

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
ESCOLA DE QUÍMICA

Thalita Neves de Melo



DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO DE IDENTIFICAÇÃO DE
MOLIDUSTAT EM URINA HUMANA POR CROMATOGRÁFIA
LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE
MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO

RIO DE JANEIRO

2024

Thalita Neves de Melo

DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO DE IDENTIFICAÇÃO DE MOLIDUSTAT EM
URINA HUMANA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À
ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Químico Industrial.

Orientador(es): Raquel Massad Cavalcante, D. Sc.
Henrique Marcelo Gualberto Pereira, D. Sc.

Rio de Janeiro

2024

CIP - Catalogação na Publicação

M528d Melo, Thalita Neves de
Desenvolvimento de um método de identificação de molidustat em urina humana por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas de alta resolução. / Thalita Neves de Melo. -- Rio de Janeiro, 2024.
42 f.

Orientadora: Raquel Massad Cavalcante.
Coorientador: Henrique Marcelo Gualberto Pereira.
Trabalho de conclusão de curso (graduação) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Bacharel em Química Industrial, 2024.

1. Controle de dopagem. 2. Molidustat. 3. Cromatografia líquida bidimensional. 4. Espectrometria de massas de alta resolução. I. Cavalcante, Raquel Massad, orient. II. Pereira, Henrique Marcelo Gualberto, coorient. III. Título.

Thalita Neves de Melo

DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO DE IDENTIFICAÇÃO DE MOLIDUSTAT EM
URINA HUMANA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À
ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Escola de Química da Universidade Federal do
Rio de Janeiro, como parte dos requisitos
necessários à obtenção do grau de Químico
Industrial.

Aprovado em 05 de dezembro de 2024.

Raquel Massad Cavalcante, D. Sc., UFRJ

Henrique Marcelo Gualberto Pereira, D. Sc., UFRJ

Daniely Silva Oliveira, M. Sc., UFRJ

Luana Barros Furtado, D. Sc., UFRJ

Ivaldo Itabaiana Jr., D. Sc., UFRJ

Rio de Janeiro
2024

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus por sua presença constante em minha vida, sendo meu suporte e guia ao longo da minha trajetória.

À minha mãe, Leandra, por acreditar em mim e por nunca me deixar desistir perante aos desafios. Sou imensamente grata por todas as oportunidades que você me proporcionou para que eu chegasse até aqui.

Ao meu pai, Alexsandro, pelas palavras de incentivo e por me encorajar a seguir os meus sonhos.

Aos meus irmãos, por todos os momentos compartilhados e pelo companheirismo ao longo de nossas vidas. Théo, obrigada por ser uma lembrança constante de que as melhores coisas da vida são simples e cheias de amor. Thairine, agradeço por todo carinho, pelos desabafos e por tornar os meus dias mais alegres. Jhonatha, mesmo com a distância dos últimos anos, sou grata por todo apoio e força que você me proporcionou.

Ao meu namorado, Fabrício, por todo amor e companheirismo ao longo desses muitos anos. Obrigada por sempre segurar a minha mão e compartilhar a vida comigo. Te amo da forma mais feliz e bonita que existe!

À professora Raquel Massad e ao professor Henrique Pereira, pela confiança e orientação.

À equipe do LBCD, agradeço pela oportunidade e por tornarem minha experiência nesse laboratório tão enriquecedora. Em especial, à Daniely Oliveira e ao Gabriel Reis por acreditarem em mim e embarcarem nesse projeto. A contribuição de vocês foi fundamental nessa reta final da graduação.

Por fim, gostaria de expressar minha gratidão a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para meu crescimento pessoal e profissional. Um agradecimento especial ao meu amigo de infância, Rodrigo, e ao amigo que a graduação me trouxe, Brayan, por compartilharem tão de perto essa jornada comigo, dividindo tanto as conquistas quanto as inseguranças. Nada disso teria sido possível sem o apoio de pessoas incríveis como vocês. Muito obrigada!

RESUMO

MELO, Thalita Neves de. **Desenvolvimento de um Método de Identificação de Molidustat em Urina Humana por Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas de Alta Resolução**. Rio de Janeiro, 2024. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química Industrial) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2024.

O controle de dopagem desempenha um papel crucial no esporte, assegurando a integridade física dos atletas e promovendo um ambiente competitivo justo para todos. Com o aumento do número de amostras e da diversidade de substâncias proibidas, torna-se necessário desenvolver métodos de detecção mais sofisticados e simplificar os procedimentos de preparo de amostras. Diante disso, este trabalho aborda o desenvolvimento de um procedimento de confirmação para molidustat em amostras de urina humana, utilizando a técnica de cromatografia líquida bidimensional acoplada à espectrometria de massas de alta resolução. O molidustat é um agente ativador de fatores indutores da hipóxia, incluído na Lista de Substâncias e Métodos Proibidos da Agência Mundial Antidopagem (AMA) por seu potencial de melhorar o desempenho esportivo. A metodologia desenvolvida inclui uma etapa de hidrólise enzimática, seguida pela adição de ácido tricloroacético a 10% e centrifugação. Posteriormente, as amostras foram analisadas por cromatografia líquida bidimensional, uma técnica analítica promissora, reconhecida por sua ampla aplicabilidade a diversos compostos e seus metabólitos, além de oferecer uma preparação rápida da amostra e de baixo custo. O método foi validado conforme os critérios estabelecidos pela AMA, abrangendo linearidade, seletividade, limite de identificação, arraste e efeito de matriz. Os resultados demonstraram que o método é seletivo e linear, sem ocorrência de arraste ou interferência da matriz, com limite de identificação estimado em 0,70 ng/mL, valor satisfatório por estar abaixo do limite mínimo de desempenho requerido de 2 ng/mL. Assim, foi possível incorporar o procedimento à rotina do Laboratório Brasileiro de Controle de Dopagem.

Palavras-chave: controle de dopagem; molidustat; agente ativador de HIF; inibidor de prolil hidroxilase; cromatografia líquida bidimensional; CL-EMAR.

ABSTRACT

MELO, Thalita Neves de. **Desenvolvimento de um Método de Identificação de Molidustat em Urina Humana por Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas de Alta Resolução**. Rio de Janeiro, 2024. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química Industrial) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2024.

Doping control plays a crucial role in sports by ensuring the physical integrity of athletes and promoting a fair competitive environment for all. With the increasing number of samples and the diversity of prohibited substances, it is necessary to develop more sophisticated detection methods and simplify sample preparation procedures. In this context, this study addresses the development of a confirmation procedure for molidustat in human urine samples, utilizing two-dimensional liquid chromatography coupled with high-resolution mass spectrometry. Molidustat is a hypoxia-inducible factor activating agent included in the World Anti-Doping Agency (WADA) Prohibited List due to its potential to enhance sports performance. The developed methodology includes an enzymatic hydrolysis step, followed by the addition of 10% trichloroacetic acid and centrifugation. Subsequently, the samples were analyzed using two-dimensional liquid chromatography, an analytical technique recognized for its wide applicability to various compounds and their metabolites, as well as for offering rapid and low-cost sample preparation. The method was validated according to the criteria established by WADA, covering linearity, selectivity, identification limit, carryover, and matrix effect. The results demonstrated that the method is selective and linear, with no occurrence of carryover or matrix interference, and an estimated identification limit of 0.70 ng/mL, which is satisfactory as it is below the minimum required performance limit of 2 ng/mL. Thus, it was possible to incorporate the procedure into the routine of the Brazilian Doping Control Laboratory.

Keywords: doping control; molidustat; HIF activating agent; prolyl hydroxylase inhibitor; two-dimensional liquid chromatography; LC-HRMS.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estrutura química do molidustat (BAY 85-3934).

Figura 2 - Representação esquemática de uma fonte ESI operada em modo positivo.

Figura 3 - Representação esquemática do espectrômetro de massas Q-Exactive Plus.

Figura 4 - Representação esquemática do funcionamento do modo de aquisição PRM.

Figura 5 - Espectro de massa de íons produto de BAY 85-3934 $[M+H]^+$.

Figura 6 - Vias de dissociação de BAY 85-3934 $[M+H]^+$.

Figura 7 - Avaliação da linearidade entre o sinal analítico e a concentração de molidustat.

Figura 8 - Cromatogramas do controle negativo (CN1 - linha 1) e do controle positivo (LOI1_1 - linha 2) referentes ao experimento de seletividade do molidustat, com cada janela representando uma transição monitorada do analito.

Figura 9 - Curva de regressão logística para a determinação do LOI de molidustat.

Figura 10 - Cromatogramas do controle negativo (CN1 - linha 1 e CN1_reinj - linha 3) e da amostra fortificada com molidustat a 500% do MRPL (CPA - linha 2) referentes ao estudo do arraste, com cada janela representando uma transição monitorada do analito.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Gradiente de eluição da análise cromatográfica.

Tabela 2 - Dados obtidos para a realização da curva analítica.

Tabela 3 - Resultado da detecção de molidustat em diferentes níveis de concentração.

Tabela 4 - Tempo de retenção e áreas dos picos cromatográficos do analito.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1D-LC	Cromatografia Líquida Unidimensional
2D-LC	Cromatografia Líquida Bidimensional
ABCD	Autoridade Brasileira de Controle de Dopagem
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
AMA	Agência Mundial Antidopagem
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BR	Branco de Reagente
CL-EMAR	Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massa de Alta Resolução
COI	Comitê Olímpico Internacional
CQN	Controle de Qualidade Negativo
CQP	Controle de Qualidade Positivo
DMSO	Dimetilsulfóxido
ESI	Ionização por <i>Electrospray</i> (do inglês, <i>Ionization Electrospray</i>)
FM	Fase Móvel
HIF	Fator Indutor da Hipóxia (do inglês, <i>Hypoxia-inducible Factor</i>)
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Performance (do inglês, <i>High-performance Liquid Chromatography</i>)
HRMS	Espectrometria de Massa de Alta Resolução (do inglês, <i>High-resolution Mass Spectrometry</i>)
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
ISL	Padrão Internacional para Laboratórios (do inglês, <i>International Standards for Laboratories</i>)
LADETEC	Laboratório de Apoio ao Desenvolvimento Tecnológico
LBCD	Laboratório Brasileiro de Controle de Dopagem
LOI	Limite de Identificação (do inglês, <i>Limit of Identification</i>)
m/z	Razão Massa/Carga
MRL	Limite Mínimo de Relatório (do inglês, <i>Minimum Reporting Level</i>)
MRPL	Limite Mínimo de Desempenho Requerido (do inglês, <i>Minimum Required Performance Level</i>)
PI	Padrão Interno
PRM	Monitoramento de Reações Paralelas (do inglês, <i>Parallel Reaction</i>)

Monitoring)

RAA	Resultado Analítico Adverso
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
SPE	Extração em Fase Sólida (do inglês, <i>Solid-Phase Extraction</i>)
TCA	Ácido Tricloroacético (do inglês, <i>Trichloroacetic Acid</i>)
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
WADA	<i>World Anti-Doping Agency</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVO	13
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
3.1 CONTROLE ANTIDOPAGEM NO ESPORTE	14
3.2 MOLIDUSTAT	15
3.3 ANÁLISE INSTRUMENTAL	17
3.3.1 Cromatografia Líquida Bidimensional	17
3.3.2 Espectrometria de Massas de Alta Resolução	18
3.4 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS	20
3.4.1 Linearidade	21
3.4.2 Seletividade	21
3.4.3 Limite de Identificação	21
3.4.4 Arraste	22
3.4.5 Efeito de Matriz	22
4 METODOLOGIA	23
4.1 SOLVENTES E REAGENTES	23
4.2 PREPARO DAS AMOSTRAS	23
4.3 CONDIÇÕES INSTRUMENTAIS	24
4.4 VALIDAÇÃO DO MÉTODO	26
4.4.1 Linearidade	26
4.4.2 Seletividade	26
4.4.3 Limite de Identificação	26
4.4.4 Arraste	27
4.4.5 Efeito de Matriz	27
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
5.1 VALIDAÇÃO DO MÉTODO	28
5.1.1 Linearidade	28
5.1.2 Seletividade	29
5.1.3 Limite de Identificação	29
5.1.4 Arraste	30
5.1.5 Efeito de Matriz	31
6 CONCLUSÕES	33
7 REFERÊNCIAS	34
APÊNDICE A – CROMATOGRAMAS REFERENTES AO ENSAIO DE SELETIVIDADE	37
APÊNDICE B – CROMATOGRAMAS REFERENTES AO ESTUDO DO EFEITO DE MATRIZ	41

1 INTRODUÇÃO

O esporte desempenha um papel fundamental na sociedade, servindo não apenas como forma de lazer e manutenção da saúde, mas também como meio de ascensão social e econômica. No entanto, o cenário esportivo profissional enfrenta desafios significativos, principalmente no que diz respeito ao uso de substâncias proibidas, conhecidas como doping, que visam aumentar o desempenho de forma ilícita. A busca incessante por superar limites, aliada à pressão para atingir altos resultados, tem levado muitos atletas a recorrerem ao uso de substâncias capazes de melhorar a performance, comprometendo a integridade física e ética do esporte (AQUINO NETO, 2001).

Para combater essa prática, a *World Anti-Doping Agency* (WADA) tem desempenhado um papel crucial desde sua criação em 1999. A WADA é responsável por monitorar e regular o uso de substâncias e métodos proibidos no esporte, visando garantir uma competição justa e proteger a saúde dos atletas (WADA, 2024a). A cada ano, a WADA revisa e publica a Lista de Substâncias e Métodos Proibidos, que categoriza compostos com potencial de aumentar o desempenho ou colocar em risco a saúde dos atletas (WADA, 2024b).

