

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

INSTITUTO DE QUÍMICA

PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ANDRESSA CRISTINA DOS SANTOS MARQUES

AVALIAÇÃO ESTEROIDAL EM PACIENTES COM INCIDENTALOMAS ADRENAIS
POR CROMATOGRAFIA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS

RIO DE JANEIRO

2025

Andressa Cristina dos Santos Marques

AVALIAÇÃO ESTEROIDAL EM PACIENTES COM INCIDENTALOMAS ADRENAIS
POR CROMATOGRAFIA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Química
da Universidade Federal do Rio de Janeiro,
como requisito parcial para obtenção do grau
de Doutora em Ciências.

Orientadora: Prof^a. Dra. Monica Costa Padilha

RIO DE JANEIRO

2025

M315a

Marques, Andressa Cristina dos Santos
Avaliação esteroidal em pacientes com
incidentalomas adrenais por cromatografia acoplada à
espectrometria de massas / Andressa Cristina dos
Santos Marques. -- Rio de Janeiro, 2025.
189 f.

Orientadora: Monica Costa Padilha.
Tese (doutorado) - Universidade Federal do Rio
de Janeiro, Instituto de Química, Programa de Pós
Graduação em Química, 2025.

1. Cromatografia. 2. Cortisol. 3. Síndrome de
Cushing. 4. Espectrometria de massas. I. Costa
Padilha, Monica, orient. II. Título.

Andressa Cristina dos Santos Marques

**AVALIAÇÃO ESTEROIDAL EM PACIENTES COM INCIDENTALOMAS
ADRENAIS POR CROMATOGRAFIA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE
MASSAS**

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Química
da Universidade Federal do Rio de Janeiro,
como requisito parcial para obtenção do grau
de Doutora em Ciências (Ênfase em
Química).

Aprovada em: 16/07/2025

Documento assinado digitalmente
 **MONICA COSTA PADILHA**
Data: 16/07/2025 15:44:54-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof^a. Monica Costa Padilha (UFRJ)

Documento assinado digitalmente
 **LEANDRO SOTER DE MARIZ E MIRANDA**
Data: 17/07/2025 09:47:35-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Leandro Soter de Mariz e Miranda (UFRJ)

Documento assinado digitalmente
 **FERNANDA VERONESI MARINHO PONTES**
Data: 17/07/2025 10:41:41-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof^a. Fernanda Veronesi Marinho Pontes (UFRJ)

Documento assinado digitalmente
 **FERNANDO HENRIQUE CINCOTTO**
Data: 17/07/2025 11:05:45-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Fernando Henrique Cincotto (UFRJ)

Documento assinado digitalmente
 **VIVIAN MARIA SAEZ MARTINEZ**
Data: 17/07/2025 11:21:39-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof^a. Vivian Maria Saez Martinez (UFRJ)

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai, Amir, pelo apoio, ajuda e chão que foi em todos esses anos. Se hoje estou aqui, sem dúvidas foi pelo seu incentivo a estudar. Obrigada por tudo.

À minha professora e orientadora Monica Padilha, por ter me aceitado como sua orientanda, pela sua preocupação e apoio. Obrigada pela sua confiança, pela ajuda, paciência e acolhimento.

É impossível escrever os agradecimentos sem pensar em uma pessoa, Jéssica Fontes, minha parceira de laboratório. Você foi meu suporte, me deu ânimo e forças pra continuar em muitos momentos. Eu tenho uma admiração gigante por você, tanto na vida profissional quanto na pessoal. Te desejo luz em qualquer caminho que você escolha trilhar, pois é isso que você leva para todos que conhece.

Agradeço aos amigos que fui criando ao longo do caminho, por tantas vezes me ouvirem e me fazerem esquecer os momentos mais difíceis e tornarem eles mais leves. Não vou citar nomes, justamente para não deixar ninguém de fora, mas vocês sabem quem são. Obrigada por tanto.

Agradeço também ao Mateus, que por tantas vezes me incentivou, ficou ao meu lado durante a escrita, por vezes me levou ao laboratório aos finais de semana... Sou eternamente grata por compartilhar minha vida contigo. Seu apoio foi e é fundamental.

Queria também agradecer ao LBCD e sua equipe; em especial ao Márcio e Gabriel, que sempre se dispuseram a me ajudar a mexer nos cromatógrafos, inclusive quando eu pedia socorro aos finais de semana. Também agradeço a todos do LAPAA, em especial a Bruna, pois sempre se dispôs a ajudar quando possível. Sua dedicação lhe levará longe. Agradeço também aos meus colegas da triagem XVI, Gustavo e Soneca, que me deram forças para terminar de vez a escrita. Deixo meu agradecimento também ao Gustavo Cavalcante, que foi apoio em muitos momentos.

Agradeço ainda ao LADETEC e ao Instituto de Química da UFRJ. Agradeço especialmente aos doutores Leonardo Vieira Neto e Aline Barbosa Moraes, por cederem as amostras oriundas do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho.

Também deixo meu agradecimento para a CAPES, pela bolsa e por tornar viável o desenvolvimento deste trabalho.

Por fim, a todos que me ajudaram, direta ou indiretamente, na realização deste projeto, deixo aqui o meu mais sincero agradecimento.

RESUMO

MARQUES, Andressa Cristina dos Santos. Avaliação esteroidal em pacientes com incidentalomas adrenais por cromatografia acoplada a espectrometria de massas. Rio de Janeiro, 2025. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2025.

Incidentalomas adrenais são massas com tamanho igual ou superior a 1 cm, detectadas na glândula adrenal durante exames de imagem de rotina. Os incidentalomas adrenais não funcionantes (IANF) são caracterizados pela ausência de secreção excessiva de hormônios. Entretanto, em alguns casos, observa-se a liberação de esteroides específicos, como o cortisol, cuja atuação no organismo é extensa. A liberação excessiva de cortisol resulta na Síndrome de Cushing (SC), cujo fenótipo é característico e facilitador do diagnóstico. Em outros casos, a liberação é sutil, mas suficiente para aumentar a morbidez e a mortalidade, sendo denominada secreção autônoma branda de cortisol (SABC). A quantificação do cortisol é geralmente realizada por imunoensaios, que podem ser inespecíficos e gerar reações cruzadas. A distinção entre pacientes com IANF e SABC é crucial, pois as abordagens terapêuticas são diferentes e podem incluir a retirada da glândula adrenal. Assim, o objetivo deste estudo foi quantificar o cortisol em urina e plasma por meio de cromatografia líquida, além de validar os respectivos métodos. Adicionalmente, foram avaliados outros esteroides para observar possíveis alterações entre as diferentes classificações de pacientes. A etapa inicial do trabalho envolveu testes preliminares à validação, incluindo a verificação de matriz substituta, e a validação seguindo os parâmetros estabelecidos na RDC 166/17 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Os métodos foram aplicados a uma população de referência e a uma coorte de pacientes do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho. Os valores de cortisol na população de referência estavam dentro dos limites esperados, com distinções entre os sexos, possivelmente atribuídas ao uso de anticoncepcionais. Na coorte de pacientes, foram observadas diferenças estatísticas entre pacientes com SC e o grupo controle, com e sem o uso de dexametasona, um princípio ativo que suprime o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal. Diferenças estatísticas também foram observadas entre o grupo controle e os pacientes com

IANF, destacando a importância de monitorar esses pacientes e a possibilidade de reclassificação futura. Entre os demais hormônios, apenas a androstenodiona na coorte feminina apresentou diferença significativa entre o grupo controle e o grupo com SC, independentemente do uso de medicamentos.

Palavras-chave: cortisol, síndrome de Cushing, SABC, cromatografia, espectrometria de massas, validação.

ABSTRACT

MARQUES, Andressa Cristina dos Santos. Steroid evaluation in patients with adrenal incidentalomas by chromatography coupled to mass spectrometry. Rio de Janeiro, 2025. Thesis (Doctorate in Chemistry) – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2025.

Adrenal incidentalomas are masses measuring 1 cm or more, detected in the adrenal gland during routine imaging exams. Non-functioning adrenal incidentalomas (NFAIs) are characterized by the absence of excessive hormone secretion. However, in some cases, specific steroids, such as cortisol, are released, which have extensive effects on the body. Excessive cortisol release results in Cushing's Syndrome (CS), characterized by a distinctive phenotype that facilitates diagnosis. In other cases, the release is subtle but sufficient to increase morbidity and mortality, referred to as mild autonomous cortisol secretion (MACS). Cortisol quantification is generally performed using immunoassays, which can be non-specific and generate cross-reactions. Distinguishing between patients with NFAI and MACS is crucial, as therapeutic approaches differ and may include adrenal gland removal. Therefore, this study aimed to quantify cortisol in urine and plasma using liquid chromatography and validate the respective methods. Additionally, other steroids were evaluated to observe possible alterations among the different patient classifications. The initial phase of the study involved preliminary tests prior to validation, including surrogate matrix verification. The validation followed the parameters established in RDC 166/17 by the Agência Nacional de Vigilância Sanitária. The methods were applied to a reference population and a cohort of patients from Clementino Fraga Filho University Hospital. Cortisol values in the reference population were within expected limits, with distinctions between sexes possibly attributed to contraceptive pills. In the patient cohort, statistical differences were observed between patients with CS and the control group, with and without the use of dexamethasone, an active pharmaceutical ingredient that suppresses the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. Statistical differences were also observed between the control group and patients with NFAI, highlighting the importance of monitoring these patients and the possibility of future reclassification. Among other hormones, only androstenedione in the female cohort

showed a significant difference between the control group and the group with CS, regardless of medication use.

Keywords: cortisol, Cushing's syndrome, MACS, chromatography, mass spectrometry, validation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema da glândula adrenal.....	25
Figura 2. Cascata de formação dos esteroides.	26
Figura 3. Estrutura molecular do cortisol.....	27
Figura 4. Esquema do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) e liberação do hormônio cortisol. CRH: Hormônio Liberador de Corticotrofina; ACTH: hormônio adrenocorticotrófico. Criado com BioRender.com.....	29
Figura 5. Metabólitos de excreção do cortisol. Adaptado de SANDEEP; WALKER, 2001.	30
Figura 6. Diagrama de blocos de um sistema de cromatografia gasosa.	38
Figura 7. Diagrama de blocos de componentes comumente vistos em cromatografia líquida.....	41
Figura 8. Esquema da ionização por eletrospray.	45
Figura 9. Reação de sililação com MSTFA. Y = O, S, NH, NR', COO.....	50
Figura 10. Esquema do estado de transição em uma reação de sililação.	50
Figura 11. Moléculas alvo monitoradas nas análises por cromatografia gasosa e líquida.....	66
Figura 12. Esquema das moléculas avaliadas em plasma e urina e as técnicas analíticas utilizadas.	67
Figura 13. Cromatograma de íons extraídos da androstenodiona, testosterona e cortisol em soro humano após 24 horas com carvão ativado.....	88
Figura 14. Cromatograma de íons extraídos do soro humano após procedimento de extração em fase sólida feito por 5 vezes.	89
Figura 15. Comparação das curvas analíticas em simplicatas nas três matrizes testadas para o cortisol: <i>pool</i> de plasma (retirada fixa e variável de alíquotas), solução de cloreto de sódio a 0,85% (<i>m/v</i>) e na matriz de plasma simulada (<i>simulated body fluid</i> - SBF).	91
Figura 16. Seletividade do cortisol na urina.	98
Figura 17. Avaliação de seletividade em plasma para os analitos cortisol, testosterona, androstenodiona e progesterona.	99
Figura 18. Avaliação de seletividade para epitestosterona em matriz sintética de plasma. (a) matriz SBF com albumina a 7% (<i>m/v</i>) sem adição de padrão. (b)	

