quanto a matriz em que se realiza a análise influencia na medição da quantidade de analito presente na amostra. Foi realizada a análise de 10 urinas diferentes com o analito fortificado no valor de corte. É desejável que o desvio padrão relativo não deve exceda 10%.

Tabela 22. Resultado da interferência de matriz.

Concentração (ng mL <sup>-1</sup> )	Área analito	Área PI	Analito/PI (y)	x calculado	G calculado	Conclusão	Resultados
1000,00	1691971	858254	1,9714	1270,477	2,720	Aberrante	Desvio de repetitividade (Sr)
1000,00	1640221	1080998	1,5173	959,491	0,044	OK	112,510
1000,00	1652029	1065020	1,5512	982,674	0,162	OK	
1000,00	2313434	1515381	1,5266	965,870	0,013	OK	Desvio padrão relativo
1000,00	1306121	927256	1,4086	885,024	0,706	OK	11,7
1000,00	1401669	952213	1,4720	928,460	0,319	OK	Excluindo o ponto aberrante:
1000,00	1821883	1272207	1,4321	901,103	0,563	OK	
1000,00	2012902	1424093	1,4135	888,363	0,676	OK	Desvio de repetitividade (Sr)
1000,00	1961266	1312470	1,4943	943,747	0,184	OK	35,066
1000,00	2072685	1421649	1,4579	918,826	0,405	OK	
			x médio $\bar{x}$	964,403			Desvio padrão relativo
							3,8

Um dos valores se mostrou aberrante segundo o teste de Grubbs. Então, o valor de y de 1270,477 foi excluído e o teste de Grubbs foi realizado novamente com  $n = 9$  e verificou-se que os pontos restantes não eram aberrantes. Ao excluir esse ponto, o desvio padrão relativo é de 3,8%, o que demonstra que as diferentes matrizes não influenciam na medição da quantidade de analito presente na amostra.

**Precisão intermediária:** A precisão intermediária mede o grau do espalhamento de medidas realizadas pelo mesmo laboratório, mas por analistas diferentes e em dias diferentes. Deve ser determinada em 10 replicatas de urina na concentração de corte. O desvio padrão dos resultados é a precisão intermediária. É feito o cálculo do desvio padrão relativo, que não deve ultrapassar 10%.

Tabela 23. Resultado da precisão intermediária.

Concentração (ng mL <sup>-1</sup> )	Área analito	Área PI	Analito/PI (y)	xi calculado	Resultados
1000,00	1504131	949882	1,5835	1050,004	Desvio de precisão intermediária 89,538
1000,00	2118521	1480537	1,4309	957,599	
1000,00	1508991	913157	1,6525	1091,795	
1000,00	1080227	722247	1,4956	996,803	
1000,00	1304665	904795	1,4419	964,280	Desvio padrão relativo 9,4
1000,00	1423794	1011330	1,4078	943,627	
1000,00	2144638	1378126	1,5562	1033,474	
1000,00	1638836	1056088	1,5518	1030,809	
1000,00	1347535	1034070	1,3031	880,215	
1000,00	2122852	1343913	1,5796	1047,649	
				x médio $\bar{x}$	
				999,625	

Ao apresentar um desvio padrão relativo menor que 10%, o método permite a repetição confiável dos resultados em momentos diferentes e com diferentes operadores realizando o ensaio.

**Robustez:** A robustez é a avaliação da capacidade do método em reproduzir resultados exatos, quando uma ou mais variações controladas nas condições analíticas são estabelecidas. Deve ser analisada uma triplicata de urinas controle com analito em concentração de corte. Outra triplicata é analisada em condições analíticas controladamente modificadas. A média dos resultados é utilizada para o cálculo do erro relativo. O erro relativo não deve exceder 10%.

Equação 16. Erro relativo.

$$\text{Erro relativo} = \left( \frac{|M1 - M2|}{M1} \right) * 100$$

$$\text{Erro relativo} = 10,6\%$$

M1 – Média dos valores obtidos nas condições originais do método.

M2 – Média dos valores obtidos nas condições forçadamente modificadas.

Tabela 24. Resultado da robustez.

Concentração (ng mL <sup>-1</sup> )	Área analito	Área PI	Analito/PI	x <sub>i</sub> calculado	Resultados
1000,00	1793899	961734	1,8653	1220,6563	Desvio da robustez
1000,00	1496486	877207	1,7060	1124,1758	101,155
1000,00	1609499	1051042	1,5313	1018,4167	
				x médio ( $\bar{x}$ )	Desvio padrão relativo
				1121,0829	9,02

Ao apresentar desvio padrão relativo menor que 10%, o procedimento demonstra produzir resultados semelhantes com relação a pequenas variações nas condições analíticas que podem afetar os resultados da análise, neste caso, a modificação do tempo de hidrólise.

## 5. CONCLUSÕES

O método vigente de análise de salbutamol no LBCD cumpre o seu objetivo de confirmar a presença e concentração da substância na urina de atletas dentro ou fora de competição. No entanto, é possível esse método seja ainda mais eficiente, isto é, de maneira mais rápida, menos cansativa ao analista e que possua um resultado de extração ainda melhor. Foi buscada uma nova forma de análise que estivesse dentro dos parâmetros exigidos pela AMA e que fosse compatível com a capacidade do laboratório, usando equipamentos, reagentes e consumíveis que já estivessem disponíveis.

A partir dos experimentos realizados, observou-se que o método vigente, utilizando NaCl para *salting out*, fornece uma extração de salbutamol de cerca de 40%. A análise preliminar, empregando sais diferentes, apresentou porcentagem de extração menor ou igual ao NaCl, com exceção do Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, que dobrou a extração. No entanto, como não foi eliminada nenhuma etapa, o objetivo de tornar o método menos dispendioso não foi atendido.

Ao realizar a extração apenas em fase líquida, os resultados de extração obtidos foram muito menores que a extração com cloreto de sódio. A junção de extração em fase sólida com a fase líquida não apenas apresentou piores resultados de extração, mas aumentou o número de etapas e o tempo de análise.

Os melhores resultados foram obtidos a partir de somente extração em fase sólida, sendo ela em cartucho de EFS de fase reversa ou de troca catiônica fraca. A XCW apresentou melhor capacidade de extração e foi utilizada para os experimentos de validação, sendo potencialmente capaz de substituir o método vigente.

A EFS apresenta várias vantagens sobre a EFL porque inclui um procedimento de pré-tratamento relativamente simples e é menos dependente da proficiência do pesquisador. Além disso, envolve menos manipulação da amostra, o que deve diminuir a introdução de erros.

A troca da mistura de derivatização por apenas um reagente foi um passo bem sucedido neste trabalho. Os agentes de derivatização são corrosivos, tóxicos, irritantes a pele, causam lesões oculares e a sua manipulação causa riscos ao seu operador. Reduzindo o número de reagentes perigosos utilizados, além de diminuir a chance de contaminação do usuário, também reduz uma etapa da análise, que é a de preparação da mistura de derivatização. O uso do MSFTA sozinho foi capaz de derivatizar as moléculas em questão.

É possível verificar que o procedimento atual possui uma eficiência de extração de 40%, enquanto o procedimento com extração com coluna de troca catiônica fraca chega a

praticamente 100% de extração, o que foi confirmado por um segundo analista repetindo o experimento. A validação mostrou que os parâmetros estão dentro do esperado, o que indica que o procedimento segue uma tendência pertinente.

Isso comprova que o método utilizando a troca catiônica fraca utilizando como solvente para eluição do cartucho o  $\text{NH}_4\text{OH}$  5% em metanol é o mais rápido, eficiente e menos trabalhoso para a confirmação do salbutamol.

## **6. PERSPECTIVAS FUTURAS**

Em ordem de implantar a metodologia desenvolvida neste Trabalho de Conclusão de Curso nas análises de rotina do LBCD é necessário refazer a validação de acordo com as recomendações da AMA mais recentes, o que inclui a realização de um ensaio de tendência (*bias*) utilizando EQAS, que não estava disponível durante a parte experimental. A AMA modifica seus parâmetros conforme o que for mais adequado para os laboratórios de análise de dopagem e uma dessas mudanças ocorreu durante o andamento deste trabalho.



## 7. REFERÊNCIAS

- [1] CHAPPELET, J.-L., KÜBLER-MABBOTT, B. The International Olympic Committee and the Olympic system: the governance of world sport. London; New York, Routledge Global Institutions, 2008.
- [2] LJUNGQVIST, A., "Brief History of Anti-Doping". In: RABIN, O., PITSILADIS, Y. (Org.), *Medicine and Sport Science*, S. Karger AG, 2017. v. 62. p. 1–10. DOI: 10.1159/000460680. Disponível em: <https://www.karger.com/Article/FullText/460680>. Acesso em: 14 jun. 2022.
- [3] MØLLER, V. "Knud Enemark Jensen's Death During the 1960 Rome Olympics: A Search for Truth?", *Sport in History*, v. 25, n. 3, p. 452–471, dez. 2005. DOI: 10.1080/17460260500396319.
- [4] MÜLLER, R. K., "History of Doping and Doping Control". In: THIEME, D., HEMMERSBACH, P. (Org.), *Doping in Sports*, Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg, 2009. v. 195. p. 1–23. DOI: 10.1007/978-3-540-79088-4\_1.
- [5] KREMENIK, M., ONODERA, S., NAGAO, M., *et al.* A Historical Timeline of Doping in the Olympics (Part III 1989--2006). Disponível em: <https://doi.org/10.15112/00005049>.
- [6] KRÜGER, M. F., NIELSEN, S., BECKER, C. "The Munich Olympics 1972: Its Impact on the Relationship Between State, Sports and Anti-Doping Policy in West Germany", *Sport in History*, v. 32, n. 4, p. 526–549, dez. 2012. DOI: 10.1080/17460263.2012.756424.
- [7] Who We Are. [2022]. World Anti-Doping Agency. Disponível em: <https://www.wada-ama.org/en/who-we-are>. Acesso em: 14 jun. 2022.
- [8] Laboratories. [2022]. World Anti-Doping Agency. Disponível em: <https://www.wada-ama.org/en/anti-doping-partners/laboratories>. Acesso em: 14 jun. 2022.
- [9] CONEXÃO. Jornalistas visitam laboratório de doping do Pan – Conexão UFRJ. [S.d.]. Disponível em: <https://conexao.ufrj.br/2007/07/jornalistas-visitam-laboratorio-de-doping-do-pan/>. Acesso em: 14 jun. 2022.
- [10] Nossa História – LADETEC. . [S.l: s.n.]. Disponível em: <https://www.ladetec.iq.ufrj.br/nossahistoria/>. Acesso em: 14 jun. 2022.
- [11] Prohibited List. [2022]. World Anti-Doping Agency. Disponível em: <https://www.wada-ama.org/en/resources/world-anti-doping-program/prohibited-list>. Acesso em: 14 jun. 2022.

- [12] FITCH, K. D. "The enigma of inhaled salbutamol and sport: unresolved after 45 years: Enigma of inhaled salbutamol and sport", *Drug Testing and Analysis*, v. 9, n. 7, p. 977–982, jul. 2017. DOI: 10.1002/dta.2184.
- [13] CAZZOLA, M., PAGE, C. P., ROGLIANI, P., *et al.* " $\beta_2$ -Agonist Therapy in Lung Disease", *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, v. 187, n. 7, p. 690–696, 1 abr. 2013. DOI: 10.1164/rccm.201209-1739PP.
- [14] LAURENT, G. J., SHAPIRO, S. D. (Org.). *Encyclopedia of respiratory medicine*. 1st ed ed. Amsterdam Boston, Elsevier/AP, 2006.
- [15] FORSDAHL, G., GMEINER, G. "Quantification and stability of Salbutamol in human urine", *Journal of Separation Science*, v. 27, n. 1–2, p. 110–114, jan. 2004. DOI: 10.1002/jssc.200301655.
- [16] HOSTRUP, M., JACOBSON, G. A., JESSEN, S., *et al.* "Anabolic and lipolytic actions of beta<sub>2</sub>-agonists in humans and antidoping challenges", *Drug Testing and Analysis*, v. 12, n. 5, p. 597–609, maio 2020. DOI: 10.1002/dta.2728.
- [17] HSU, E., BAJAJ, T., "Beta 2 Agonists". StatPearls, Treasure Island (FL), StatPearls Publishing, 2022. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK542249/>. Acesso em: 15 jun. 2022.
- [18] HANDLEY, D. A. "Single-Isomer  $\beta$ -Agonists", *Pharmacotherapy*, v. 21, n. 3 Part 2, p. 21S-27S, mar. 2001. DOI: 10.1592/phco.21.4.21S.34261.
- [19] BAKALE, R. P., WALD, S. A., BUTLER, H. T., *et al.* "Albuterol: A pharmaceutical chemistry review of R-, S-, and RS-albuterol", *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, v. 14, n. 1, p. 7–35, mar. 1996. DOI: 10.1007/BF02772200.
- [20] FUENTES, A., PINEDA, M., VENKATA, K. "Comprehension of Top 200 Prescribed Drugs in the US as a Resource for Pharmacy Teaching, Training and Practice", *Pharmacy*, v. 6, n. 2, p. 43, 14 maio 2018. DOI: 10.3390/pharmacy6020043.
- [21] Anti-Doping Testing Figures Report. [2021]. World Anti-Doping Agency. Disponível em: <https://www.wada-ama.org/en/resources/anti-doping-stats/anti-doping-testing-figures-report>. Acesso em: 15 jun. 2022.
- [22] ADAMS. [2022]. World Anti-Doping Agency. Disponível em: <https://www.wada-ama.org/en/what-we-do/adams>. Acesso em: 14 jun. 2022.

- [23] SALEH, M. I., KOH, Y. M., TAN, S. C., *et al.* "Clean-up, detection and determination of salbutamol in human urine and serum", *The Analyst*, v. 125, n. 9, p. 1569–1572, 2000. DOI: 10.1039/b000010h.
- [24] TD2022DL. [2022]. World Anti-Doping Agency. Disponível em: <https://www.wada-ama.org/en/resources/lab-documents/td2022dl>. Acesso em: 14 jun. 2022.
- [25] GARZA, A. Z., PARK, S. B., KOCZ, R., "Drug Elimination". StatPearls, Treasure Island (FL), StatPearls Publishing, 2022. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK547662/>. Acesso em: 18 jun. 2022.
- [26] POLETTINI, A. "Bioanalysis of  $\beta$ 2-agonists by hyphenated chromatographic and mass spectrometric techniques", *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, v. 687, n. 1, p. 27–42, dez. 1996. DOI: 10.1016/S0378-4347(96)00015-1.
- [27] LU, J.-D., XUE, J., "Poisoning". *Critical Care Nephrology*, Elsevier, 2019. p. 600-629.e7. DOI: 10.1016/B978-0-323-44942-7.00101-1.
- [28] AL-ZOUGHLOO, M., TALASKA, G. "4-AminobiphenylN-glucuronidation by liver microsomes: optimization of the reaction conditions and characterization of the UDP-glucuronosyltransferase isoforms", *Journal of Applied Toxicology*, v. 26, n. 6, p. 524–532, nov. 2006. DOI: 10.1002/jat.1172.
- [29] BANES, P. Glucuronide formation - Metabolic Activation. 6 jan. 2021. European Medical. Disponível em: <http://www.europeanmedical.info/metabolic-activation/glucuronide-formation.html>. Acesso em: 3 jul. 2022.
- [30] TESTA, B., "Principles of Drug Metabolism 2: Hydrolysis and Conjugation Reactions". *Comprehensive Medicinal Chemistry II*, [S.l.], Elsevier, 2007. p. 133–166. DOI: 10.1016/B0-08-045044-X/00120-6.
- [31] COLLINS, S., O'KEEFFE, M., SMYTH, M. R. "Multi-residue analysis for beta-agonists in urine and liver samples using mixed phase columns with determination by radioimmunoassay", *The Analyst*, v. 119, n. 12, p. 2671, 1994. DOI: 10.1039/an9941902671.
- [32] DE GRAAF, M., BOVEN, E., SCHEEREN, H. W., *et al.* "Beta-glucuronidase-mediated drug release", *Current Pharmaceutical Design*, v. 8, n. 15, p. 1391–1403, 2002. DOI: 10.2174/1381612023394485.
- [33] MCCARTER, J. D., STEPHEN WITHERS, G. "Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis", *Current Opinion in Structural Biology*, v. 4, n. 6, p. 885–892, 1 jan. 1994. DOI: 10.1016/0959-440X(94)90271-2.

- [34] KIM, Y., JEON, M., MIN, H., *et al.* "Development of a multi-functional concurrent assay using weak cation-exchange solid-phase extraction (WCX-SPE) and reconstitution with a diluted sample aliquot for anti-doping analysis", *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, v. 32, n. 11, p. 897–905, 15 jun. 2018. DOI: 10.1002/rcm.8119.
- [35] MAMLOUK, M., YOUNG, P. M., BEBAWY, M., *et al.* "Salbutamol Sulfate Absorption Across Calu-3 Bronchial Epithelia Cell Monolayer is Inhibited in the Presence of Common Anionic NSAIDs", *Journal of Asthma*, v. 50, n. 4, p. 334–341, 1 maio 2013. DOI: 10.3109/02770903.2013.773518.
- [36] MENG, W., WEI, J., LUO, X., *et al.* "Separation of  $\beta$ -agonists in pork on a weak cation exchange column by HPLC with fluorescence detection", *Analytical Methods*, v. 4, n. 4, p. 1163, 2012. DOI: 10.1039/c2ay05936c.
- [37] OUYANG, J., DUAN, J. L., BAEYENS, W. R. G., *et al.* "A simple method for the study of salbutamol pharmacokinetics by ion chromatography with direct conductivity detection", *Talanta*, v. 65, n. 1, p. 1–6, 15 jan. 2005. DOI: 10.1016/j.talanta.2004.01.026.
- [38] MARIN, S. J. When should I choose weak ion exchange SPE phases? 2020. Disponível em: <https://sampleprep.biotage.com/blog/when-should-i-choose-weak-ion-exchange>. Acesso em: 3 jul. 2022.
- [39] MONTRADE, M. -P., LE BIZEC, B., MONTEAU, F., *et al.* "Analysis of  $\beta$ -agonists in urine and tissues by capillary gas chromatography-mass spectrometry: *In vivo* study of salbutamol disposition in calves", *Food Additives and Contaminants*, v. 12, n. 5, p. 625–636, set. 1995. DOI: 10.1080/02652039509374351.
- [40] BLAU, K., HALKET, J. M. (Org.). *Handbook of derivatives for chromatography*. 2nd ed ed. Chichester ; New York, Wiley, 1993.
- [41] MOHD, M. A. *Advanced Gas Chromatography - Progress in Agricultural, Biomedical and Industrial Applications*. s.l., InTechOpen, 2012.
- [42] NAGY, K., VÉKEY, K., "Separation methods". *Medical Applications of Mass Spectrometry*, [S.l.], Elsevier, 2008. p. 61–92. DOI: 10.1016/B978-044451980-1.50007-0.
- [43] WU, C., LIU, T., BAKER, E. S., *et al.*, "Mass Spectrometry for Biomarker Development". In: PREEDY, V. R., PATEL, V. B. (Org.), *General Methods in Biomarker Research and their Applications*, Dordrecht, Springer Netherlands, 2015. p. 17–48. DOI: 10.1007/978-94-007-7696-8\_21.

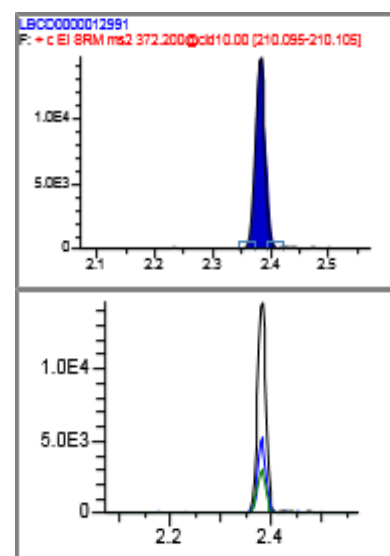
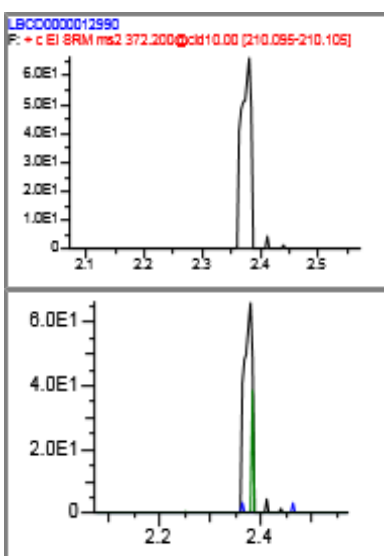
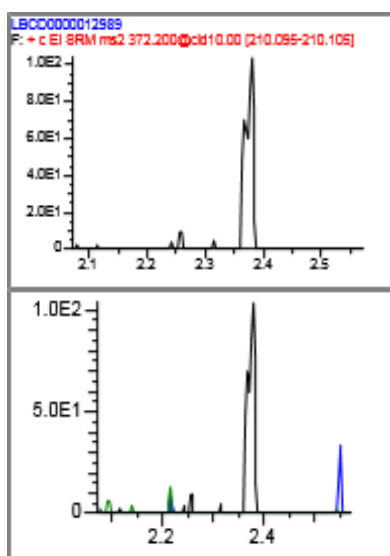
- [44] CHIARADIA, M. C., COLLINS, C. H., JARDIM, I. C. S. F. "O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos", *Química Nova*, v. 31, n. 3, p. 623–636, 2008. DOI: 10.1590/S0100-40422008000300030.
- [45] CROOTE, D., QUAKE, S. R. "Food allergen detection by mass spectrometry: the role of systems biology", *npj Systems Biology and Applications*, v. 2, n. 1, p. 16022, dez. 2016. DOI: 10.1038/npjbsba.2016.22.
- [46] MARECK, U., GUDDAT, S., SCHWENKE, A., *et al.* "Determination of salbutamol and salbutamol glucuronide in human urine by means of liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Salbutamol and salbutamol glucuronide in human urine", *Drug Testing and Analysis*, v. 3, n. 11–12, p. 820–827, nov. 2011. DOI: 10.1002/dta.367.
- [47] DOMÍNGUEZ-ROMERO, J. C., GARCÍA-REYES, J. F., MARTÍNEZ-ROMERO, R., *et al.* "Detection of main urinary metabolites of  $\beta_2$ -agonists clenbuterol, salbutamol and terbutaline by liquid chromatography high resolution mass spectrometry", *Journal of Chromatography B*, v. 923–924, p. 128–135, abr. 2013. DOI: 10.1016/j.jchromb.2013.02.008.
- [48] KANG, B., TANG, H., ZHAO, Z., *et al.* "Hofmeister Series: Insights of Ion Specificity from Amphiphilic Assembly and Interface Property", *ACS Omega*, v. 5, n. 12, p. 6229–6239, 31 mar. 2020. DOI: 10.1021/acsomega.0c00237.
- [49] DAMASCENO, L., VENTURA, R., ORTUÑO, J., *et al.* "Derivatization procedures for the detection of  $\beta_2$ -agonists by gas chromatographic/mass spectrometric analysis", *Journal of Mass Spectrometry*, v. 35, n. 11, p. 1285–1294, nov. 2000. DOI: 10.1002/1096-9888(200011)35:11<1285::AID-JMS61>3.0.CO;2-L.
- [50] International Standard for Laboratories (ISL). 2021. World Anti Doping Agency. Disponível em: <https://www.wada-ama.org/en/resources/world-anti-doping-program/international-standard-laboratories-isl>.
- [51] Bruno Carius Garrido, Mayra Leal Chrisóstomo Silva, Ricardo Moreira Borges, Monica Costa Padilha and Francisco Radler de Aquino Neto. Salbutamol extraction from urine and stability in different solutions. *Biomed. Chromatogr.* 2013; 27: 1630–1638.