Entre as substâncias destacadas na lista está o molidustat, um agente ativador de fatores indutores da hipóxia (HIF), utilizado clinicamente para promover a produção de glóbulos vermelhos em condições como a anemia (FLAMME *et al.*, 2014). Embora promissor no tratamento de doenças, seu uso no esporte é proibido devido à capacidade de aumentar a disponibilidade de oxigênio no sangue, oferecendo uma vantagem competitiva desleal (LOCATELLI *et al.*, 2022). Com isso, surge a necessidade de métodos de detecção precisos e eficazes, como os que envolvem a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas de alta resolução (CL-EMAR), para assegurar a identificação de tais substâncias em amostras biológicas, protegendo a integridade esportiva (MAZZARINO *et al.*, 2021).

Um dos maiores desafios enfrentados pelos laboratórios de controle de dopagem na identificação de agentes ativadores de HIF é sua presença em baixas concentrações nas amostras biológicas, o que exige métodos analíticos altamente sensíveis. Além disso, essas substâncias passam por um metabolismo rápido no organismo, originando diversos metabólitos, muitos deles conjugados, como glicuronídeos. Para torná-los detectáveis, etapas específicas, como a hidrólise enzimática, são indispensáveis no preparo das amostras (MAZZARINO *et al.*, 2021).

O presente trabalho tem como objetivo o desenvolvimento e a validação de um método analítico para a confirmação de molidustat em amostras de urina humana, utilizando técnicas avançadas de cromatografia e espectrometria de massas. Além disso, a abordagem utilizada visa minimizar os esforços de preparação de amostras, preservando a sensibilidade e especificidade do ensaio (GÖRGENS *et al.*, 2016).

2 OBJETIVO

O escopo deste trabalho objetiva o desenvolvimento de um método de detecção de molidustat (BAY 85-3934) em amostras de urina humana, utilizando o sistema de cromatografia líquida acoplado à espectrometria de massa de alta resolução (CL-EMAR).

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Estabeleceu-se os seguintes objetivos específicos para alcançar o objetivo proposto:

- Desenvolver um método para a confirmação de molidustat em amostras de urina humana, utilizando hidrólise seguida de injeção direta e análise por cromatografia líquida bidimensional acoplada à espectrometria de massas de alta resolução.
- Realizar a validação da metodologia desenvolvida para a análise qualitativa do molidustat em amostras de urina humana, de acordo com os critérios exigidos pela WADA.
- Avaliar os seguintes parâmetros na validação do método analítico: linearidade, seletividade, limite de identificação, arraste e efeito de matriz.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 CONTROLE ANTIDOPAGEM NO ESPORTE

A dopagem, caracterizada pela violação do Código Internacional Antidopagem, compromete a integridade das competições e coloca em risco a saúde dos atletas. As infrações às regras antidopagem incluem a recusa em fornecer amostras, o uso ou tentativa de uso de métodos proibidos e a presença de substâncias proibidas ou de seus metabólitos nas amostras, resultando em um resultado analítico adverso. Detectada principalmente pela análise de fluidos corporais como urina e sangue, a dopagem é uma preocupação crescente para organizações esportivas em âmbito mundial (WADA, 2021b).

A preocupação com a dopagem no cenário esportivo só emergiu após a morte de Kurt Jensen em 1960, nas Olimpíadas de Roma, por overdose de anfetamina. Esse incidente levou à implementação de medidas de controle pelo Comitê Olímpico Internacional (COI) a partir de 1967, com a primeira testagem oficial ocorrendo nos Jogos Olímpicos de Inverno de Grenoble em 1968. Entretanto, as limitações tecnológicas iniciais restringiam a detecção a apenas alguns estimulantes e narcóticos, impedindo a identificação de uma variedade maior de substâncias dopantes (AQUINO NETO, 2001).

A Agência Mundial Antidopagem (AMA), conhecida como *World Anti-Doping Agency* (WADA) em inglês, foi fundada em 1999 como uma agência internacional independente. Seu papel principal é liderar um movimento colaborativo global em direção a um esporte livre de *doping*. Em parceria com o meio desportivo e os governos, ela busca harmonizar e coordenar as políticas antidopagem, desenvolvendo regras universais para proteger a integridade do esporte e fomentar um ambiente competitivo justo e limpo para todos os atletas (WADA, 2024a).

No cenário nacional, a Autoridade Brasileira de Controle de Dopagem (ABCD) regulamenta e promove ações antidopagem no Brasil, assegurando que as práticas esportivas no país atendam aos padrões estabelecidos pela WADA. Suas atribuições incluem a gestão de políticas antidopagem, a educação de atletas e a coordenação dos testes de controle de dopagem em competições nacionais e internacionais (ABCD, 2024).

Em paralelo, o Laboratório Brasileiro de Controle de Dopagem (LB CD) é responsável pela análise de amostras coletadas em eventos esportivos, sendo o único laboratório credenciado pela WADA na América Latina. Localizado no Polo de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), o LB CD encontra-se associado ao Laboratório de Apoio ao Desenvolvimento Tecnológico (LADETEC) e desempenha um papel essencial no

monitoramento de substâncias proibidas, garantindo a integridade dos resultados e contribuindo para a promoção de um esporte justo e ético no país (LBCE, 2024).

A responsabilidade de definir e revisar anualmente a Lista de Substâncias e Métodos Proibidos é atribuída à AMA. Esse documento detalha todas as substâncias e métodos considerados ilícitos no esporte devido aos potenciais efeitos que podem ter no aumento do desempenho, nos riscos à saúde dos atletas ou na violação do espírito esportivo. Ele é monitorado por laboratórios credenciados e funciona como um padrão internacional obrigatório, integrando o Programa Mundial Antidopagem (WADA, 2024b).

A lista é organizada em substâncias e métodos proibidos a todo momento, ao período de competição e aqueles restritos a determinados esportes. Dentro de cada categoria são estabelecidas classes com base nos efeitos que cada composto apresenta no organismo, incluindo substâncias não aprovadas (S0), agentes anabolizantes (S1), hormônios peptídicos, fatores de crescimento, substâncias relacionadas e miméticos (S2), beta-2-agonistas (S3), hormônio e moduladores metabólitos (S4), diuréticos e agentes mascarantes (S5), estimulantes (S6), narcóticos (S7), canabinoides (S8), glicocorticoides (S9) e betabloqueadores (P1) (WADA, 2024c).

Entre as inúmeras classes presentes na Lista Proibida da AMA, encontra-se o composto de estudo deste trabalho, conhecido como molidustat ou BAY 85-3934. Essa substância é um agente ativador de fatores indutores da hipóxia (HIF), associada à classe S2. Sua principal função é estimular a produção de glóbulos vermelhos, um processo denominado eritropoiese, útil no tratamento de hipóxia e anemia. No entanto, devido ao seu potencial de melhorar o desempenho esportivo ao aumentar o transporte de oxigênio, os ativadores de HIF são proibidos pelas regulamentações da AMA (DIB *et al.*, 2017).

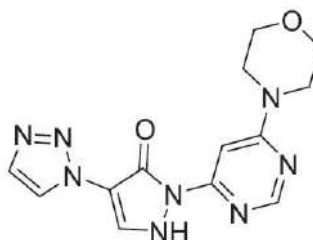
3.2 MOLIDUSTAT

O molidustat, também conhecido como BAY 85-3934, é um novo agente terapêutico classificado como um agente ativador de fatores indutores da hipóxia (HIF), atualmente em ensaios clínicos (DIB *et al.*, 2017). Pertencente a uma nova classe de medicamentos, os ativadores de HIF aumentam a eritropoiese, o processo de produção de glóbulos vermelhos, tornando-se uma opção promissora para o tratamento de condições como anemia, especialmente em pacientes com doença renal crônica ou em quimioterapia (LOCATELLI *et al.*, 2022; WIGERUP, C.; PÅHLMAN, S.; BEXELL, D., 2016).

Sua ação inibe a atividade das prolil-hidroxilases de HIF, enzimas que degradam a subunidade HIF- α em níveis normais de oxigênio. Ao estimular o HIF- α , o molidustat

promove a formação do complexo HIF- α/β , que ativa genes relacionados à eritropoiese, incluindo o gene da eritropoietina (EPO). Isso, em última análise, leva ao aumento da produção de glóbulos vermelhos e à capacidade aprimorada de transporte de oxigênio (MAZZARINO *et al.*, 2021). A estrutura química do molidustat pode ser vista na Figura 1.

Figura 1 – Estrutura química do molidustat (BAY 85-3934).



3.3 ANÁLISE INSTRUMENTAL

A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas de alta resolução (CL-EMAR) é uma técnica amplamente empregada em diversas áreas, especialmente no controle de dopagem, devido à sua capacidade de separar, identificar e quantificar compostos químicos de forma eficiente. No presente trabalho, essa técnica analítica foi aplicada e será detalhada nos tópicos subsequentes.

3.3.1 Cromatografia Líquida Bidimensional

A cromatografia líquida é uma técnica analítica que permite a separação dos componentes de uma amostra com base em suas interações com duas fases: a fase estacionária, que pode ser sólida ou líquida, e a fase móvel, que é líquida. No caso da fase estacionária líquida, esta é adsorvida ou imobilizada sobre um suporte sólido, enquanto a fase estacionária sólida constitui diretamente o material de preenchimento da coluna. Durante o processo, a amostra é dissolvida na fase móvel e bombeada pela coluna, onde os analitos interagem de forma diferenciada com as fases, migrando a velocidades variadas. Esse comportamento resulta em tempos de retenção distintos, promovendo a separação eficiente dos compostos (SKOOG *et al.*, 2009).

Com o avanço dos instrumentos analíticos, a cromatografia bidimensional (2D-LC) tem se tornado uma técnica comum no controle de dopagem. Essa abordagem avançada utiliza dois mecanismos de separação em sequência, proporcionando uma melhor resolução de misturas complexas em comparação à cromatografia líquida convencional (1D-LC). Além de permitir a injeção direta das amostras, a 2D-LC realiza uma limpeza e pré-concentração automáticas, protegendo tanto a coluna analítica quanto o espectrômetro de massas das interferências da matriz. Embora mais complexa, essa técnica proporciona maior agilidade no tempo de resposta e redução de custos devido à simplificação no preparo das amostras, permitindo a detecção de uma ampla variedade de compostos (GÖRGENS *et al.*, 2016).

Esse método utiliza um sistema de comutação com duas válvulas de seis portas, que alternam entre as etapas da análise em 2D-LC. Inicialmente, a amostra é carregada na coluna SPE com alta vazão, descartando os compostos não retidos. Em seguida, a vazão é reduzida, as válvulas são ajustadas, e o solvente orgânico transfere os compostos retidos para a coluna analítica, onde ocorre a segunda separação. Durante a análise, o circuito é recarregado com solvente orgânico, e ao final, o sistema é lavado e preparado para a próxima análise. Essa técnica pode ser acoplada a detectores, como a espectrometria de massas, para aprimorar a

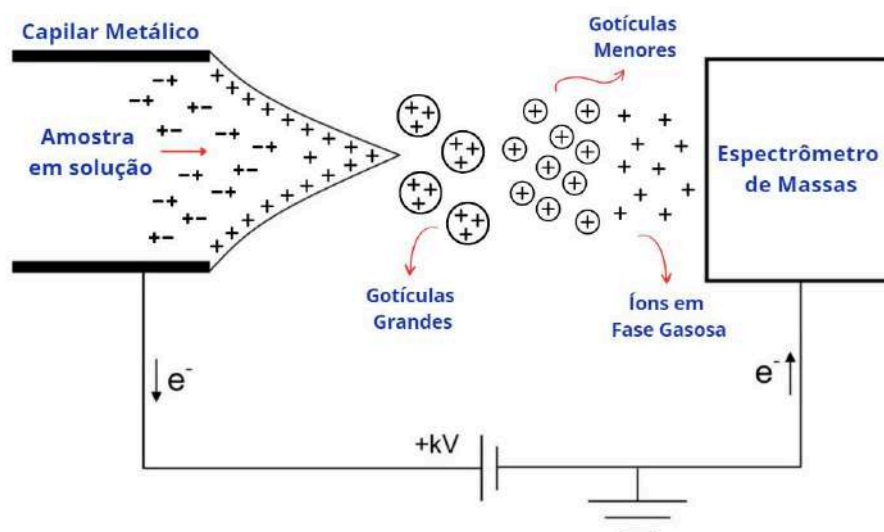
identificação e quantificação de compostos, como foi realizado no presente trabalho (DE WILDE *et al.*, 2018; GÖRGENS *et al.*, 2018).

3.3.2 Espectrometria de Massas de Alta Resolução

A espectrometria de massas de alta resolução (EMAR) é uma técnica analítica que permite determinar com precisão a massa molecular de compostos, medindo a razão massa/carga (m/z) dos íons gerados na fonte do espectrômetro. As informações obtidas são convertidas em espectros detalhados, que auxiliam na identificação e quantificação de compostos. Além disso, é um método reconhecido por sua alta seletividade e sensibilidade, contribuindo significativamente para a descoberta de estruturas químicas (WATERS, 2024; SILVERSTEIN *et al.*, 2005).