Fortificação a 0,1 ng/mL do analito. (c) Fortificação a 1,2 ng/mL do analito. (d) Fortificação a 0,1 ng/mL do analito com subtração do sinal da matriz.	101
Figura 19. Curvas analíticas do cortisol em urina e plasma, androstenodiona, testosterona, epitestosterona e progesterona em plasma.	105
Figura 20. Gráficos de resíduos dos analitos verificados.	107
Figura 21. Comparação das matrizes sintéticas utilizadas nas construções das curvas analíticas e as curvas em urina e plasma real para o cortisol.	110
Figura 22. LD de 0,033 ng/mL em branco de urina. LQ de 0,1 ng mL ⁻¹ em branco de urina (b), LD no branco de plasma de 0,05 ng mL ⁻¹ (c) LQ de 0,150 ng mL ⁻¹ em branco de plasma (d).	115
Figura 23. Primeiros pontos da curva de calibração e LQs da androstenodiona, testosterona, progesterona e epitestosterona.	116
Figura 24. Avaliação de pico cromatográfico da progesterona na População de referência.	123
Figura 25. Gráficos de boxplot com os valores de cortisol da população de referência na urina e plasma.	124
Figura 26. Amostras de urina antes (a) e após (b) a administração de dexametasona; plasma antes (c) e após (d) a dexametasona. Os asteriscos indicam diferenças estatísticas entre os grupos mencionados.	134
Figura 27. Comparações entre diferentes analitos antes e após a administração de dexametasona 1 mg. Ao lado, é indicado o zoom para observação da mudança da mediana entre as amostras. Testes feitos com amostras pareadas.	137
Figura 28. Avaliação de androstenodiona no plasma feminino entre as diferentes coortes de pacientes. Na segunda coluna, foi retirada a classificação de SC para melhor visualização.	138
Figura 29. PCA das amostras de plasma pós dexametasona. *retirado o grupo SABC para as amostras masculinas.	140

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores de corte para diagnóstico de SABC e possível SABC de acordo com a literatura.....	33
Tabela 2. Concentrações utilizadas, em ng/mL, nos mixes para curvas de calibração e controles nas análises de plasma por cromatografia gasosa.....	62
Tabela 3. Pontos de fortificação da curva de calibração na metodologia de avaliação de cortisol em urina por cromatografia líquida.....	72
Tabela 4. Pontos de fortificação da curva de calibração na metodologia de avaliação de esteroides em plasma por cromatografia gasosa; a unidade das concentrações é de ng/mL.	74
Tabela 5. Concentração dos pontos das curvas de calibração utilizadas na avaliação de linearidade.....	78
Tabela 6. Concentrações dos analitos, em ng/mL, nos controles de qualidade baixo (CQB), médio (CQM) e alto (CQA) usados na análise de precisão.....	80
Tabela 7. Variações realizadas para avaliação da robustez.	82
Tabela 8. Comparação das curvas analíticas de fortificação de cortisol em diferentes matrizes. Comparação entre um <i>pool</i> de plasma, pool de plasma com retirada fixa de alíquotas, solução de cloreto de sódio a 0,85% (<i>m/v</i>) e na matriz de plasma simulada (<i>simulated body fluid</i> - SBF).	91
Tabela 9. Comparação da concentração de íons presentes no plasma, SBF e NaCl a 0,85%. Comparação entre plasma e SBF retirada de Kokubo e colaboradores, 2006.	92
Tabela 10. Área obtida do cortisol em diferentes métodos de extração.....	94
Tabela 11. Resultados do teste de desproteinização com diferentes agentes.....	96
Tabela 12. Estimativa do erro calculado nos primeiros pontos da curva de calibração utilizando a regressão linear simples.	103
Tabela 13. Avaliação de paralelismo entre as curvas realizadas com plasma sintético e plasma real do cortisol.	109
Tabela 14. Avaliação de repetibilidade e precisão intermediária para o cortisol em urina e plasma.....	111
Tabela 15. Resultados da repetibilidade, Exatidão e precisão intermediária da testosterona em plasma.	113

Tabela 16. Resultados da repetibilidade, Exatidão e precisão intermediária da androstenodiona em plasma.	113
Tabela 17. Resultados da repetibilidade, Exatidão e precisão intermediária da epitestosterona em plasma.	114
Tabela 18. Resultados da repetibilidade, Exatidão e precisão intermediária da progesterona em plasma.	114
Tabela 19. Resultados do LQ para cortisol em urina e plasma.	116
Tabela 20. Resultados de LQ para androstenodiona, testosterona, epitestosterona e progesterona.	117
Tabela 21. Dados de robustez para o cortisol em plasma.	119
Tabela 22. Dados de recuperação dos analitos.	119
Tabela 23. Avaliação de arraste dos analitos.	120
Tabela 24. Informações gerais da população de referência.	121
Tabela 25. Dados da concentração da população de referência por cromatografia líquida.	122
Tabela 26. Comparação dos resultados encontrados para androstenodiona e testosterona por cromatografia líquida e cromatografia gasosa. Valores em ng/mL.	127
Tabela 27. Resultados de cortisol nas duas matrizes nas amostras obtidas do hospital, separadas por tipos de pacientes.	131
Tabela 28. Resumo das informações de plasma, divididas entre grupos.	135
Tabela 29. Média dos valores encontrados para os analitos em urina (valores basais – antes do uso do medicamento). Valores em ng/mL.	136

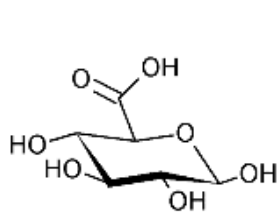
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

a	Coeficiente angular
ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
Adiol	5 α -androstano-3 α ,17 β -diol
Andro	Androsterona
ANVISA	Agência nacional de vigilância sanitária
AP	Aldosteronismo primário
b	Coeficiente linear
CBG	Globulina ligadora de cortisol (<i>cortisol binding globulin</i>)
CRH	Hormônio liberador da corticotrofina
DHEA	Desidroepiandrosterona
LBCD	Laboratório Brasileiro de Controle de Dopagem
LADETEC	Laboratório de Apoio ao Desenvolvimento Tecnológico
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CG-EM/EM	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas do tipo triplo quadrupolo
DPR	Desvio Padrão relativo
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EFS	Extração em fase sólida
ELISA	Ensaio de imunabsorção enzimática (<i>enzyme immunosorbent assay</i>)
ELL	Extração líquido-líquido
EM	Espectrometria de massas
ESI	Ionização por electrospray (<i>electrospray ionization</i>)

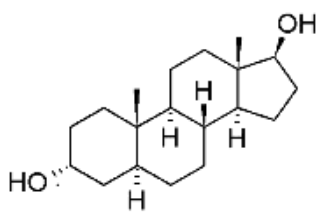
Etio	Etiocolanolona
FE	Fase estacionária
FM	Fase móvel
HPA	Hipotálamo-hipófise-adrenal
HPLC-EM/EM	Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas do tipo triplo quadrupolo
11β HSD	11- hidroxiestereode desidrogenase
HUCFF	Hospital Universitário Clementino Fraga Filho
IANF	Incidentaloma adrenal não funcionante
INMETRO	Instituto nacional de metrologia, qualidade e metrologia
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
MeOH	Metanol
MSTFA	N-trimetilsilil-N-metil trifluoroacetamida
MTBE	Metil-terc-butil-éter
<i>m/z</i>	Razão massa/carga
PE	Perfil endógeno
PI	Padrão interno
R²	Coeficiente de determinação
RPM	Rotações por minuto
SABC	Secreção autônoma branda de cortisol
SC	Síndrome de cushing
SDU	Solução Derivatizante de Uso
S/R	Razão sinal/ruído

SRM	Monitoramento dos ions selecionados – (<i>Selection Reaction Monitoring</i>)
TMS	Trimetil silila
t_R	Tempo de retenção

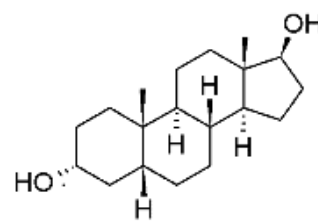
ESTRUTURA DAS MOLÉCULAS CITADAS



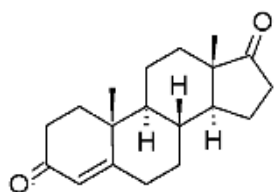
Ácido glicurônico



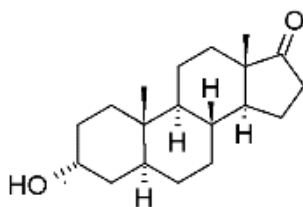
5α-androstan-3α,17βdiol



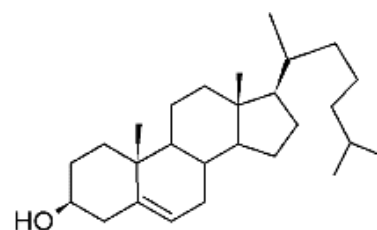
5β-androstan-3α,17βdiol



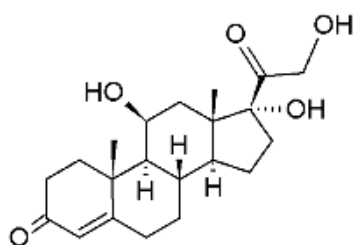
Androstenodiona



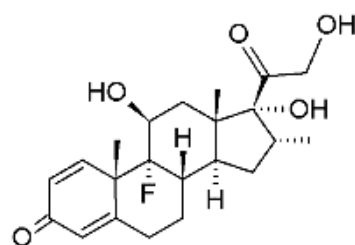
Androsterona



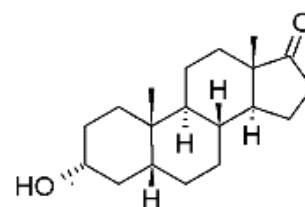
Colesterol



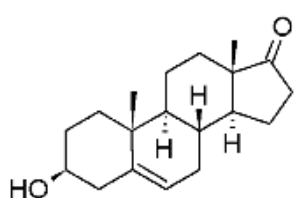
Cortisol



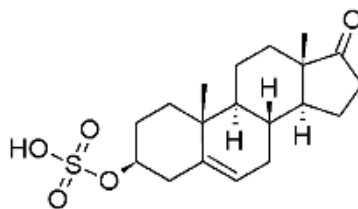
Dexametasona



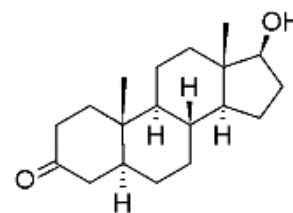
Etiocolanolona



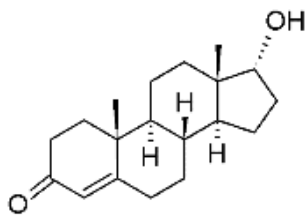
DHEA



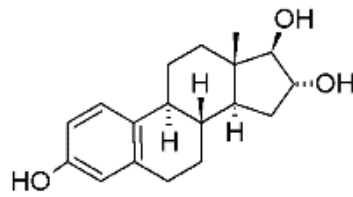
DHEAS



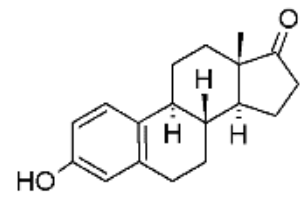
DHT



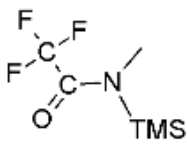
Epitestosterona



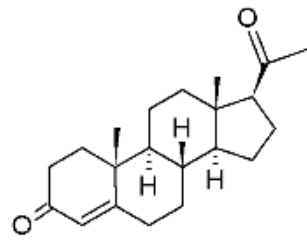
Estriol



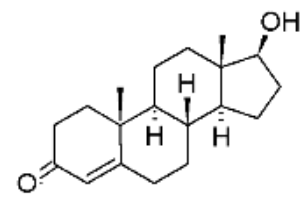
Estrona



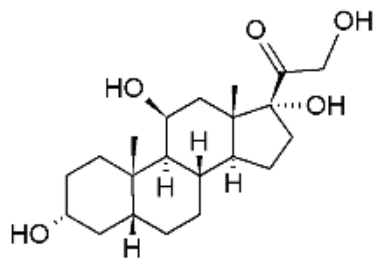
MSTFA



Progesterona



Testosterona



Tetrahydrocortisol

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	24
1.1. INCIDENTALOMAS ADRENAIS E GLÂNDULA ADRENAL.....	24
1.2. CORTISOL.....	27
1.3. ANOMALIAS RELACIONADAS AO AUMENTO DA SECREÇÃO DE CORTISOL	30
1.4. MÉTODOS DE DETECÇÃO DA SC E DA SABC	33
1.5. RELEVÂNCIA DO DIAGNÓSTICO PRECOCE	35
1.6. CROMATOGRAFIA E ESPECTROMETRIA DE MASSAS – DEFINIÇÕES	36
1.6.1. Cromatografia gasosa	38
1.6.2. Cromatografia líquida de alta eficiência.....	39
1.6.3. Espectrometria de massas	42
1.7. PREPARO DE AMOSTRAS PARA ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA.....	47
1.8. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS	52
2. OBJETIVOS.....	55
2.1. OBJETIVO GERAL	55
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	55
3. JUSTIFICATIVA	55
4. METODOLOGIA	57
4.1. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS.....	57
4.1.1. Padrões	57
4.1.2. Reagentes e solventes	58
4.1.3. Equipamentos	58
4.1.4. Sistema cromatográfico e espectrômetro de massas	59
4.2. PREPARO DE SOLUÇÕES	60