## 8. APÊNDICES

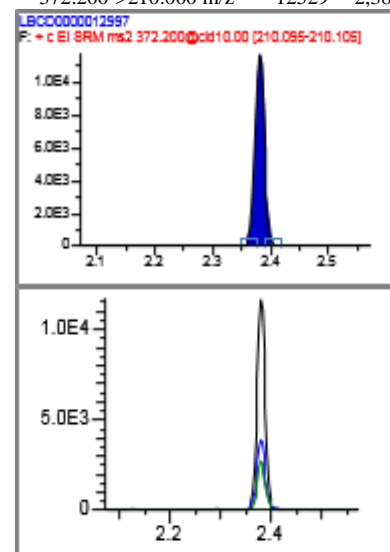
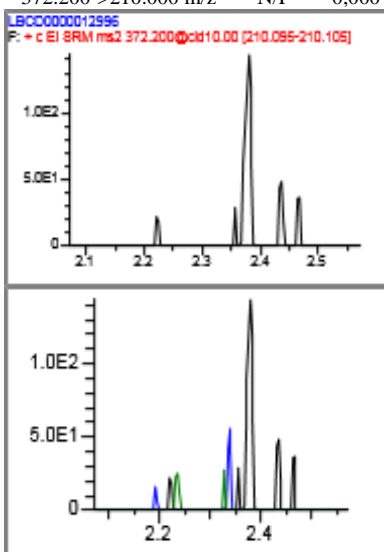
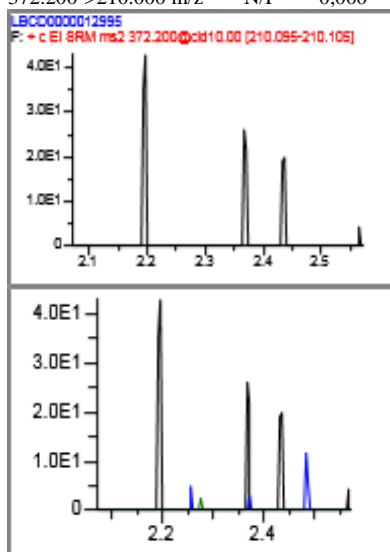
Extração com metanol (extração em fase sólida) e MTBE (extração em fase líquida):

Salbutamol-d3

CQN - MeOH - MTBE			Amostra - MeOH - MTBE			Efic. de extração - MeOH – MTBE		
Quan:	Area:	RT	Quan:	Area:	RT	Quan:	Area:	RT
372.200->210.000 m/z	N/F	0,000	372.200->210.000 m/z	N/F	0,000	372.200->210.000 m/z	16595	2,383

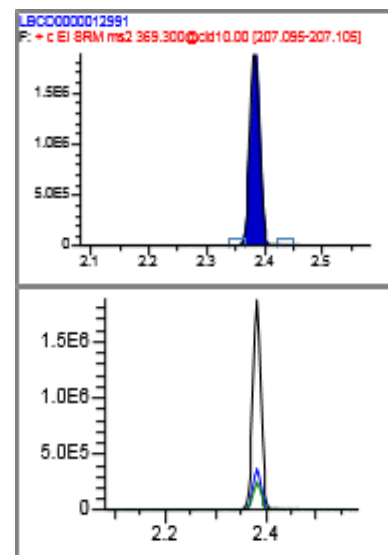
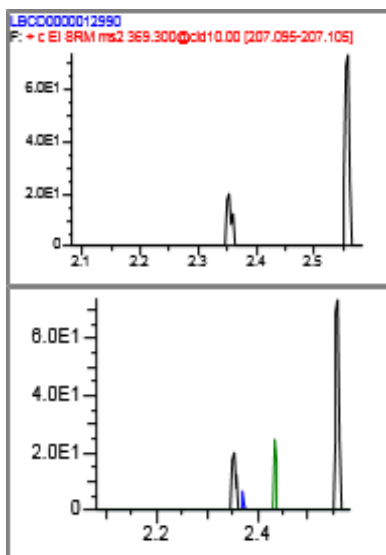
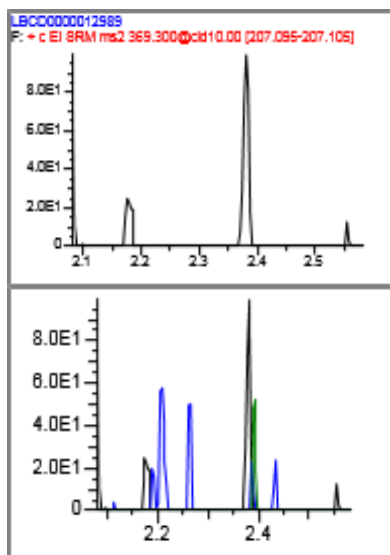


CQN - MeOH - MTBE			Amostra - MeOH - MTBE			Efic. de extração - MeOH – MTBE		
Quan:	Area:	RT	Quan:	Area:	RT	Quan:	Area:	RT
372.200->210.000 m/z	N/F	0,000	372.200->210.000 m/z	N/F	0,000	372.200->210.000 m/z	12529	2,380

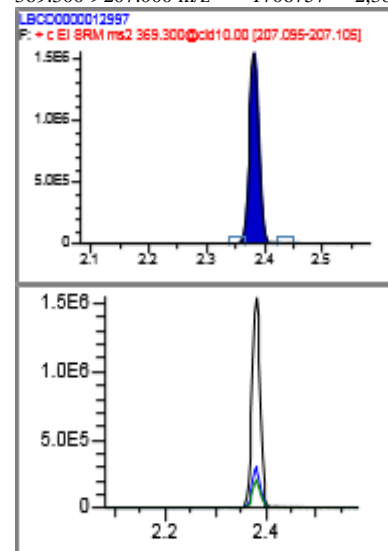
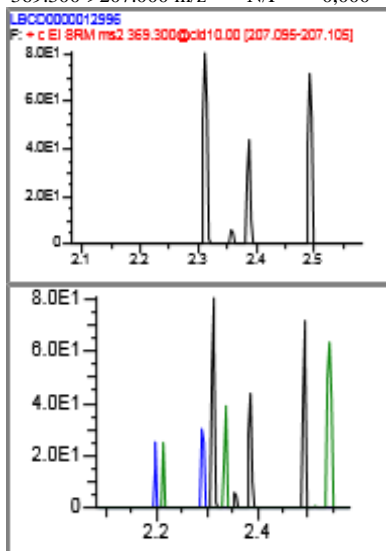
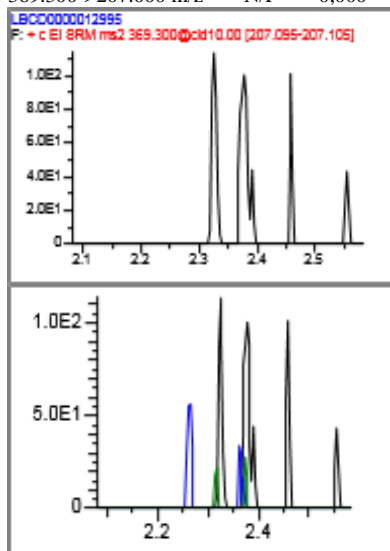


## Salbutamol

CQN - MeOH - MTBE			Amostra - MeOH - MTBE			Efic. de extração - MeOH – MTBE		
Quan:	Area:	RT	Quan:	Area:	RT	Quan:	Area:	RT
369.300->207.000 m/z	N/F	0,000	369.300->207.000 m/z	N/F	0,000	369.300->207.000 m/z	2138460	2,384

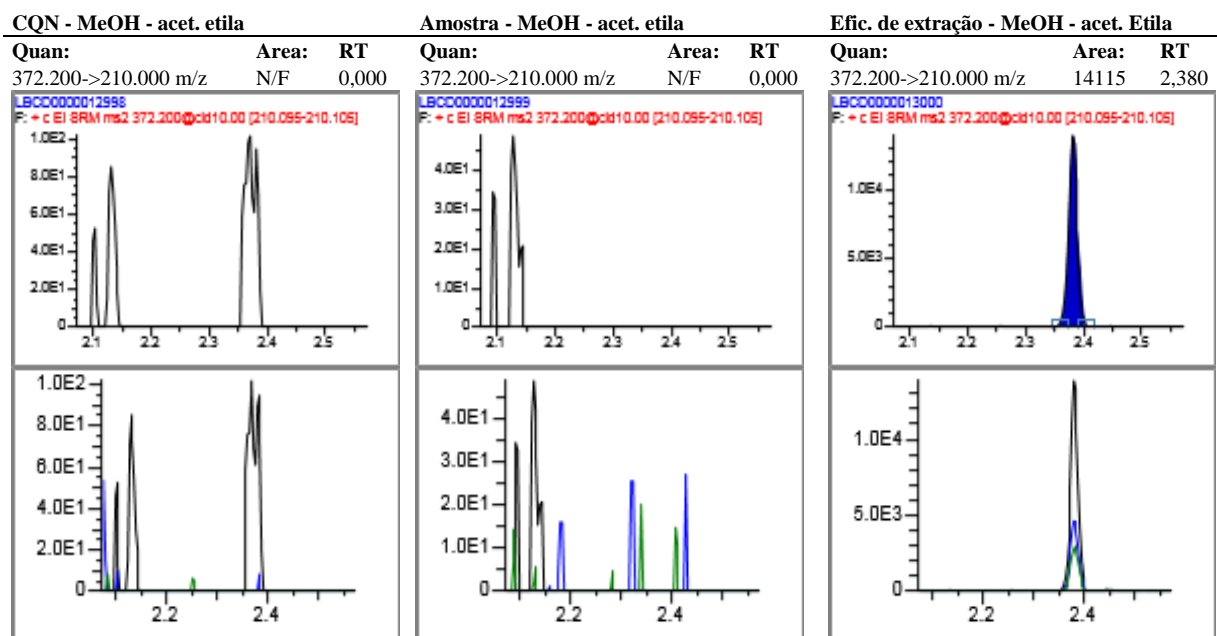
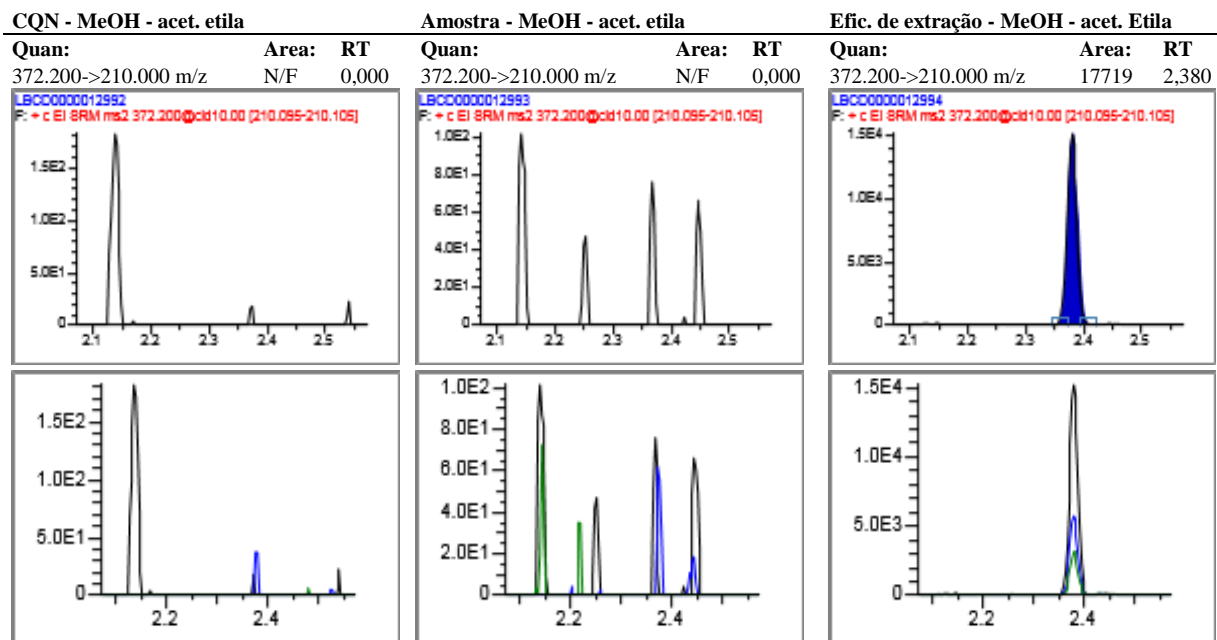


CQN - MeOH - MTBE			Amostra - MeOH - MTBE			Efic. de extração - MeOH – MTBE		
Quan:	Area:	RT	Quan:	Area:	RT	Quan:	Area:	RT
369.300->207.000 m/z	N/F	0,000	369.300->207.000 m/z	N/F	0,000	369.300->207.000 m/z	1706757	2,381



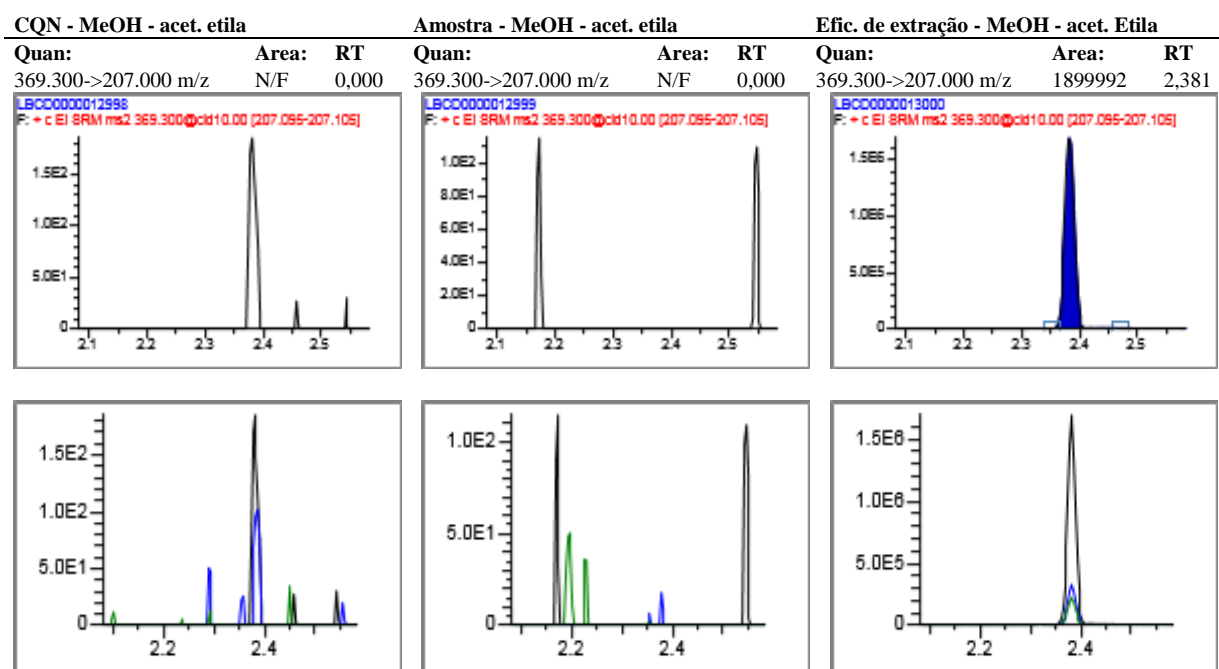
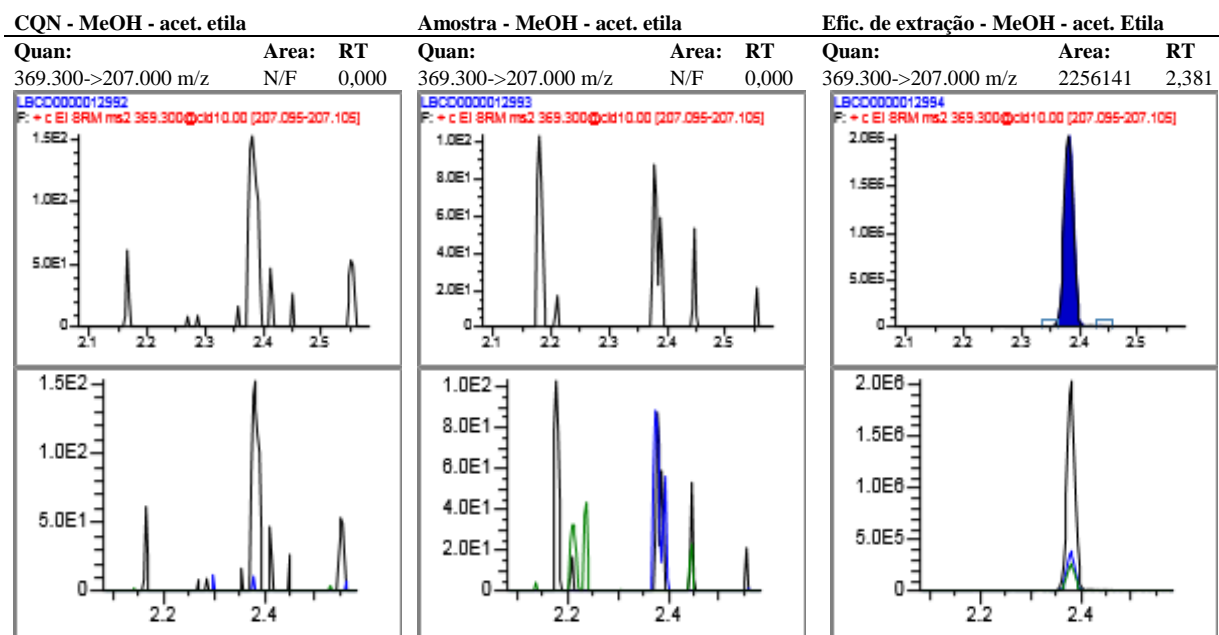
Extração com metanol (EFS) e acetato de etila (EFL):

### Salbutamol-d3



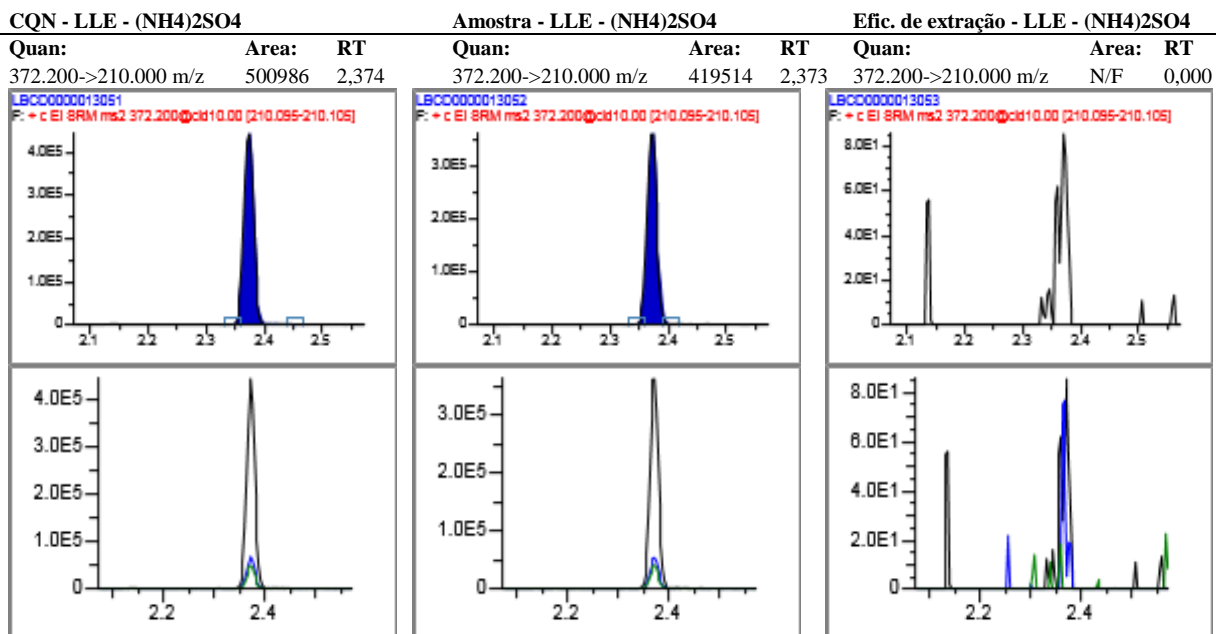


## Salbutamol

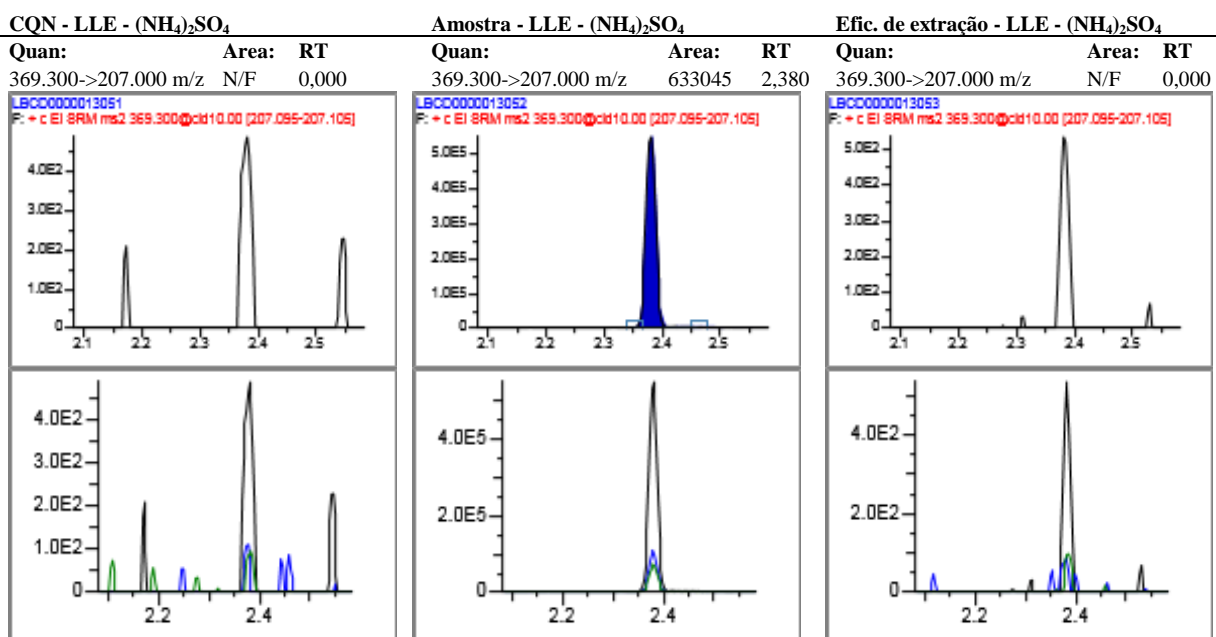


Resultados obtidos quando  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  foi utilizado para realizar a extração:

### Salbutamol-d3

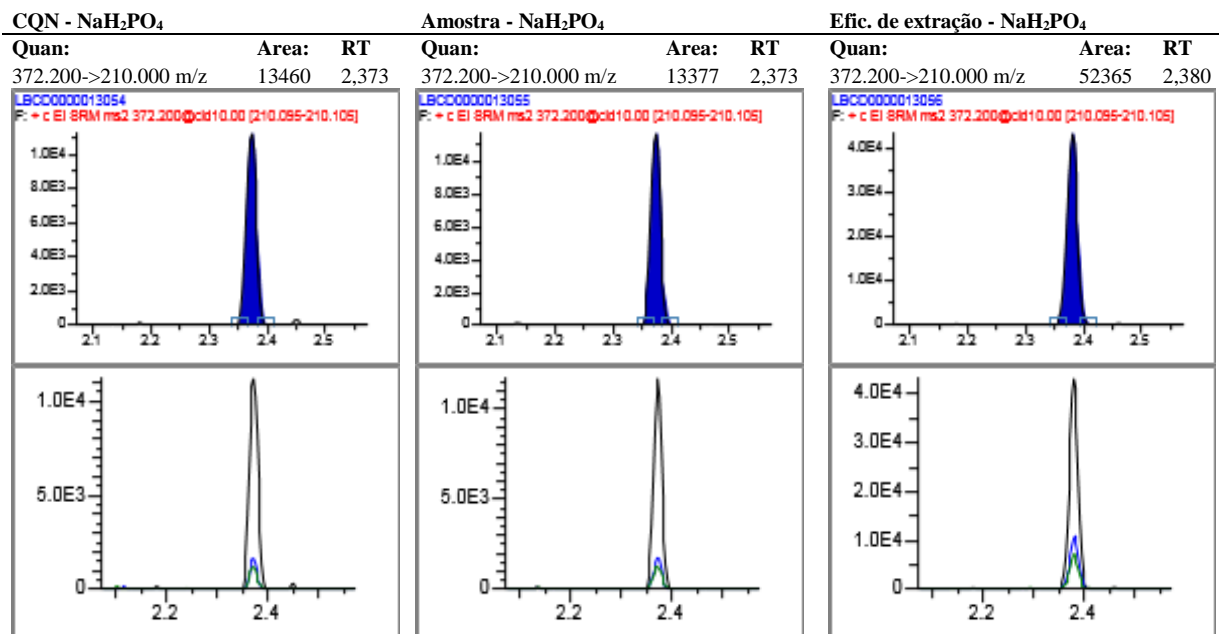


### Salbutamol



Resultados obtidos quando  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  foi utilizado para realizar a extração:

### Salbutamol-d3



### Salbutamol

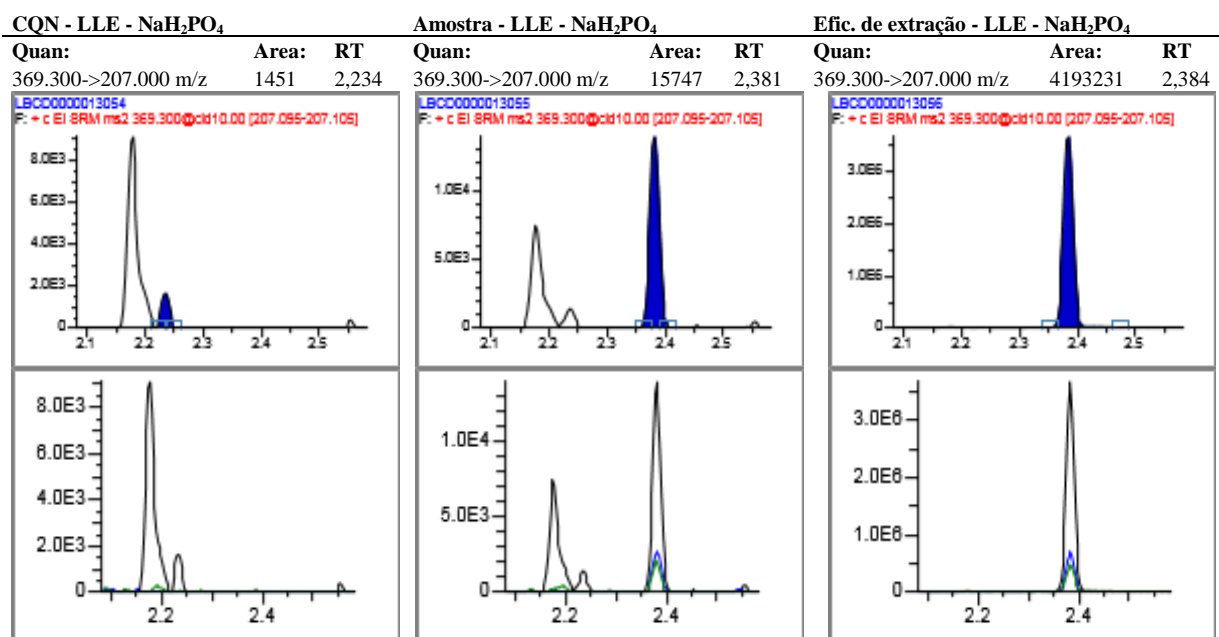
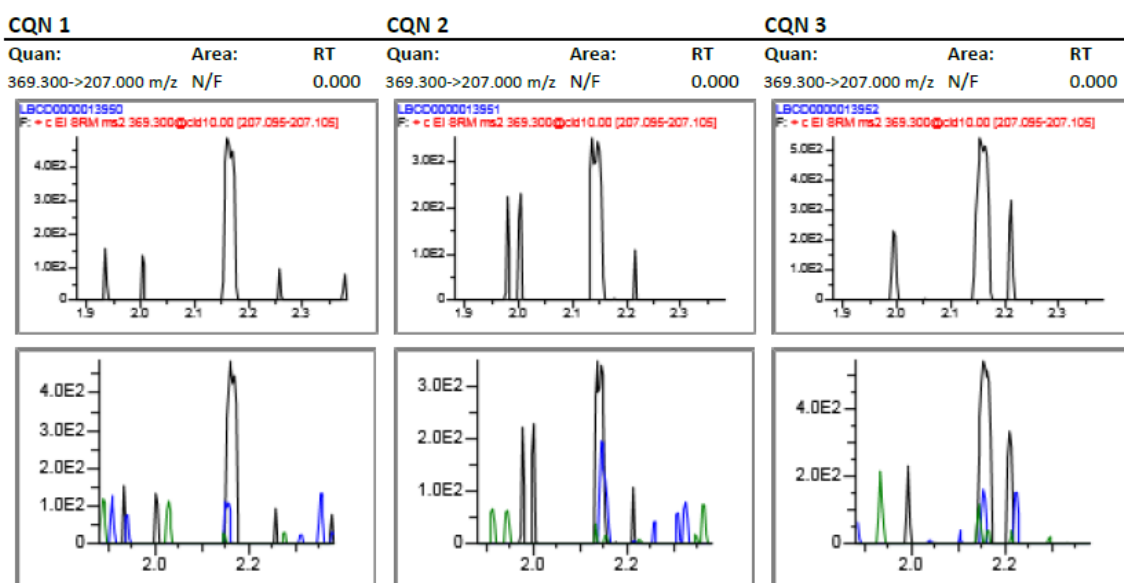


Tabela 25. Extração por um segundo analista em coluna de troca catiônica fraca.