A eficiência da EMAR está diretamente associada à escolha do método de ionização. Entre as fontes mais relevantes, destaca-se a ionização por eletrospray (ESI), amplamente utilizada em conjunto com a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS). A ESI apresenta fragmentação branda das moléculas, formando íons pseudomoleculares do tipo $[M+H]^+$ no modo positivo ou $[M-H]^-$ no modo negativo, o que contribui para a preservação da estrutura molecular dos analitos. Isso, pois, a ESI opera à pressão atmosférica, convertendo íons em fase condensada para a fase gasosa, e apresenta três principais etapas de funcionamento, conforme observado na Figura 2 (KONERMANN *et al.*, 2013; SILVERSTEIN *et al.*, 2005).

Figura 2 – Representação esquemática de uma fonte ESI operada em modo positivo.

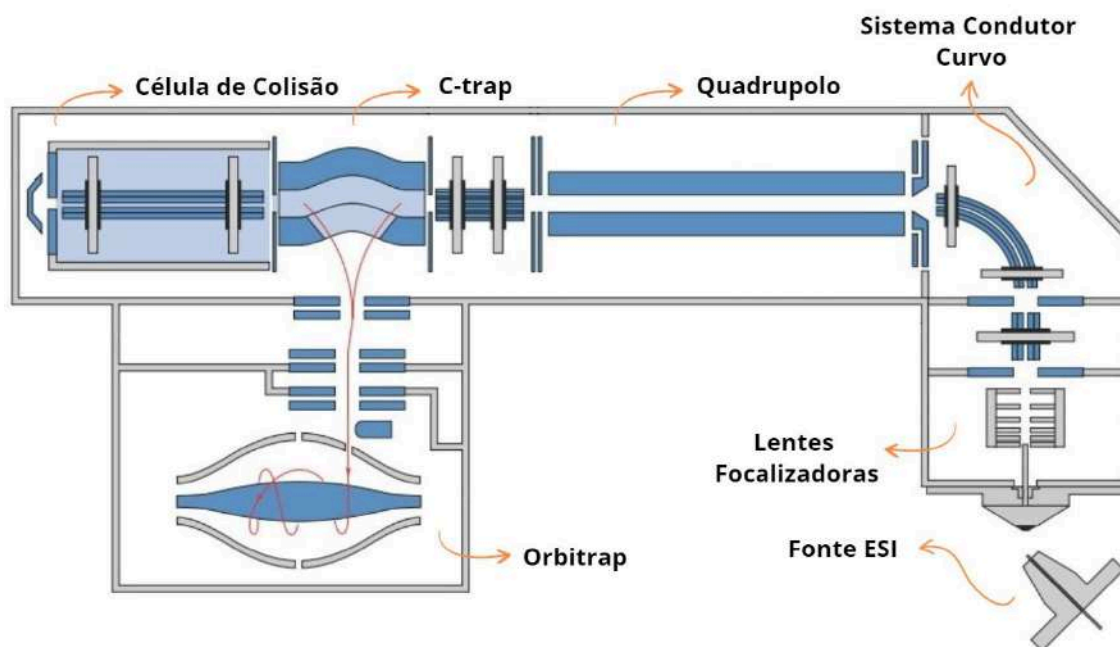


Fonte: Adaptado de Konermann *et al.* (2013).

O processo começa com a emissão de um spray de gotículas, produzido quando a amostra em solução é introduzida através de um capilar metálico. Esse capilar gera um aerossol de gotículas carregadas, que é direcionado por um gás nebulizador, geralmente nitrogênio. À medida que o solvente evapora com o auxílio do gás de secagem, a densidade de carga superficial das gotículas aumenta até que a repulsão eletrostática atinja um limite crítico, levando à explosão coulômbica. A partir disso, formam-se gotículas menores, das quais os íons da amostra são finalmente liberados para a fase gasosa e direcionados para o analisador de massas (KONERMANN *et al.*, 2013; SILVERSTEIN *et al.*, 2005).

O analisador de massas é essencial para determinar com precisão a razão massa/carga dos íons, sendo o Orbitrap amplamente utilizado em análises antidopagem devido à sua alta resolução, capaz de medir massas com precisão de até cinco casas decimais. A Figura 3 apresenta um esquema do Q-Exactive Plus, um espectrômetro de massas híbrido utilizado no LBCD, que inclui uma fonte de íons, lentes focalizadoras, um filtro de massa quadrupolo, uma região de acúmulo de íons (C-Trap), uma célula de dissociação colisional de alta energia (HCD) e o analisador Orbitrap (KAUFMANN, A.; BROMIRSKI, M., 2018).

Figura 3 – Representação esquemática do espectrômetro de massas Q-Exactive Plus.



Fonte: Adaptado de Creative Proteomics (2024).

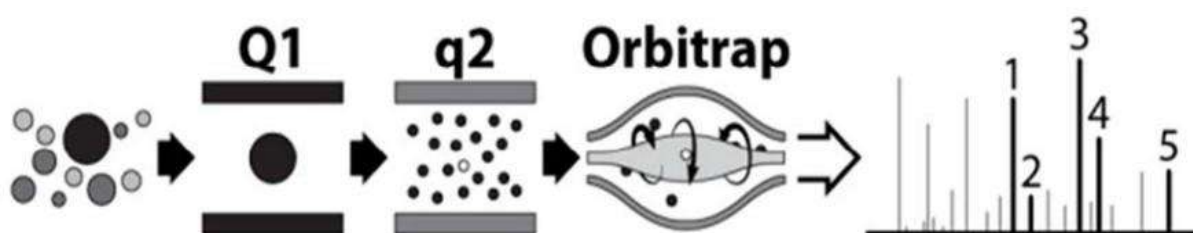
Em linhas gerais, as amostras são ionizadas pela fonte ESI e direcionadas por lentes focalizadoras. O fluxo de íons passa por um sistema condutor curvo, que remove resíduos não ionizados, e segue para o quadrupolo, onde ocorre a separação dos íons. Esta separação é feita pela oscilação de polaridade das suas quatro barras metálicas cilíndricas, dispostas em pares, e

da aplicação simultânea de voltagem contínua e radiofrequência. Devido à baixa energia aplicada, a fragmentação dos íons não costuma acontecer até essa etapa (MAKAROV, A.; SCIGELOVA, M., 2010; KAUFMANN, A.; BROMIRSKI, M., 2018).

Para tal, a célula de colisão (HCD) é acionada e realiza experimentos específicos de fragmentação, gerando espectros usados para elucidação e confirmação estrutural dos analitos. Por fim, os íons são acumulados na C-Trap e enviados ao Orbitrap, onde são detectados pela correlação entre a frequência de suas oscilações harmônicas e a razão m/z , resultando em um espectro de alta resolução. Assim, o Orbitrap atua tanto como analisador de massas quanto como detector (MAKAROV, A.; SCIGELOVA, M., 2010; KAUFMANN, A.; BROMIRSKI, M., 2018).

O modo de fragmentação denominado monitoramento de reações paralelas (PRM) foi escolhido para o procedimento de confirmação no Q-Exactive Plus, devido à sua alta seletividade e sensibilidade. Nesse modo de varredura, os íons precursores são selecionados pelo quadrupolo, que atua como um filtro de massa, isolando os íons em uma faixa estreita previamente definida pelo usuário em uma lista de inclusão. Após a seleção, os íons são transmitidos para a C-Trap, fragmentados na célula de colisão (HCD) e, posteriormente, analisados no Orbitrap. Embora equivalente ao modo de varredura de íons produto (*Product Ion Scan*) em instrumentos de triplo quadrupolo (QqQ), o PRM utiliza a tecnologia Orbitrap, o que permite alcançar níveis superiores de seletividade e sensibilidade (KAUFMANN, A.; BROMIRSKI, M., 2018; ZHANG, W., 2014).

Figura 4 – Representação esquemática do funcionamento do modo de aquisição PRM.



Fonte: Adaptado de Zhang (2014).

3.4 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

A validação de métodos analíticos é um processo sistemático que visa garantir que um método é capaz de fornecer resultados confiáveis, rastreáveis e comparáveis sob condições definidas, assegurando que ele atende às exigências de sua aplicação analítica específica (RIBANI *et al.*, 2004). O procedimento de confirmação descrito no presente trabalho foi validado de acordo com a ABNT NBR ISO/IEC 17025:2017 e baseou-se nas diretrizes

estabelecidas pela WADA no Padrão Internacional para Laboratórios, bem como em seus documentos técnicos (INMETRO, 2018; WADA, 2021).

Os parâmetros de validação considerados foram a linearidade, seletividade, limite de identificação, arraste e efeito de matriz, os quais são detalhados nos tópicos subsequentes. Além disso, a análise do rendimento de extração é um aspecto fundamental na validação; no entanto, não foi abordada neste trabalho, pois o método utilizado não inclui esse processo.

3.4.1 Linearidade

A linearidade de um método refere-se à sua capacidade de gerar respostas analíticas diretamente proporcionais à concentração da substância analisada ao longo de uma faixa estabelecida, representada por uma curva analítica. A determinação dos coeficientes dessa curva é realizada por meio de regressão linear, que também permite o cálculo do coeficiente de correlação (R). Um valor de R superior a 0,999 é considerado ideal, indicando mínima dispersão dos pontos experimentais e maior precisão nos coeficientes de regressão. No entanto, a ANVISA recomenda um valor mínimo de 0,99, enquanto o INMETRO sugere um valor acima de 0,90 (RIBANI *et al.*, 2004; ANVISA, 2017).

3.4.2 Seletividade

A seletividade é um parâmetro fundamental na validação de métodos analíticos, pois define a capacidade de um método em identificar o analito de interesse em amostras complexas, sem a interferência de outros componentes presentes na matriz. Dessa forma, assegura-se que o pico de resposta observado em uma análise refira-se exclusivamente à substância de estudo, evitando resultados equivocados devido à presença de compostos que possam co-eluir ou interferir no sinal do analito.

A avaliação da seletividade pode ser realizada de diversas maneiras, sendo comum a abordagem de comparar a matriz isenta do analito com a matriz fortificada com o padrão correspondente, que foi a utilizada neste trabalho. Neste contexto, espera-se que nenhum interferente elua no mesmo tempo de retenção do analito, assegurando, assim, a eficácia e a confiabilidade do método analítico empregado (RIBANI *et al.*, 2004).

3.4.3 Limite de Identificação

O limite de identificação (LOI) corresponde à menor concentração na qual a substância em análise pode ser confirmada pelo método, atendendo aos critérios de identificação cromatográfica e espectrométrica de massa estabelecidos pela Agência Mundial

Antidopagem (WADA, 2023). Além disso, ela estabelece em seu Padrão Internacional para Laboratórios (ISL) que essa concentração mínima deve ser estimada a uma taxa de falsos negativos de 5% (WADA, 2021a).

A determinação do limite de identificação de um analito é feita utilizando uma curva de resposta de detecção, modelada por uma função sigmoide. Neste trabalho, o modelo de regressão logística empregado se baseia na Equação 1, em que P representa a probabilidade de detecção, x corresponde ao nível de concentração, e b_0 e b_1 são os coeficientes do modelo. Para facilitar esse processo durante as validações de métodos, o LBCD faz uso de uma planilha baseada nesse modelo e estruturada no Microsoft Excel®, conforme descrito por Garrido e colaboradores (2023).

$$P = \frac{e^{(b_0+b_1*x)}}{1+e^{(b_0+b_1*x)}} \quad (\text{Equação 1})$$

3.4.4 Arraste

O estudo do arraste envolve a investigação de uma possível contaminação de uma amostra negativa por outra que contenha a substância de interesse. Essa contaminação pode ocorrer tanto durante o processamento das amostras quanto na análise instrumental, resultando em falsos positivos. Dessa forma, os analitos de uma amostra anterior podem ainda ser detectados na injeção da amostra subsequente, comprometendo a confiabilidade dos resultados e, conseqüentemente, do método analítico (WADA, 2021a).

3.4.5 Efeito de Matriz

O efeito de matriz consiste na avaliação da influência dos componentes presentes na matriz biológica sobre a resposta analítica. Esse efeito pode causar a diminuição ou amplificação do sinal instrumental, comprometendo a precisão e a exatidão dos resultados na identificação do analito. Portanto, esse estudo é essencial para garantir a confiabilidade do procedimento analítico, minimizando interferências provenientes da matriz (WADA, 2021a).

4 METODOLOGIA

4.1 SOLVENTES E REAGENTES

Todos os solventes utilizados para a preparação da fase móvel e das soluções de lavagem, como ácido fórmico, ácido acético glacial, acetonitrila, dimetilsulfóxido (DMSO), isopropanol e metanol, possuíam grau analítico ou HPLC. Esses solventes foram adquiridos da Tedia, localizada em Fairfield (Estados Unidos), ou da Biograde, sediada em Anápolis (Brasil). Além disso, a água ultrapura empregada foi obtida através do sistema de purificação de água tipo 1 da Thermo Fisher Scientific.

Quanto aos reagentes usados na metodologia, como ácido tricloroacético (TCA), fosfato de sódio monobásico, fosfato dissódico e a enzima β -glicuronidase de *E. coli* K12 foram comprados da Merck e da Roche. Os materiais de referência, como molidustat (BAY 85-3934) e D2-GHRP-2 metabólito, foram fornecidos pelas empresas de biotecnologia MedChemExpress (New Jersey, EUA) e AnaSpec (Califórnia, EUA).

4.2 PREPARO DAS AMOSTRAS

Ao realizar uma investigação de substâncias proibidas em amostras por CL-EMAR, é imprescindível reunir um conjunto de controles positivos e negativos. Eles desempenham o papel de referência para os resultados das análises e devem ser submetidos ao mesmo procedimento da amostra, visando minimizar possíveis erros. Esse conjunto inclui o branco de reagente (BR), que contém apenas água ultrapura; o controle de qualidade negativo (CQN), composto por branco de urina; e o controle de qualidade positivo (CQP), referente ao branco de urina fortificado com a substância no qual se deseja confirmar.