4.2.1. Preparo de soluções padrão e mixes de padrão	60
4.2.2. Preparo dos brancos de urina e plasma sintéticos	63
4.2.3. Preparo dos tampões	64
4.2.4. Preparo da solução derivatizante de uso (SDU)	64
4.2.5. Preparo das soluções de fase móvel (SFM)	64
4.3. ALVOS ANALÍTICOS	65
4.4. COLETA DE AMOSTRAS – PACIENTES E POPULAÇÃO DE REFERÊNCIA.....	67
4.5. TESTES ANTERIORES À VALIDAÇÃO	69
4.5.1. Escolha da matriz sintética para plasma	69
4.5.2. Métodos de preparação das amostras em plasma	69
4.5.3. Escolha do solvente de desproteinização	71
4.6. PREPARO DAS AMOSTRAS	71
4.6.1. Preparo das amostras de urina	71
4.6.2. Preparo das amostras de urina para avaliação de cortisol	72
4.6.3. Preparo das amostras de plasma para cromatografia líquida.....	73
4.6.4. Preparo das amostras de plasma para análise na cromatografia gasosa	74
4.7. CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS DO SISTEMA CROMATOGRÁFICO E DO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS	75
4.8. VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS DE CORTISOL EM URINA HUMANA E PLASMA	77
4.8.1. Seletividade.....	78
4.8.2. Linearidade.....	78
4.8.3. Efeito de matriz.....	79
4.8.4. Precisão.....	80
4.8.5. Exatidão.....	81
4.8.6. Limites de detecção e de quantificação	81

4.8.7. Robustez	82
4.8.8. Arraste	83
4.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	83
4.9.1. Teste de Grubbs	83
4.9.3. Teste de Cochran.....	84
4.9.4. Testes de comparação de medias/medianas – Teste T, ANOVA, Mann-Whitney U e Kruskal-Wallis	85
4.10. PROGRAMAS UTILIZADOS PARA PROCESSAMENTO DE DADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	86
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	86
5.1. TESTES ANTERIORES À VALIDAÇÃO DAS METODOLOGIAS.....	86
5.1.1. Escolha da matriz sintética para o plasma.....	86
5.1.2. Comparação de métodos de extração dos endógenos em plasma	93
5.1.3. Teste de desproteinização.....	95
5.2. VALIDAÇÃO DOS ESTEROIDES EM URINA E PLASMA POR CROMATOGRAPHIA LÍQUIDA.....	97
5.2.1. Seletividade.....	97
5.2.2. Linearidade.....	102
5.2.3. Efeito matriz	108
5.2.4. Precisão e exatidão	110
5.2.5. Limites de detecção e de quantificação	115
5.2.6. Robustez	118
5.2.7. Arraste	120
5.3. ANÁLISE DAS AMOSTRAS.....	120
5.3.1. Resposta da população de referência	120
5.3.2. Comparação entre pacientes.....	128
6. CONCLUSÕES	140
7. REFERÊNCIAS.....	142

APENDICE A – Sugestões de fragmentação dos analitos avaliados por cromatografia líquida. Estruturas obtidas com o software MassFrontier.....	156
APÊNDICE B – TEMPOS DE RETENÇÃO DOS ANALITOS, PADRÕES INTERNOS E PARÂMETROS DO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS NAS ANÁLISES POR CROMATOGRAPHIA LÍQUIDA.....	159
APÊNDICE C – TESTE DE GRUBBS, TESTE DE COCHRAN E DADOS DAS CURVAS DE CALIBRAÇÃO PARA OS ANALITOS MONITORADOS POR CROMATOGRAPHIA LÍQUIDA	160
APÊNDICE D – RESULTADOS DA AVALIAÇÃO DO EFEITO DE MATRIZ.....	164
APÊNDICE E – DADOS DOS PARÂMETROS DE REPETIBILIDADE E PRECISÃO INTERMEDIÁRIA DOS ANALITOS AVALIADOS POR CROMATOGRAPHIA LÍQUIDA.....	170
APÊNDICE F - DADOS DE ROBUSTEZ DOS ANALITOS AVALIADOS POR CROMATOGRAPHIA LÍQUIDA.	176
APÊNDICE G – RESULTADOS DA POPULAÇÃO DE REFERÊNCIA	180
APÊNDICE H – RESULTADO DAS AMOSTRAS DOS PACIENTES DO HOSPITAL (PLASMA BASAL E APÓS DEXAMETASONA; URINA BASAL E APÓS DEXAMETASONA).....	181
ANEXO - RESULTADOS DO PLASMA DA POPULAÇÃO DE REFERÊNCIA – CROMATOGRAPHIA GASOSA (RETIRADO DE FONTES, 2023).	189

1. INTRODUÇÃO

1.1. INCIDENTALOMAS ADRENAIS E GLÂNDULA ADRENAL

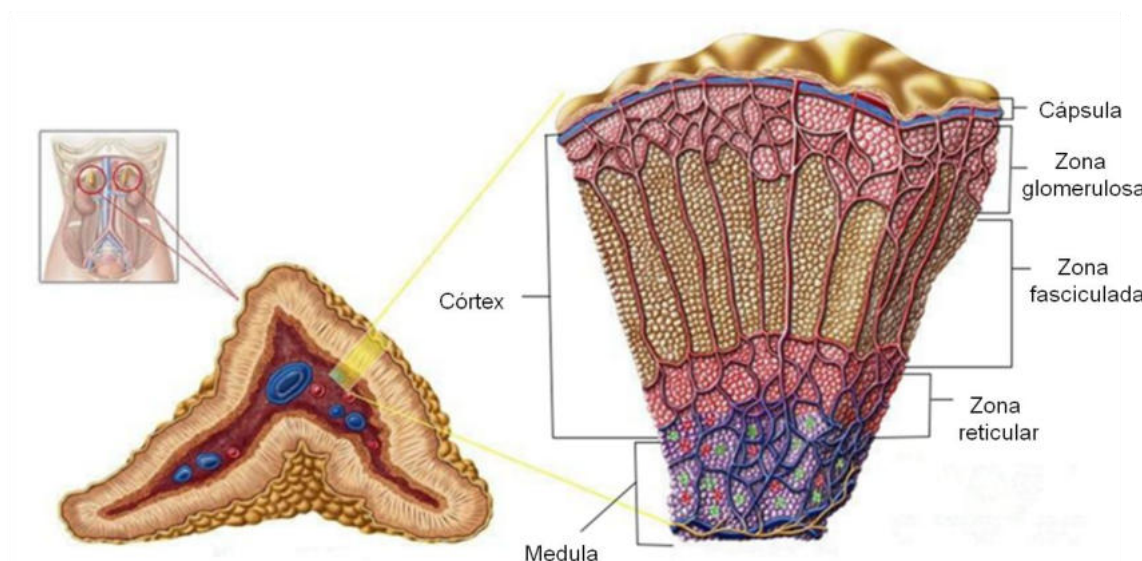
Incidentalomas adrenais (IA) são massas de tamanho igual ou superior a 1 cm encontradas na glândula adrenal (também chamada de suprarrenal) em exames rotineiros de imagem para avaliação de sintomas não relacionados a esta glândula (Cuthbertson *et al.*, 2023). Estima-se que os IA são descobertos em 0,2 a 7,0% do total de exames de imagens, número que pode variar de acordo com a idade (Hána *et al.*, 2019). Alguns estudos relatam que IA podem ser encontrados em até 10% da população geral (Araujo-Castro, Casals, *et al.*, 2023).

A presença deste tumor é mais comum em pessoas de pele branca; em relação ao gênero, a prevalência é incerta na literatura até o momento. Alguns estudos relatam que a presença de IA é maior em pacientes do sexo feminino (em torno de 1,7 mulheres para cada homem); outros estudos indicam que esta aparição é independente de gênero (Araujo-Castro, Pascual-Corrales e Lamas, 2023; Araujo-Castro, Sampedro Núñez e Marazuela, 2019).

O IA pode ser visto em apenas uma das glândulas adrenais, sendo chamado de unilateral, a qual representa a maior parte dos casos vistos. Caso seja observada a presença nas duas glândulas, é chamado de bilateral, sendo vista em aproximadamente 15% dos casos totais de IA (Araujo-Castro, Sampedro Núñez e Marazuela, 2019).

Em relação à fisiologia da adrenal em humanos, a mesma pode ser dividida em região da medula e do córtex, como visto na Figura 1, devido à presença de tecidos distintos. A medula é responsável pela liberação de catecolaminas, como noradrenalina e adrenalina. O córtex pode ser separado em três regiões bem definidas: zona glomerulosa (parte externa), zona fasciculada (meio) e zona reticular (parte interna). Cada região é responsável pela liberação de um tipo de corticosteroide, os quais são designados os hormônios liberados por essa glândula (Silverthorn, 2010).

Figura 1. Esquema da glândula adrenal.



Fonte: Imagem de livre utilização modificada de EdgarasLe, CC BY-SA 4.0, Wikimedia Commons.
Disponível em: <https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0>. Acesso em 21 de outubro de 2024.

A zona glomerulosa é responsável pela síntese de mineralocorticoides, que regulam o transporte de sódio, minerais e água em tecidos. Dentre os hormônios enquadrados neste tipo, a aldosterona é o produzido em maior quantidade (Fuller e Young, 2005).

A zona fasciculada é responsável pela produção da maior parte de glicocorticoides, assim como os esteroides androgênicos. Os glicocorticoides participam da atividade catabólica e estão presentes no metabolismo de carboidratos, o que dá origem ao nome destes esteroides. Dentre os glicocorticoides, o cortisol é o principal esteroide (Katsu *et al.*, 2016).