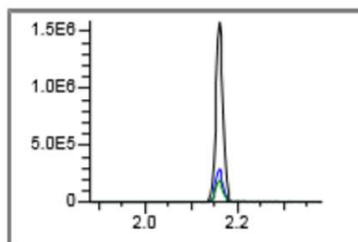
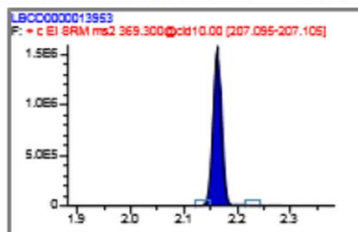
Nome	T <sub>R</sub>	Área do pico	Área PI	Razão entre áreas
CQN 1	N/F	0	1151715	N/F
CQN 2	N/F	0	1383190	N/F
CQN 3	N/F	0	1283669	N/F
AM 1	2.16	1728730	1095748	1.578
AM 2	2.16	4217443	2390995	1.764
AM 3	2.16	1921184	1095039	1.754
EE 1	2.16	3242267	1770016	1.832
EE 2	2.16	4559322	2793977	1.632
EE 3	2.16	1832074	1190704	1.539

Resultado de extração por segundo analista:



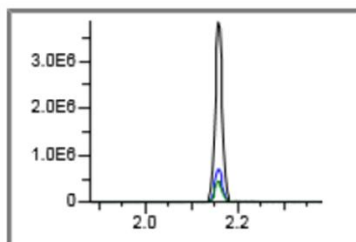
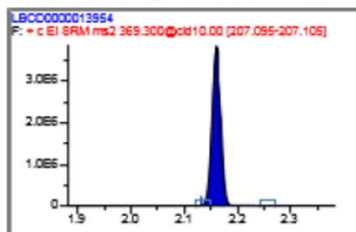
## AM 1

Quan: Area: RT  
369.300->207.000 m/z 1728730 2.161



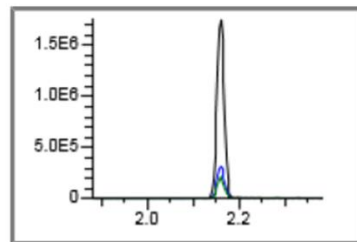
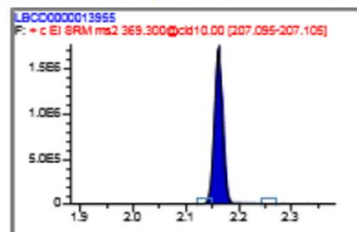
## AM 2

Quan: Area: RT  
369.300->207.000 m/z 4217443 2.158



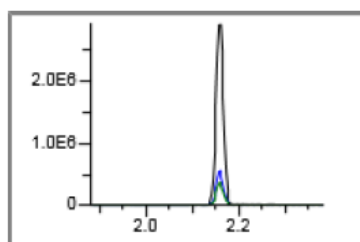
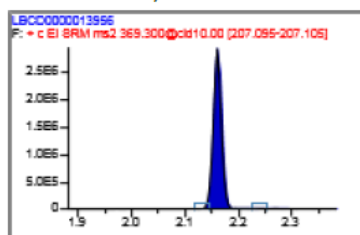
## AM 3

Quan: Area: RT  
369.300->207.000 m/z 1921184 2.161



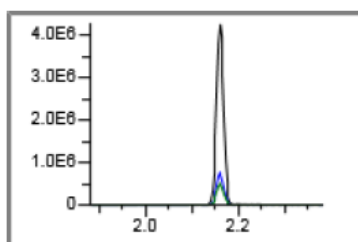
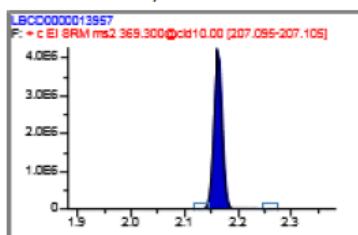
## EE 1

Quan: Area: RT  
369.300->207.000 m/z 3242267 2.161



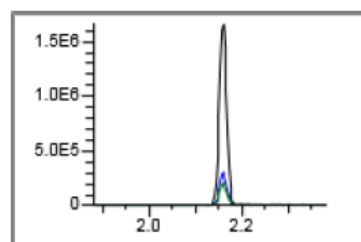
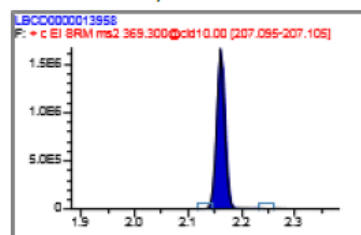
## EE 2

Quan: Area: RT  
369.300->207.000 m/z 4559322 2.161



## EE 3

Quan: Area: RT  
369.300->207.000 m/z 1832074 2.161



## 8.1 Resultados e cromatogramas referentes à validação – primeiro dia.

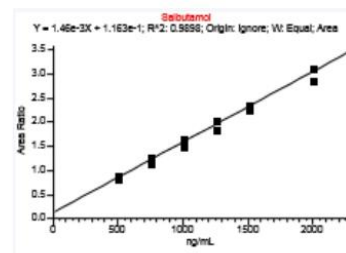
**LBCD - Laboratorio Brasileiro de Controle de Dopagem**

**Lab Name:** LBCD-4  
**Instrument:** 15E1439  
**User:** triagem4  
**Batch:** 20210716\_2\_Validacao\_Salbutamol\_dia\_1

**Master method:** Salbutamol  
**Cali File:** 20210716\_2\_Validacao\_Salbutamol\_dia\_1.cali

**Salbutamol**

**Calibration A1/Slope:** 0,00146  
**Calibration A0/Y-Intercept/Mean RF:** 0,11631  
**Calibration R Squared/RSD (%):** 0,990

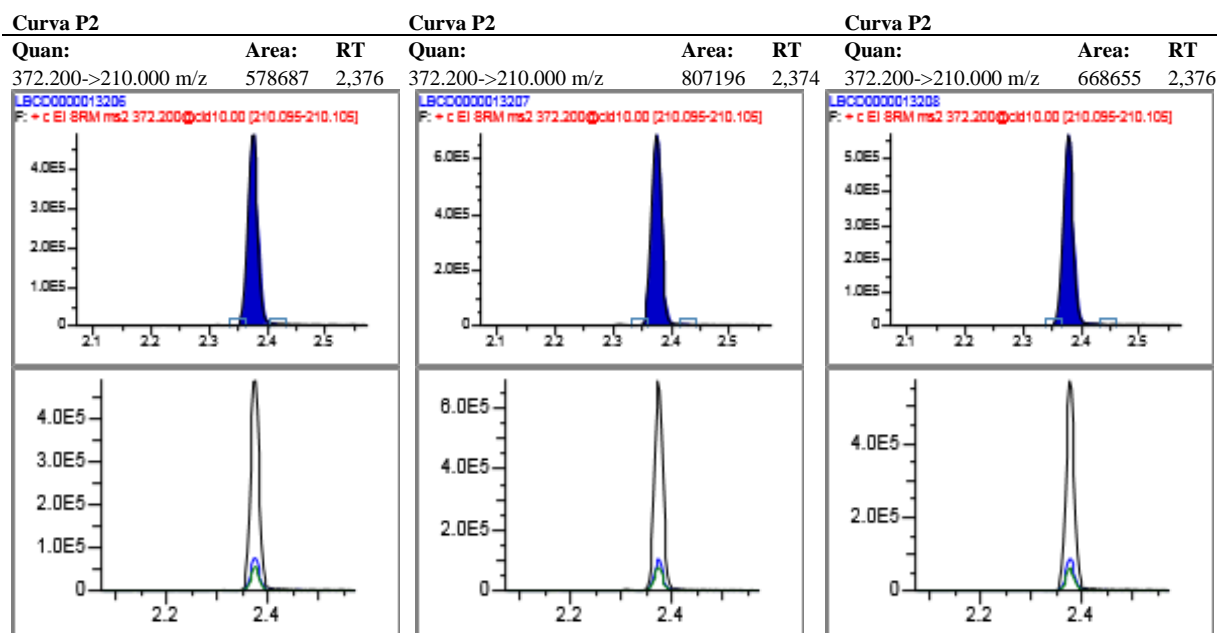
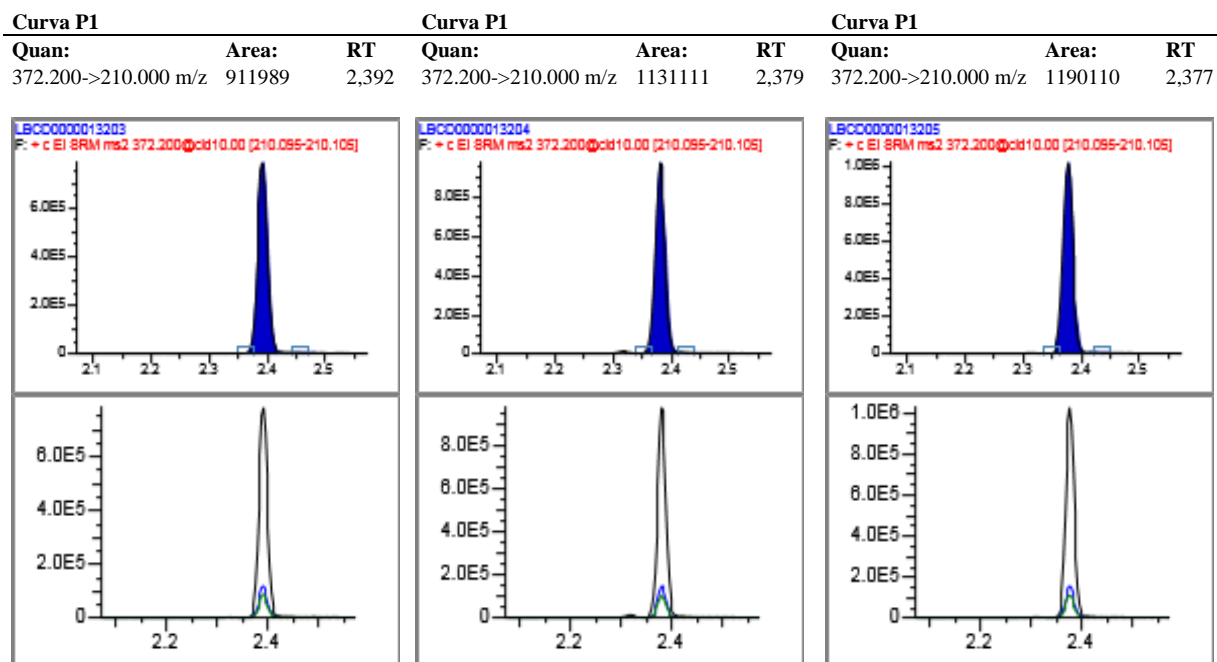


FileName	Sample Name	RT	Peak Area	ISTD Area	Area Ratio	Theo Amount	QC Amount	Calc Amount	Amount Diff	MEAN	S dev	%RSD
LBCD0000013203	Curva p1	2,4	781478	911989	0,857	500		507,19	1,4	514,967	18,187	3,532
LBCD0000013204	Curva p1	2,39	960598	1131111	0,849	500		501,96	0,4	514,967	18,187	3,532
LBCD0000013205	Curva p1	2,38	1069421	1190110	0,899	500		535,75	7,2	514,967	18,187	3,532
LBCD0000013206	Curva p2	2,38	736401	578687	1,273	750		791,85	5,6	740,440	44,527	6,014
LBCD0000013207	Curva p2	2,38	935451	807196	1,159	750		714,02	-4,8	740,440	44,527	6,014
LBCD0000013208	Curva p2	2,38	776301	668655	1,161	750		715,45	-4,6	740,440	44,527	6,014
LBCD0000013209	Curva p3	2,38	1304798	779130	1,675	1000		1067,26	6,7	1001,436	57,755	5,767
LBCD0000013210	Curva p3	2,38	1397451	921203	1,517	1000		959,26	-4,1	1001,436	57,755	5,767
LBCD0000013211	Curva p3	2,38	1804122	1168450	1,544	1000		977,78	-2,2	1001,436	57,755	5,767
LBCD0000013212	Curva p4	2,38	2295197	1246391	1,841	1250		1181,49	-5,5	1232,787	75,450	6,120
LBCD0000013213	Curva p4	2,38	1792517	877448	2,043	1250		1319,42	5,6	1232,787	75,450	6,120
LBCD0000013214	Curva p4	2,38	2339775	1254720	1,865	1250		1197,45	-4,2	1232,787	75,450	6,120
LBCD0000013215	Curva p5	2,38	1555125	688002	2,26	1500		1468,36	-2,1	1501,946	31,606	2,104
LBCD0000013216	Curva p5	2,38	2567910	1091814	2,352	1500		1531,10	2,1	1501,946	31,606	2,104
LBCD0000013217	Curva p5	2,38	2682622	1158368	2,316	1500		1506,38	0,4	1501,946	31,606	2,104
LBCD0000013218	Curva p6	2,38	3589244	1243315	2,887	2000		1897,41	-5,1	2008,424	96,143	4,787
LBCD0000013219	Curva p6	2,38	1569454	501562	3,129	2000		2063,35	3,2	2008,424	96,143	4,787
LBCD0000013220	Curva p6	2,38	4441121	1418512	3,131	2000		2064,51	3,2	2008,424	96,143	4,787
LBCD0000013221	Rep 1	2,38	1593576	1069603	1,49	N/A	1000,00	940,70	-5,9	918,097	44,607	4,859
LBCD0000013222	Rep 2	2,38	1096983	725395	1,512	N/A	1000,00	956,02	-4,4	918,097	44,607	4,859
LBCD0000013223	Rep 3	2,38	1998653	1334835	1,497	N/A	1000,00	945,78	-5,4	918,097	44,607	4,859
LBCD0000013224	Rep 4	2,38	972790	864021	1,126	N/A	1000,00	691,42	-30,9			
LBCD0000013225	Rep 5	2,38	1376191	977941	1,407	N/A	1000,00	884,10	-11,6	918,097	44,607	4,859
LBCD0000013226	Rep 6	2,38	1394651	1031530	1,352	N/A	1000,00	846,29	-15,4	918,097	44,607	4,859
LBCD0000013227	Rep 7	2,38	1829230	1295769	1,412	N/A	1000,00	887,15	-11,3	918,097	44,607	4,859
LBCD0000013228	Rep 8	2,38	1264190	901423	1,402	N/A	1000,00	880,81	-11,9	918,097	44,607	4,859

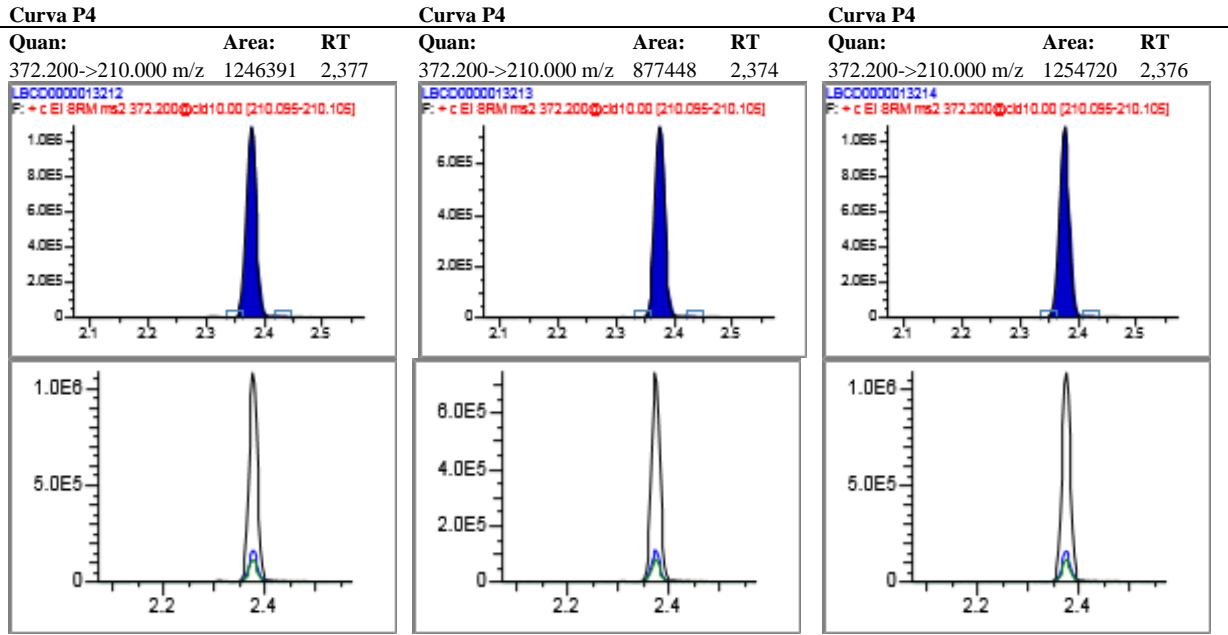
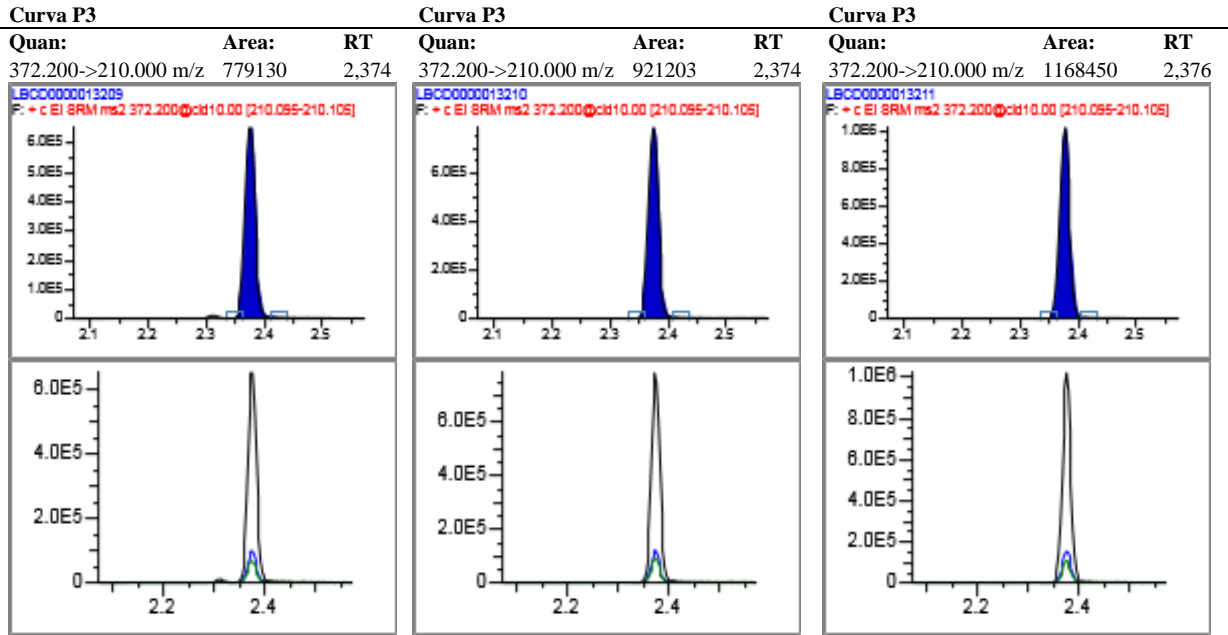
### LBCD - Laboratorio Brasileiro de Controle de Dopagem

Lab Name:	LBCD-4											
Instrument:	15E1439			Master method:		Salbutamol						
User:	triagem4											
Batch:	20210716 2 Validacao Salbutamol dia 1			Cali File:		20210716 2 Validacao Salbutamol dia 1.cali						
LBCD0000013229	Rep 9	2,38	1966957	1320740	1,489	N/A	1000,00	940,29	-6,0	918,097	44,607	4,859
LBCD0000013230	Rep 10	N/F	0	N/F	N/F	N/A	1000,00	N/F	NaN			
LBCD0000013231	Arraste - BU	2,38	1238	1041422	0,001	N/A		-78,84	N/A			
LBCD0000013232	Arraste - fortificado	2,38	4932144	1585083	3,112	N/A		2051,34	N/A			
LBCD0000013233	Arraste - BU	2,38	2847	1060891	0,003	N/A		-77,82	N/A			
LBCD0000013234	Interferencia de matriz 1	2,38	1691971	858254	1,971	N/A	1000,00	1270,48	27,1			
LBCD0000013235	Interferencia de matriz 2	2,38	1640221	1080998	1,517	N/A	1000,00	959,49	-4,1	930,396	35,066	3,769
LBCD0000013236	Interferencia de matriz 3	2,38	1652029	1065020	1,551	N/A	1000,00	982,67	-1,7	930,396	35,066	3,769
LBCD0000013237	Interferencia de matriz 4	2,38	2313434	1515381	1,527	N/A	1000,00	965,87	-3,4	930,396	35,066	3,769
LBCD0000013238	Interferencia de matriz 5	2,38	1306121	927256	1,409	N/A	1000,00	885,02	-11,5	930,396	35,066	3,769
LBCD0000013239	Interferencia de matriz 6	2,38	1401669	952213	1,472	N/A	1000,00	928,46	-7,2	930,396	35,066	3,769
LBCD0000013240	Interferencia de matriz 7	2,38	1821883	1272207	1,432	N/A	1000,00	901,10	-9,9	930,396	35,066	3,769
LBCD0000013241	Interferencia de matriz 8	2,38	2012902	1424093	1,413	N/A	1000,00	888,36	-11,2	930,396	35,066	3,769
LBCD0000013242	Interferencia de matriz 9	2,38	1961266	1312470	1,494	N/A	1000,00	943,75	-5,6	930,396	35,066	3,769
LBCD0000013243	Interferencia de matriz 10	2,38	2072685	1421649	1,458	N/A	1000,00	918,83	-8,1	930,396	35,066	3,769
LBCD0000013244	rep 10 reinj	2,4	3459930	2232497	1,55	N/A	1000,00	981,74	-1,8	918,097	44,607	4,859

### Primeiro dia - Salbutamol-d<sub>3</sub>

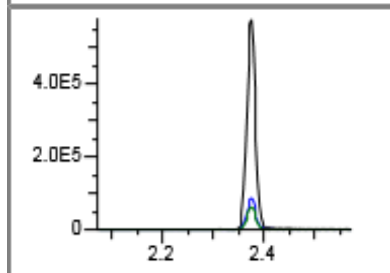
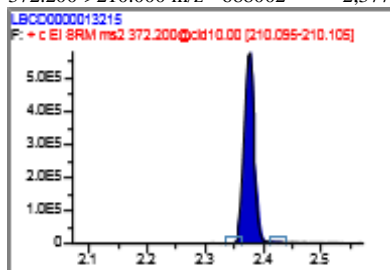