A preparação das amostras é iniciada com a fortificação de alíquotas de 1 mL de urina, às quais foram adicionados 10 μ L de uma solução de padrão interno contendo o metabólito D2-GHRP-2 a uma concentração de 1000 ng/mL. Em seguida, as amostras foram hidrolisadas por 1 hora a 50 °C usando 25 μ L de β -glicuronidase de *E. coli* e 200 μ L de tampão fosfato a 0,8 M e pH 7,0. Quando necessário, o pH das amostras foi ajustado para uma faixa de 6,0 a 8,0, visando otimizar a atividade da enzima.

Após a hidrólise enzimática, adicionaram-se 100 μ L de TCA 10% a fim de precipitar as proteínas presentes e evitar interferências na detecção do analito de interesse. Posteriormente, os tubos foram centrifugados a 4 °C e 14000 \times g durante 10 minutos. O sobrenadante foi então transferido para os vials correspondentes e injetado utilizando um método de CL-EMAR.

4.3 CONDIÇÕES INSTRUMENTAIS

O sistema de cromatografia líquida utilizado foi um Dionex Ultimate 3000 acoplado a um espectrômetro de massa de alta resolução Q-Exactive Plus, ambos da Thermo Fisher Scientific. O método cromatográfico foi realizado em duas colunas de fase reversa do tipo ACE UltraCore SuperC18 (2,5 μ m, 50 mm \times 2,1 mm) a 40 °C. As fases móveis A e C foram constituídas por água ultrapura e acetonitrila, ambas contendo 1% de ácido fórmico e 1% DMSO. As soluções de lavagem da seringa, após cada injeção, foram compostas por água ultrapura, acetonitrila, isopropanol e metanol (1:1:1:1) e por água ultrapura e metanol (95:5).

Conforme ilustrado na Tabela 1, o gradiente de eluição começou com 1% da fase móvel C, aumentando para 40% em 10 minutos. Após 1 minuto, a proporção subiu para 90% desse mesmo eluente e, em 13 minutos, alcançou 99%. No final da análise, a coluna foi equilibrada para a sua condição inicial e o tempo total de execução foi de 15 minutos. Destaca-se que a mudança na posição das válvulas ocorreu em 2,2 minutos para a realização da separação cromatográfica na segunda coluna. O volume de injeção foi de 80 μ L e os ajustes realizados na vazão estão descritos na tabela abaixo.

Tabela 1 - Gradiente de eluição da análise cromatográfica.

Tempo (min)	Posição das Válvulas	Vazão (mL/min)	FM A (%)	FM C (%)
0,0	A(1-6)/B(1-2)	0,6	99	1
1,0	A(1-6)/B(1-2)	0,6	99	1
2,0	A(1-6)/B(1-2)	0,4	99	1
2,1	A(1-6)/B(1-2)	0,4	99	1
10,0	A(1-2)/B(1-6)	0,4	60	40
11,0	A(1-2)/B(1-6)	0,4	10	90
13,0	A(1-2)/B(1-6)	0,4	1	99
13,1	A(1-2)/B(1-6)	0,4	99	1
15,0	A(1-2)/B(1-6)	0,4	99	1

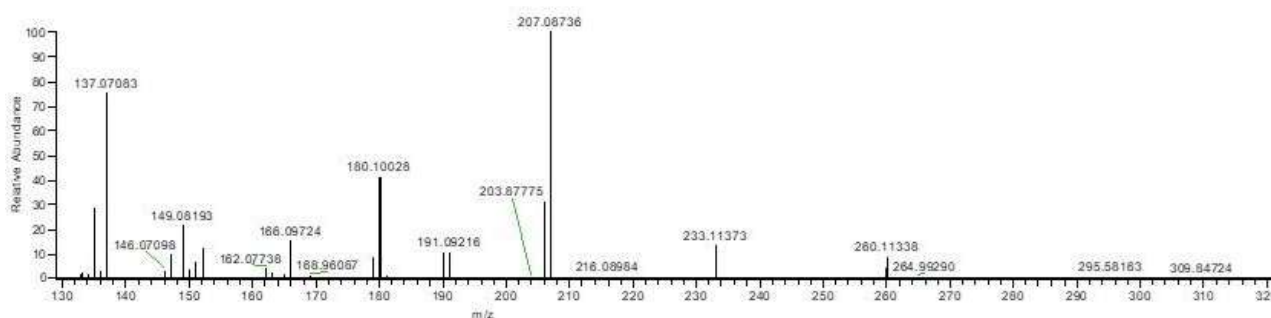
Fonte: Autoria própria.

Após a cromatografia, o efluente da segunda coluna foi bombeado para o Q-Exactive Plus, utilizando o processo *electrospray* como fonte de ionização. Para garantir precisões de massa abaixo de 6 ppm, o espectrômetro de massa foi calibrado diariamente com soluções fornecidas pelo fabricante. Os parâmetros operacionais incluíram a voltagem do spray, a temperatura do capilar e o nível de radiofrequência da lente S, ajustados para 3,5 kV, 280 °C e 60 unidades arbitrárias, respectivamente. Adicionalmente, a vazão do gás nebulizador (*sheath gas*) foi configurada em 55 unidades arbitrárias, enquanto a do gás de secagem (*auxiliar gas*) foi definida em 20 unidades arbitrárias.

O experimento de massas utilizado foi o de monitoramento de reações paralelas (PRM), realizado no modo positivo de ionização, com resolução de 17500 FWHM. O espectro de massa dos íons produto do molidustat (BAY 85-3934) foi obtido a partir de sua molécula protonada $[M+H]^+$, utilizando seu padrão de referência. Com uma energia de colisão normalizada (NCE) de 70, os principais íons produto derivados do íon precursor em m/z 315 foram identificados em m/z 207.08736, 137.07083 e 180.10028 (Figura 4). Essas transições foram fundamentais para a identificação do analito nas amostras.

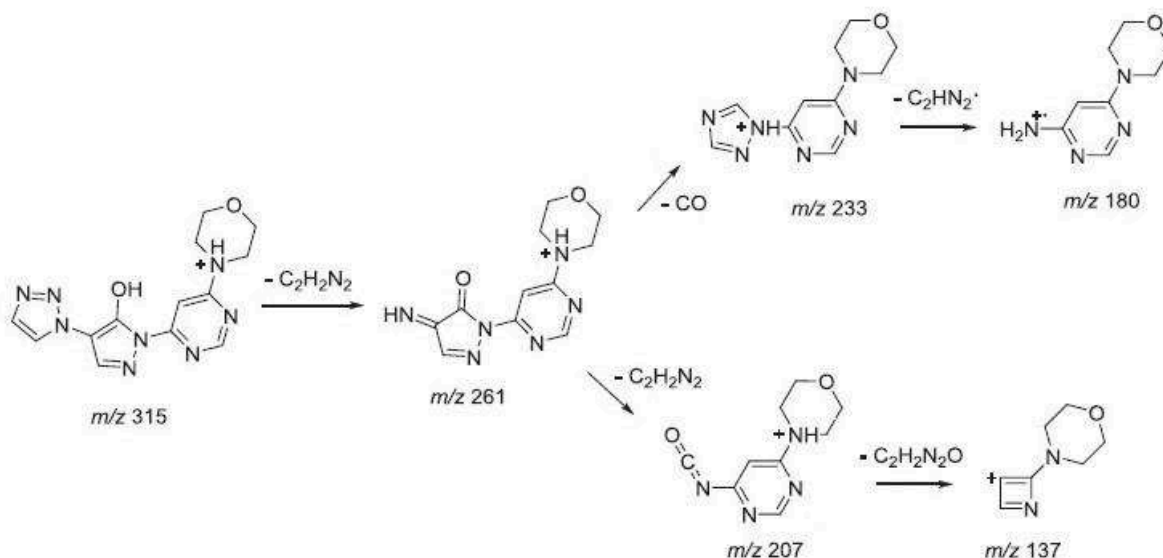
O íon em m/z 261.08984 é resultante da perda do fragmento $[C_2H_2N_2]^+$ da molécula protonada. A eliminação subsequente de monóxido de carbono ou cianeto de hidrogênio desse íon, correspondente à perda de 28 unidades de razão m/z , originou o íon em m/z 233.11373. Adicionalmente, a perda do fragmento $[C_2H_2N_2]^+$ gerou o íon em m/z 207.08736. Outras vias de dissociação resultaram em íons observados em m/z 137.07083 e 180.10028, conforme ilustrado na Figura 5 e sugeridas por Dib e colaboradores (2017).

Figura 5 – Espectro de massa de íons produto de BAY 85-3934 $[M+H]^+$.



Fonte: Autoria própria, utilizando o software Xcalibur®, associado ao Q-Exactive Plus.

Figura 6 – Vias de dissociação de BAY 85-3934 $[M+H]^+$.



Fonte: Adaptado de DIB *et al.* (2017).

4.4 VALIDAÇÃO DO MÉTODO

A validação do método qualitativo baseou-se nas diretrizes do documento *International Standards for Laboratories (ISL)* da WADA. Os ensaios foram conduzidos com dez amostras de urina humana de diferentes origens, as quais foram fortificadas com molidustat em concentração conhecida. Optou-se pelo metabólito D2-GHRP-2 como padrão interno por ser integrante da classe S2 e devido à disponibilidade do material de referência. Ademais, os seguintes parâmetros foram avaliados: linearidade, seletividade, limite de identificação, arraste e efeito de matriz.

4.4.1 Linearidade

Com o propósito de verificar uma correlação entre a concentração do analito e a resposta de detecção, prepararam-se seis amostras de branco de urina de mesma origem. Elas foram fortificadas com a substância de interesse em diferentes níveis de concentração, sendo elas: 0,5 ng/mL; 1,0 ng/mL; 2,5 ng/mL; 5,0 ng/mL; 7,5 ng/mL e 10 ng/mL.

4.4.2 Seletividade

A seletividade do método foi avaliada por meio da preparação e análise, em momentos diferentes, de dois lotes de cinco amostras de branco de urina, sem adição do analito e do padrão interno. As amostras, provenientes de diferentes origens, apresentaram variações em termos de pH, gravidade específica e gênero dos indivíduos, garantindo a representatividade da matriz biológica. Desta forma, a metodologia permite assegurar ausência de interferentes nos tempos de retenção da substância de interesse e do padrão interno usado.

4.4.3 Limite de Identificação

A determinação do limite de identificação foi realizada por meio da análise de seis amostras de urina representativas, cada uma fortificada em seis níveis de concentração distintos, correspondendo a 100%, 50%, 25%, 12,5%, 5% e 2,5% do MRPL. Essas amostras foram divididas em dois lotes e avaliadas em momentos diferentes. A estimativa do LOI foi obtida a partir de uma curva de resposta de detecção modelada por uma função sigmoide, a uma taxa de detecção de 95%. Nesse contexto, é importante destacar que o LOI deve ser inferior ao respectivo MRPL.

4.4.4 Arraste

O estudo do arraste consistiu na injeção de um controle negativo, seguido de um branco de urina fortificado com o analito de interesse a 10 ng/mL. A concentração escolhida representou 500% do MRPL, assegurando concentrações superiores às normalmente encontradas. Posteriormente, foi realizada a reinjeção do CQN a fim de verificar a presença de picos correspondentes ao composto.

4.4.5 Efeito de Matriz

Para analisar o efeito de matriz, foram injetadas três amostras de água ultrapura, cada uma fortificada com a substância em estudo a uma concentração de 2 ng/mL. Os resultados obtidos foram então comparados com aqueles de amostras de urina humana na mesma concentração, avaliando a estabilidade do tempo de retenção. Essa abordagem foi adotada com o intuito de investigar a interferência da matriz na detecção do analito.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 VALIDAÇÃO DO MÉTODO

5.1.1 Linearidade

A análise da linearidade de um método é realizada por meio de uma regressão linear, buscando estabelecer uma relação linear entre o sinal analítico e a concentração da substância de interesse. Os resultados obtidos, apresentados na Tabela 2, permitiram a construção da curva de calibração mostrada na Figura 6, utilizando o método dos mínimos quadrados.

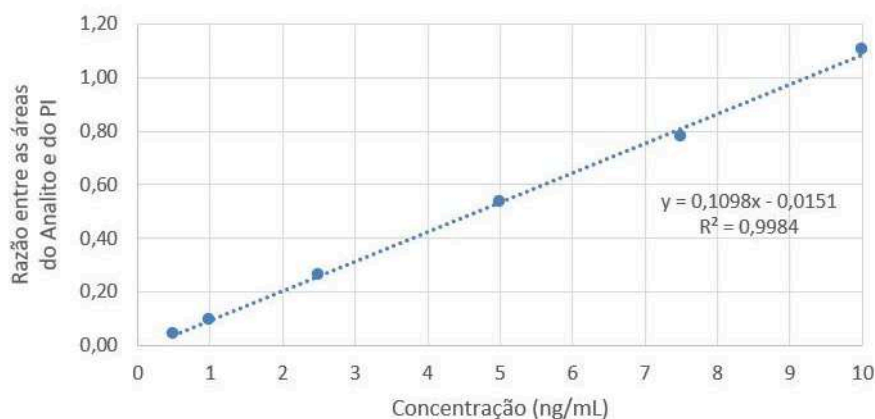
Tabela 2 - Dados obtidos para a realização da curva analítica.