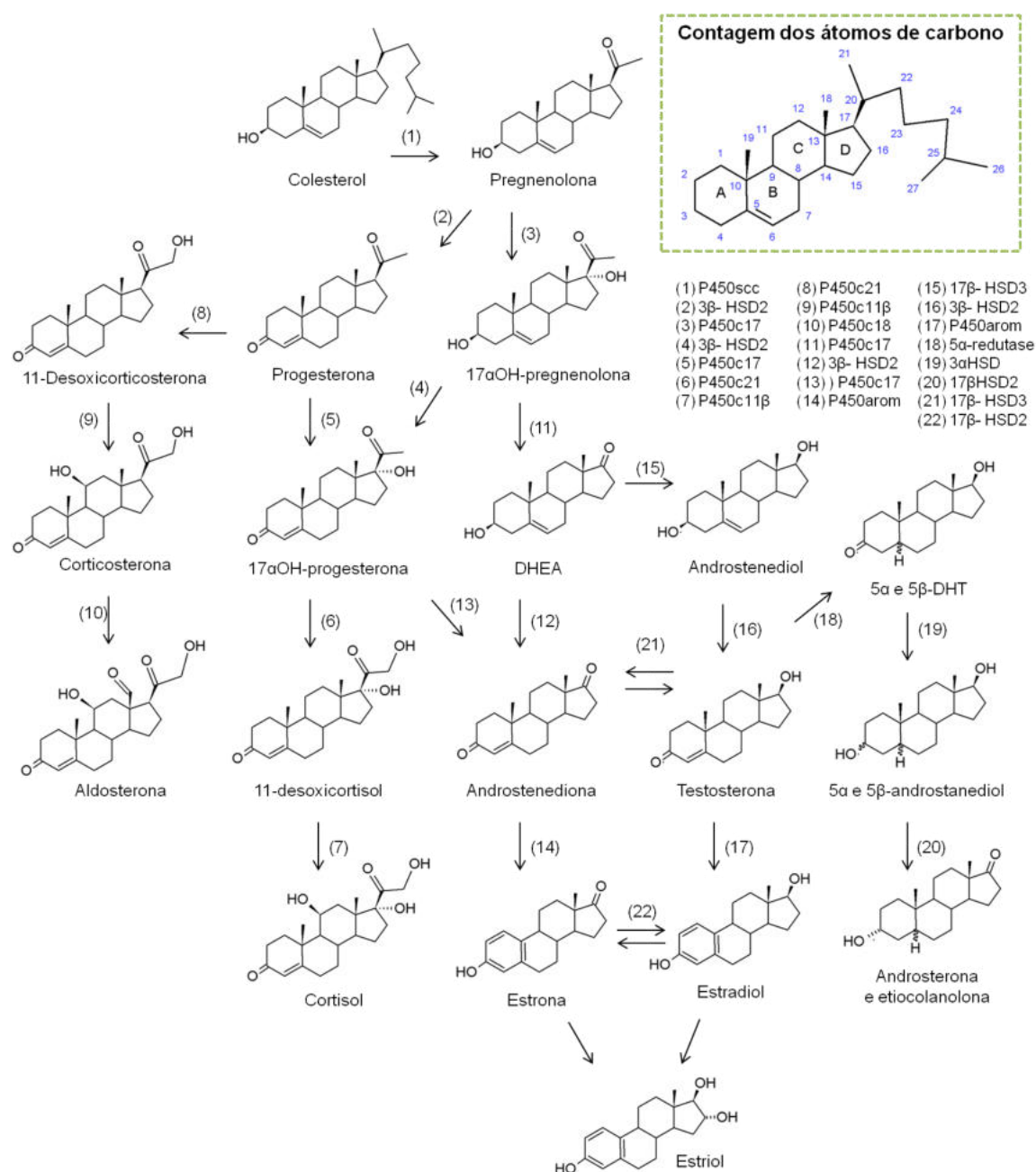
A zona reticular só é desenvolvida cerca de três anos após o nascimento e também é a zona responsável pela produção dos esteroides androgênicos e glicocorticoides. Dentre os androgênicos, pode-se destacar a desidroepiandrosterona (DHEA), androstenodiona, testosterona, progesterona e a progesterona (Molina, 2014).

Os hormônios liberados pelo córtex apresentam em comum o esqueleto esteroidal; ou seja, a presença de 17 átomos de carbono divididos em 3 anéis de seis membros e um anel de cinco membros, formando o

ciclopentanoperidrofenantreno. A numeração deste esqueleto está indicada na Figura 2.

A esteroidogênese (síntese) dos corticosteroides, nome dado aos hormônios formados pela glândula adrenal, tem como ponto inicial a conversão do colesterol em pregnenolona pela enzima p450scc (Molina, 2014). A conversão e as enzimas responsáveis por cada etapa encontram-se no esquema a seguir.

Figura 2. Cascata de formação dos esteroides.



Fonte: elaborada pela autora. Adaptado de Hanukoglu, 1992; Miller e Auchus, 2011; Norman e Henry, 2015; Payne e Hales, 2004.

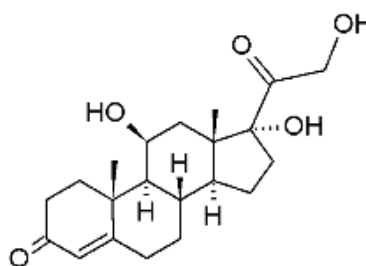
A conversão da pregnenolona em outros esteroides é dependente da região do córtex, uma vez que cada parte apresenta características enzimáticas distintas, levando à formação dos diferentes corticosteroides em cada zona. Além disso, a formação de intermediários pode levar à formação de esteroides fora das suprarrenais (Molina, 2014).

Em relação aos incidentalomas adrenais, alguns desses tumores podem promover o aumento de secreção de hormônios de forma desenfreada ou não. Nos casos em que não é visto o excesso do nível de excreção, o IA é designado como não funcionante (IANF) (Araujo-Castro, Casals, *et al.*, 2023). Os IANF representam a maior parte dos casos de IA, visto que aproximadamente 14% dos IA secretam excesso de hormônios (Cuthbertson *et al.*, 2023). Dentre estes hormônios, a liberação excessiva de cortisol pode desencadear diversos problemas fisiológicos ao paciente.

1.2. CORTISOL

O cortisol, também chamado de hidrocortisona (Figura 3), é um corticosteroide e o glicocorticoide mais secretado em mamíferos. O cortisol apresenta influência em diversas funções do organismo. Como exemplo, pode-se citar a sua atuação no metabolismo de proteínas e carboidratos, na gliconeogênese, na ação em processos anti-inflamatórios, auxiliando na resposta do corpo ao estresse e também apresenta funções no sistema nervoso central, digestivo, renal e reprodutor (Katsu e Iguchi, 2016).

Figura 3. Estrutura molecular do cortisol.



Fonte: elaborada pela autora.

Cerca de 95% do cortisol que circula no corpo está na forma conjugada, sendo 80% ligado à globulina ou transcortina (*cortisol binding globulin* – CBG) e os outros 15% ligados à albumina; os 5% livres representam a forma ativa deste hormônio. Uma vez que a avaliação da forma livre é dispendiosa, os métodos de avaliação utilizam a fração total (Karachaliou *et al.*, 2023; Katsu *et al.*, 2016).

Sua concentração no corpo varia de acordo com o ciclo circadiano. Ao nascer do dia, a quantidade de cortisol no organismo aumenta, chegando ao seu máximo entre 7 a 9 horas da manhã; este nível decresce até chegar ao mínimo, encontrado por volta de meia noite. Por este motivo, a dosagem deste esteroide é sempre realizada no período matutino (Karachaliou *et al.*, 2023; Pappachan *et al.*, 2017). O nível comum de cortisol no soro varia entre 45 a 227 ng/mL pela manhã e 17 a 141 ng/mL à noite. Na urina, são encontrados valores entre 43 a 139 ng/mL no exame cuja coleta é feita durante o período de 24 horas (Fraser e Uum, 2010; Zea *et al.*, 2020a).

Sua produção é regulada pelo eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (comumente chamado de HPA), como mostrado na

Figura 4. Em situações de estresse, o hipotálamo libera o hormônio liberador da corticotrofina (CRH), que estimula a produção do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) pela pituitária. O ACTH então estimula a produção de cortisol pela adrenal, sendo os três hormônios regulados, portanto, por um sistema de *feedback* negativo.

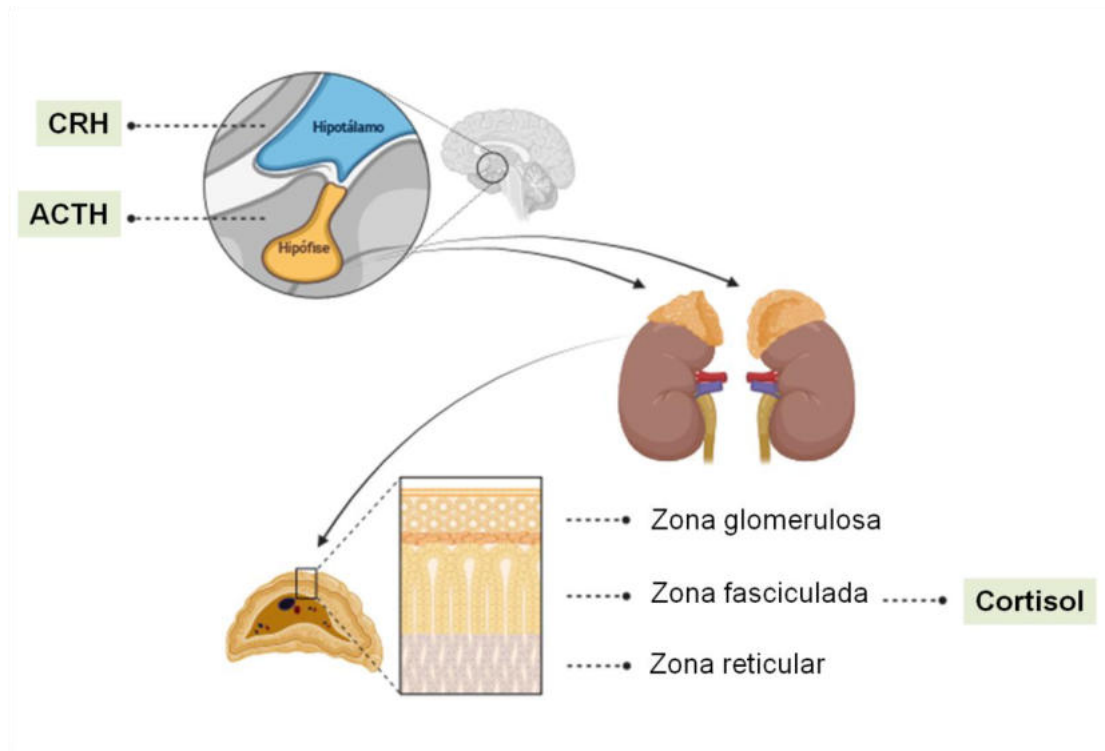
O cortisol é produzido na zona fasciculada, através do estímulo da ACTH para o aumento do cAMP. Este processo leva ao aumento da concentração de colesterol que será convertido em pregnenolona pela enzima P450scc (CYP11A1); etapa primária da esteroidogênese (Katsu *et al.*, 2016).

A metabolização destes esteroides citados, uma vez que apresentam a característica lipídica, é a transformação em produtos mais hidrofílicos para facilitar a eliminação. De forma geral, as vias de eliminação podem ser divididas entre fase I e II.

Na metabolização de fase I geralmente ocorre a conversão catalisada enzimaticamente de oxidação, redução ou hidroxilação. A Fase II tem como

característica a conjugação dos esteroides ou seus metabólitos com ácido glicurônico ou sulfato, sendo ambas controladas enzimaticamente (Schänzer, 1996).

Figura 4. Esquema do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) e liberação do hormônio cortisol. CRH: Hormônio Liberador de Corticotrofina; ACTH: hormônio adrenocorticotrófico. Criado com BioRender.com.