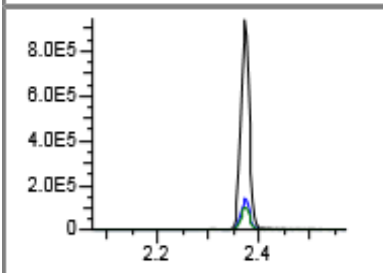
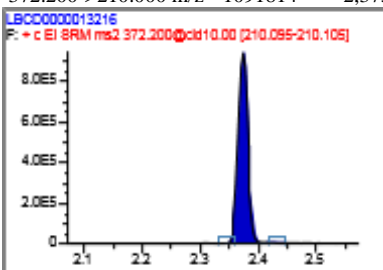
Curva P5

Quan: 372.200->210.000 m/z Area: 688002 RT: 2,377



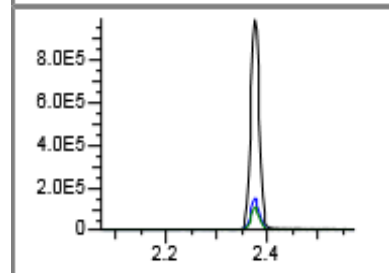
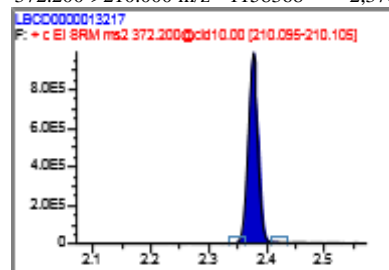
Curva P5

Quan: 372.200->210.000 m/z Area: 1091814 RT: 2,373



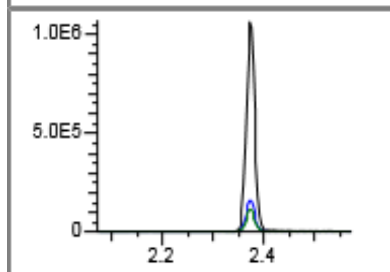
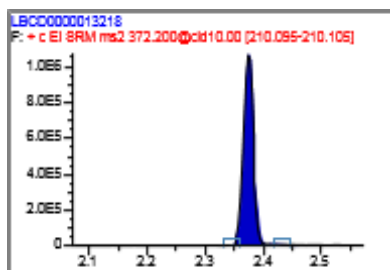
Curva P5

Quan: 372.200->210.000 m/z Area: 1158368 RT: 2,376



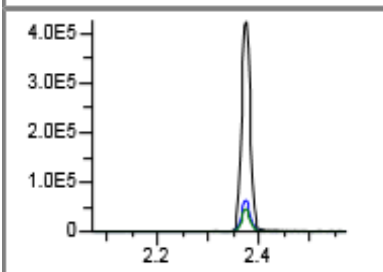
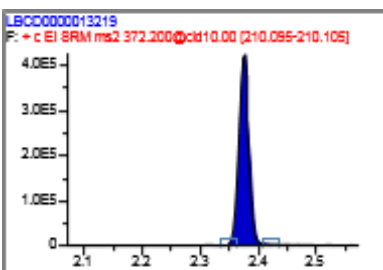
Curva P6

Quan: 372.200->210.000 m/z Area: 1243315 RT: 2,373



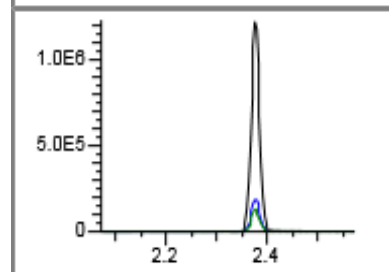
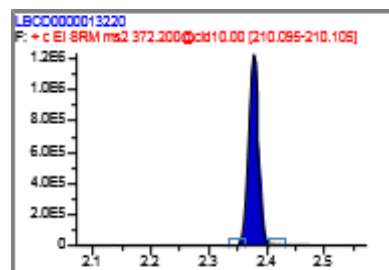
Curva P6

Quan: 372.200->210.000 m/z Area: 501562 RT: 2,376



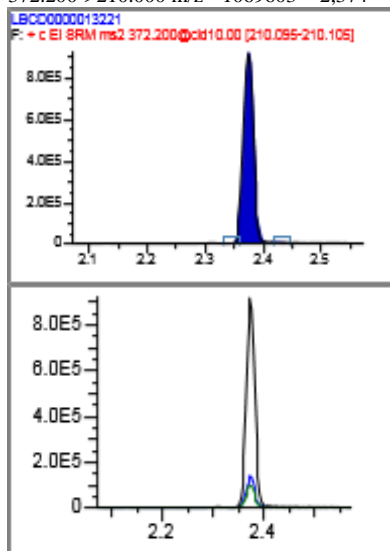
Curva P6

Quan: 372.200->210.000 m/z Area: 1418512 RT: 2,376



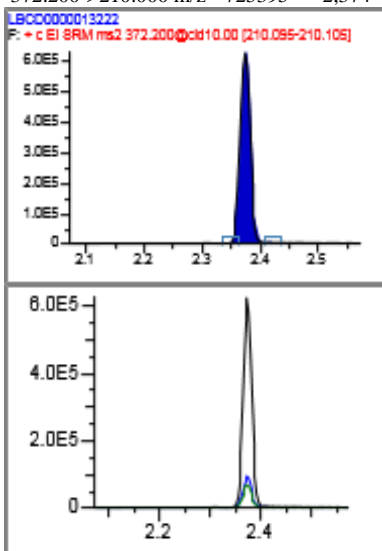
Rep 1

Quan: Area: RT  
372.200->210.000 m/z 1069603 2,374



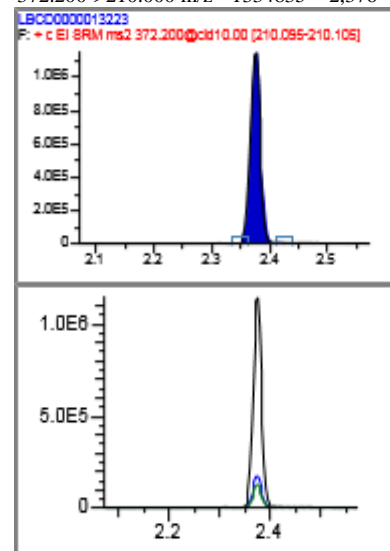
Rep 2

Quan: Area: RT  
372.200->210.000 m/z 725395 2,374



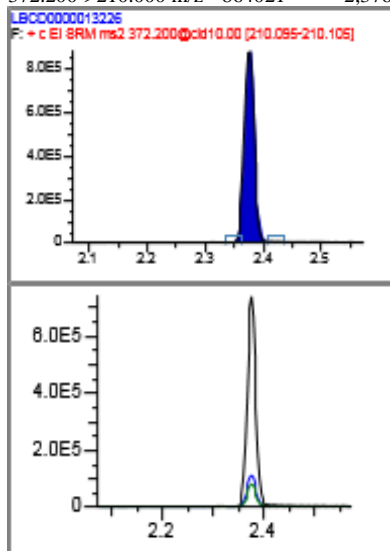
Rep 3

Quan: Area: RT  
372.200->210.000 m/z 1334835 2,376



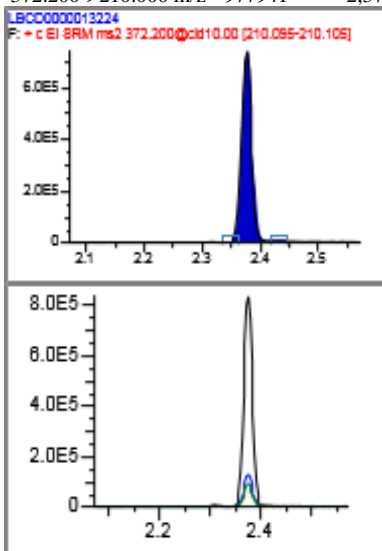
Rep 4

Quan: Area: RT  
372.200->210.000 m/z 864021 2,376



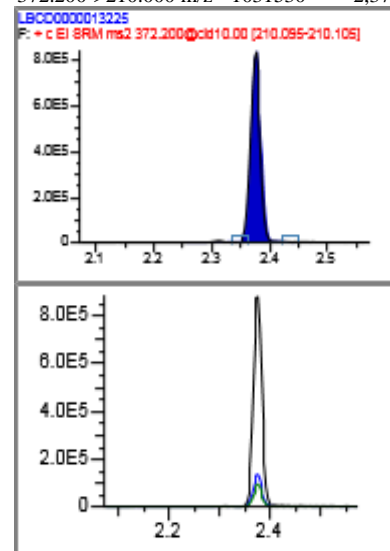
Rep 5

Quan: Area: RT  
372.200->210.000 m/z 977941 2,376



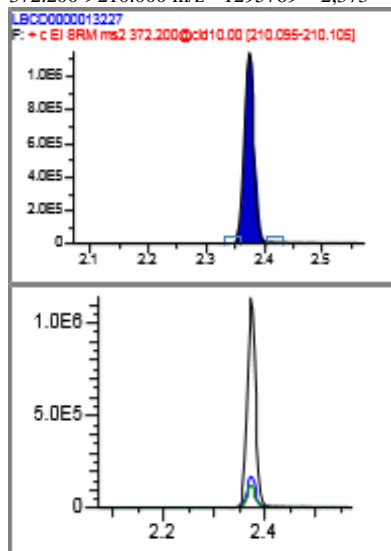
Rep 6

Quan: Area: RT  
372.200->210.000 m/z 1031530 2,377



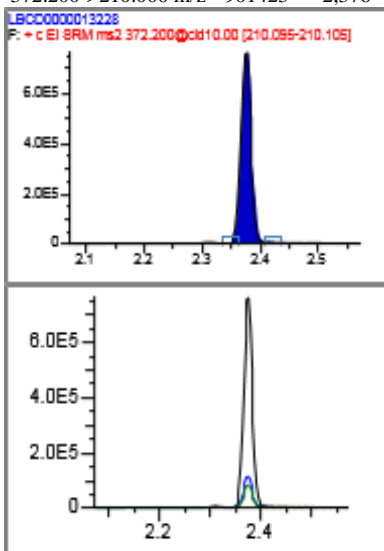
Rep 7

Quan: Area: RT  
372.200->210.000 m/z 1295769 2,373



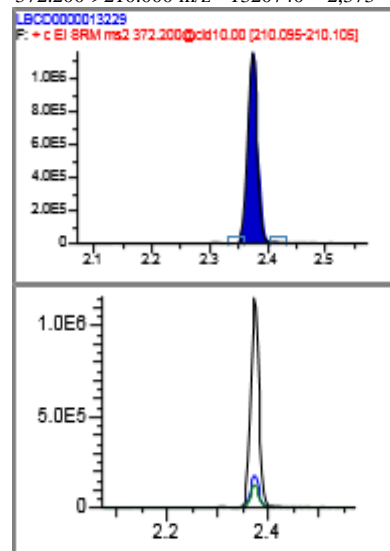
Rep 8

Quan: Area: RT  
372.200->210.000 m/z 901423 2,376



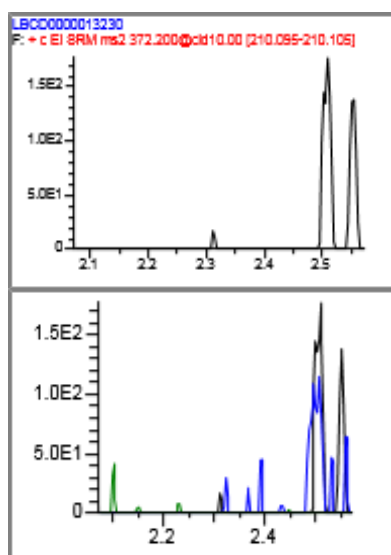
Rep 9

Quan: Area: RT  
372.200->210.000 m/z 1320740 2,373



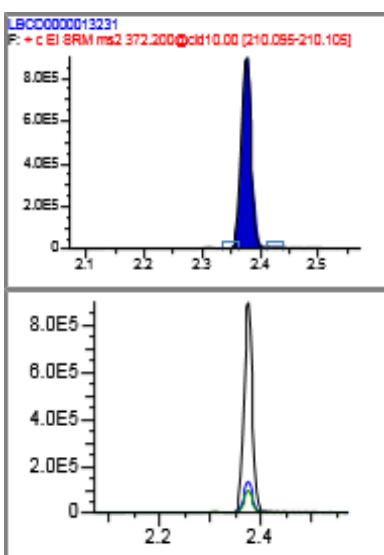
Rep 10

Quan: Area: RT  
372.200->210.000 m/z N/F 0,000



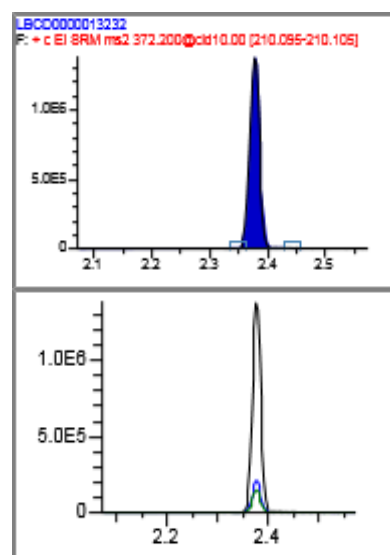
Arraste - BU

Quan: Area: RT  
372.200->210.000 m/z 1041422 2,377



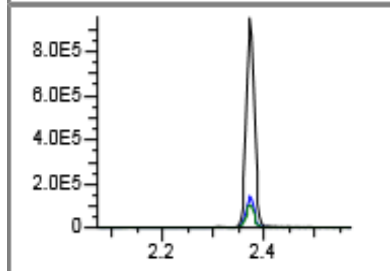
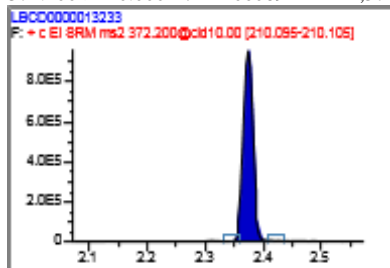
Arraste - fortificado

Quan: Area: RT  
372.200->210.000 m/z 1585083 2,377



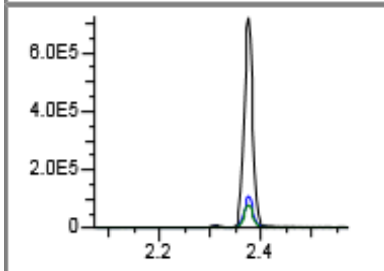
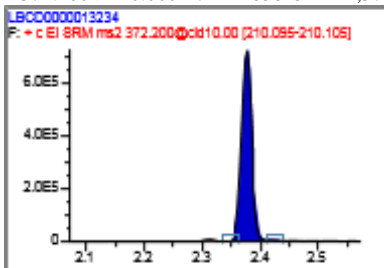
## Arraste - BU

Quan: 372.200->210.000 m/z Area: 1060891 RT 2,374



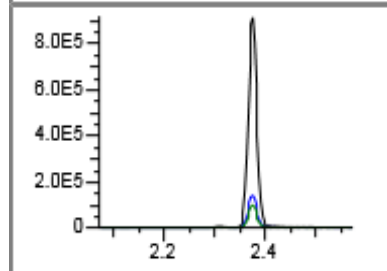
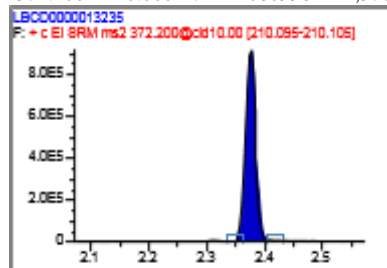
## Interferência de matriz 1

Quan: 372.200->210.000 m/z Area: 858254 RT 2,377



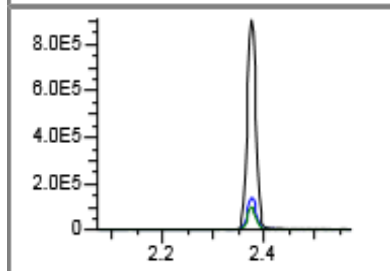
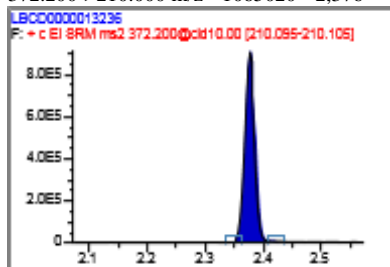
## Interferência de matriz 2

Quan: 372.200->210.000 m/z Area: 1080998 RT 2,376



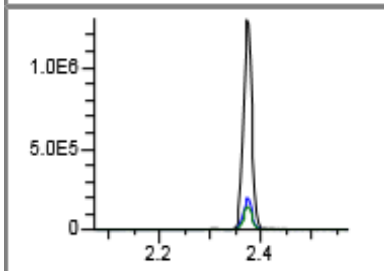
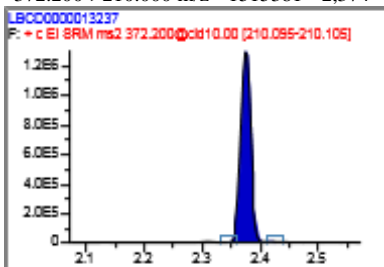
## Interferência de matriz 3

Quan: 372.200->210.000 m/z Area: 1065020 RT 2,376



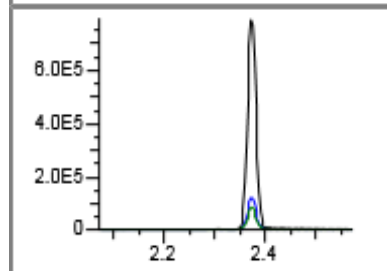
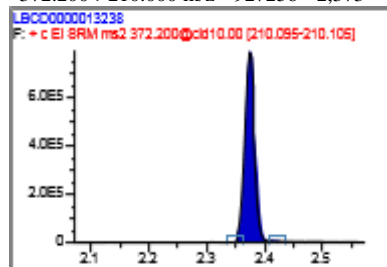
## Interferência de matriz 4

Quan: 372.200->210.000 m/z Area: 1515381 RT 2,374



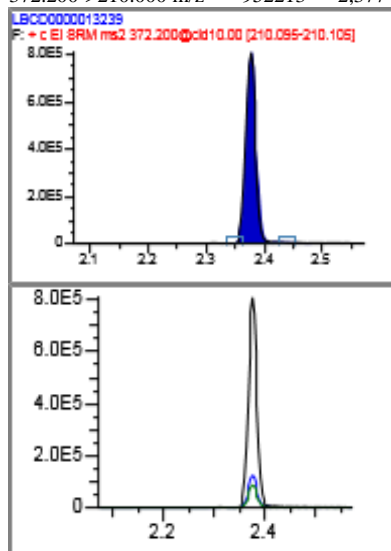
## Interferência de matriz 5

Quan: 372.200->210.000 m/z Area: 927256 RT 2,373

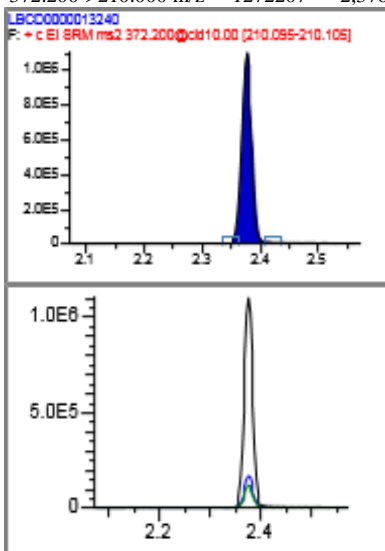


**Interferência de matriz 6**

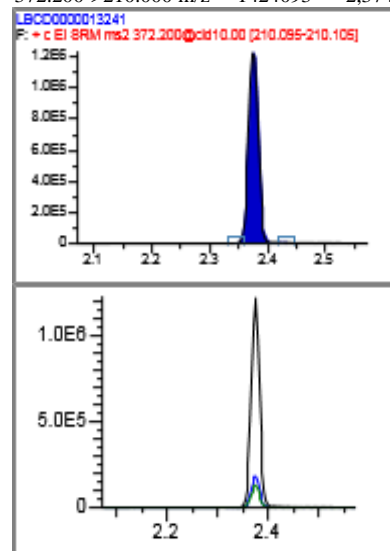
Quan: Area: RT  
372.200->210.000 m/z 952213 2,377

**Interferência de matriz 7**

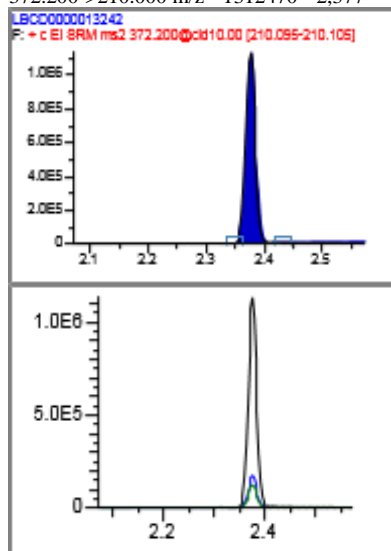
Quan: Area: RT  
372.200->210.000 m/z 1272207 2,376

**Interferência de matriz 8**

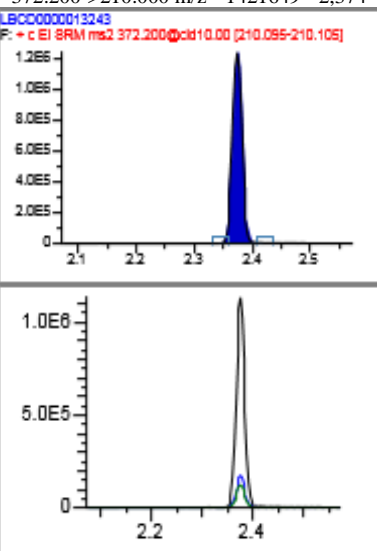
Quan: Area: RT  
372.200->210.000 m/z 1424093 2,374

**Interferência de matriz 9**

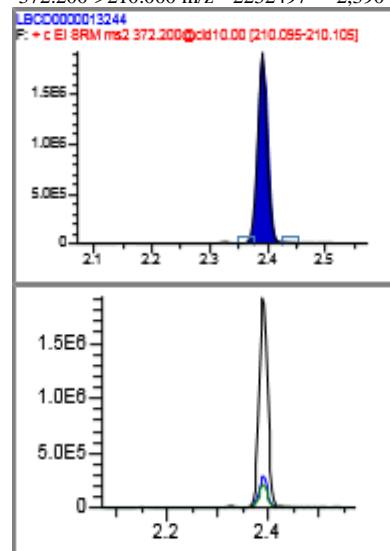
Quan: Area: RT  
372.200->210.000 m/z 1312470 2,377

**Interferência de matriz 10**

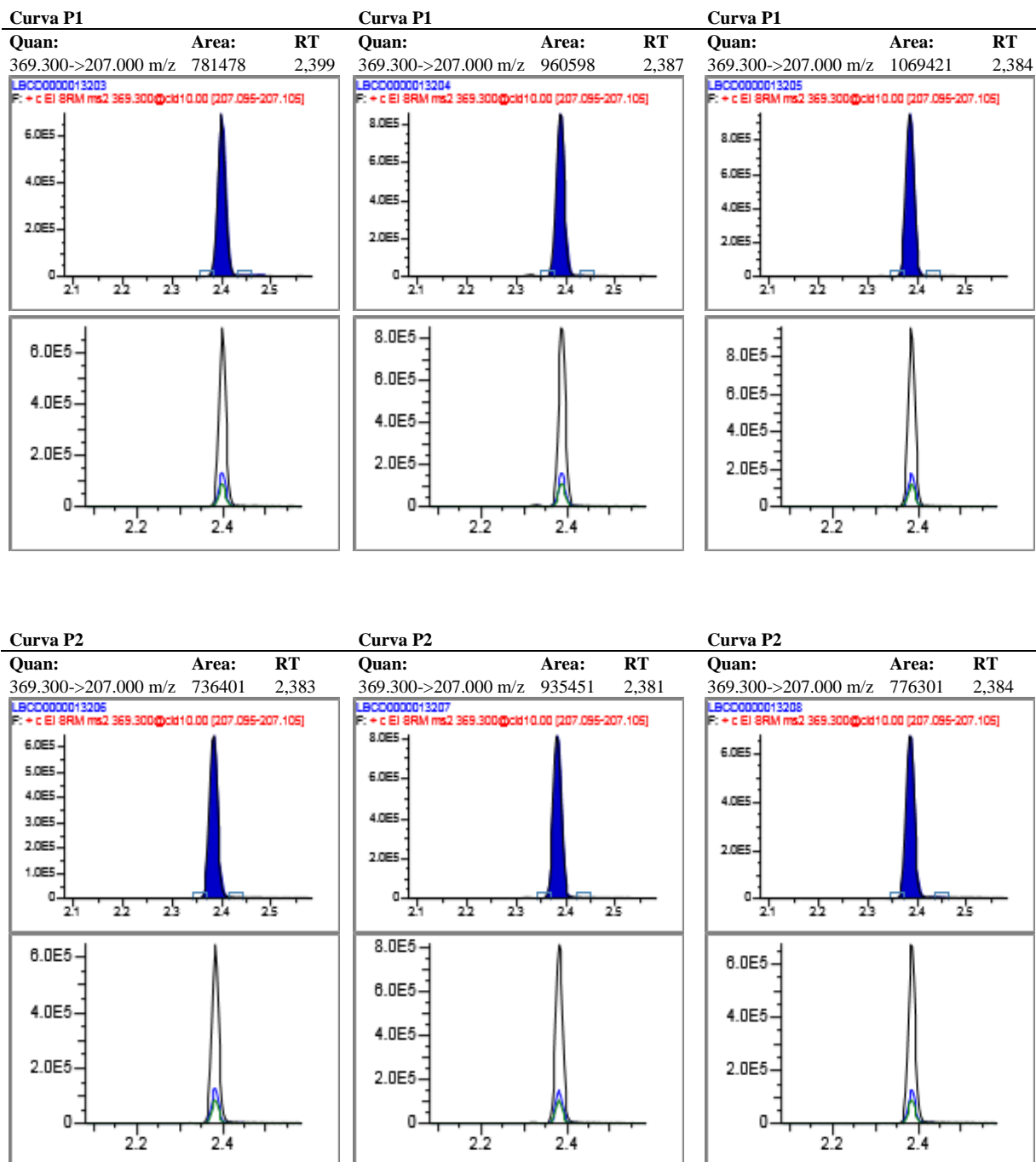
Quan: Area: RT  
372.200->210.000 m/z 1421649 2,374