Amostra	Concentração (ng/mL)	Analito m/z 207,08804	PI m/z 244,15250	Razão Analito/PI
AC1	0,5	187567	4189658	0,04
AC2	1,0	337754	3633713	0,09
AC3	2,5	948259	3591583	0,26
AC4	5,0	1783067	3326276	0,54
AC5	7,5	3507228	4508988	0,78
AC6	10,0	4574209	4143758	1,10

Fonte: Autoria própria.

Conforme a RDC n° 166, de 24 de julho de 2017, essa avaliação é feita através dos coeficientes de correlação (R), que deve estar acima de 0,990, e de determinação (R²), que também deve estar o mais próximo de 1,000. A partir da curva de calibração (Figura 6), nota-se que o coeficiente de determinação apresentou um valor de 0,9984 e, consequentemente, o coeficiente de correlação apresentou um valor de 0,9992, confirmando a linearidade do método.

Figura 7 – Avaliação da linearidade entre o sinal analítico e a concentração de molidustat.

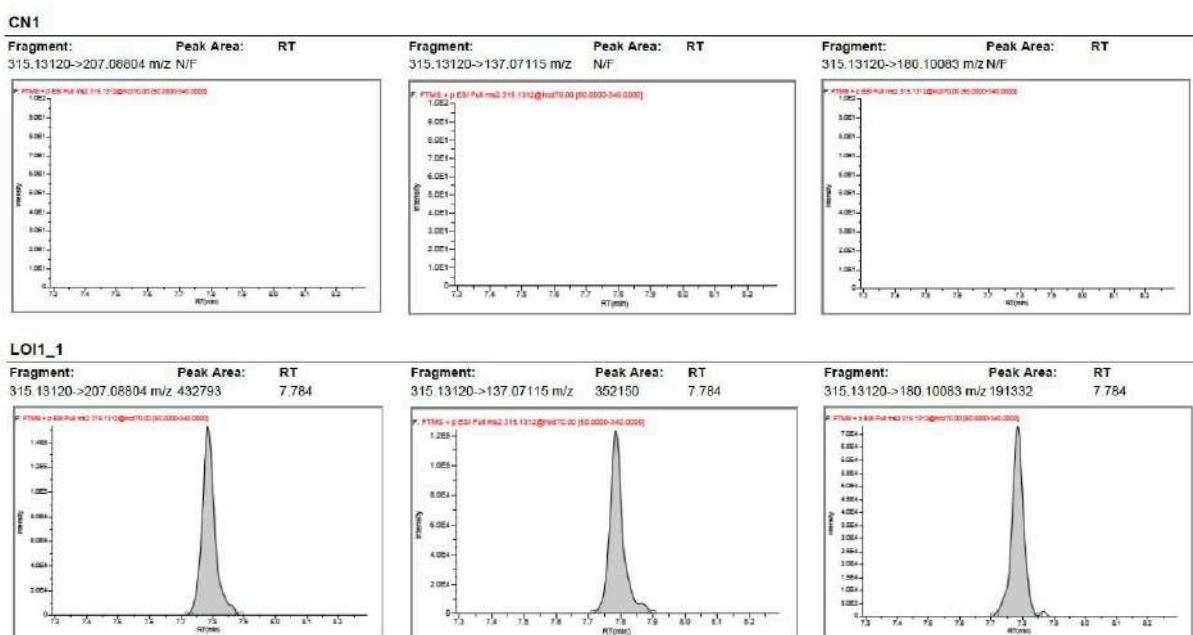


Fonte: Autoria própria, utilizando Microsoft Excel®.

5.1.2 Seletividade

O critério de análise da seletividade do método é definido pela ausência de um pico com mesmo tempo de retenção, área comparável e/ou razão entre os íons produtos. Com o intuito de realizar uma análise comparativa, prepararam-se dez amostras de branco de urina e seus respectivos controles positivos, contendo a substância molidustat e o metabólito D2-GHRP-2. Conforme ilustrado na Figura 7, não foi encontrado nenhum interferente nos tempos de retenção do analito e do padrão interno. Esse resultado foi consistente em todas as amostras de branco de urina analisadas, cujos cromatogramas estão disponibilizados no APÊNDICE A.

Figura 8 – Cromatogramas do controle negativo (CN1 - linha 1) e do controle positivo (LOI1_1 - linha 2) referentes ao experimento de seletividade do molidustat, com cada janela representando uma transição monitorada do analito.



Fonte: Autoria própria, utilizando o software TraceFinder®, associado ao Q-Exactive Plus.

5.1.3 Limite de Identificação

Com o intuito de determinar o limite de identificação (LOI) do molidustat, foram utilizadas seis amostras de urina fortificadas em diferentes concentrações. O limite mínimo de desempenho requerido (MRPL) para o grupo dos agentes ativadores de HIF é de 2 ng/mL, conforme estabelecido no documento técnico da WADA, TD2022MRPL. Esse valor foi usado como referência na avaliação, com todas as concentrações expressas como uma porcentagem

do MRPL (% MRPL). Os resultados estão apresentados na Tabela 3, onde o número 1 indica a detecção do analito e 0 indica que ele não foi detectado.

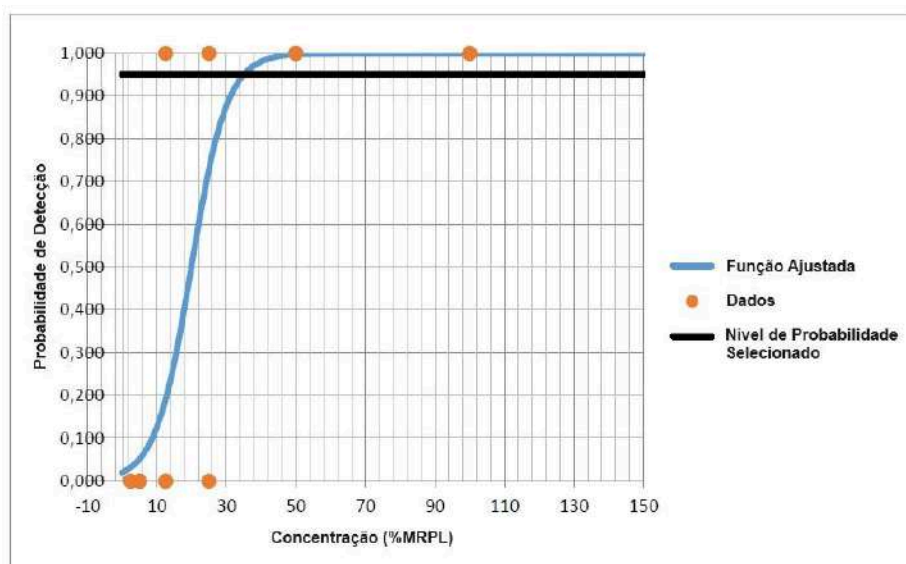
Tabela 3 - Resultado da detecção de molidustat em diferentes níveis de concentração.

Concentração (ng/mL)	Concentração (% MRPL)	Resultado da Detecção					
2,0	100	1	1	1	1	1	1
1,0	50	1	1	1	1	1	1
0,5	25	1	1	1	0	0	1
0,25	12,5	1	1	0	0	0	0
0,1	5	0	0	0	0	0	0
0,05	2,5	0	0	0	0	0	0

Fonte: Autoria própria.

Em posse dos dados da Tabela 3, o LOI foi estimado a partir de uma curva de resposta de detecção modelada por uma função sigmoide (Equação 1), considerando uma taxa de detecção de 95%. Isso, pois, a WADA define que o LOI de uma substância, cujo material de referência está disponível, deve ser determinado com uma taxa máxima de falsos negativos de 5%. A curva de regressão logística, ilustrada na Figura 8, resultou em um LOI estimado de 0,70 ng/mL, valor que está abaixo do MRPL e atende aos critérios da WADA para o procedimento de confirmação de analitos.

Figura 9 – Curva de regressão logística para a determinação do LOI de molidustat.



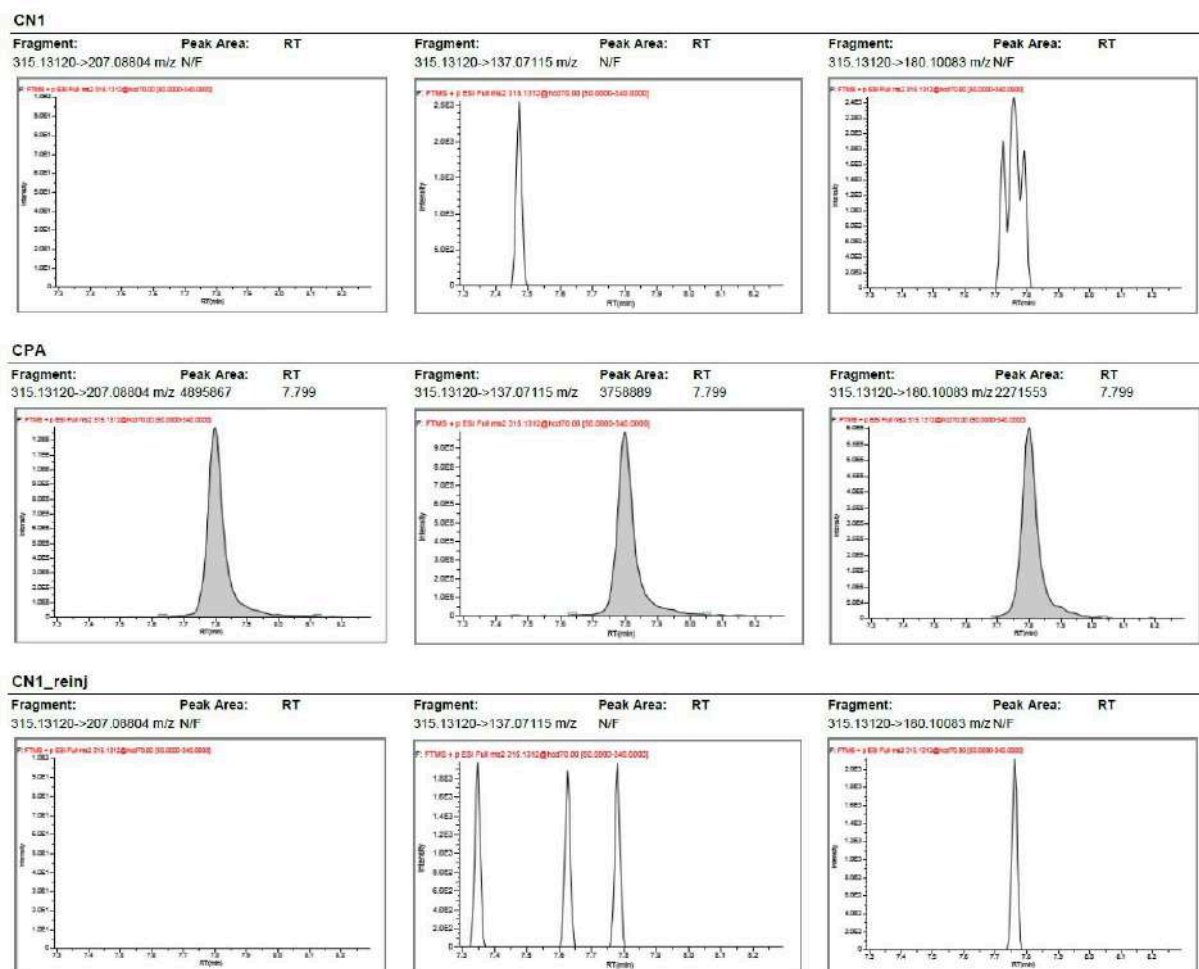
Fonte: Autoria própria, utilizando Microsoft Excel®.

5.1.4 Arraste

O estudo do arraste foi realizado por meio da injeção de uma amostra fortificada em 500% do MRPL, precedida e seguida por duas amostras de controle negativo (CN1 e

CN1_reinj). A ausência de molidustat nas amostras de branco de urina, conforme mostrado na Figura 9, confirma a segurança do método em amostras reais. Além disso, os resultados indicam que o gradiente cromatográfico foi bem ajustado, garantindo o equilíbrio adequado da coluna e a limpeza eficiente da seringa, evitando a transferência de contaminantes.

Figura 10 – Cromatogramas do controle negativo (CN1 - linha 1 e CN1_reinj - linha 3) e da amostra fortificada com molidustat a 500% do MRPL (CPA - linha 2) referentes ao estudo do arraste, com cada janela representando uma transição monitorada do analito.



Fonte: Autoria própria, utilizando o software TraceFinder®, associado ao Q-Exactive Plus.

5.1.5 Efeito de Matriz

O efeito de matriz foi avaliado através da análise comparativa de seis amostras fortificadas com a substância molidustat a uma concentração de 2 ng/mL, sendo metade em água ultrapura e a outra metade em urina humana. Na Tabela 4, percebe-se que o tempo de retenção do analito de interesse permaneceu em 7,8 minutos e os picos cromatográficos apresentaram áreas satisfatórias. Vale ressaltar que esse parâmetro de validação é uma análise

complementar, sem critério estabelecido, e os cromatogramas estão disponibilizados no APÊNDICE B.

Tabela 4 - Tempo de retenção e áreas dos picos cromatográficos do analito.

Amostra	Tempo de Retenção (min)	Analito m/z 207,08804	Analito m/z 137,07115	Analito m/z 180,10083
EM1	7,79	812345	647693	367970
EM2	7,79	771684	603906	332387
EM3	7,79	851322	619473	386085
LOI1_1	7,78	432793	352150	191332
LOI1_2	7,78	513175	410015	237270
LOI1_3	7,78	479643	360810	202224

Fonte: Autoria própria.