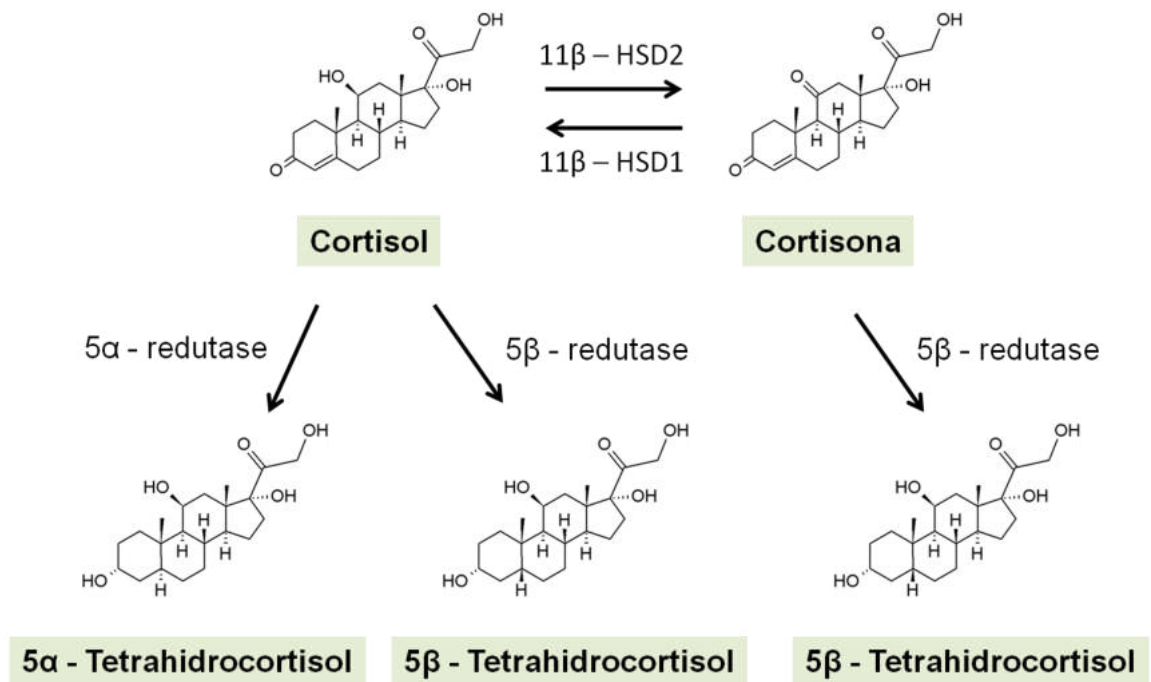


Fonte: elaborada pela autora.

A excreção do cortisol é realizada através da sua conversão para tetrahidrometabólitos através de enzimas redutases no fígado (Zea *et al.*, 2020a), como mostrado na Figura 5. As enzimas do tipo 11 β -hidroxiesteroides desidrogenases (11 β HSDs) são as responsáveis pela transformação do cortisol em cortisona, a qual é inativa biologicamente (Sandeep e Walker, 2001).

Glicocorticoides no geral também apresentam reações de fase II, principalmente promovendo conjugações com ácido glicurônico, através da enzima UDP glicuronil transferase (Arioli *et al.*, 2022). De forma geral, apenas 3% do cortisol é excretado na forma livre (Turpeinen e Hämäläinen, 2013), com valores reportados na literatura de cortisol livre (UFC) na urina entre 21,5 a 149,7 $\mu\text{g}/24\text{h}$ (Zea *et al.*, 2020b).

Figura 5. Metabólitos de excreção do cortisol. Adaptado de SANDEEP; WALKER, 2001.



Fonte: elaborada pela autora.

Como mencionado anteriormente, a presença de incidentalomas adrenais, levando à disfunção do eixo HPA, pode ocasionar produções fora da normalidade de diversos hormônios, incluindo o cortisol. As principais irregularidades são descritas a seguir.

1.3. ANOMALIAS RELACIONADAS AO AUMENTO DA SECREÇÃO DE CORTISOL

A diminuição dos níveis de cortisol no organismo leva à chamada Doença de Addison, a qual apresenta sintomas como fadiga, náuseas e vômitos, fraqueza muscular, perda de peso e dor abdominal (Fries *et al.*, 2005). Entre as causas para a formação desta enfermidade, quase 80% dos casos são oriundos por uma resposta autoimune do organismo. A segunda principal causa é a infecção de tuberculose (Simpson e Brooke, 2021).

A Síndrome de Cushing (SC), também chamada de hipercortisolismo (HC), é causada pelo aumento do nível de cortisol no organismo (Chiodini *et al.*, 2016a),

podendo ser consequência de secreção aumentada por tumores (incidentalomas adrenais) ou uso excessivo de medicamentos corticoides (Pappachan *et al.*, 2017).

Em relação à população geral, estima-se que uma pessoa a cada 500 mil apresente a síndrome de Cushing (ou 0,8 a 2% da população) (Chiodini *et al.*, 2016a; Favero *et al.*, 2022; Pappachan *et al.*, 2017). No caso de incidentalomas adrenais, a SC é considerada rara, sendo presente em aproximadamente 7% dos indivíduos acima de 60 anos e 10% para pacientes acima de 70 anos. Em números gerais, este valor gira em torno de 0,2 a 5 casos por milhão por ano, tendo prevalência de mulheres, principalmente quando o causador é um tumor na glândula pituitária (Araujo-Castro, Pascual-Corrales e Lamas, 2023).

O paciente portador da SC clássica apresenta um fenótipo característico desta síndrome, o qual auxilia no diagnóstico clínico. Observa-se a presença de sintomas como fragilidade da pele, fraqueza, redistribuição do tecido adiposo, obesidade centrípeta, a face no formato de lua e avermelhada, estrias e hematomas avermelhados e/ou arroxeados pelo corpo de tamanho superior a 1 cm, entre outros (Nieman *et al.*, 2008).

A SC pode ser de origem exógena ou endógena. Nos casos exógenos, o uso de medicamentos corticoides, como prednisona, podem afetar os níveis de cortisol, levando ao desenvolvimento da síndrome. Como a causa do aumento é temporário, após a retirada do medicamento, os níveis tornam a ficar dentro da normalidade (Chiodini *et al.*, 2016b).

Já nos casos de origem endógena, o aumento pode ser causado por tumores tanto nas glândulas adrenais quanto na hipófise. Quando o aumento de cortisol é devido ao estímulo de grande quantidade de ACTH por causa de um tumor benigno na hipófise, ou o seu aumento de forma não usual, a enfermidade é designada como doença de Cushing (Araujo-Castro, Pascual-Corrales e Lamas, 2023).

Porém, alguns casos apresentam apenas um aumento discreto da taxa desse hormônio endógeno, sem as manifestações clássicas da doença, dificultando o diagnóstico e levando a sintomas inespecíficos. Neste caso, a síndrome é chamada de secreção autônoma branda de cortisol (SABC – do inglês *mild autonomous cortisol secretion* - MACS) ou hipercortisolismo leve (Araujo-Castro, Pascual-Corrales e Lamas, 2023; Zavatta e Dalmaz, 2018). Em relação à SABC, a

proporção de pessoas acometidas é considerada entre 0,8 a 2 a cada mil habitantes (Chiodini *et al.*, 2016a; Favero *et al.*, 2022; Pappachan *et al.*, 2017; Pizzorno e Pizzorno, 2022). Alguns autores indicam, ainda, que a SABC leve pode estar presente em até 50% dos incidentalomas adrenais (Araujo-Castro, García Cano, *et al.*, 2023; Araujo-Castro, Pascual-Corrales e Lamas, 2023). Em pacientes considerados como tendo IANF, estima-se que entre 5 a 10% desenvolverão SABC em algum momento (Araujo-Castro, Parra Ramírez, *et al.*, 2023; Elhassan *et al.*, 2019).

Em casos de SABC, a pessoa não manifesta nenhum sintoma relativo à síndrome, tornando o diagnóstico ainda mais difícil de ser realizado. Entretanto, outros sintomas, como fragilidade muscular, diabetes, hipertensão, obesidade, dislipidemia, osteoporose, hipertensão arterial e transtornos de humor, encontram-se tanto na SC quanto na SABC; porém são inespecíficos e podem ser atribuídos a diversos outros transtornos durante a consulta clínica (Favero *et al.*, 2022).

Anteriormente o termo SABC também era designado como Síndrome de Cushing subclínica ou hipercortisolismo subclínico, mas foi recomendada a substituição do termo (Araujo-Castro, Sampedro Núñez e Marazuela, 2019). Esta alteração é devido a dois fatores: a progressão de pacientes portadores da SABC para SC, com manifestações físicas características, é considerada rara (menor que 1%) (Araujo-Castro *et al.*, 2021; Araujo-Castro, Sampedro Núñez e Marazuela, 2019). Além disso, o termo “subclínico” leva a crer que ainda não houve manifestação da síndrome e diminui a importância desta condição (Araujo-Castro, Sampedro Núñez e Marazuela, 2019). O novo termo foi adotado no último guia publicado pela Sociedade Europeia de Endocrinologia para distinguir pacientes portadores de SC e de SABC (Fassnacht *et al.*, 2023).

Os valores para classificar um paciente como tendo SABC variam de acordo com a literatura estudada. Geralmente são feitos alguns testes e o resultado do conjunto deles indica se o portador apresenta ou não valores atípicos. O principal deles é a quantificação do esteroide no soro após a administração de 1 mg de dexametasona (DXT) na noite anterior. Este fármaco inibe a produção de ACTH, consequentemente promovendo a diminuição de cortisol em pessoas saudáveis (Chiodini *et al.*, 2016b). Mais detalhes deste e outros testes serão mais bem explicados no item seguinte.

Na Tabela 1, são mostrados os valores de corte para classificação do paciente de acordo com as principais associações mundiais de endocrinologia.

Tabela 1. Valores de corte para diagnóstico de SABC e possível SABC de acordo com a literatura.

	AACE/AAES	NIH	ESE/ENSAT
Referência, ano	(Zeiger <i>et al.</i> , 2009)	(Grumbach <i>et al.</i> , 2003)	(Fassnacht <i>et al.</i> , 2016)
Possível SABC	> 50 ng/mL	> 50 ng/mL	19 – 50 ng/mL
SABC	> 50 ng/mL + outro critério	> 50 ng/mL + outro critério	> 50 ng/mL

AACE/AAES: *American Association of Clinical Endocrinologists/American Association of Endocrine Surgeons*; NIH: *National Institutes of Health*; ESE/ENSAT: *European Society of Endocrinology/European Network for the Study of Adrenal Tumors*.

Outros critérios: alto cortisol livre urinário, baixa concentração de ACTH, alta concentração de cortisol no soro ou saliva retirados à meia-noite ou baixo nível de dheas.

Fonte: Araujo-Castro, Pascual-Corrales e Lamas, 2023.

Uma vez que a determinação da presença da SABC determina o tipo de intervenção a ser realizada, a sua caracterização de forma eficaz é imprescindível. Entretanto, como mencionado anteriormente, essa identificação é feita por meio de uma série de testes específicos. O detalhamento destes métodos de avaliação encontra-se a seguir.

1.4. MÉTODOS DE DETECÇÃO DA SC E DA SABC

O teste mais comum de avaliação do hipercortisolismo é através da administração de 1 mg de dexametasona às 23:00h no dia anterior à coleta de sangue, retirado entre 8 e 9 horas da manhã, conhecido como teste de supressão por dexametasona (DXT). Valores normais de cortisol após DXT ficam em torno de 9 ng/mL (Araujo-Castro, Parra Ramírez, *et al.*, 2023). Valores entre 18 a 50 ng/mL indicam que o paciente pode apresentar SABC. Valores acima de 150 ng/mL indicam a presença de secreção autônoma, mesmo sem os sintomas clássicos da SC (Cuthbertson *et al.*, 2023).