**Rep 10 reinjeção**

Quan: Area: RT  
372.200->210.000 m/z 2232497 2,390

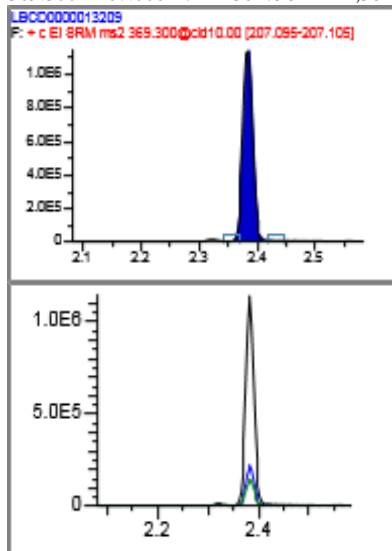


## Primeiro dia - Salbutamol



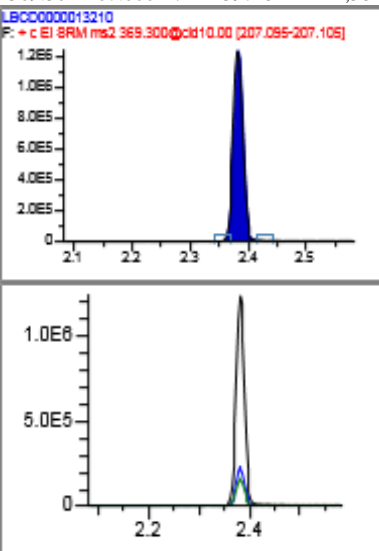
Curva P3

Quan: Area: RT  
369.300->207.000 m/z 1304798 2,384



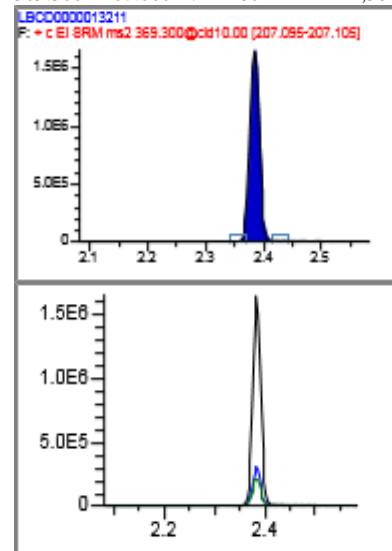
Curva P3

Quan: Area: RT  
369.30->207.000 m/z 1397451 2,381



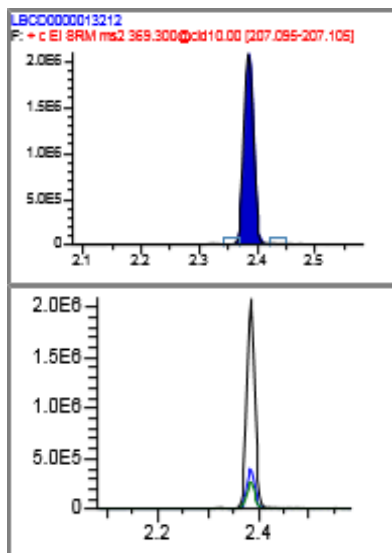
Curva P3

Quan: Area: RT  
369.300->207.000 m/z 1804122 2,384



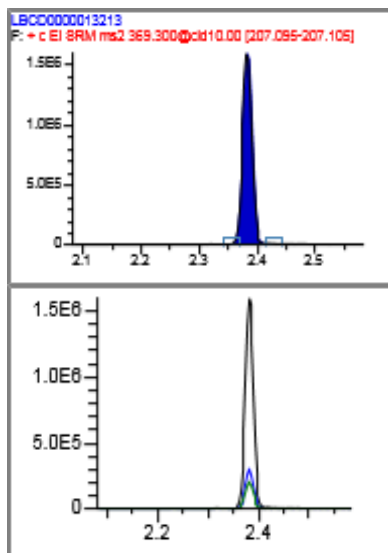
Curva P4

Quan: Area: RT  
369.30->207.000 m/z 2295197 2,384



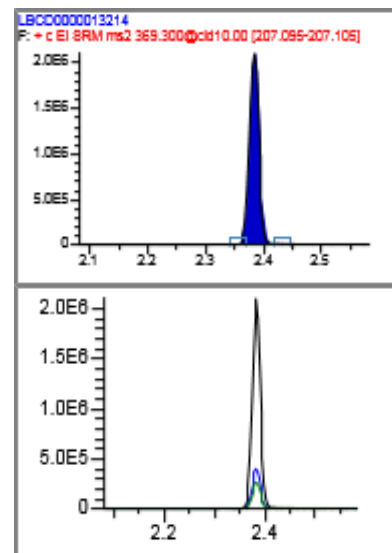
Curva P4

Quan: Area: RT  
369.300->207.000 m/z 1792517 2,381



Curva P4

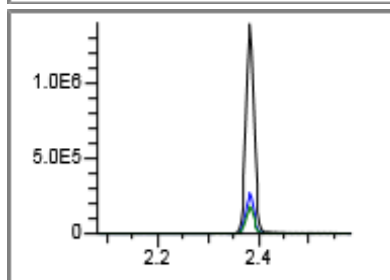
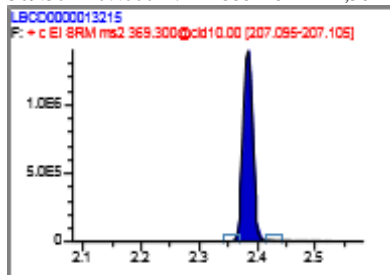
Quan: Area: RT  
369.300->207.000 m/z 2339775 2,383





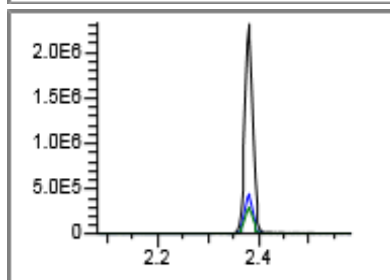
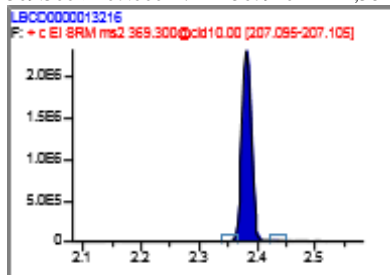
Curva P5

Quan: Area: RT  
369.30->207.000 m/z 1555125 2,384



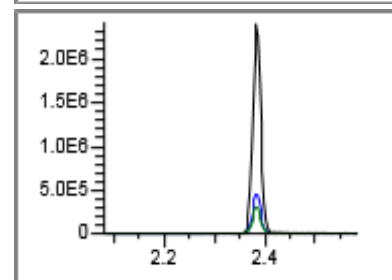
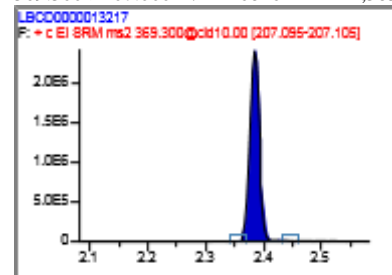
Curva P5

Quan: Area: RT  
369.300->207.000 m/z 2567910 2,381



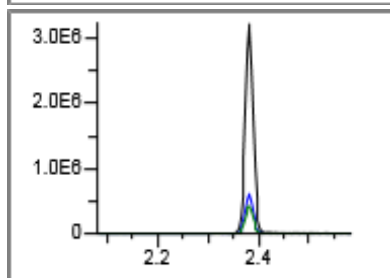
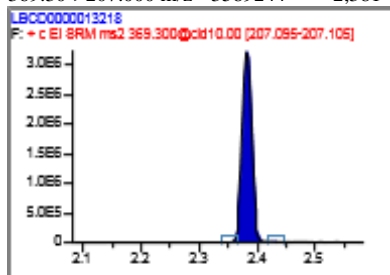
Curva P5

Quan: Area: RT  
369.300->207.000 m/z 2682622 2,383



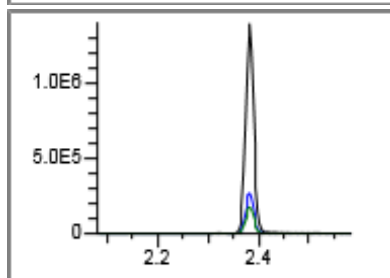
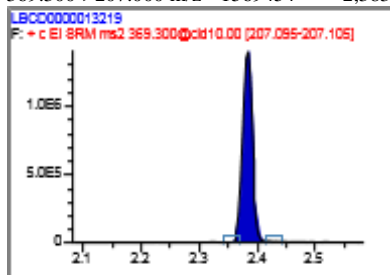
Curva P6

Quan: Area: RT  
369.30->207.000 m/z 3589244 2,381



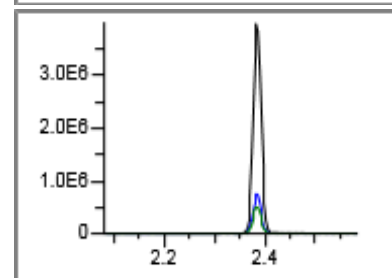
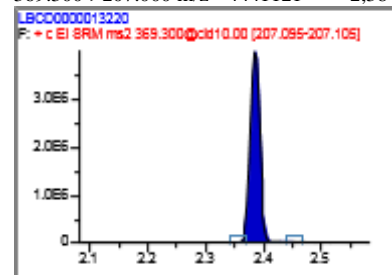
Curva P6

Quan: Area: RT  
369.300->207.000 m/z 1569454 2,383



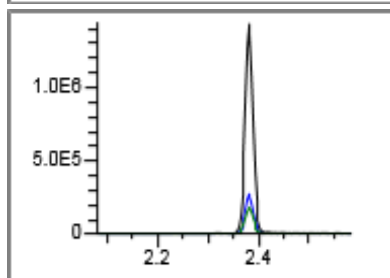
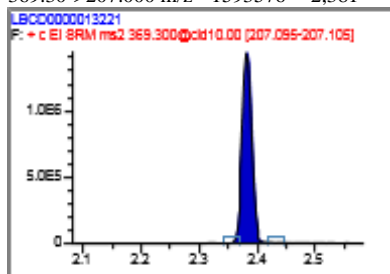
Curva P6

Quan: Area: RT  
369.300->207.000 m/z 4441121 2,384



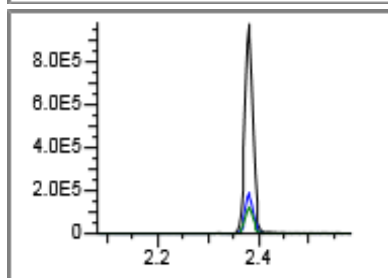
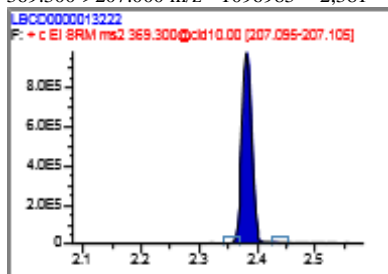
Rep 1

Quan: Area: RT  
369.30->207.000 m/z 1593576 2,381



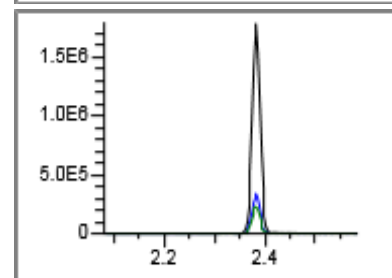
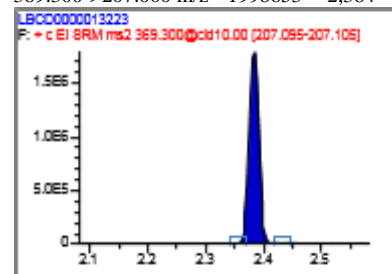
Rep 2

Quan: Area: RT  
369.300->207.000 m/z 1096983 2,381



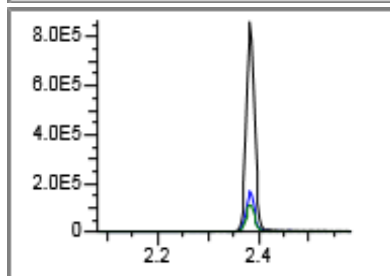
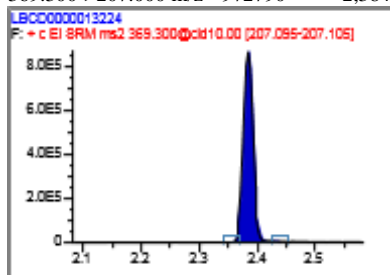
Rep 3

Quan: Area: RT  
369.300->207.000 m/z 1998653 2,384



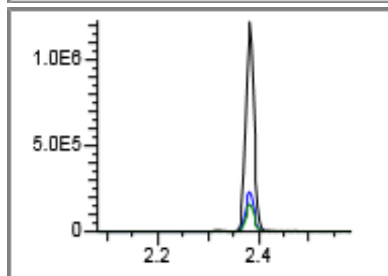
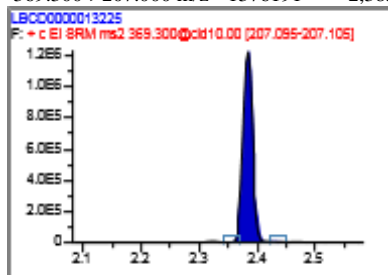
Rep 4

Quan: Area: RT  
369.300->207.000 m/z 972790 2,384



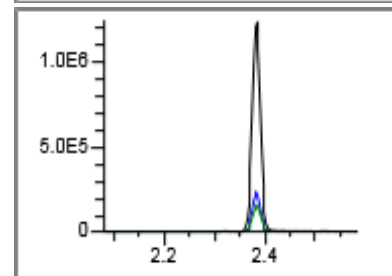
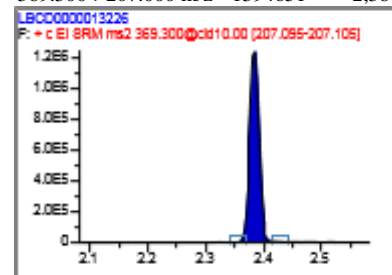
Rep 5

Quan: Area: RT  
369.300->207.000 m/z 1376191 2,383



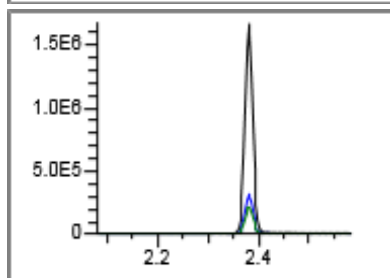
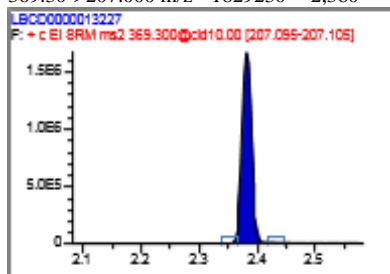
Rep 6

Quan: Area: RT  
369.300->207.000 m/z 1394651 2,384



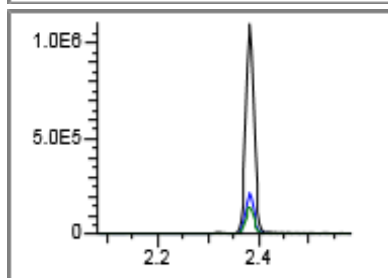
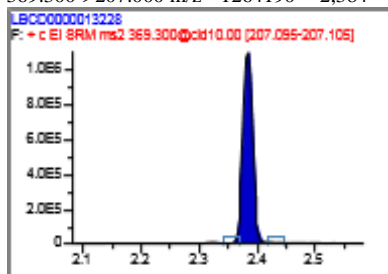
Rep 7

Quan: Area: RT  
369.30->207.000 m/z 1829230 2,380



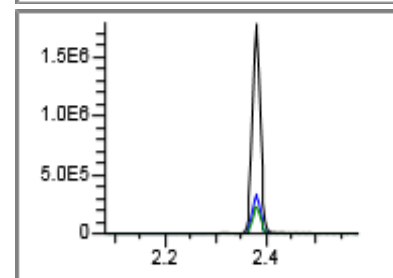
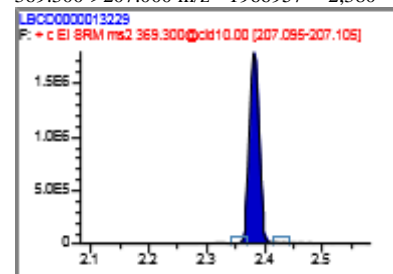
Rep 8

Quan: Area: RT  
369.300->207.000 m/z 1264190 2,384



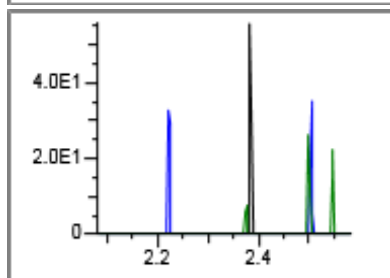
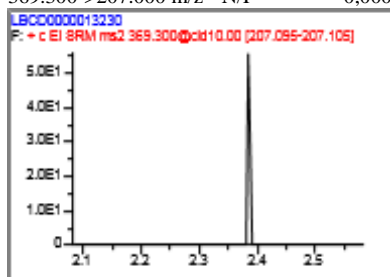
Rep 9

Quan: Area: RT  
369.300->207.000 m/z 1966957 2,380



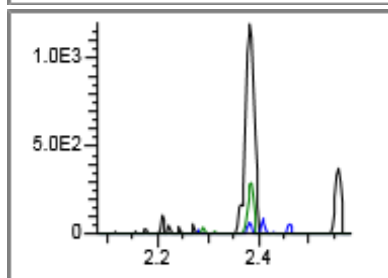
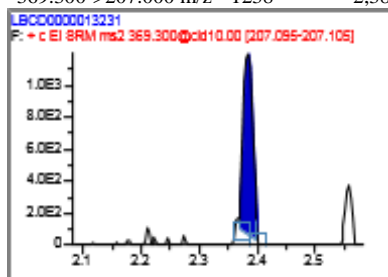
Rep 10

Quan: Area: RT  
369.300->207.000 m/z N/F 0,000



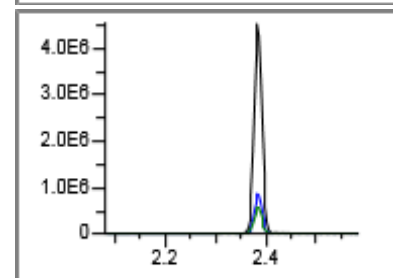
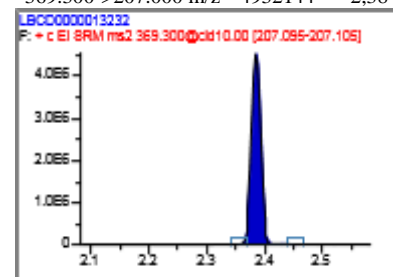
Arraste - BU

Quan: Area: RT  
369.300->207.000 m/z 1238 2,384



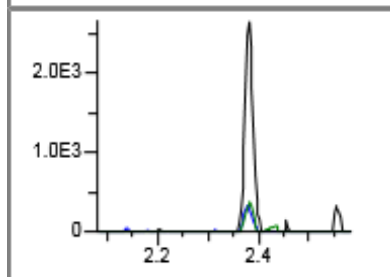
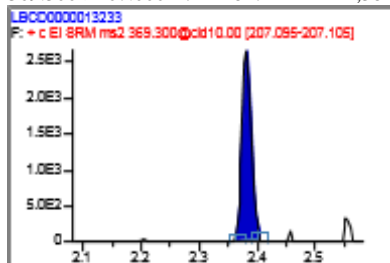
Arraste - fortificado

Quan: Area: RT  
369.300->207.000 m/z 4932144 2,384



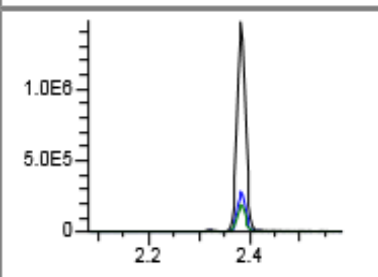
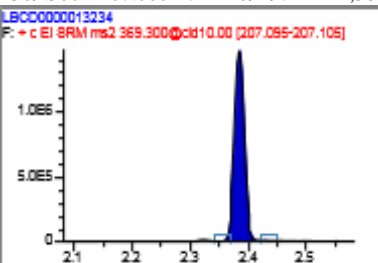
## Arraste - BU

Quan: Area: RT  
369.300->207.000 m/z 2847 2,381



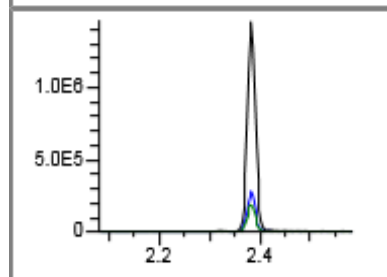
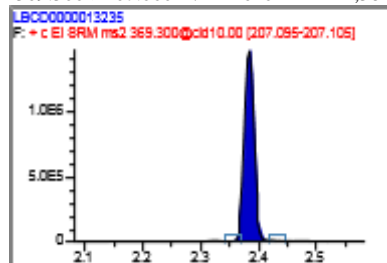
## Interferência de matriz 1

Quan: Area: RT  
369.300->207.000 m/z 1691971 2,384



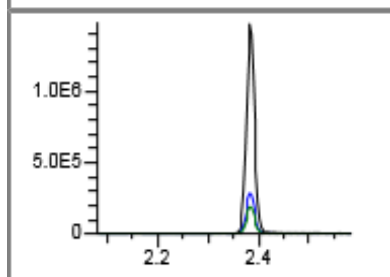
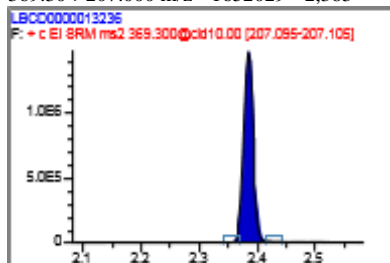
## Interferência de matriz 2

Quan: Area: RT  
369.300->207.000 m/z 1640221 2,384



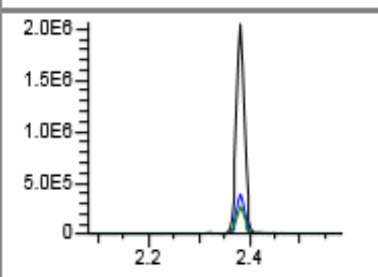
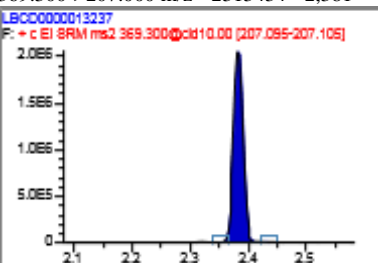
## Interferência de matriz 3

Quan: Area: RT  
369.30->207.000 m/z 1652029 2,383



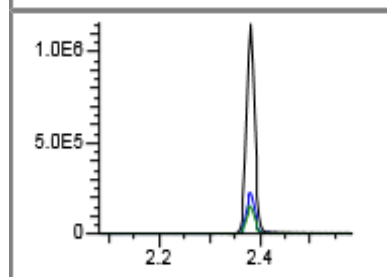
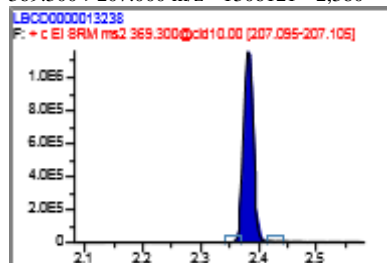
## Interferência de matriz 4

Quan: Area: RT  
369.300->207.000 m/z 2313434 2,381



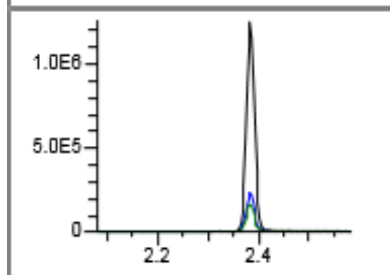
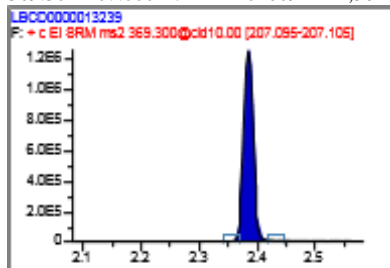
## Interferência de matriz 5

Quan: Area: RT  
369.300->207.000 m/z 1306121 2,380

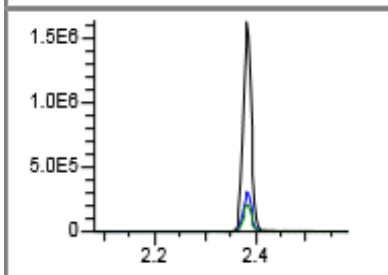
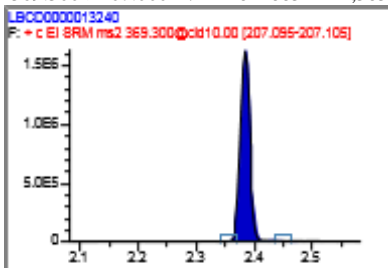