6 CONCLUSÕES

O procedimento de confirmação da substância molidustat, utilizando hidrólise enzimática seguida de injeção direta da amostra, foi desenvolvido e validado com sucesso. Após atender a todos os critérios estabelecidos pela WADA no documento técnico "*Minimum Required Performance Levels and Applicable Minimum Reporting Levels for Non-Threshold Substances Analyzed by Chromatographic-Mass Spectrometric Analytical Methods*" e no "*International Standard for Laboratories*", o método foi incorporado à rotina do LBCD.

A avaliação da linearidade demonstrou que a resposta analítica possui uma correlação linear com a concentração do analito. Isso foi evidenciado pelo coeficiente de determinação (R^2), que apresentou um valor de 0,9984, indicando uma excelente linearidade conforme os critérios definidos na RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. Ademais, a seletividade do método foi confirmada pela ausência de interferentes nos tempos de retenção previstos para o analito e o padrão interno em diferentes amostras de urina humana.

Com base nos ensaios realizados, foi possível estimar o limite de identificação da substância molidustat em 0,70 ng/mL, o qual se mostrou satisfatório por estar abaixo do MRPL definido pela WADA para substâncias *non-threshold*. Estas substâncias são analisadas de forma qualitativa, não sendo necessária a determinação de sua concentração na amostra. Além disso, não foi observado o arraste do analito em questão, nem houve efeito dos componentes da matriz no sinal analítico ao substituir urina humana por água ultrapura.

Outro aspecto relevante deste estudo foi o uso da cromatografia líquida bidimensional acoplada à espectrometria de massas de alta resolução, o que permitiu reduzir significativamente o uso de materiais e reagentes, resultando em um procedimento de baixo custo. A automação no processo de limpeza de amostras também proporcionou maior agilidade no preparo, com expressiva economia de tempo. Em comparação com métodos que envolvem a preparação manual das amostras, este ensaio se mostrou competitivo em termos de sensibilidade analítica.

Dessa forma, a abordagem adotada atende às crescentes demandas por um maior volume de amostras em testes de dopagem esportiva, eliminando a preparação laboriosa e mantendo a eficiência necessária para as análises. Como perspectiva futura, propõe-se a inclusão de outros integrantes da classe de agentes ativadores de HIF no método desenvolvido, ampliando sua aplicabilidade.

7 REFERÊNCIAS

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 166, de 24 de julho de 2017.** Disponível em: <https://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC_166_2017_COMP.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401>. Acesso em: 27 maio 2024.

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

AUTORIDADE BRASILEIRA DE CONTROLE DE DOPAGEM. **Programa de Educação Antidopagem.** 2024. Disponível em: <https://www.gov.br/abcd/pt-br/composicao/educacao-e-prevencao/acoes-de-educacao/copy_of_ProgramadeEducaoAntidopagem2024.pdf>. Acesso em: 28 jun. 2024.

CREATIVE PROTEOMICS. Disponível em: <<https://www.creative-proteomics.com/support/q-exactive-hybrid-quadrupole-orbitrap-mass-spectrometer.htm>>. Acesso em: 11 jun. 2024.

DE WILDE, L. *et al.* Identification and confirmation of diuretics and masking agents in urine by turbulent flow online solid-phase extraction coupled with liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry for doping control. **Journal of Chromatography A**, v. 1579, p. 31–40, 2018.

DE WILDE, L. *et al.* Automated sample preparation for the detection and confirmation of hypoxia-inducible factor stabilizers in urine. **Biomedical Chromatography**, v. 35, n. 2, 2021.

DIB, J. *et al.* Mass spectrometric characterization of the hypoxia-inducible factor (HIF) stabilizer drug candidate BAY 85-3934 (molidustat) and its glucuronidated metabolite BAY-348, and their implementation into routine doping controls. **Drug Testing and Analysis**, v. 9, n. 1, p. 61–67, 2017.

FLAMME, I. *et al.* Mimicking Hypoxia to Treat Anemia: HIF-Stabilizer BAY 85-3934 (Molidustat) Stimulates Erythropoietin Production without Hypertensive Effects. **PLoS One**, v. 9, n. 11, 2014.

GARRIDO, B. C. *et al.* Assessing limits of detection in qualitative methods: A simple implementation of logistic regression in a web-based R Shiny application environment and its potential in toxicology and doping control. **Drug Testing and Analysis**, v. 15, n. 1, p. 66–74, 2023.

GÖRGENS, C. *et al.* Recent improvements in sports drug testing concerning the initial testing for peptidic drugs (< 2 kDa) – sample preparation, mass spectrometric detection, and data review. **Drug Testing and Analysis**, v. 10, n. 11-12, p. 1755–1760, 2018.

GÖRGENS, C. *et al.* Simplifying and expanding analytical capabilities for various classes of doping agents by means of direct urine injection high performance liquid chromatography high resolution/high accuracy mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 131, p. 482–496, 2016.

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **Orientações gerais sobre os requisitos da ABNT NBR ISO/IEC 17025:2017 - DOQ-CGCRE-087.** 2018. Disponível em:

<http://www.inmetro.gov.br/credenciamento/eventos-cgcre/13-14-15Workshop/00-DOQ-CG-CRE-087_rev_00_-_Orientacoes_gerais_sobre_os_requisitos_da_ABNT_NBR_ISO_IEC_17025_2017.pdf>. Acesso em: 16 maio 2024.

KAUFMANN, A.; BROMIRSKI, M. Selecting the Best Q Exactive Orbitrap Mass Spectrometer Scan Mode for Your Application. **Thermo Fisher Scientific White Paper 65147**, 2018.

KONERMANN, L. *et al.* Unraveling the Mechanism of Electrospray Ionization. **Analytical Chemistry**, v. 85, n. 1, p. 2-9, 2013.

LABORATÓRIO BRASILEIRO DE CONTROLE DE DOPAGEM. 2024. Disponível em: <<https://www.ladetec.iq.ufrj.br/lbcd/>>. Acesso em: 28 jun. 2024.

LOCATELLI, F. *et al.* Evolving Strategies in the Treatment of Anaemia in Chronic Kidney Disease: The HIF-Prolyl Hydroxylase Inhibitors. **Drugs**, v. 82, n. 16, p. 1565-1589, 2022.

MAZZARINO, M. *et al.* UPLC–MS-Based Procedures to Detect Prolyl-Hydroxylase Inhibitors of HIF in Urine. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 45, p. 184–194, 2021.

MAKAROV, A.; SCIGELOVA, M. Coupling liquid chromatography to Orbitrap mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 25, p. 3938–3945, 2010.

RIBANI, M. *et al.* Validação em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Spectrometric Identification of Organic Compounds**. 7. ed. John Wiley & Sons, INC., p. 1-12, 2005.

SKOOG, D. A.; HOLLER, J. H.; CROUCH, S. R. **Princípios de Análise Instrumental**. 6. ed. Porto Alegre: Bookman, 2009.

WADA. **Who We Are**. 2024a. Disponível em: <<https://www.wada-ama.org/en/who-we-are>>. Acesso em: 01 abr. 2024.

_____. **The Prohibited List**. 2024b. Disponível em: <<https://www.wada-ama.org/en/prohibited-list>>. Acesso em: 01 abr. 2024.

_____. **The 2024 Prohibited List**. 2024c. Disponível em: <https://www.wada-ama.org/sites/default/files/2023-09/2024list_en_final_22_september_2023.pdf>. Acesso em: 01 abr. 2024.

_____. **TD2022MRPL**. 2022. Disponível em: <https://www.wada-ama.org/sites/default/files/2022-01/td2022mrpl_v1.1_eng_0.pdf>. Acesso em: 03 abr. 2024.

_____. **International Standard for Laboratories (ISL)**. 2021a. Disponível em: <https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/isl_2021.pdf>. Acesso em: 03 abr. 2024.

_____. **World Anti-Doping Code**. 2021b. Disponível em: <https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/2021_wada_code.pdf>. Acesso em: 10 abr. 2024.

_____. **TD2023IDCR.** 2023. Disponível em:
<https://www.wada-ama.org/sites/default/files/2023-02/td2023idcrv1.1_eng_final.pdf>.
Acesso em: 03 abr. 2024.

WATERS. **O que é Espectrometria de Massas e como ela funciona?** Disponível em:
<<https://www.waters.com/nextgen/br/pt/education/primers/the-mass-spectrometry-primer/what-is-ms-and-how-does-it-work.html>>. Acesso em: 10 jun. 2024.

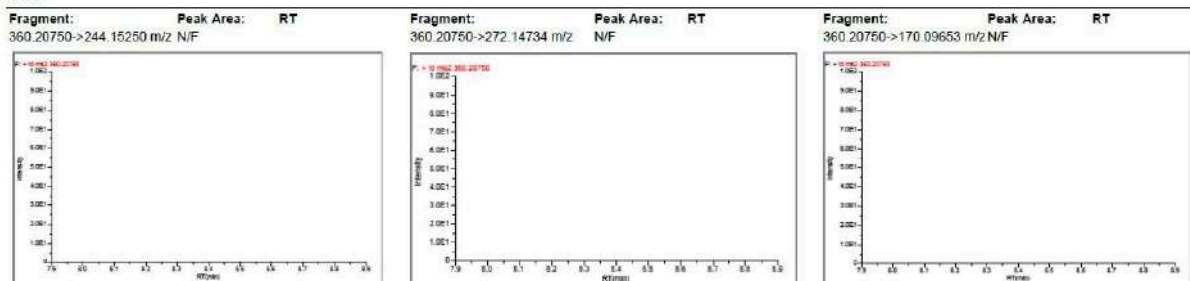
WIGERUP, C.; PÅHLMAN, S.; BEXELL, D. Therapeutic targeting of hypoxia and hypoxia-inducible factors in cancer. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 164, p. 152–169, 2016.

ZHANG, W. Progress in Mass Spectrometry Acquisition Approach for Quantitative Proteomics. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, v. 42, n. 12, p. 1859-1868, 2014.

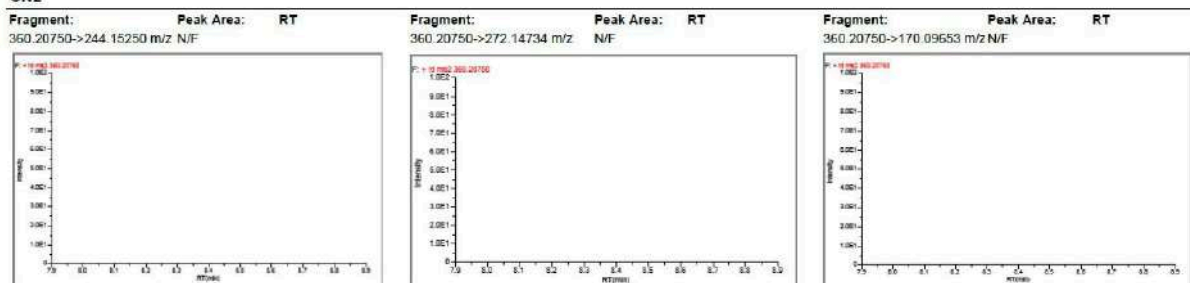
APÊNDICE A – CROMATOGRAMAS REFERENTES AO ENSAIO DE SELETIVIDADE

Análise dos fragmentos do metabólito D2-GHRP-2 nas dez amostras de branco de urina utilizadas (CN1 à CN10).