Outros exames incluem a dosagem matinal do ACTH plasmático, a quantificação do cortisol livre urinário em amostras de 24 horas e a medição do cortisol salivar no período noturno. Essas abordagens são empregadas como métodos auxiliares ao teste de supressão com dexametasona, visando aumentar a confiabilidade diagnóstica no contexto clínico. Define-se hipercortisolismo dependente de ACTH quando os níveis elevados deste hormônio persistem, mesmo após tentativas de supressão farmacológica (Chiodini e Morelli, 2016). A observação de ACTH acima de 20 pg/mL no sangue (ou 30 pg/mL após o estímulo de liberação do CRH) sugere que a liberação de cortisol seja de origem hipofisária (Favero *et al.*, 2021).

O teste de cortisol urinário em 24 horas permite avaliar a média da secreção hormonal, compensando as variações circadianas, enquanto a análise do cortisol salivar noturno possibilita detectar concentrações anormalmente elevadas desse hormônio em um período do dia caracterizado por sua liberação mínima. Apesar de complementares, esses métodos diagnósticos ainda carecem de valores de referência bem estabelecidos, o que limita sua padronização e aplicação universal (Chiodini e Morelli, 2016).

Para a quantificação dos testes mencionados anteriormente, o mais utilizado para quantificação de cortisol na prática clínica é através de imunoensaios, mais especificamente o ensaio de imunabsorção enzimática (*Enzyme immunosorbent assay* - ELISA) (Karachaliou *et al.*, 2023). Imunoensaios comuns medem a presença do esteroide na solução utilizando anticorpos; em ELISA, o anticorpo é ligado a uma enzima que reage com o antígeno, produzindo mudança de cor (Zea *et al.*, 2020a). Dentre os outros tipos de imunoensaios utilizados, encontram-se a quimioluminescência, eletroquimioluminescência e fluorescência (Pappachan *et al.*, 2017). Todos os imunoensaios avaliam a fração total (ligada e não ligada).

Diferentes imunoensaios levam a respostas diferentes, além de apresentarem problema de especificidade, principalmente nos imunoensaios diretos (sem anticorpos secundários). Os esteroides endógenos, em muitos, casos, apresentam estrutura similar ou são isômeros, dificultando o ensaio e podendo ocasionar quantificações errôneas (Athimulam, Grebe e Endocrinology, 2021). Esteroides similares ao cortisol e também presentes no sangue, como prednisolona e 11-

deoxicortisol podem levar ao que é chamado de reações cruzadas, levando à superestimação da concentração real (Turpeinen e Hämäläinen, 2013).

Algumas pesquisas mais recentes estão sendo realizadas para obtenção de imunossensores para o monitoramento de cortisol; porém, ainda estão em fase de desenvolvimento e não são amplamente aplicados (Karachaliou *et al.*, 2023).

1.5. RELEVÂNCIA DO DIAGNÓSTICO PRECOCE

A dificuldade no diagnóstico faz com que haja um atraso significativo no tratamento das pessoas acometidas com a SC. É estimado que o tempo de atraso para SC seja entre 3 a 5 anos; para a SABC, este número ainda não é conhecido (Favero *et al.*, 2022).

Caso não venha a ser tratada, as síndromes podem levar o indivíduo a óbito (EISENHOFER *et al.*, 2018). Desta forma, a detecção da doença em estágio inicial e de maneira precisa se faz necessária. Porém, por apresentar sintomas facilmente confundidos com de outras enfermidades, o diagnóstico da SABC pode ser difícil de ser realizado.

Visto que pode ser causado por um tumor na glândula adrenal (onde o cortisol é produzido), é mandatória a crítica avaliação deste órgão. Em caso de liberação excessiva de hormônio, a retirada da glândula por completo torna-se necessária (Javanmard, Duan e B. Geer, 2018). Além disso, tanto os portadores de SC quanto de SABC apresentam deteriorização da qualidade de vida, pois são acometidos dos efeitos colaterais causados pelo aumento, mesmo discreto, de cortisol.

A cirurgia não é indicada em casos de incidentalomas adrenais não funcionantes unilaterais, tumores benignos e pacientes assintomáticos (Fassnacht *et al.*, 2023). Entretanto, é visto que pacientes com IANF apresentam maiores mortalidades e riscos cardiovasculares quando comparados à população geral. Estima-se que entre 5 a 10% dos IANF poderão desenvolver SABC nos anos seguintes (Araujo-Castro, Casals, *et al.*, 2023).

Apesar de não ser indicada, alguns estudos na literatura indicam que houve melhora em problemas cardiovasculares após a adrenalectomia em pacientes IANF, o se leva a supor que, mesmo sendo considerados como não funcionantes, estes

tumores excretam hormônios um pouco mais elevados que a população saudável (Wang *et al.*, 2023).

Mesmo sem a aparente secreção, os pacientes com IANF necessitam de avaliação médica para observar se há possível progressão do adenoma ou piora no quadro clínico (Cuthbertson *et al.*, 2023). Observa-se também que pacientes IANF apresentam problemas cardiovasculares e aumento de problemas vistos em pacientes com secreção hormonal aumentada, como hipertensão, arterosclerose e diabetes (Kim *et al.*, 2020; Tuna *et al.*, 2014). A distinção entre um paciente portador de IANF e um que apresenta a SABC, neste caso, é fundamental para que se leve a um diagnóstico clínico correto.

Visto que a descoberta tardia leva a menor possibilidade de tratamento, ocasionando o aumento da taxa de mortalidade, e os métodos de detecção atuais são ineficientes, torna-se necessária a busca de métodos alternativos para avaliação desta síndrome. Neste sentido, tem-se cada vez mais no campo da medicina optado por equipamentos sensíveis e precisos, tais como a utilização da cromatografia acoplada à espectrometria de massas (Casals e Hanzu, 2020; Keevil, 2016; Wudy e Choi, 2016).

1.6. CROMATOGRAFIA E ESPECTROMETRIA DE MASSAS – DEFINIÇÕES

De acordo com Collins, a cromatografia é uma técnica físico-química que visa a separação dos componentes de uma mistura. Esta separação baseia-se na distribuição dos componentes da mistura em duas fases: uma que se mantém retida (chamada de fase estacionária) e outra que se move pelo caminho da coluna cromatográfica (chamada de fase móvel) (Collins, Braga, Bonato, 2006). A depender da força e tipo de interação dos analitos pelas fases, observa-se diferença nas retenções dos analitos pela fase estacionária (FE), levando à separação dos componentes ocasionada pela diferença da migração diferencial entre estas moléculas. O tempo que leva para o analito chegar ao detector é denominado de tempo de retenção (T_R).

A depender do estado físico da fase móvel (FM), a cromatografia pode ser separada em cromatografia gasosa (CG) (quando a FM é um gás inerte) ou cromatografia líquida (CL) (quando a FM é um líquido ou uma mistura de solventes).

A FE pode ser um sólido ou um líquido espalhado ou imobilizado em um suporte sólido (Collins, Braga, Bonato, 2006).

Em relação ao seu histórico, a cromatografia é frequentemente atribuída ao químico russo Mikhail Tswett, que em 1906 utilizou colunas de adsorção para separação de pigmentos vegetais. Devido a esse experimento, surgiu o nome da técnica, advindo do grego *Chroma* (cor) e *graphein* (escrever) (Skoog *et al.*, 2006). A evolução da técnica teve um "renascimento" nas décadas de 1930 e 1940, com Martin e Synge desenvolvendo a cromatografia de partição líquida-líquida, que marcou o início da cromatografia moderna. Posteriormente, técnicas como cromatografia em papel, gás, camada delgada e líquida de alta eficiência expandiram suas aplicações e funcionalidades (Touchstone, 1993).

Os tipos de cromatografia, assim como suas classificações, são extensas. Neste tópico terão foco a cromatografia gasosa (CG) e a cromatografia líquida, mais especificamente a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Entre as diferenças da CLAE para a cromatografia líquida simples, destacam-se a velocidade de separação, menores tamanhos das partículas usadas na FE e a maior pressão de bombeamento, devido à modernização da técnica (Skoog *et al.*, 2006).

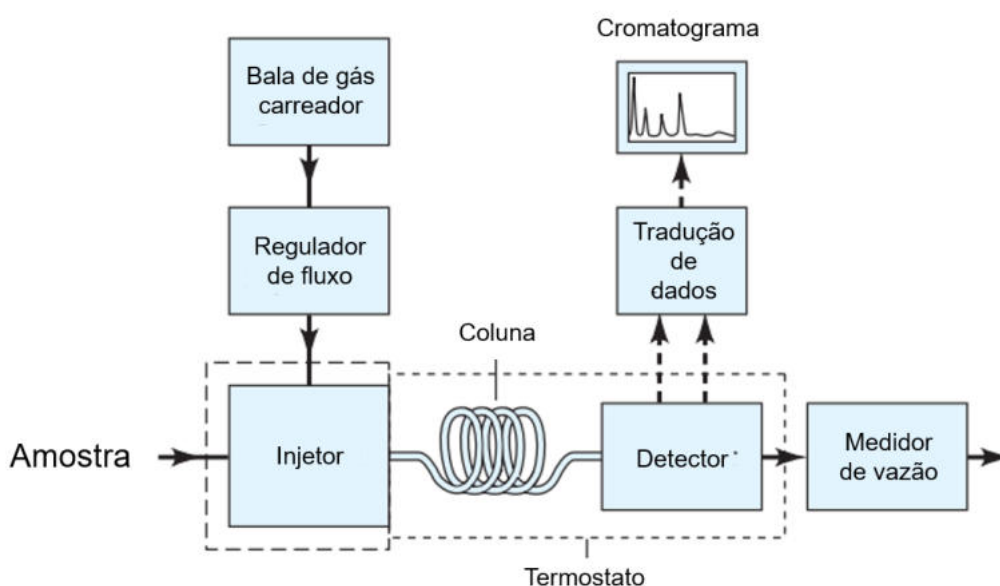
Entre as principais distinções das cromatografias a gás e líquida, além da FM, é que na CG a amostra deve ser termicamente estável, além de volátil o suficiente para que seja possível a sua inserção na coluna. Em alguns casos, o uso da derivatização para aumento da volatilidade dos analitos é recomendada (Collins, Braga, Bonato, 2006). A descrição deste termo e as formas de derivatização serão detalhadas mais adiante.

Na CLAE, é mandatório que os analitos sejam solúveis nas fases móveis. Além disso, ao contrário da CG, na qual os analitos interagem apenas com a FE, na CL os analitos interagem com as duas fases. Ambas apresentam suas particularidades, vantagens e limitações; tornando-se, portanto, técnicas complementares de análise (Collins, Braga, Bonato, 2006). As descrições destes dois tipos de cromatografia encontram-se a seguir.

1.6.1. Cromatografia gasosa

A cromatografia gasosa (CG) fundamenta-se na separação dos componentes de uma amostra por meio da interação entre os analitos e a fase estacionária. Nesse sistema, a fase móvel, denominada gás carreador, é quimicamente inerte, não interagindo com os componentes da amostra. O hélio é amplamente utilizado como gás carreador devido à sua eficiência de separação, de acordo com a equação de Van Deemter, apesar de outros gases serem passíveis de serem utilizados. O nitrogênio pode ser considerado uma alternativa econômica; o hidrogênio, por sua vez, oferece maior eficiência de separação e, em casos menos frequentes, o argônio também pode ser empregado (Skoog, Holler e Crouch, 2018). A Figura 6 apresenta um diagrama de blocos típico de um sistema de CG.

Figura 6. Diagrama de blocos de um sistema de cromatografia gasosa.



Fonte: Adaptado de Skoog, Holler e Crouch, 2018(Skoog, Holler e Crouch, 2018).