**Interferência de matriz 6**

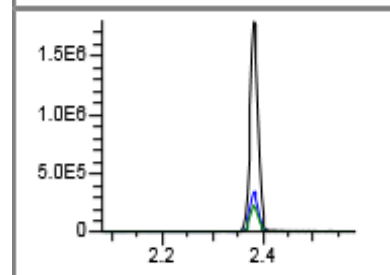
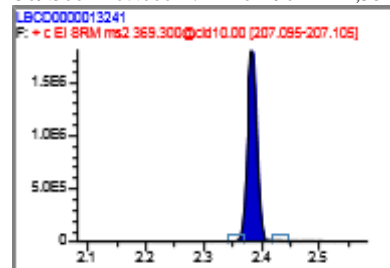
Quan: 369.30->207.000 m/z    Area: 1401669    RT 2,384

**Interferência de matriz 7**

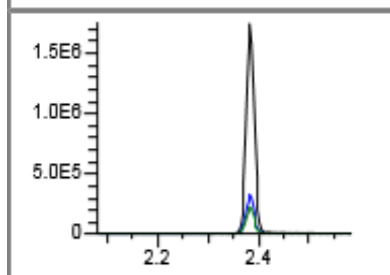
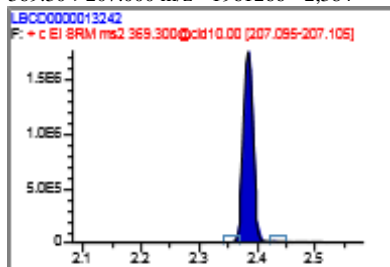
Quan: 369.300->207.000 m/z    Area: 1821883    RT 2,383

**Interferência de matriz 8**

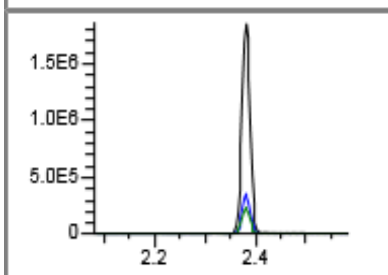
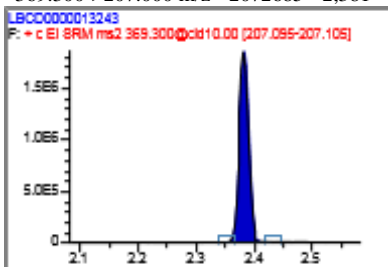
Quan: 369.300->207.000 m/z    Area: 2012902    RT 2,381

**Interferência de matriz 9**

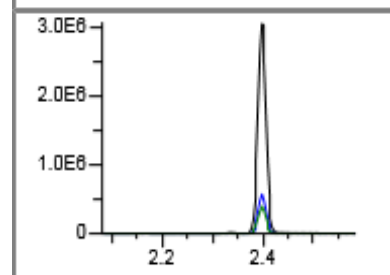
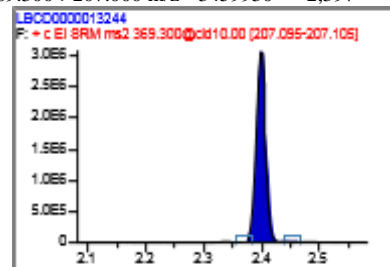
Quan: 369.30->207.000 m/z    Area: 1961266    RT 2,384

**Interferência de matriz 10**

Quan: 369.300->207.000 m/z    Area: 2072685    RT 2,381

**rep 10 reinj**

Quan: 369.300->207.000 m/z    Area: 3459930    RT 2,397



## 8.2 Resultados e cromatogramas referentes à validação – segundo dia.

LBCD - Laboratorio Brasileiro de Controle de Dopagem

Lab Name:

LBCD-4

Instrument:

15E1439

User:

triagem4

Batch:

20210719\_1\_Validacao\_Salbutamol dia 2

Master method:

Salbutamol

Cali File:

20210719\_1\_Validacao\_Salbutamol dia 2.calx

Salbutamol

Calibration A1/Slope:

0.00165

Calibration A0/Y-Intercept/Mean RF:

-0.15028

Calibration R Squared/RSD (%):

0.992

Y = 1.651e-3X - 1.503e-1; R^2: 0.9915; Origin: Ignore; Wt: Equal; Area

Area Ratio

ng/mL

FileName	Sample Name	RT	Peak Area	ISTD Area	Area Ratio	Theo Amount	QC Amount	Calc Amount	Amount Diff	MEAN	S dev	%RSD
LBCD0000013245	Curva pt 1	2.4	761386	1064857	0.715	500		524.04	4.8			
LBCD0000013246	Curva pt 2	2.38	1543855	1436269	1.075	750		741.99	-1.1			
LBCD0000013247	Curva pt 3	2.38	1176177	745133	1.578	1000		1046.97	4.7			
LBCD0000013248	Curva pt 4	2.38	2094178	1160895	1.804	1250		1183.51	-5.3			
LBCD0000013249	Curva pt 5	2.38	3067487	1363269	2.25	1500		1453.71	-3.1			
LBCD0000013250	Curva pt 6	2.38	3792469	1172565	3.234	2000		2049.78	2.5			
LBCD0000013251	Robustez 1	2.38	1793899	961734	1.865	N/A	1000.00	1220.66	22.1	1121.083	101.155	9.023
LBCD0000013252	Robustez 2	2.38	1496486	877207	1.706	N/A	1000.00	1124.18	12.4	1121.083	101.155	9.023
LBCD0000013253	Robustez 3	2.38	1609499	1051042	1.531	N/A	1000.00	1018.42	1.8	1121.083	101.155	9.023
LBCD0000013254	Robustez 4	2.38	2364953	1500910	1.576	N/A	1000.00	1045.27	4.5	1011.439	49.188	4.863
LBCD0000013255	Robustez 5	2.38	2055295	1319931	1.557	N/A	1000.00	1034.03	3.4	1011.439	49.188	4.863
LBCD0000013256	Robustez 6	2.38	372478	261086	1.427	N/A	1000.00	955.01	-4.5	1011.439	49.188	4.863
LBCD0000013257	Seletividade (sem PI e analito) 1	N/F	0	N/F	N/F	N/A		N/F	N/A			
LBCD0000013258	Seletividade (sem PI e analito) 2	N/F	0	N/F	N/F	N/A		N/F	N/A			
LBCD0000013259	Seletividade (sem PI e analito) 3	N/F	0	N/F	N/F	N/A		N/F	N/A			
LBCD0000013260	Seletividade (sem PI e analito) 4	N/F	0	N/F	N/F	N/A		N/F	N/A			
LBCD0000013261	Seletividade (sem PI e analito) 5	N/F	0	N/F	N/F	N/A		N/F	N/A			
LBCD0000013262	Seletividade (sem PI e analito) 6	N/F	0	N/F	N/F	N/A		N/F	N/A			
LBCD0000013263	Seletividade (sem PI e analito) 7	N/F	0	N/F	N/F	N/A		N/F	N/A			
LBCD0000013264	Seletividade (sem PI e analito) 8	N/F	0	N/F	N/F	N/A		N/F	N/A			
LBCD0000013265	Seletividade (sem PI e analito) 9	N/F	0	N/F	N/F	N/A		N/F	N/A			
LBCD0000013266	Seletividade (sem PI e analito) 10	N/F	0	N/F	N/F	N/A		N/F	N/A			
LBCD0000013267	PI + analito (?)	2.38	1751952	1056463	1.658	N/A		1095.32	N/A			
LBCD0000013268	Prec. Intermediaria1	2.38	1504131	949882	1.583	N/A	1000.00	1050.00	5.0	999.625	63.136	6.316
LBCD0000013269	Prec. Intermediaria2	2.38	2118521	1480537	1.431	N/A	1000.00	957.60	-4.2	999.625	63.136	6.316
LBCD0000013270	Prec. Intermediaria3	2.38	1508991	913157	1.652	N/A	1000.00	1091.80	9.2	999.625	63.136	6.316

Flag Legend: LOD<J<LOQ;!=Ion Ratio Failure; C=Carryover; ?=Upper Limit Of Linearity; D=Limit Of Detection; Q=Limit Of Quantitation; POS=Limit Of Reporting; n=Negative; s=Solvent flag; est=Estimated; Bordered cell = Manually integrated.

<b>LBCD - Laboratorio Brasileiro de Controle de Dopagem</b>
---

**Lab Name:** LBCD-4

**Instrument:** 15E1439

**User:** triagem4

**Batch:** 20210719\_1 Validacao Salbutamol dia 2

**Master method:** Salbutamol

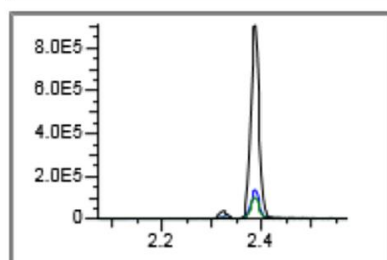
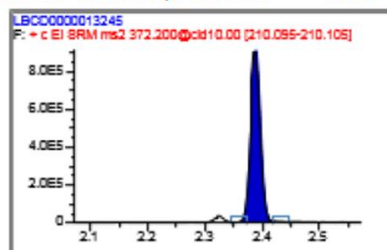
**Cali File:** 20210719\_1 Validacao Salbutamol dia 2 calx

LBCD0000013271	Prec. Intermediaria4	2.38	1080227	722247	1.496	N/A	1000.00	996.80	-0.3	999.625	63.136	6.316
LBCD0000013272	Prec. Intermediaria5	2.38	1304665	904795	1.442	N/A	1000.00	964.28	-3.6	999.625	63.136	6.316
LBCD0000013273	Prec. Intermediaria6	2.38	1423794	1011330	1.408	N/A	1000.00	943.63	-5.6	999.625	63.136	6.316
LBCD0000013274	Prec. Intermediaria7	2.38	2144638	1378126	1.556	N/A	1000.00	1033.47	3.4	999.625	63.136	6.316
LBCD0000013275	Prec. Intermediaria8	2.38	1638836	1056088	1.552	N/A	1000.00	1030.81	3.1	999.625	63.136	6.316
LBCD0000013276	Prec. Intermediaria9	2.38	1347535	1034070	1.303	N/A	1000.00	880.22	-12.0	999.625	63.136	6.316
LBCD0000013277	Prec. Intermediaria10	2.38	2122852	1343913	1.58	N/A	1000.00	1047.65	4.8	999.625	63.136	6.316

## Segundo dia - Salbutamol-d3

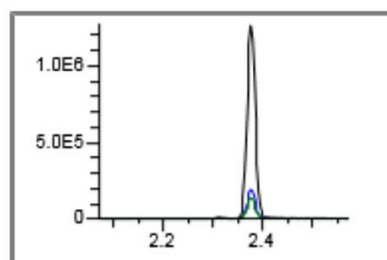
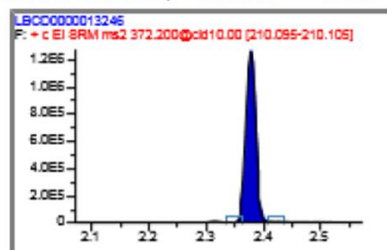
Curva pt 1

Quan: Area: RT  
372.200->210.000 m/z 1064857 2.389



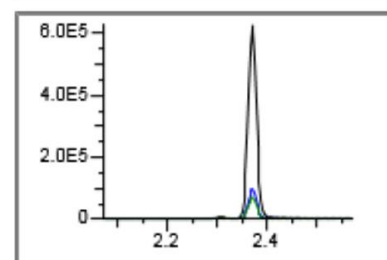
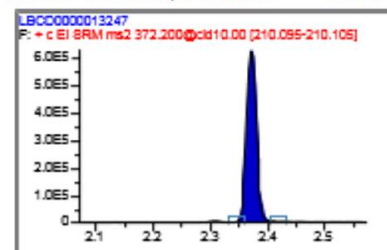
Curva pt 2

Quan: Area: RT  
372.200->210.000 m/z 1436269 2.377



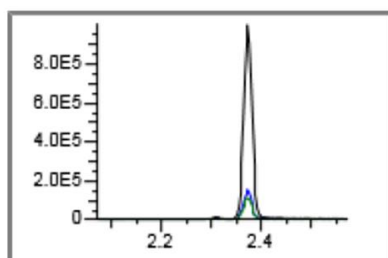
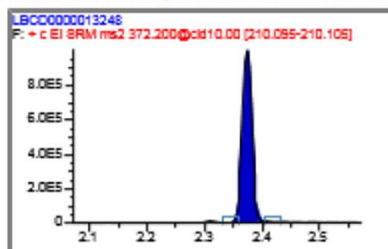
Curva pt 3

Quan: Area: RT  
372.200->210.000 m/z 745133 2.370



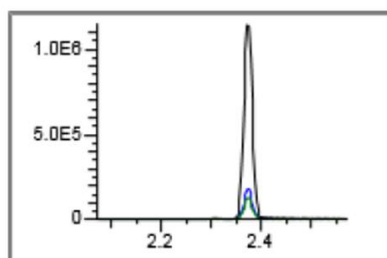
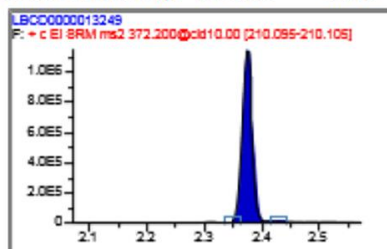
Curva pt 4

Quan: Area: RT  
372.200->210.000 m/z 1160895 2.374



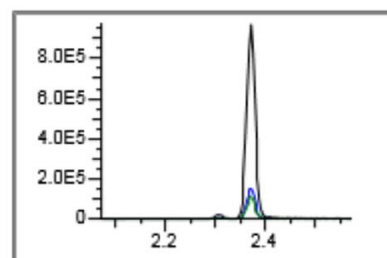
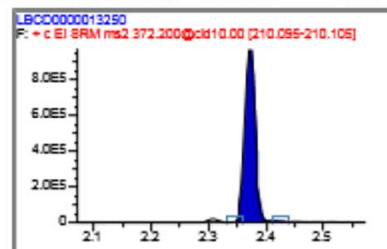
Curva pt 5

Quan: Area: RT  
372.200->210.000 m/z 1363269 2.373



Curva pt 6

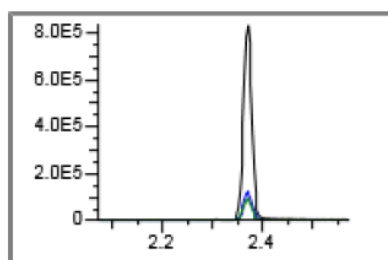
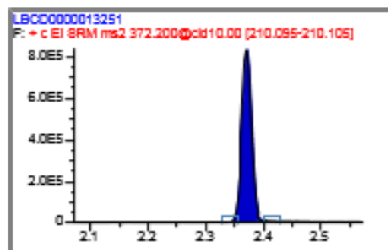
Quan: Area: RT  
372.200->210.000 m/z 1172565 2.373





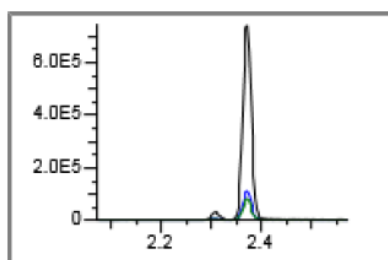
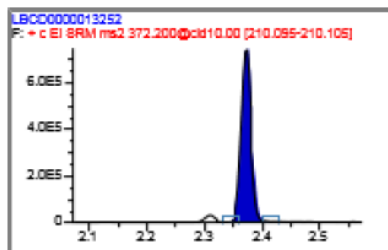
## Robustez 1

Quan: Area: RT  
372.200->210.000 m/z 961734 2.371



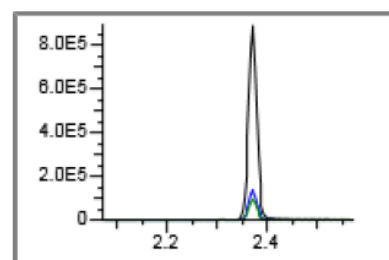
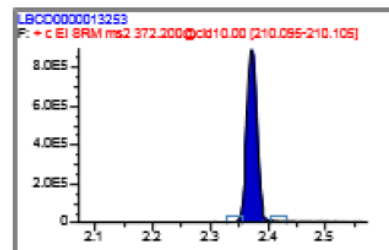
## Robustez 2

Quan: Area: RT  
372.200->210.000 m/z 877207 2.373



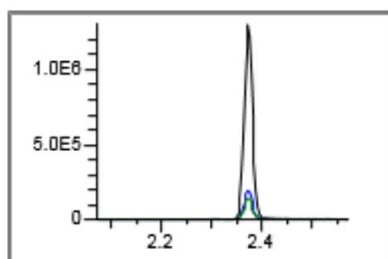
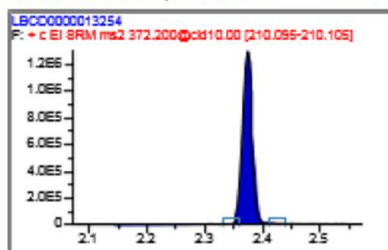
## Robustez 3

Quan: Area: RT  
372.200->210.000 m/z 1051042 2.371



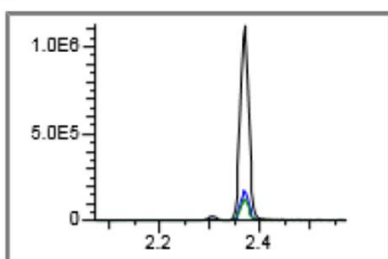
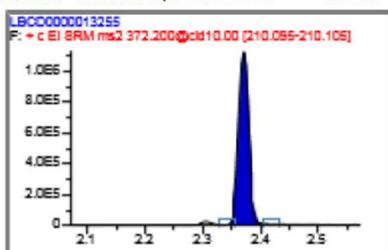
## Robustez 4

Quan: Area: RT  
372.200->210.000 m/z 1500910 2.373



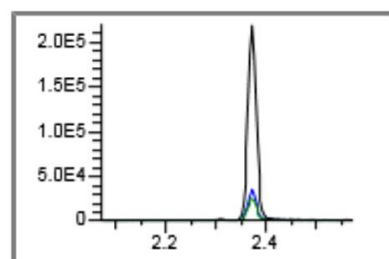
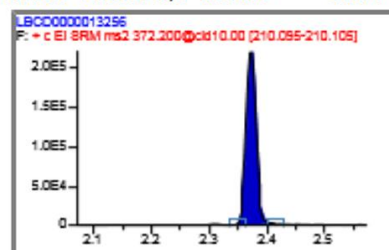
## Robustez 5

Quan: Area: RT  
372.200->210.000 m/z 1319931 2.370



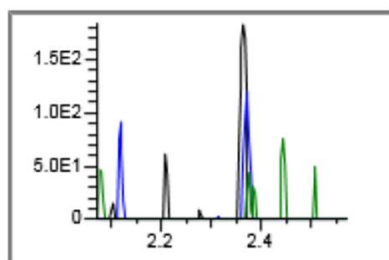
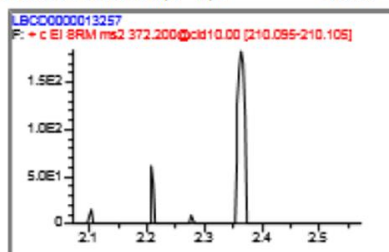
## Robustez 6

Quan: Area: RT  
372.200->210.000 m/z 261086 2.374

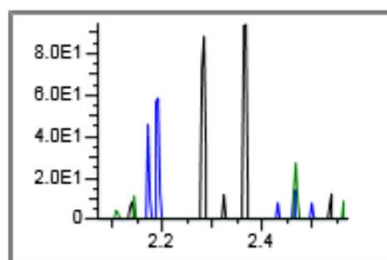
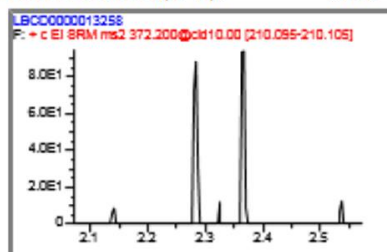


**Seletividade (sem PI e analito) 1**

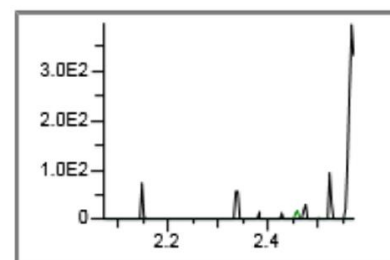
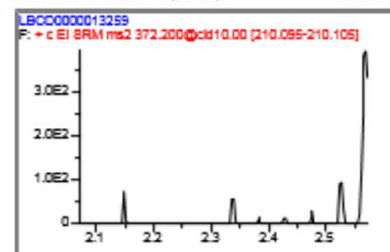
Quan: Area: RT  
372.200->210.000 m/z N/F 0.000

**Seletividade (sem PI e analito) 2**

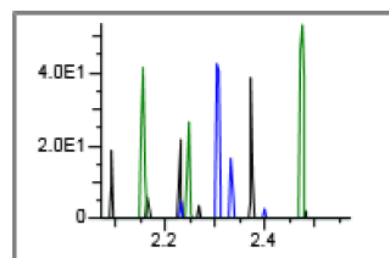
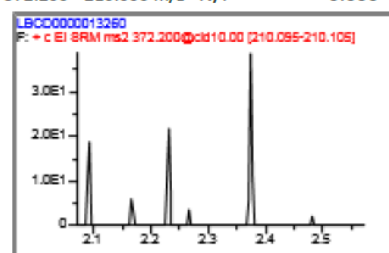
Quan: Area: RT  
372.200->210.000 m/z N/F 0.000

**Seletividade (sem PI e analito) 3**

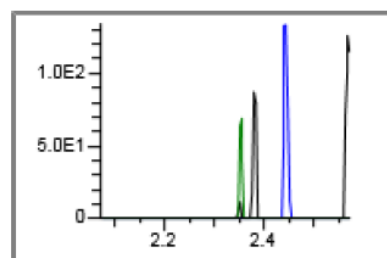
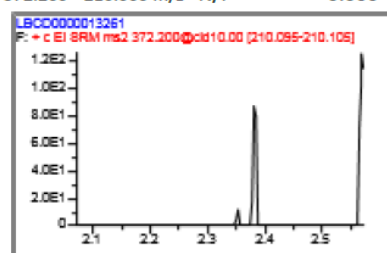
Quan: Area: RT  
372.200->210.000 m/z N/F 0.000

**Seletividade (sem PI e analito) 4**

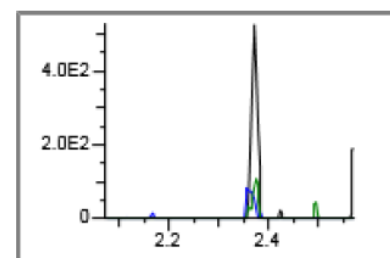
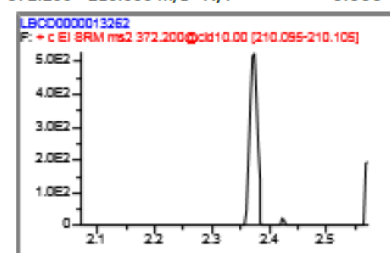
Quan: Area: RT  
372.200->210.000 m/z N/F 0.000

**Seletividade (sem PI e analito) 5**

Quan: Area: RT  
372.200->210.000 m/z N/F 0.000

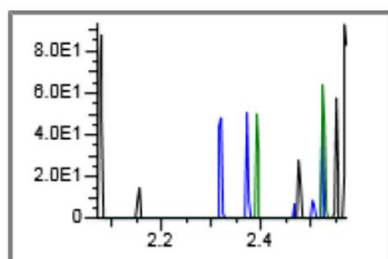
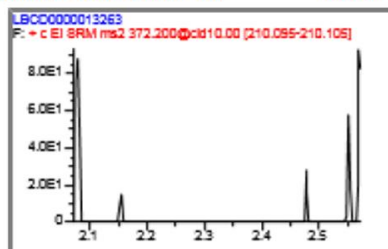
**Seletividade (sem PI e analito) 6**

Quan: Area: RT  
372.200->210.000 m/z N/F 0.000



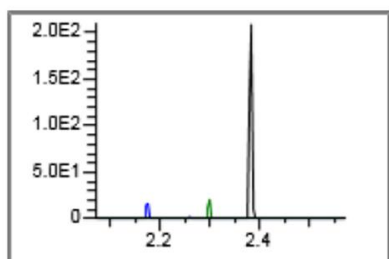
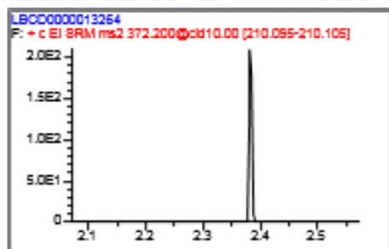
## Seletividade (sem PI e analito) 7

Quan: Area: RT  
372.200->210.000 m/z N/F 0.000



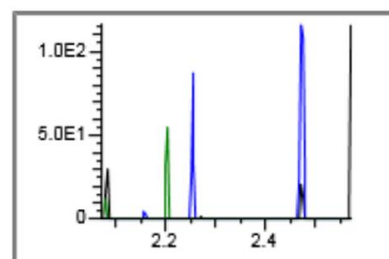
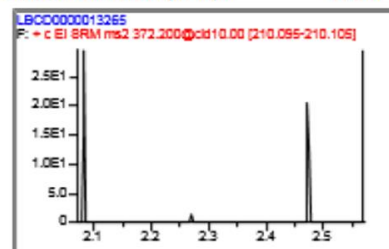
## Seletividade (sem PI e analito) 8