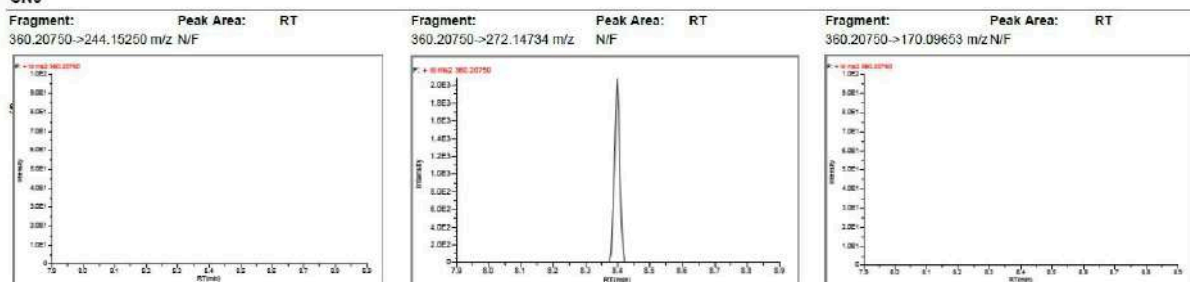
CN1



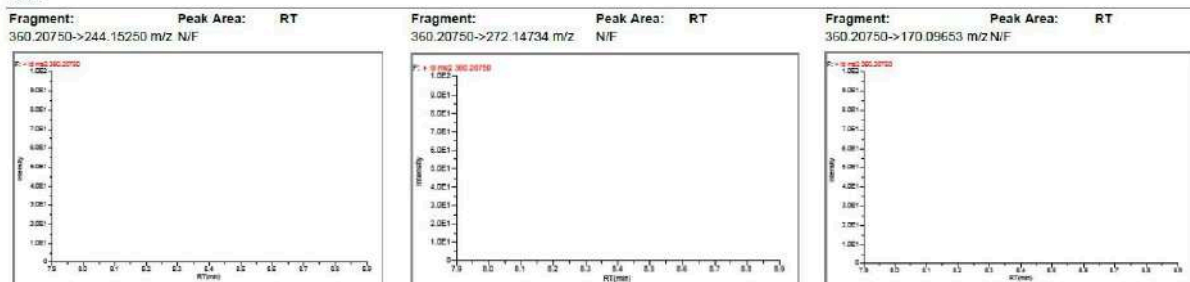
CN2



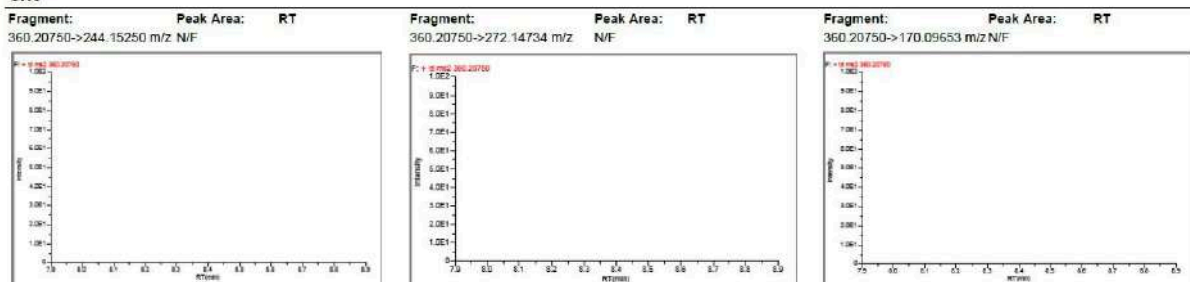
CN3



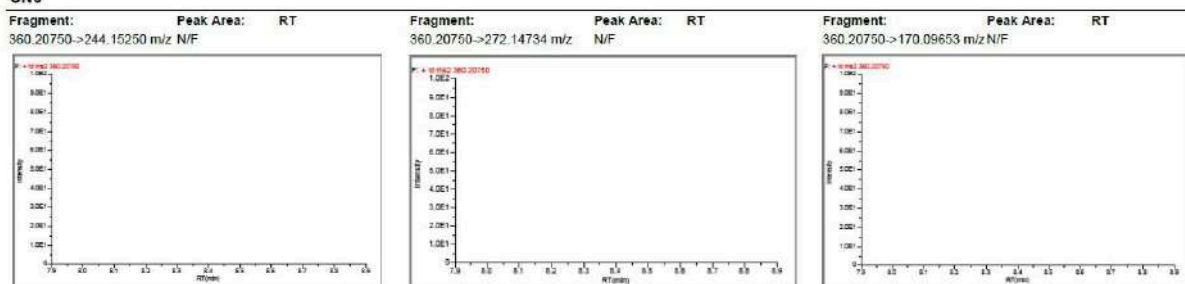
CN4



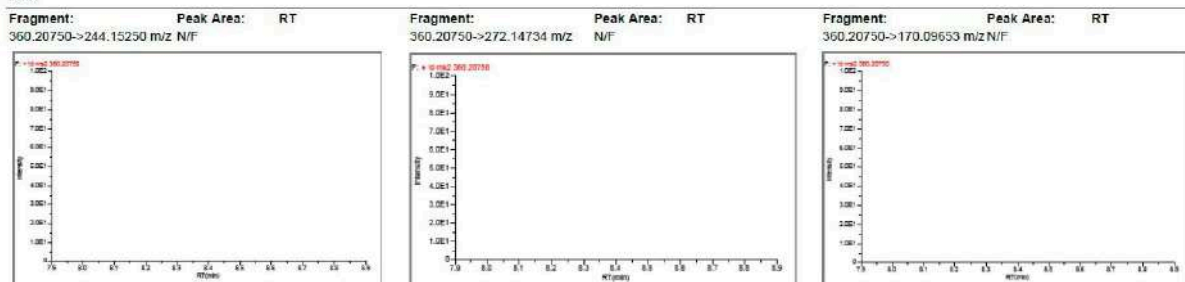
CN5



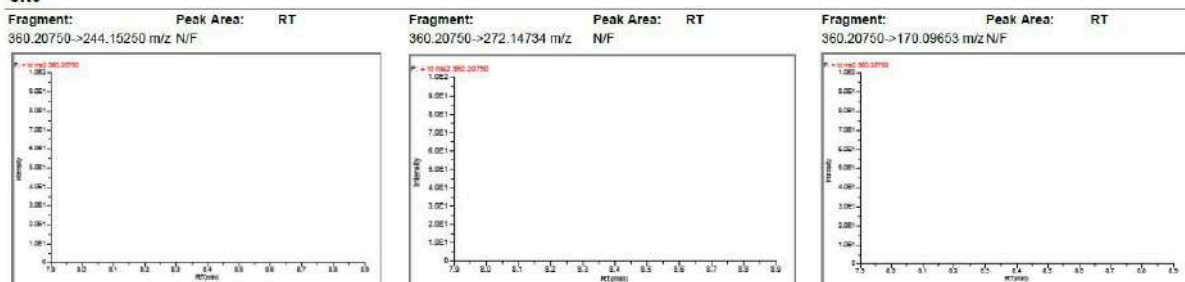
CN6



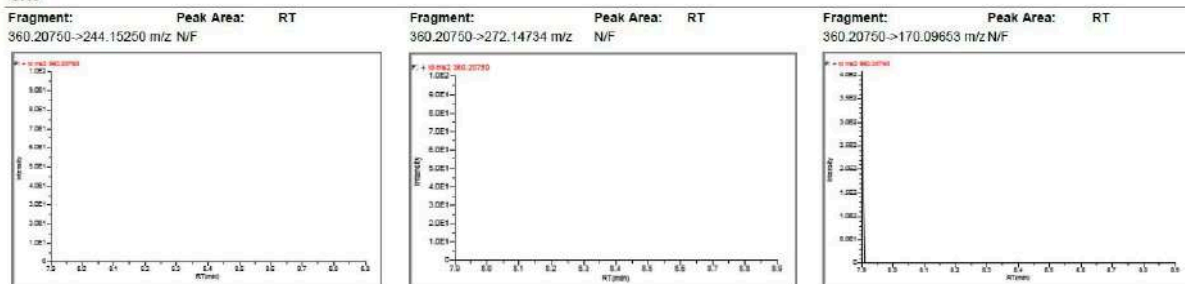
CN7



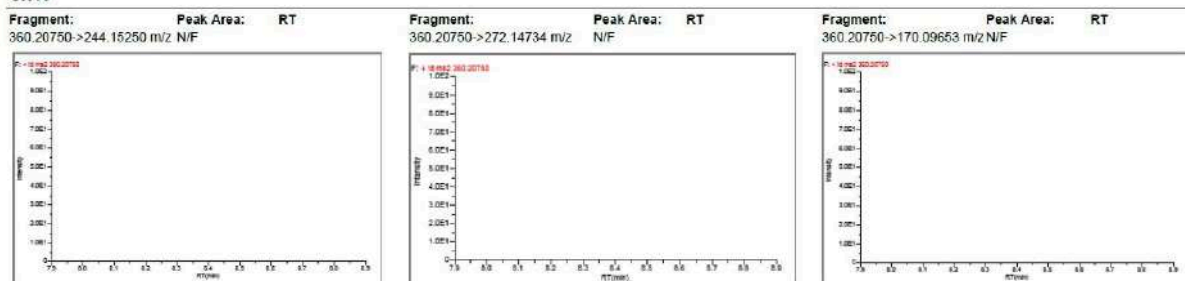
CN8



CN9



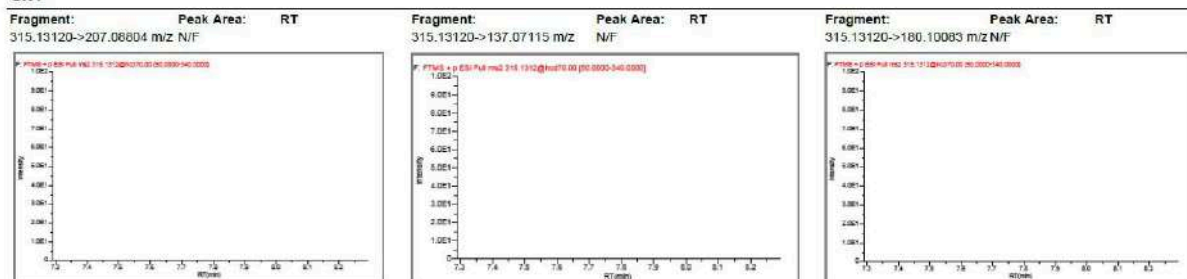
CN10



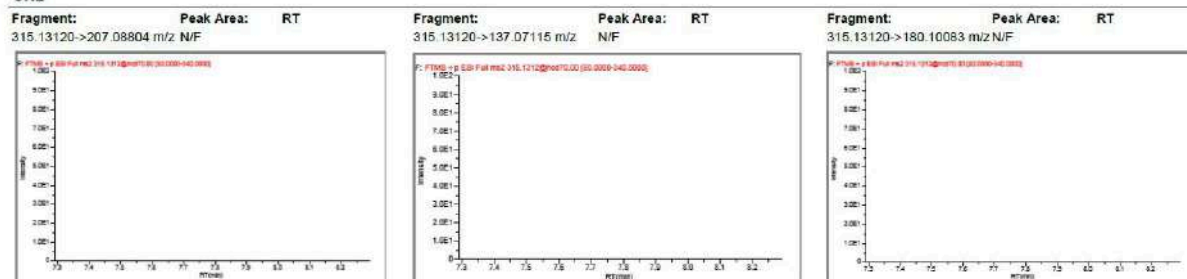
Fonte: Autoria própria, utilizando o software TraceFinder®, associado ao Q-Exactive Plus.

Análise dos fragmentos de Molidustat nas dez amostras de branco de urina utilizadas (CN1 à CN10).