A introdução da amostra ocorre geralmente no injetor, que deve ser aquecido a uma temperatura de pelo menos 50 °C acima do ponto de ebulição do componente menos volátil da mistura. O sistema de injeção permite duas abordagens: a injeção sem divisão de fluxo (*splitless*), na qual todo o volume da amostra é direcionado à coluna cromatográfica, ou a injeção com divisão de fluxo (*split*), onde apenas uma

fração da amostra é utilizada. No modo *splitless*, a válvula de purga permanece fechada por até 60 segundos, garantindo que o vapor da amostra seja completamente transferido para a coluna (Skoog, Holler e Crouch, 2018).

Os componentes da amostra são então separados na coluna cromatográfica, localizada dentro de um forno com temperatura controlada. Essas colunas, que podem variar entre 2 e 60 metros de comprimento, operam com programas de temperatura ajustáveis ou em regime isotérmico. Na maioria dos casos, utiliza-se gradiente de temperatura para separar analitos com pressões de vapores diferentes (Skoog, Holler e Crouch, 2018).

O tipo de coluna a ser utilizada depende da classe de compostos a ser separada. A opção mais comum é a coluna capilar de sílica fundida revestida com algum polímero, a qual confere maleabilidade. A fase estacionária pode variar entre as mais polares, como as que possuem substituintes cianopropil e polietilenoglicol, quanto as 100% apolares, como dimetipolissiloxano. Além do tipo da FE, leva-se em consideração o comprimento da coluna, o diâmetro interno e a espessura da fase estacionária (Nascimento *et al.*, 2018; Stashenko e Ren, 2014)

A detecção dos componentes separados ocorre no detector, que pode ser classificado como universal ou específico para determinadas classes de compostos. Esse dispositivo converte o sinal gerado em uma representação legível (Skoog, Holler e Crouch, 2018). Entre os diversos detectores disponíveis, destaca-se o espectrômetro de massas, que oferece alta sensibilidade e especificidade para análises qualitativas e quantitativas.

1.6.2. Cromatografia líquida de alta eficiência

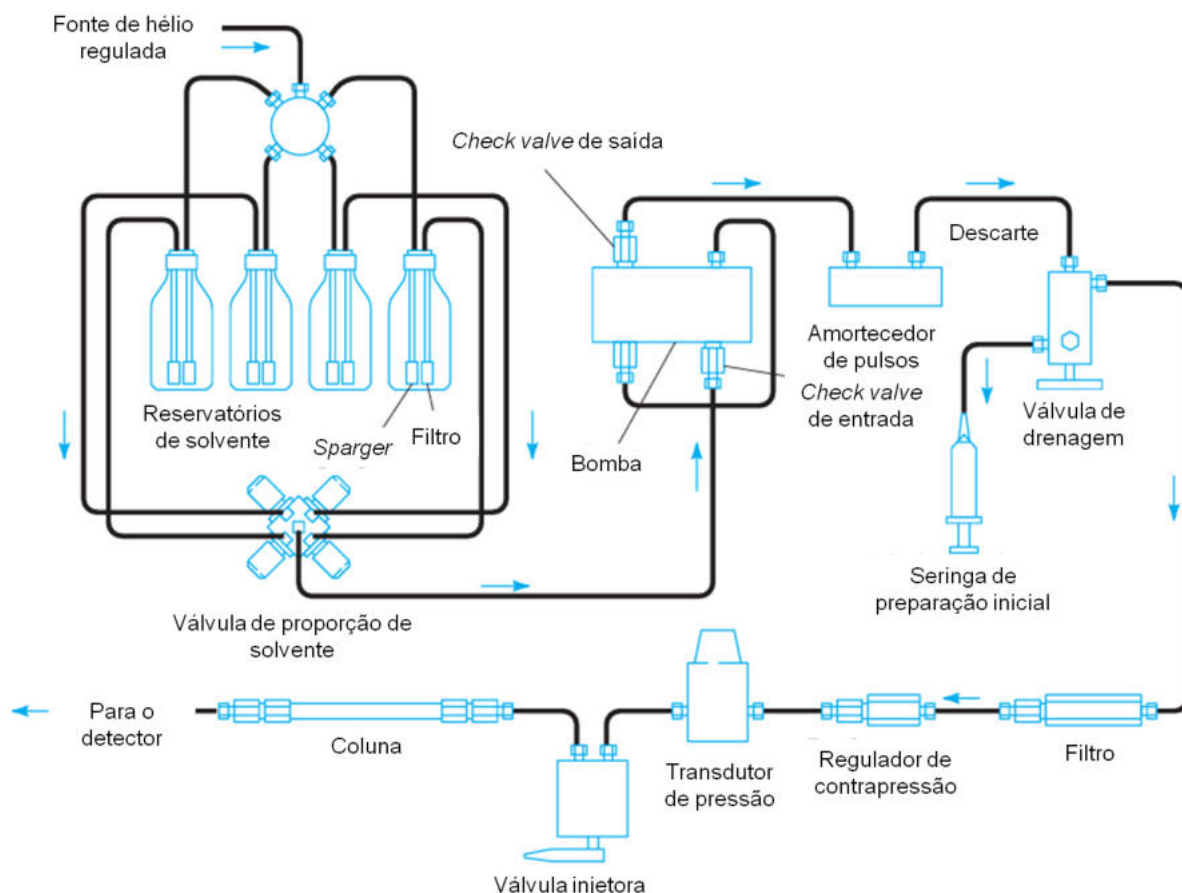
Na cromatografia líquida, a fase móvel é composta por um ou mais solventes. Dependendo do mecanismo de separação, essa técnica pode ser classificada em cromatografia de partição, adsorção, troca iônica, exclusão, afinidade e quiralidade (Skoog, Holler e Crouch, 2018).

De maneira breve, a cromatografia por adsorção, também denominada cromatografia líquido-sólido, fundamenta-se na competição entre as moléculas da fase móvel e os componentes da amostra pelos sítios ativos presentes na fase

estacionária. Na cromatografia por troca iônica, a fase estacionária contém grupos ionizáveis ligados à sua superfície, possibilitando a interação eletrostática com analitos carregados. A cromatografia por exclusão baseia-se na separação das moléculas de acordo com o seu tamanho, uma vez que espécies de maior dimensão são incapazes de penetrar nos poros da fase estacionária, sendo, portanto, excluídas. Já a cromatografia por afinidade, amplamente aplicada para moléculas bioativas, utiliza interações biológicas reversíveis — como enzima-substrato, antígeno-anticorpo ou receptor-ligante — entre o analito de interesse e um ligante imobilizado na fase estacionária. A cromatografia quiral emprega colunas específicas com o objetivo de separar enantiômeros. Por sua vez, a cromatografia por partição promove a separação dos constituintes de uma mistura com base na diferença de solubilidade entre duas fases líquidas imiscíveis, sendo uma fase móvel e uma fase estacionária líquida imobilizada em um suporte sólido. A separação ocorre em função da distribuição diferencial dos analitos entre essas fases, resultando em distintas velocidades de migração (Collins, Braga, Bonato, 2006). Neste trabalho, será enfatizada a cromatografia por partição.

O diagrama típico de um sistema de cromatografia líquida é apresentado na Figura 7. A presença de gases dissolvidos na fase móvel pode gerar bolhas, resultando em alterações no tempo de retenção, alargamento das bandas cromatográficas e interferências nos detectores. Para evitar esses problemas, são utilizados degaseificadores, que podem funcionar por vácuo, aquecimento com agitação, ou pelo método de *sparging*. Este último consiste na remoção de gases dissolvidos por meio da passagem de pequenas bolhas de um gás inerte e pouco solúvel na fase móvel. Além disso, reservatórios de solventes podem conter filtros para prevenir a entrada de partículas, sendo substituíveis por sistemas de filtração a vácuo, como os filtros Millipore, que removem simultaneamente gases e partículas em suspensão (Skoog, Holler e Crouch, 2018).

Figura 7. Diagrama de blocos de componentes comumente vistos em cromatografia líquida.



Fonte: Adaptado de Skoog, Holler e Crouch, 2018.

O transporte do solvente até a coluna cromatográfica é realizado por três tipos principais de bombas. A bomba de seringa oferece fluxo contínuo e sem pulsação, com vazão controlada, mas possui capacidade limitada. Bombas do tipo pneumáticas apresentam incompatibilidade de eluição por gradiente, apesar de serem mais baratas e sem a presença de pulsação. O modelo mais utilizado atualmente é a bomba do tipo recíproca, a qual utiliza um pistão que promove movimento alternado em uma câmara, gerando fluxo pulsado suavizado por amortecedores. Destaca-se por sua alta pressão de saída (até 10.000 psi), pequeno volume interno e capacidade de operar em eluição por gradiente (Poole, 2003).

A introdução da amostra é realizada por meio de um *loop* de injeção, também chamado de alça de amostragem, que pode variar em volume de acordo com a necessidade analítica (Skoog *et al.*, 2006).

As corridas cromatográficas podem ser isocráticas, com proporção fixa de solventes ao longo da análise, ou em gradiente, com variação das proporções de solventes para melhorar a separação de analitos com diferentes polaridades. O ajuste da mistura é realizado por válvulas de proporção (Skoog *et al.*, 2006).

O avanço tecnológico e a busca por maior eficiência levaram à redução do tamanho das partículas nas colunas cromatográficas. A técnica é denominada cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE ou UHPLC, *ultra-high-performance liquid chromatography*) quando colunas com partículas menores que 2 micrômetros são utilizadas, aliadas a pressões altas. Esta técnica possibilita separações mais rápidas e eficientes (Skoog, Holler e Crouch, 2018).

A natureza da amostra irá influenciar no tipo de detecção escolhida. Para ambas as formas de cromatografia, a espectrometria de massas pode ser acoplada para identificação dos eluatos.

1.6.3. Espectrometria de massas

A espectrometria de massas (EM, ou MS – *mass spectrometry*) é uma técnica analítica que analisa íons no estado gasoso, tanto de forma qualitativa, quanto de forma quantitativa (Andrew e Homer, 2020).

De forma geral, o espectrômetro pode ser dividido entre a fonte de ionização, o analisador de massas e o detector. As amostras são ionizadas e então separadas no analisador, o qual separará baseado na relação entre a massa de cada íon e sua respectiva carga (comumente chamado de razão massa/carga ou m/z). O produto final é um espectro de massas, com o eixo x sendo o m/z e o eixo y a abundância de cada íon (Woods e Darie, 2019).

Em relação à fonte de ionização, ela dependerá da técnica hifenada a ela e ao tipo de compostos que se está analisando. No caso da cromatografia gasosa, a técnica de ionização mais antiga empregada é através do impacto de elétrons ou ionização eletrônica (IE). Apesar do nome, a ionização ocorre pela interação e troca energética entre o elétron bombardeado e os elétrons da molécula (Stashenko e Ren, 2014).

Convencionalmente, o espectro é obtido com uma energia de 70 eV na fonte de ionização, valor significativamente superior à energia necessária para ionizar qualquer molécula orgânica, que normalmente varia entre 6 e 13 eV. Esse nível elevado de energia garante que, mesmo após as perdas energéticas inerentes ao percurso do elétron bombardeado e a transferência de energia para a molécula neutra (incluindo perdas vibracionais, por exemplo), a ionização seja efetiva. Energias inferiores poderiam resultar na ionização seletiva de algumas moléculas, enquanto outras permaneceriam neutras, comprometendo a eficiência do processo. Por isso, a padronização em 70 eV assegura maior eficiência de ionização, reprodutibilidade e comparabilidade entre diferentes análises (Gross, 2004; Stashenko e Ren, 2014).

Adicionalmente, essa padronização possibilitou a criação de uma extensa biblioteca espectral para essa técnica de ionização, facilitando a identificação dos íons gerados, independentemente da marca do espectrômetro utilizado. No entanto, se necessário, a energia pode ser ajustada pelo analista entre o cátodo (emissor de elétrons) e o ânodo, conforme a especificidade da análise (Gross, 2004; Stashenko e Ren, 2014).