Quan: Area: RT  
372.200->210.000 m/z N/F 0.000



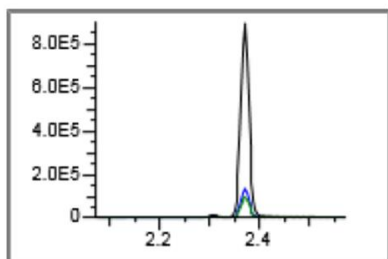
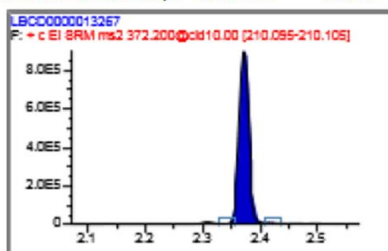
## Seletividade (sem PI e analito) 9

Quan: Area: RT  
372.200->210.000 m/z N/F 0.000



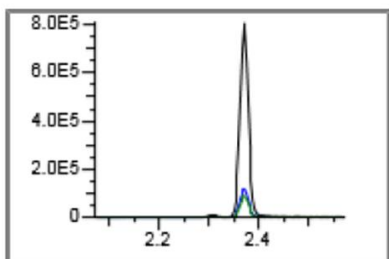
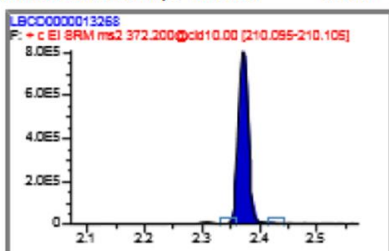
## PI + analito

Quan: Area: RT  
372.200->210.000 m/z 1056463 2.370



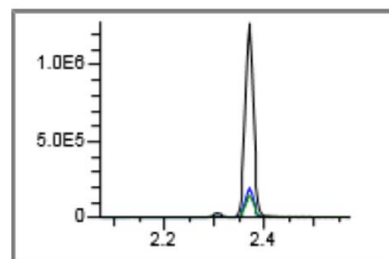
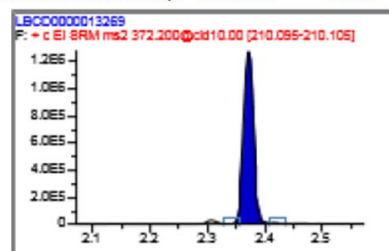
## Prec. Intermediaria1

Quan: Area: RT  
372.200->210.000 m/z 949882 2.370



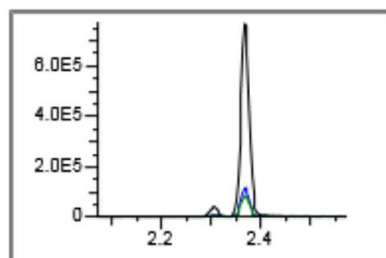
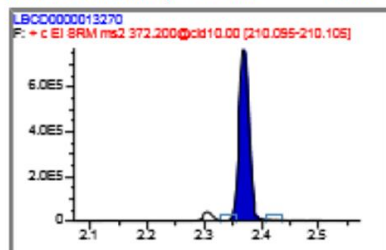
## Prec. Intermediaria2

Quan: Area: RT  
372.200->210.000 m/z 1480537 2.370

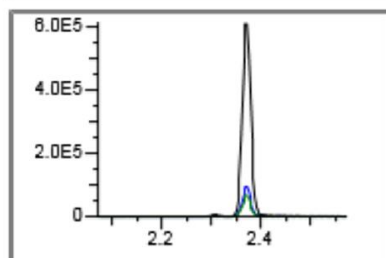
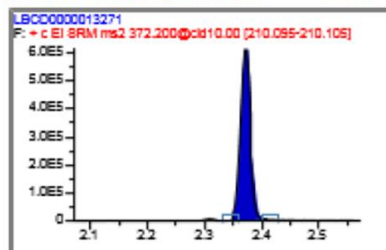


**Prec. Intermediaria3**

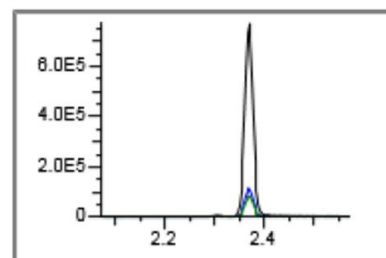
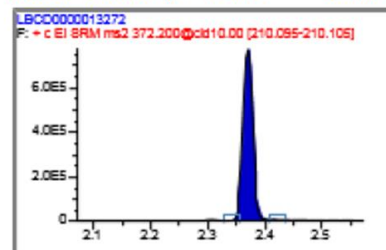
Quan: Area: RT  
372.200->210.000 m/z 913157 2.368

**Prec. Intermediaria4**

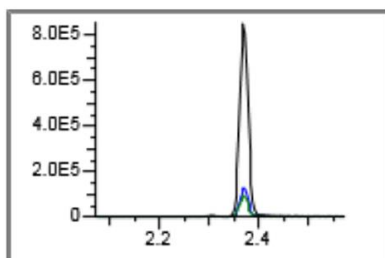
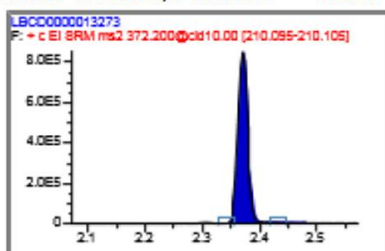
Quan: Area: RT  
372.200->210.000 m/z 722247 2.370

**Prec. Intermediaria5**

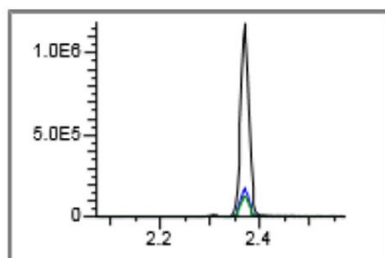
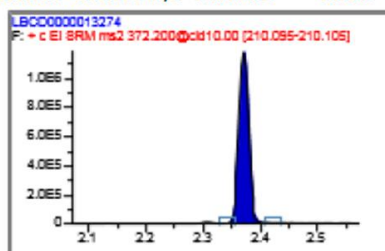
Quan: Area: RT  
372.200->210.000 m/z 904795 2.370

**Prec. Intermediaria6**

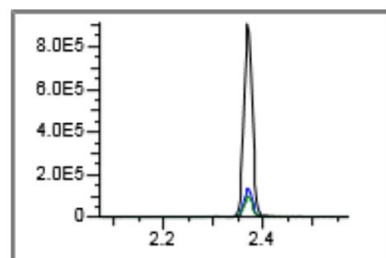
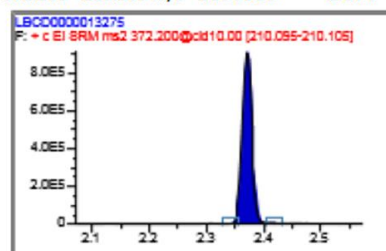
Quan: Area: RT  
372.200->210.000 m/z 1011330 2.370

**Prec. Intermediaria7**

Quan: Area: RT  
372.200->210.000 m/z 1378126 2.371

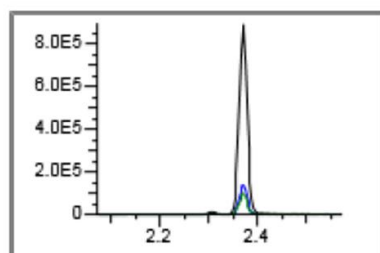
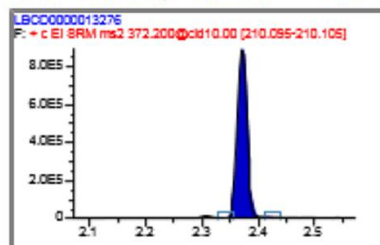
**Prec. Intermediaria8**

Quan: Area: RT  
372.200->210.000 m/z 1056088 2.370



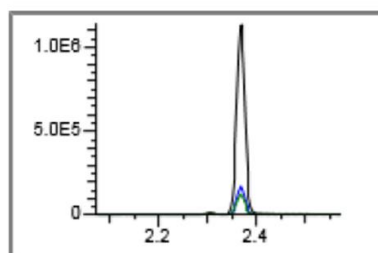
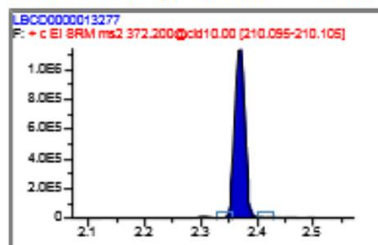
## Prec. Intermediaria9

Quan: Area: RT  
372.200->210.000 m/z 1034070 2.370



## Prec. Intermediaria10

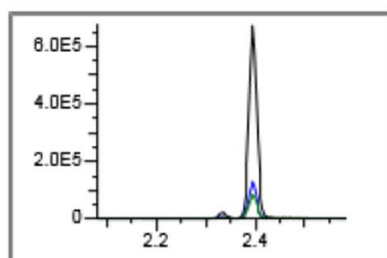
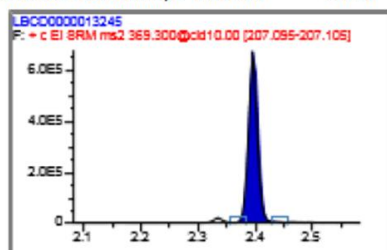
Quan: Area: RT  
372.200->210.000 m/z 1343913 2.370



## Segundo dia - Salbutamol

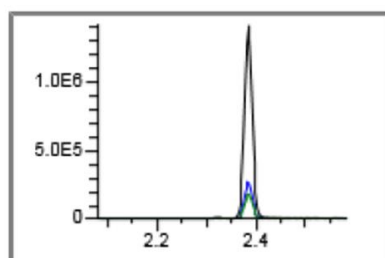
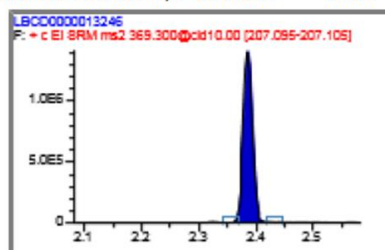
Curva pt 1

Quan: Area: RT  
369.300->207.000 m/z 761386 2.396



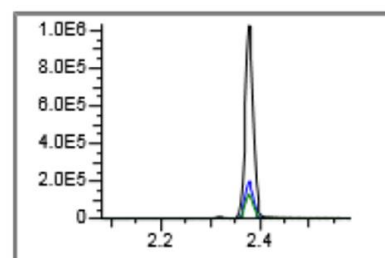
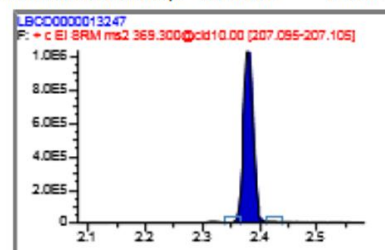
Curva pt 2

Quan: Area: RT  
369.300->207.000 m/z 1543855 2.384



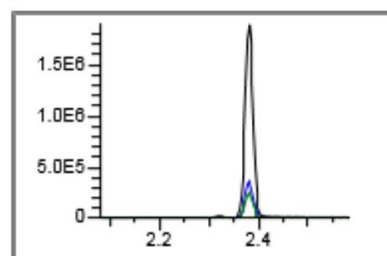
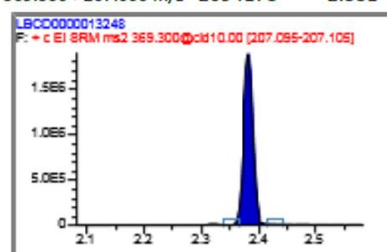
Curva pt 3

Quan: Area: RT  
369.300->207.000 m/z 1176177 2.378



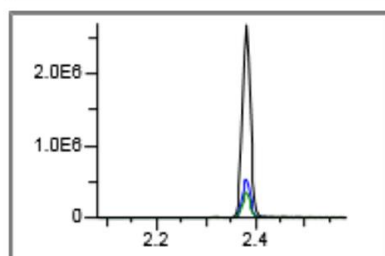
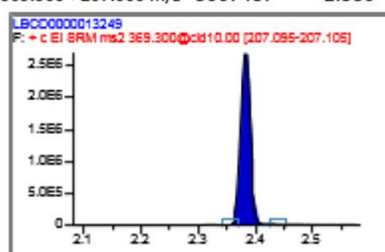
Curva pt 4

Quan: Area: RT  
369.300->207.000 m/z 2094178 2.381



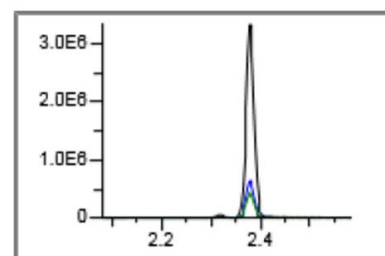
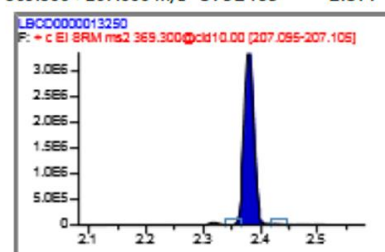
Curva pt 5

Quan: Area: RT  
369.300->207.000 m/z 3067487 2.380



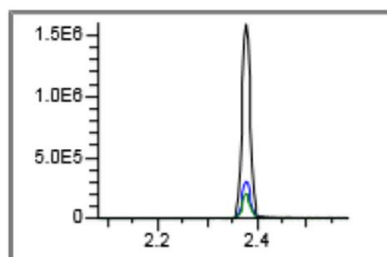
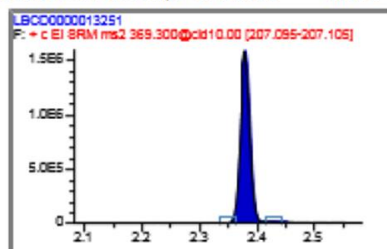
Curva pt 6

Quan: Area: RT  
369.300->207.000 m/z 3792469 2.377



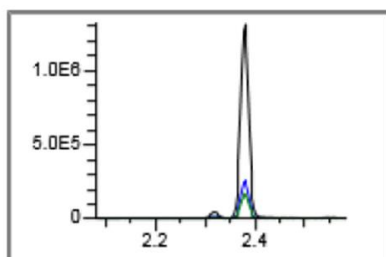
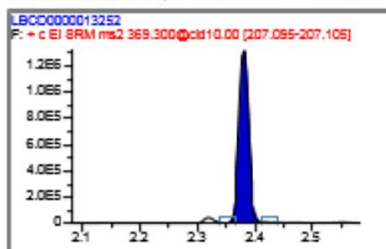
## Robustez 1

Quan: Area: RT  
369.300->207.000 m/z 1793899 2.378



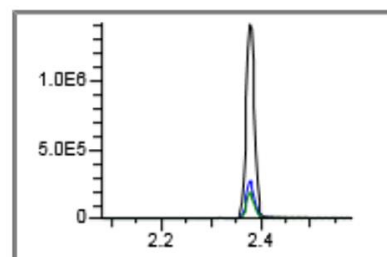
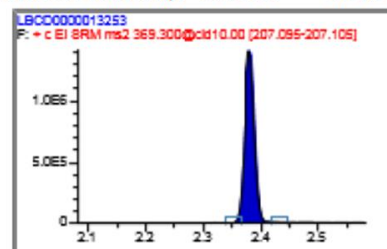
## Robustez 2

Quan: Area: RT  
369.300->207.000 m/z 1496486 2.380



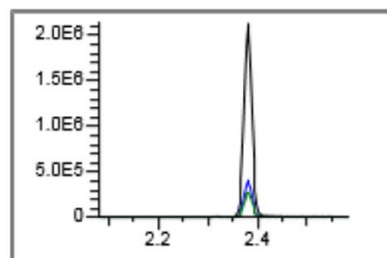
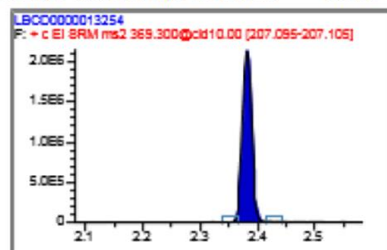
## Robustez 3

Quan: Area: RT  
369.300->207.000 m/z 1609499 2.378



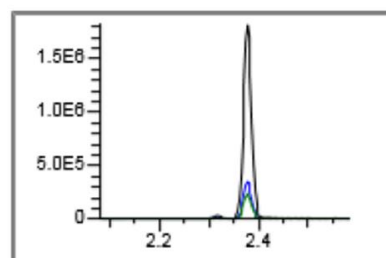
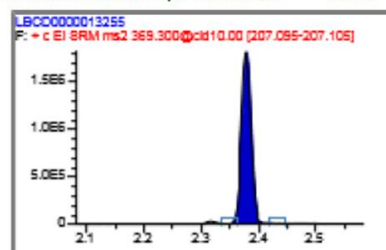
## Robustez 4

Quan: Area: RT  
369.300->207.000 m/z 2364953 2.380



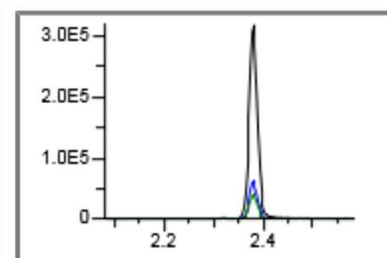
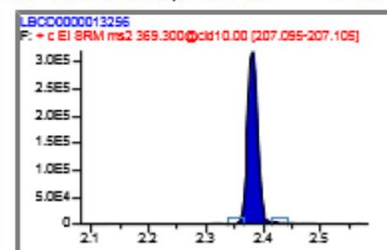
## Robustez 5

Quan: Area: RT  
369.300->207.000 m/z 2055295 2.377



## Robustez 6

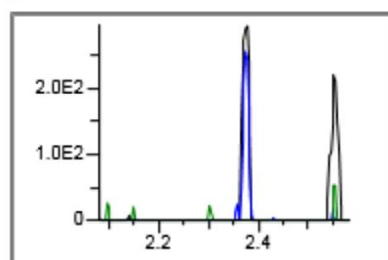
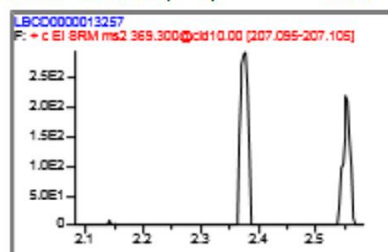
Quan: Area: RT  
369.300->207.000 m/z 372478 2.381



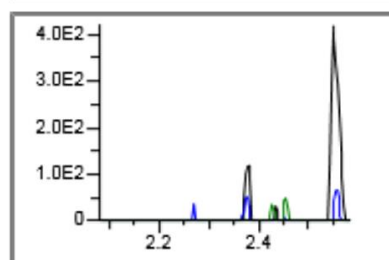
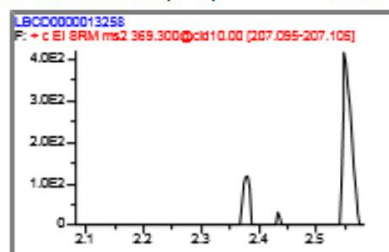


**Seletividade (sem PI e analito) 1**

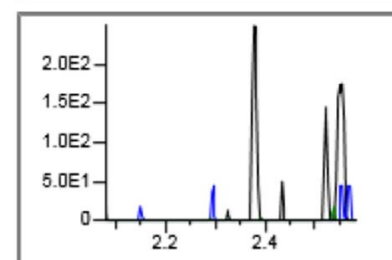
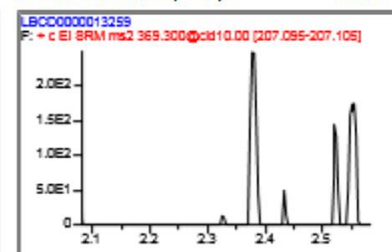
Quan: Area: RT  
369.300->207.000 m/z N/F 0.000

**Seletividade (sem PI e analito) 2**

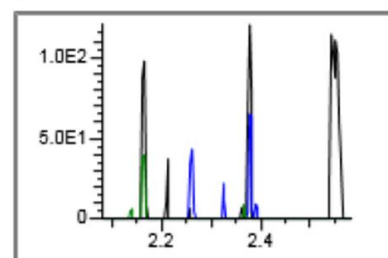
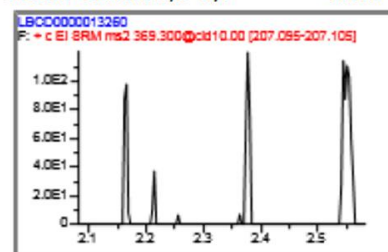
Quan: Area: RT  
369.300->207.000 m/z N/F 0.000

**Seletividade (sem PI e analito) 3**

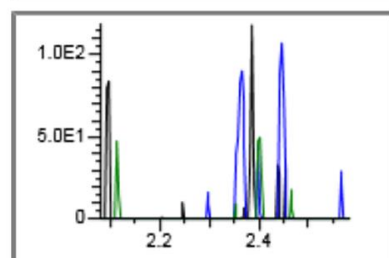
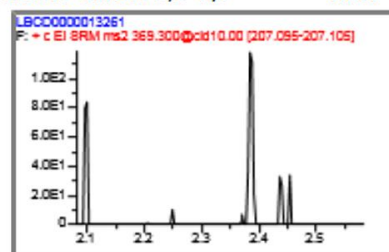
Quan: Area: RT  
369.300->207.000 m/z N/F 0.000

**Seletividade (sem PI e analito) 4**

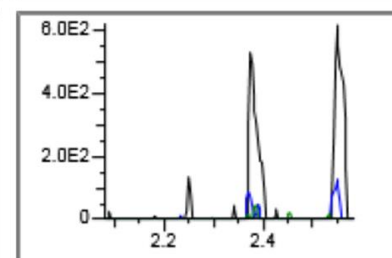
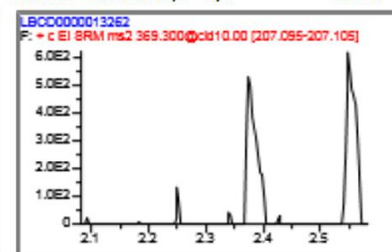
Quan: Area: RT  
369.300->207.000 m/z N/F 0.000

**Seletividade (sem PI e analito) 5**

Quan: Area: RT  
369.300->207.000 m/z N/F 0.000

**Seletividade (sem PI e analito) 6**

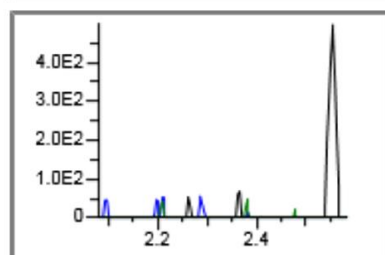
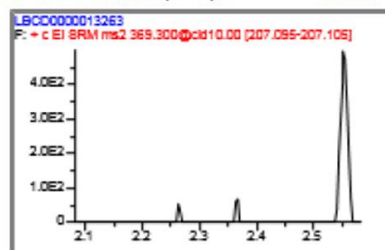
Quan: Area: RT  
369.300->207.000 m/z N/F 0.000



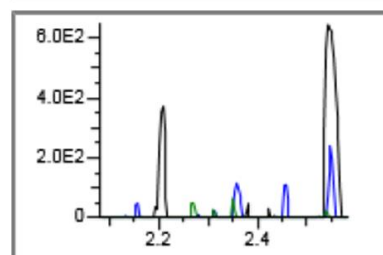
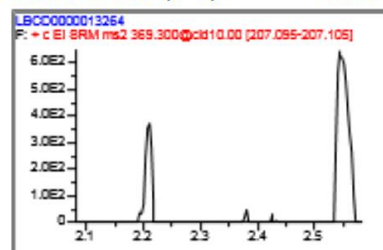


**Seletividade (sem PI e analito) 7**

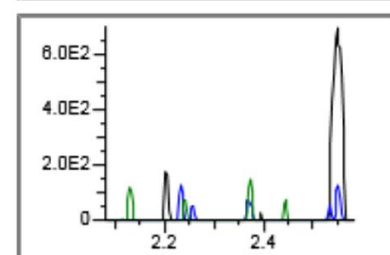
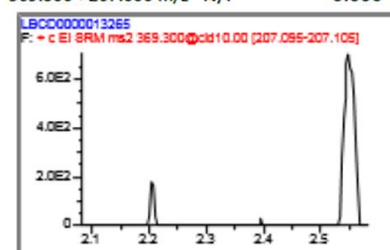
Quan: Area: RT  
369.300->207.000 m/z N/F 0.000

**Seletividade (sem PI e analito) 8**

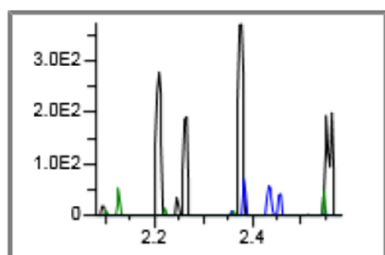
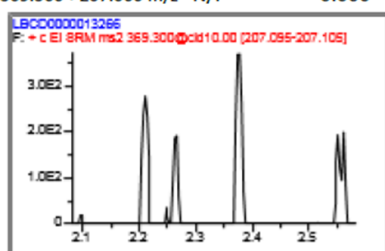
Quan: Area: RT  
369.300->207.000 m/z N/F 0.000