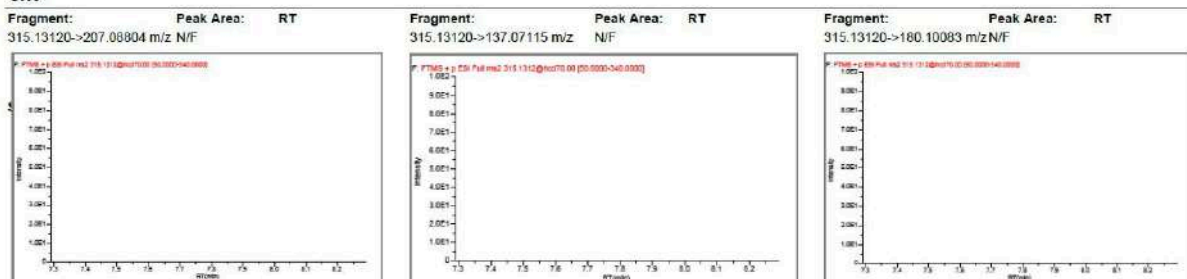
CN1



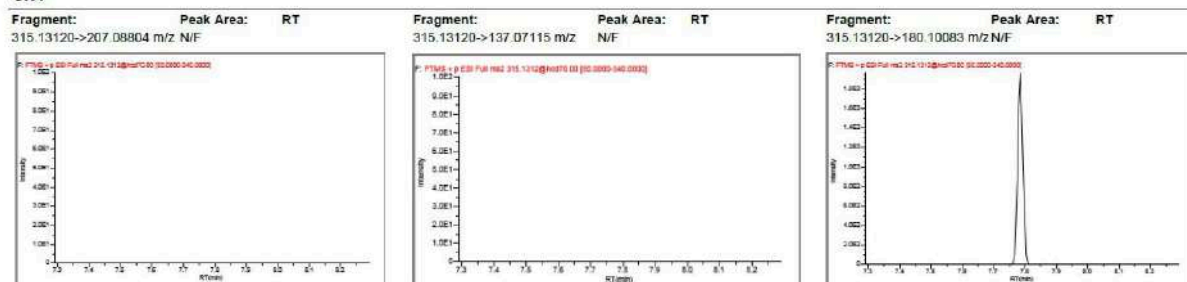
CN2



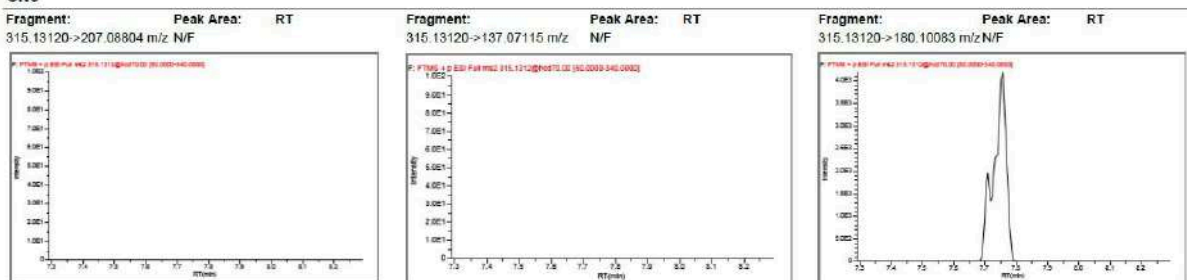
CN3



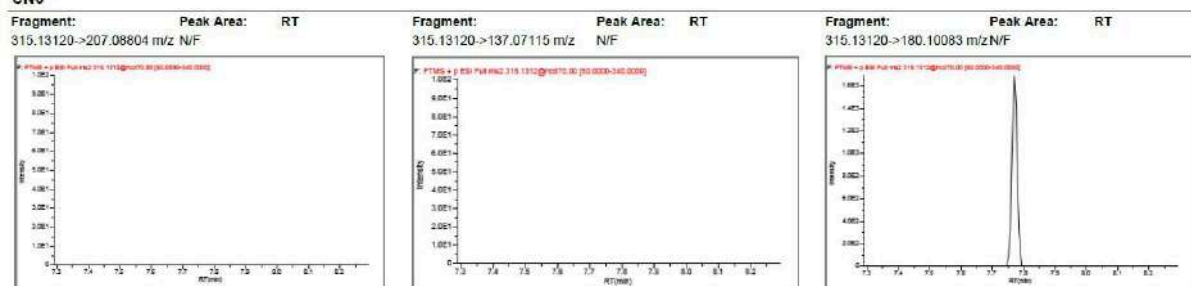
CN4



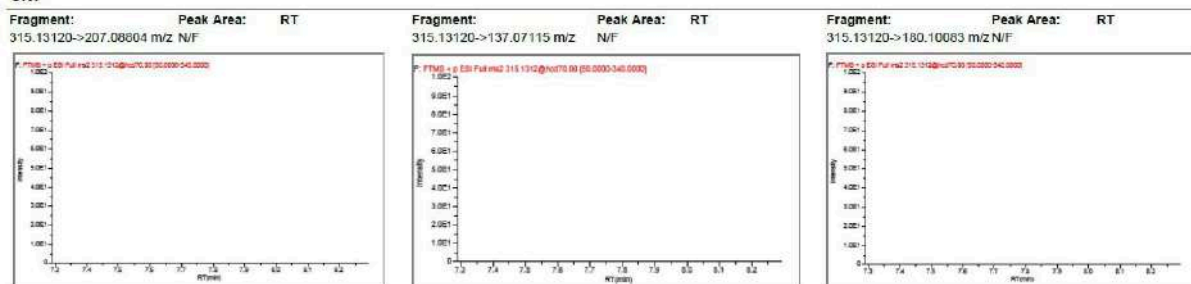
CN5



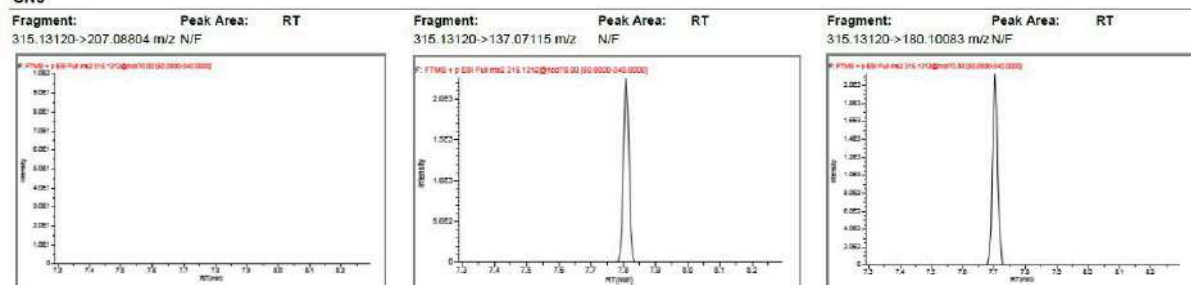
CN6



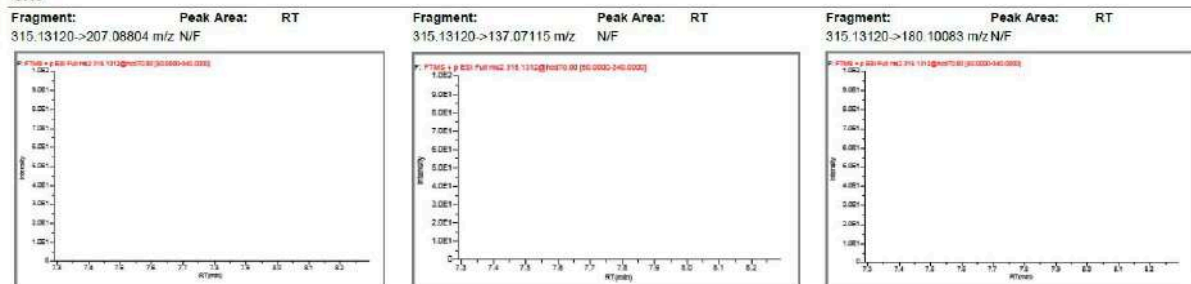
CN7



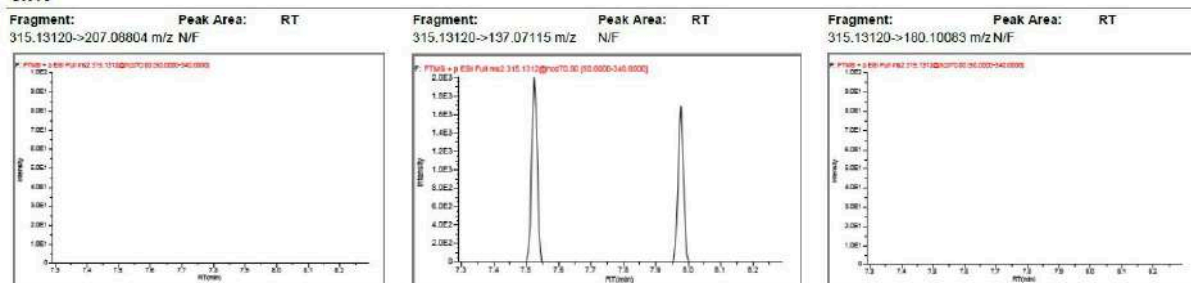
CN8



CN9



CN10



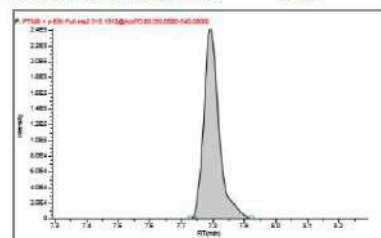
Fonte: Autoria própria, utilizando o software TraceFinder®, associado ao Q-Exactive Plus.

APÊNDICE B – CROMATOGRAMAS REFERENTES AO ESTUDO DO EFEITO DE MATRIZ

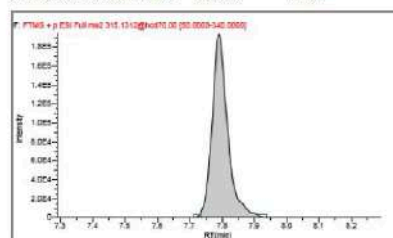
Análise dos fragmentos de Molidustat nas seis amostras fortificadas, sendo três em água ultrapura (EM1 à EM3) e três em urina humana (LOI1_1 à LOI1_3).

EM1

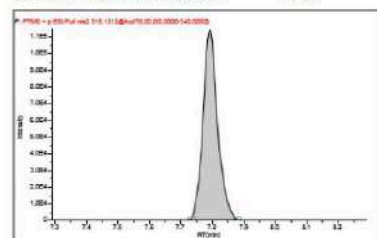
Fragment: 315.13120->207.08804 m/z
Peak Area: 812345
RT: 7.794



Fragment: 315.13120->137.07115 m/z
Peak Area: 647693
RT: 7.789

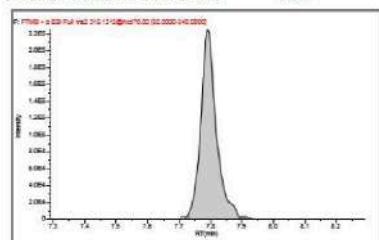


Fragment: 315.13120->180.10083 m/z
Peak Area: 367970
RT: 7.789

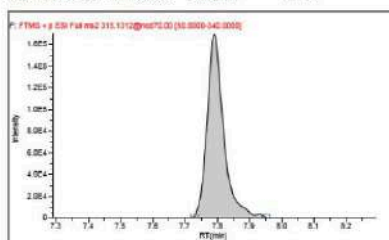


EM2

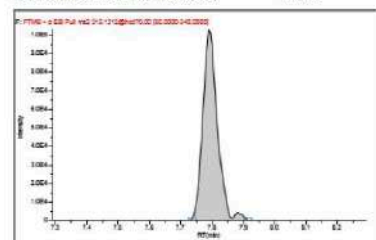
Fragment: 315.13120->207.08804 m/z
Peak Area: 771684
RT: 7.789



Fragment: 315.13120->137.07115 m/z
Peak Area: 603906
RT: 7.789

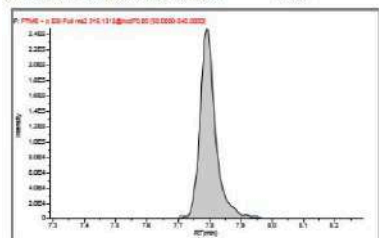


Fragment: 315.13120->180.10083 m/z
Peak Area: 332387
RT: 7.789

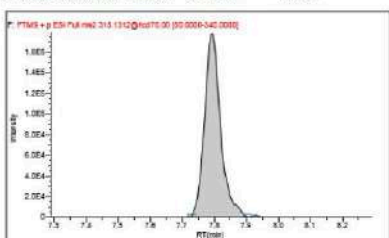


EM3

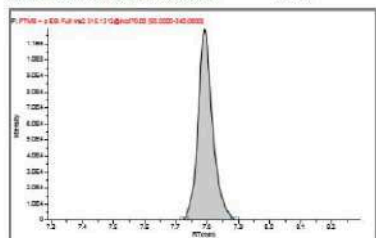
Fragment: 315.13120->207.08804 m/z
Peak Area: 651322
RT: 7.789



Fragment: 315.13120->137.07115 m/z
Peak Area: 619473
RT: 7.794

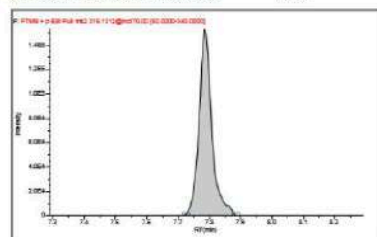


Fragment: 315.13120->180.10083 m/z
Peak Area: 386005
RT: 7.789

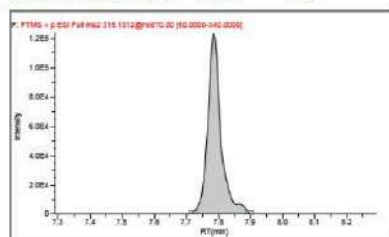


LOI1_1

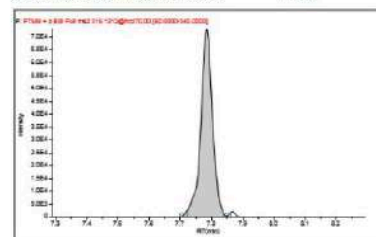
Fragment: 315.13120->207.08804 m/z
Peak Area: 432793
RT: 7.784



Fragment: 315.13120->137.07115 m/z
Peak Area: 352150
RT: 7.784

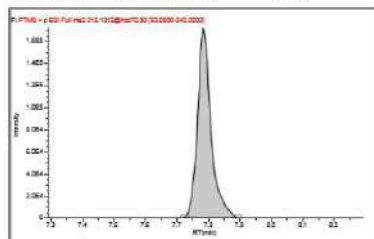


Fragment: 315.13120->180.10083 m/z
Peak Area: 191332
RT: 7.784

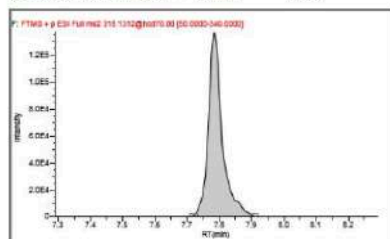


LOI1_2

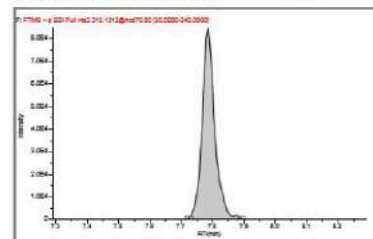
Fragment: 315.13120->207.08804 m/z 513175
Peak Area: RT
7.784



Fragment: 315.13120->137.07115 m/z 410015
Peak Area: RT
7.784

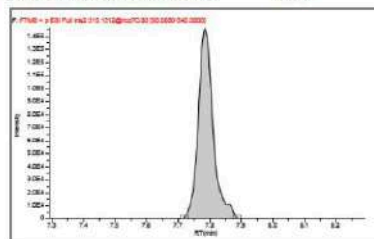


Fragment: 315.13120->180.10063 m/z 237270
Peak Area: RT
7.784

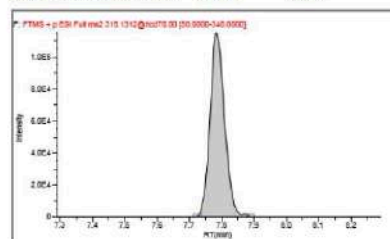


LOI1_3

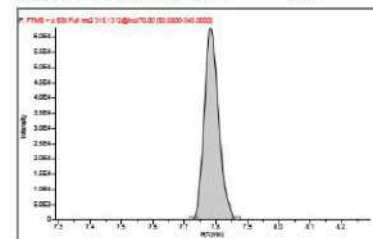
Fragment: 315.13120->207.08804 m/z 479643
Peak Area: RT
7.784



Fragment: 315.13120->137.07115 m/z 360810
Peak Area: RT
7.784



Fragment: 315.13120->180.10083 m/z 202224
Peak Area: RT
7.779



Fonte: Autoria própria, utilizando o software TraceFinder®, associado ao Q-Exactive Plus.