**Seletividade (sem PI e analito) 9**

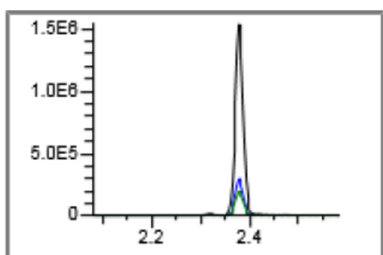
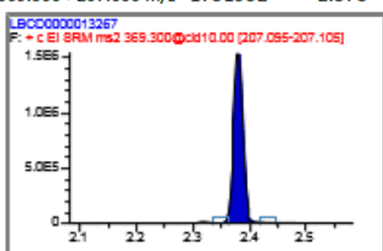
Quan: Area: RT  
369.300->207.000 m/z N/F 0.000

**Seletividade (sem PI e analito) 10**

Quan: Area: RT  
369.300->207.000 m/z N/F 0.000

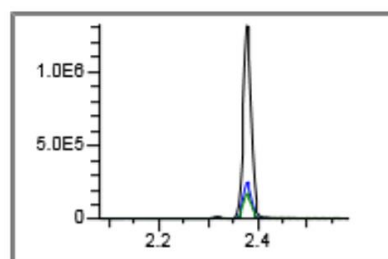
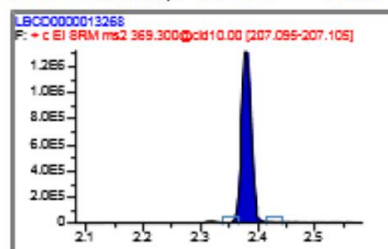
**PI + analito**

Quan: Area: RT  
369.300->207.000 m/z 1751952 2.378

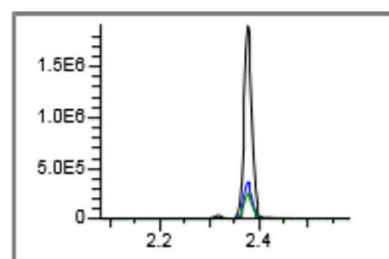
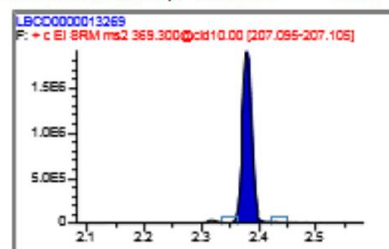


**Prec. Intermediaria1**

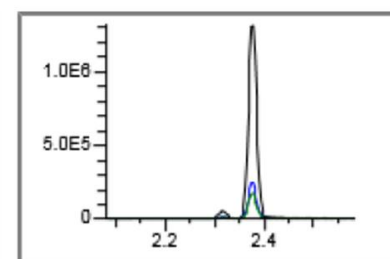
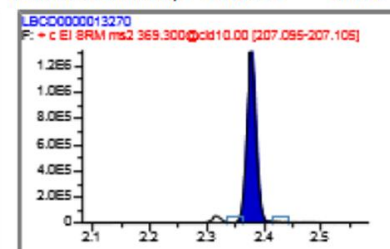
Quan: Area: RT  
369.300->207.000 m/z 1504131 2.378

**Prec. Intermediaria2**

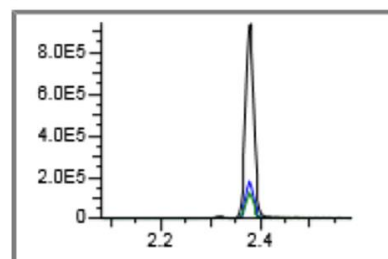
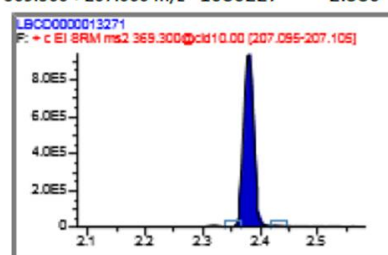
Quan: Area: RT  
369.300->207.000 m/z 2118521 2.378

**Prec. Intermediaria3**

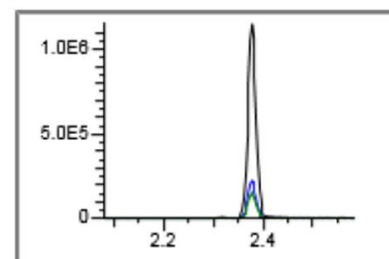
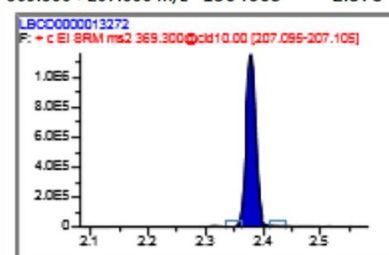
Quan: Area: RT  
369.300->207.000 m/z 1508991 2.378

**Prec. Intermediaria4**

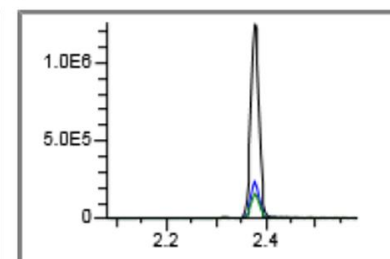
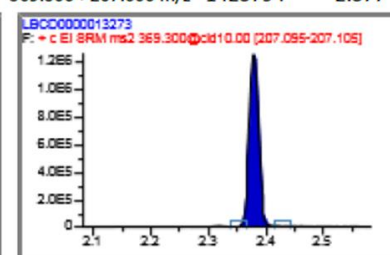
Quan: Area: RT  
369.300->207.000 m/z 1080227 2.380

**Prec. Intermediaria5**

Quan: Area: RT  
369.300->207.000 m/z 1304665 2.378

**Prec. Intermediaria6**

Quan: Area: RT  
369.300->207.000 m/z 1423794 2.377



PLANILHA PARA VALIDAÇÃO DE MÉTODOS DE ANÁLISE QUANTITATIVA						Método 5.372	
DATA TÉCNICA ANALITO PADRÃO INTERNO (P.I.)			CÓDIGO LADETEC DO MÉTODO ANALÍTICO ION DIAGNÓSTICO ANALITO ION DIAGNÓSTICO P.I. UNIDADES			ug/mL	
FORMULÁRIO DE ENTRADA DOS DADOS							
CURVAS ANALÍTICAS E DEMAIS CONTROLES							
PRIMEIRO DIA DE VALIDAÇÃO			SEGUNDO DIA DE VALIDAÇÃO			AVALIAÇÃO DE ARRASTE	
CURVA ANALÍTICA			CURVA ANALÍTICA			AMOSTRA      ÁREA	
Concentração	Área analito	Área PI	Concentração	Área analito	Área PI	BU ANTES	1238,47
500,00	781478	911989	500,00	761386	1064857	CQ 2 X	4932143,80
500,00	960598	1131111				BU APÓS	2846,65
500,00	1069421	1190110				RESULTADO	SEM ARRASTE
750,00	736401	578687	750,00	1543855	1436269		
750,00	935451	807196					
750,00	776301	668655					
1000,00	1304798	779130	1000,00	1176177	745133		
1000,00	1397451	921203					
1000,00	1804122	1168450					
1250,00	2295197	1246391	1250,00	2094178	1160895		
1250,00	1792517	877448					
1250,00	2339775	1254720					
1500,00	1555125	688002	1500,00	3067487	1363269		
1500,00	2567910	1091814					
1500,00	2682622	1158368					
2000,00	3589244	1243315	2000,00	3792469	1172565		
2000,00	1569454	501562					
2000,00	4441121	1418512					
CONTROLES DE REPETITIVIDADE			CONTROLES DE PRECISÃO INTERMEDIÁRIA			CONTROLES DE EFEITO DE MATRIZ	
Concentração	Área analito	Área PI	Concentração	Área analito	Área PI	Concentração	Área analito
1000,00	1593576	1069603	1000,00	1504131	949882	1000,00	1691971
1000,00	1096983	725395	1000,00	2118521	1480537	1000,00	1640221
1000,00	1998653	1334835	1000,00	1508991	913157	1000,00	1652029
1000,00	972790	864021	1000,00	1080227	722247	1000,00	2313434
1000,00	1376191	977941	1000,00	1304665	904795	1000,00	1306121
1000,00	1394651	1031530	1000,00	1423794	1011330	1000,00	1401669
1000,00	1829230	1295769	1000,00	2144638	1378126	1000,00	1821883
1000,00	1264190	901423	1000,00	1638836	1056088	1000,00	2012902
1000,00	1966957	1320740	1000,00	1347535	1034070	1000,00	1961266
1000,00	3459930	2232497	1000,00	2122852	1343913	1000,00	2072685
CONTROLES DE RECUPERAÇÃO (CASO HAJA MRC)							
Concentração	Área analito	Área PI	NÚMERO DE AMOSTRAS DE REFERÊNCIA DISPONÍVEIS:				
AVALIAÇÃO			DATA: NOME: ASSINATURA:				
Planilha para validação de método de análise quantitativa			Data: 15/09/15		Folha 1/6		EX.067/2015 V.02

FORMULÁRIO DE BUSCA POR VALORES ABERRANTES								
PRIMEIRO DIA DE VALIDAÇÃO					SEGUNDO DIA DE VALIDAÇÃO			
CURVA ANALÍTICA					CURVA ANALÍTICA			
Média A/PI	Desvio padrão A/PI	Gcalc (Gtab = 1,155)	Conclusão		Razão A/PI			
0,8682	0,0266	0,427 0,715 1,143	OK OK OK		0,7150			
1,1975	0,0650	1,155 0,593 0,561	OK OK OK		1,0749			
1,5786	0,0843	1,140 0,730 0,410	OK OK OK		1,5785			
1,9164	0,1102	0,680 1,148 0,468	OK OK OK		1,8039			
2,3094	0,0461	1,063 0,923 0,140	OK OK OK		2,2501			
3,0489	0,1404	1,155 0,571 0,583	OK OK OK		3,2343			
CONTROLES DE REPETITIVIDADE					CONTROLES DE REPETITIVIDADE			
Média A/PI	Desvio padrão A/PI	Gcalc (Gtab = 2,290)	Conclusão	Média A/PI	Desvio padrão A/PI	Gcalc (Gtab = 2,290)	Conclusão	
1,4238	0,1214	0,545 0,729 0,606 2,455 0,136 0,591 0,100 0,176 0,540 1,038	OK OK OK ABERRANTE OK OK OK OK OK OK	1,5003	0,1043	0,798 0,666 1,460 0,045 0,560 0,887 0,536 0,494 1,891 0,761	OK OK OK OK OK OK OK OK OK OK	

FORMULÁRIO DE CÁLCULOS DE VALIDAÇÃO								
PRIMEIRA CURVA ANALÍTICA								
CONCENTRAÇÃO	ANALITO/PI	CONC. CALCULADA	MÉDIA	Variância	$x_i - x(\text{médio})$	RECUPERAÇÃO	$y_i$ CALCULADO	RESÍDUOS
500,00	0,8569	507,194	514,968	330,7582	-7,774	101,4	0,85	0,01
500,00	0,8493	501,960			-13,008	100,4		0,00
500,00	0,8986	535,749			20,782	107,1		0,05
750,00	1,2725	791,849	740,440	1982,6968	51,409	105,6	1,21	0,06
750,00	1,1589	714,017			-26,424	95,2		-0,05
750,00	1,1610	715,455			-24,986	95,4		-0,05
1000,00	1,6747	1067,263	1001,436	3335,7140	65,828	106,7	1,58	0,10
1000,00	1,5170	959,261			-42,175	95,9		-0,06
1000,00	1,5440	977,783			-23,653	97,8		-0,03
1250,00	1,8415	1181,489	1232,786	5692,7612	-51,297	94,5	1,94	-0,10
1250,00	2,0429	1319,420			86,634	105,6		0,10
1250,00	1,8648	1197,449			-35,337	95,8		-0,08
1500,00	2,2604	1468,359	1501,946	998,9243	-33,587	97,9	2,31	-0,05
1500,00	2,3520	1531,103			29,156	102,1		0,05
1500,00	2,3159	1506,377			4,431	100,4		0,01
2000,00	2,8868	1897,410	2008,424	9243,4092	-111,014	94,9	3,04	-0,15
2000,00	3,1291	2063,349			54,925	103,2		0,09
2000,00	3,1308	2064,513			56,089	103,2		0,09

CONTROLES DE REPETITIVIDADE			
CONCENTRAÇÃO	ANALITO/PI	CONC. CALCULADA	RESULTADOS
1000	1,4899	940,695	DESvio DE REPETITIVIDADE $S_r$ 83,110
1000	1,5123	956,022	
1000	1,4973	945,782	
1000	1,1259	691,415	DESvio PADRÃO RELATIVO 9,3
1000	1,4072	884,096	
1000	1,3520	846,285	
1000	1,4117	887,152	
1000	1,4024	880,813	
1000	1,4893	940,290	
1000	1,5498	981,736	

RECUPERAÇÃO / TENDÊNCIA (CASO HAJA MRC)			
CONCENTRAÇÃO	ANALITO/PI	CONC. CALCULADA	TENDÊNCIA
0	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
0	#DIV/0!	#DIV/0!	0,000
0	#DIV/0!	#DIV/0!	0,000
		RMS(TENDÊNCIA)	#DIV/0!

Gráfico de Razonamento Analítico vs Concentração. A curva linear é dada por  $y = 0,0015x + 0,1163$  com  $R^2 = 0,9898$ . O eixo Y (Razão analito/PI) varia de 0,0000 a 3,5000. O eixo X (Concentração) varia de 0,00 a 2500,00.

Gráfico de Resíduos vs Concentração. O eixo Y (Resíduos) varia de -0,20 a 0,20. O eixo X (Concentração) varia de 0,00 a 2500,00.

CÁLCULOS DA CURVA ANALÍTICA	
Coef. Angular	0,001460
Coef. Linear	0,116310
Correlação (r)	0,995
Determinação ( $r^2$ )	0,990
Linearidade	CONFORME
s residual ( $s_e$ )	0,155
s de $b_0$ ( $s_{b_0}$ )	1,641
IC 95% p/ $B_0$ (inf)	-4,439
IC 95% p/ $B_0$ (sup)	4,672
Intercepto de $b_0$	CONFORME
Soma das var.	21584,2637
Ccalc.	0,4282
Ctab	0,6161
Resultado Cochran	HOMOCEDÁSTICO

FORMULÁRIO DE CÁLCULOS DE VALIDAÇÃO					
SEGUNDA CURVA ANALÍTICA					
CONCENTRAÇÃO	ANALITO/PI	CONC. CALCULADA	RECUPERAÇÃO	y <sub>i</sub> CALCULADO	RESÍDUOS
500,00	0,7150	524,036	104,8	0,68	0,04
750,00	1,0749	741,994	98,9	1,09	-0,01
1000,00	1,5785	1046,967	104,7	1,50	0,08
1250,00	1,8039	1183,507	94,7	1,91	-0,11
1500,00	2,2501	1453,711	96,9	2,33	-0,08
2000,00	3,2343	2049,784	102,5	3,15	0,08
CONTROLES DE PRECISÃO INTERMEDIÁRIA					
CONCENTRAÇÃO	ANALITO/PI	CONC. CALCULADA	RESULTADOS		
1000	1,5835	1050,004	DESVIO DE PRECISÃO INTERMEDIÁRIA		
1000	1,4309	957,599			
1000	1,6525	1091,795			
1000	1,4956	996,803		89,538	
1000	1,4419	964,280			
1000	1,4078	943,627	DESVIO PADRÃO RELATIVO		
1000	1,5562	1033,474			
1000	1,5518	1030,809			
1000	1,3031	880,215		9,4	
1000	1,5796	1047,649			
CONTROLES DA ROBUSTEZ					
CONCENTRAÇÃO	ANALITO/PI	CONC. CALCULADA	RESULTADOS		
1000,00	1,8653	1220,6563	DESVIO DA ROBUSTEZ		
1000,00	1,7060	1124,1758			
1000,00	1,5313	1018,4167		101,155	
		MÉDIA	DESVIO PADRÃO RELATIVO		
		1121,0829			
				9,02	
CONCENTRAÇÃO	ANALITO/PI	CONC. CALCULADA	RESULTADOS		
1000,00	1,5757	1045,2716	DESVIO DA ROBUSTEZ		
1000,00	1,5571	1034,0334			
1000,00	1,4266	955,0147		49,188	
		MÉDIA	DESVIO PADRÃO RELATIVO		
		1011,4399			
ERRO RELATIVO					
9,78				4,86	

Gráfico de dispersão da curva analítica. O eixo X representa a Concentração (de 0,00 a 2500,00) e o eixo Y representa a Razão analito/PI (de 0,0000 a 3,5000). Os dados seguem a equação da reta  $y = 0,0017x - 0,1503$  com  $R^2 = 0,9919$ .

CÁLCULOS DA CURVA ANALÍTICA	
Coef. Angular	0,001651
Coef. Linear	-0,150278
Correlação (r)	0,996
Determinação (r^2)	0,992
Linearidade	CONFORME
s residual (se)	0,104

Gráfico dos resíduos. O eixo X representa a Concentração (de 0,00 a 2500,00) e o eixo Y representa os resíduos (de -0,20 a 0,10). Os pontos estão distribuídos aleatoriamente em torno da linha zero.

Tabela 26. Teste de Grubbs.

Number of Observations n	Values of Grubbs Statistic (G)					
	Confidence Level (%)					
	99.9	99.5	99	97.5	95	90
3	1.155	1.155	1.155	1.155	1.153	1.148
4	1.499	1.496	1.492	1.481	1.463	1.425
5	1.780	1.764	1.749	1.715	1.672	1.602
6	2.011	1.973	1.944	1.887	1.822	1.729
7	2.201	2.139	2.097	2.020	1.938	1.828
8	2.358	2.274	2.221	2.126	2.032	1.909
9	2.492	2.387	2.323	2.215	2.110	1.977
10	2.606	2.482	2.410	2.290	2.176	2.036
11	2.705	2.564	2.485	2.355	2.234	2.088
12	2.791	2.636	2.550	2.412	2.285	2.134
13	2.867	2.699	2.607	2.462	2.331	2.175
14	2.935	2.755	2.659	2.507	2.371	2.213
15	2.997	2.806	2.705	2.549	2.409	2.247
16	3.052	2.852	2.747	2.585	2.443	2.279
17	3.103	2.894	2.785	2.620	2.475	2.309
18	3.149	2.932	2.821	2.651	2.504	2.335
19	3.191	2.968	2.854	2.681	2.532	2.361
20	3.230	3.001	2.884	2.709	2.557	2.385
30	3.507	3.236	3.103	2.908	2.745	2.563
40	3.673	3.381	3.240	3.036	2.866	2.682
50	3.789	3.483	3.336	3.128	2.956	2.768
60	3.874	3.560	3.411	3.199	3.025	2.837
70	3.942	3.622	3.471	3.257	3.082	2.893
80	3.998	3.673	3.521	3.305	3.130	2.940
90	4.044	3.716	3.563	3.347	3.171	2.981
100	4.084	3.754	3.600	3.383	3.207	3.017

Fonte: ASTM E178-00, “Standard Practice for Dealing with Outlying Observations”.



Tabela 27. Teste de Cochran.

Level of significance $\alpha = 0.05$														
k	$V_k$													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	16	36	144	$\infty$
2	0.9985	0.9750	0.9392	0.9057	0.8772	0.8534	0.8332	0.8159	0.8010	0.7880	0.7341	0.6602	0.5813	0.5000
3	0.9669	0.8709	0.7977	0.7457	0.7071	0.6771	0.6530	0.6333	0.6167	0.6025	0.5466	0.4748	0.4031	0.3333
4	0.9065	0.7679	0.6841	0.6287	0.5895	0.5598	0.5365	0.5175	0.5017	0.4884	0.4366	0.3720	0.3093	0.2500
5	0.8412	0.6838	0.5981	0.5441	0.5065	0.4783	0.4564	0.4387	0.4241	0.4118	0.3645	0.3066	0.2513	0.2000
6	0.7808	0.6161	0.5321	0.4803	0.4447	0.4184	0.3980	0.3817	0.3682	0.3568	0.3135	0.2612	0.2119	0.1667
7	0.7271	0.5612	0.4800	0.4307	0.3974	0.3726	0.3535	0.3384	0.3259	0.3154	0.2756	0.2278	0.1833	0.1429
8	0.6798	0.5157	0.4377	0.3910	0.3595	0.3362	0.3185	0.3043	0.2926	0.2829	0.2462	0.2022	0.1616	0.1250
9	0.6385	0.4775	0.4027	0.3584	0.3286	0.3067	0.2901	0.2768	0.2659	0.2568	0.2226	0.1820	0.1446	0.1111
10	0.6020	0.4450	0.3733	0.3311	0.3029	0.2823	0.2666	0.2541	0.2439	0.2353	0.2032	0.1655	0.1308	0.1000
12	0.5410	0.3924	0.3264	0.2880	0.2624	0.2439	0.2299	0.2187	0.2098	0.2020	0.1737	0.1403	0.1100	0.0833
15	0.4709	0.3346	0.2758	0.2419	0.2195	0.2034	0.1911	0.1815	0.1736	0.1671	0.1429	0.1144	0.0889	0.0667
20	0.3894	0.2705	0.2205	0.1921	0.1735	0.1602	0.1501	0.1422	0.1357	0.1303	0.1108	0.0879	0.0675	0.0500
24	0.3434	0.2354	0.1907	0.1656	0.1493	0.1374	0.1286	0.1216	0.1160	0.1113	0.0942	0.0743	0.0567	0.0417
30	0.2929	0.1980	0.1593	0.1377	0.1237	0.1137	0.1061	0.1002	0.0958	0.0921	0.0771	0.0604	0.0457	0.0333
40	0.2370	0.1576	0.1259	0.1082	0.0968	0.0887	0.0827	0.0780	0.0745	0.0713	0.0595	0.0462	0.0347	0.0250
60	0.1737	0.1131	0.0895	0.0765	0.0682	0.0623	0.0583	0.0552	0.0520	0.0497	0.0411	0.0316	0.0234	0.0167
120	0.0998	0.0632	0.0495	0.0419	0.0371	0.0337	0.0312	0.0292	0.0279	0.0266	0.0218	0.0165	0.0120	0.0083
$\infty$	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Fonte: Kanji, Gopal K. 100 Statistical Tests. London: SAGE Publication Ltd., 1993.



Tabela 28. *t* de Student.

<i>gl</i>	Área na cauda superior								
	0,25	0,10	0,05	0,025	0,01	0,005	0,0025	0,001	0,0005
1	1,000	3,078	6,314	12,71	31,82	63,66	127,3	318,3	636,6
2	0,816	1,886	2,920	4,303	6,965	9,925	14,09	22,33	31,60
3	0,765	1,638	2,353	3,182	4,541	5,841	7,453	10,21	12,92
4	0,741	1,533	2,132	2,776	3,747	4,604	5,598	7,173	8,610
5	0,727	1,476	2,015	2,571	3,365	4,032	4,773	5,894	6,869
6	0,718	1,440	1,943	2,447	3,143	3,707	4,317	5,208	5,959
7	0,711	1,415	1,895	2,365	2,998	3,499	4,029	4,785	5,408
8	0,706	1,397	1,860	2,306	2,896	3,355	3,833	4,501	5,041
9	0,703	1,383	1,833	2,262	2,821	3,250	3,690	4,297	4,781
10	0,700	1,372	1,812	2,228	2,764	3,169	3,581	4,144	4,587
11	0,697	1,363	1,796	2,201	2,718	3,106	3,497	4,025	4,437
12	0,695	1,356	1,782	2,179	2,681	3,055	3,428	3,930	4,318
13	0,694	1,350	1,771	2,160	2,650	3,012	3,372	3,852	4,221
14	0,692	1,345	1,761	2,145	2,624	2,977	3,326	3,787	4,140
15	0,691	1,341	1,753	2,131	2,602	2,947	3,286	3,733	4,073
16	0,690	1,337	1,746	2,120	2,583	2,921	3,252	3,686	4,015
17	0,689	1,333	1,740	2,110	2,567	2,898	3,222	3,646	3,965
18	0,688	1,330	1,734	2,101	2,552	2,878	3,197	3,610	3,922
19	0,688	1,328	1,729	2,093	2,539	2,861	3,174	3,579	3,883
20	0,687	1,325	1,725	2,086	2,528	2,845	3,153	3,552	3,850
21	0,686	1,323	1,721	2,080	2,518	2,831	3,135	3,527	3,819
22	0,686	1,321	1,717	2,074	2,508	2,819	3,119	3,505	3,792
23	0,685	1,319	1,714	2,069	2,500	2,807	3,104	3,485	3,768
24	0,685	1,318	1,711	2,064	2,492	2,797	3,091	3,467	3,745
25	0,684	1,316	1,708	2,060	2,485	2,787	3,078	3,450	3,725
26	0,684	1,315	1,706	2,056	2,479	2,779	3,067	3,435	3,707
27	0,684	1,314	1,703	2,052	2,473	2,771	3,057	3,421	3,689
28	0,683	1,313	1,701	2,048	2,467	2,763	3,047	3,408	3,674
29	0,683	1,311	1,699	2,045	2,462	2,756	3,038	3,396	3,660
30	0,683	1,310	1,697	2,042	2,457	2,750	3,030	3,385	3,646
35	0,682	1,306	1,690	2,030	2,438	2,724	2,996	3,340	3,591
40	0,681	1,303	1,684	2,021	2,423	2,704	2,971	3,307	3,551
45	0,680	1,301	1,679	2,014	2,412	2,690	2,952	3,281	3,520
50	0,679	1,299	1,676	2,009	2,403	2,678	2,937	3,261	3,496
<b>z</b>	0,674	1,282	1,645	1,960	2,326	2,576	2,807	3,090	3,291

**Nota:** A coluna em destaque é a mais usada.

Fonte: BARBETTA, P. A. – Estatística aplicada às Ciências Sociais. 7 ed. Florianópolis:

Editora da UFSC, 2010.