O processo de ionização resulta na formação de um cátion radical ($M^{+\bullet}$), o qual pode fragmentar de diferentes maneiras, dependendo das características químicas da molécula analisada. Íons altamente excitados podem sofrer múltiplos processos de fragmentação, enquanto outros podem apresentar apenas uma ruptura. Esse comportamento depende, em grande parte, do tipo de ligação química e da estabilidade do cátion radical formado. Esses íons, por sua vez, serão direcionados ao analisador (Gross, 2004; Stashenko e Ren, 2014), cuja descrição será apresentada mais adiante.

Já em relação à cromatografia líquida, é importante ressaltar que os compostos devem preferencialmente já estar ionizados em solução. A depender da sua natureza, os compostos poderão estar na forma protonada, comumente indicado como $[M+H]^+$, ou desprotonados, $[M-H]^-$. Esta ionização pode ser alterada pelo pH da FM, composição da FM e a presença de aditivos (Gao, Zhang e Karnes, 2005).

Os aditivos promovem a manutenção do pH da solução, assim como facilita a protonação ou desprotonação dos compostos, melhorando portanto a sensibilidade

na detecção. Entre os aditivos comumente utilizados, são encontrados o ácido acético, ácido fórmico, acetato de amônio e formiato de amônio (Gao, Zhang e Karnes, 2005).

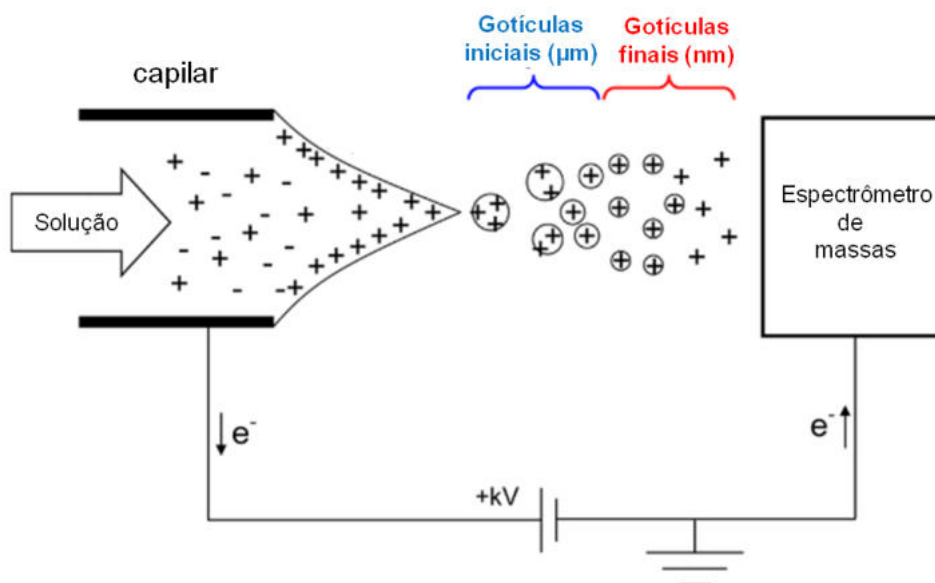
Sobre as fontes de ionização em cromatografia líquida, mais especificamente as que são com pressão atmosférica, pode-se citar a ionização química em pressão atmosférica, a fotoionização em pressão atmosférica (APPI) e a ionização por eletrospray (ESI - *electrospray ionization*) (Nair e Clarke, 2016). Esta última também pode ser chamada de ionização por eletronebulização (Vessecchi *et al.*, 2011) e será detalhada a seguir devido à sua importância.

A ESI é classificada como uma técnica de ionização branda; ou seja, caracterizada pela pouca ou nenhuma fragmentação das moléculas na fonte. Esse método permite a transferência de íons em solução para a fase gasosa, preservando a integridade molecular. De modo geral, a solução contendo os analitos é introduzida em um capilar metálico submetido a uma alta voltagem, tipicamente na faixa de vários kilovolts (kV) (Nair e Clarke, 2016).

Um gás coaxial, frequentemente nitrogênio, conhecido como gás de nebulização ou *sheath gas*, auxilia na formação de pequenas gotas a partir da solução inicial. Na extremidade do capilar, a solução é deformada em um cone de Taylor, que emite um spray fino de gotículas carregadas. Essas gotículas, inicialmente com raios na faixa de micrômetros, contêm cargas positivas provenientes de íons em excesso na solução (Konermann *et al.*, 2013).

O processo de emissão é seguido pela rápida evaporação do solvente das gotículas, que pode ser acelerada pelo uso de calor e gases auxiliares. À medida que as gotículas encolhem devido à evaporação, a densidade de carga na superfície aumenta até que a tensão superficial seja superada pela repulsão Coulombiana, provocando a fragmentação das gotículas em partículas menores. Esse processo, denominado fissão Coulômbica, ocorre repetidamente até que os íons individuais sejam liberados na fase gasosa (Konermann *et al.*, 2013). A Figura 8 mostra um esquema representativo do que acontece entre a ponta do capilar de uma fonte ESI e a introdução da amostra no espectrômetro de massas.

Figura 8. Esquema da ionização por eletrospray.



Fonte: Adaptado de Konermann *et al.*, 2013.

Ao adentrarem o espectrômetro de massas, os íons são submetidos à separação de acordo com o analisador encontrado. Entre os modelos mais frequentemente utilizados destacam-se o *time-of-flight* (TOF), a armadilha de íons (*ion trap*), o *orbitrap*, o espectrômetro de transformada de Fourier por ressonância ciclotrônica de íons (*Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance* - FT-ICR) e o analisador do tipo quadrupolo (El-Aneed, Cohen e Banoub, 2009). Será dada ênfase ao último analisador mencionado, devido à sua relevância e ampla aplicação.

O analisador do tipo quadrupolo é composto por um conjunto de quatro hastes condutoras dispostas paralelamente, com um espaço central entre elas. Os pares de hastes opostas estão eletricamente conectados entre si, permitindo a geração de um campo elétrico oscilante (Nair e Clarke, 2016).

Nestas hastes, podem ser aplicadas uma tensão de rádio-frequência (RF), com ou sem aplicação de tensão contínua (*direct current* - DC). Quando não há a DC, íons com ampla faixa de razões de m/z terão trajetórias estáveis no quadrupolo; neste caso, será obtida uma varredura de diversos íons com m/z diferentes, chamado de escaneamento ou *scan* (Li *et al.*, 2021).

Já quando o quadrupolo opera como um filtro de massas específicas, é aplicada uma tensão de rádio-frequência (RF) em um dos pares opostos de hastes, enquanto o outro par recebe a DC. Nesse sistema, apenas os íons com uma razão m/z específica manterão uma trajetória estável e atravessarão o quadrupolo, alcançando o detector. Íons com outras razões m/z apresentarão trajetórias instáveis e serão eliminados antes de alcançar o detector (Li *et al.*, 2021).

Os espectrômetros de massas de quadrupolo simples, também chamados de monoquadrupolares, possuem um único analisador de massas, limitando-se à detecção de íons gerados diretamente na fonte do instrumento. Em razão dessa restrição, os espectrômetros monoquadrupolares oferecem menor capacidade de análise estrutural e apresentam especificidade reduzida quando comparados aos espectrômetros de massas de dois quadrupolos, conhecidos como triplo quadrupolo ou espectrômetros de massas em *tandem* (Nair e Clarke, 2016).

O espectrômetro de massas de quadrupolo duplo é constituído por dois analisadores de massas de quadrupolo separados por uma célula de colisão. Esta célula apresenta geometria semelhante aos quadrupolos, motivo pelo qual este analisador também é comumente chamado de triplo quadrupolo, QqQ ou MS/MS (Nair e Clarke, 2016).

O primeiro quadrupolo atua na seleção dos íons precursores, que, ao ingressarem na célula de colisão, sofrem fragmentação por dissociação induzida por colisão (*collision-induced dissociation* - CID). Durante esse processo, os íons precursores interagem com um gás inerte, como nitrogênio ou argônio, resultando na formação de íons produtos. A geração desses fragmentos é determinada pelas energias de ligação moleculares do íon precursor e pela energia de colisão utilizada (Nair e Clarke, 2016).

Os íons produtos gerados pelo CID são posteriormente analisados pelo segundo quadrupolo, que os filtra e os direciona ao detector. Cada combinação de íon precursor e íon produto forma uma transição de massa específica. Quando as condições experimentais, como os campos elétricos e a energia de colisão, permanecem constantes, apenas os íons que correspondem à transição de massa selecionada chegam ao detector, conferindo elevada especificidade aos métodos do tipo QqQ. Esse procedimento é denominado monitoramento de reação selecionada

(*selection reaction monitoring* - SRM). Quando o método é aplicado para monitorar diversas transições ao longo de uma análise cromatográfica, a abordagem é denominada de monitoramento de reações múltiplas (*multiple reaction monitoring* - MRM) (Nair e Clarke, 2016).

Por fim, os sinais gerados são levados a um detector, como uma eletromultiplicadora, a qual será responsável pela conversão dos íons obtidos em sinais elétricos e realizar a sua amplificação (Gross, 2004).

1.7. PREPARO DE AMOSTRAS PARA ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA

O preparo de amostras desempenha papel crucial no processo analítico, com objetivos principais de eliminar interferentes presentes na matriz, extrair determinados componentes de interesse e, em alguns casos, concentrar os analitos para aumentar a sensibilidade analítica. Ao término dessa etapa, a amostra é reconstituída em um solvente adequado para posterior análise cromatográfica (Jardim, 2010; Niu *et al.*, 2018).

Trata-se de uma das etapas mais trabalhosas e demoradas, responsável por cerca de 80% do tempo total de análise. Apesar de muitas vezes necessária, a adição de etapas no preparo pode introduzir erros na identificação e quantificação dos analitos, resultantes de perdas durante o processo ou contaminação da amostra (Jardim, 2010; Niu *et al.*, 2018).

No caso de amostras biológicas, caracterizadas por matrizes complexas, o preparo torna-se praticamente imperativo. Devido à instabilidade dos analitos, cuidados especiais são necessários durante o armazenamento e preparo, uma vez que fatores como temperatura, pH, ciclos de descongelamento e etapas de extração, evaporação e reconstituição podem comprometer a integridade dos componente da amostra (Nováková e Vlčková, 2009).

Diversas técnicas são descritas na literatura, incluindo precipitação de proteínas, extração líquido-líquido (ELL), extração em fase sólida (EFS) e métodos mais recentes ou menos comuns, como microextração em fase sólida (SPME, do inglês *solid phase microextraction*), extração assistida por ultrassom (UASE, do inglês *ultrasonic-assisted solvent extraction*) e QuEChERS (do inglês *Quick, Easy,*

Cheap, Effective, Rugged, Safe). A escolha do método depende da concentração dos analitos, do tipo de matriz e da complexidade da técnica, podendo-se combinar mais de uma abordagem para melhores resultados (Nováková e Vičková, 2009).

Dentre as técnicas mais empregadas, destacam-se a ELL e a EFS, especialmente em amostras com níveis traços dos analitos (Jardim, 2010; Kanu, 2021).

A ELL baseia-se na partição dos componentes da amostra entre dois solventes imiscíveis. Em amostras biológicas, geralmente aquosas, adiciona-se um solvente orgânico imiscível. A eficiência da extração depende da constante de distribuição dos analitos entre os solventes, sendo possível ajustar parâmetros, como o pH da fase aquosa, para otimizar o equilíbrio entre espécies ionizáveis. Adicionalmente, a adição de sais, como o acetato de amônio, pode melhorar a separação pelo efeito de *salting out*. Apesar de bem simples e muito utilizada, a ELL apresenta desvantagens, como o grande volume de solventes orgânicos e dificuldades de automatização, tornando o método dispendioso (Medvedovici, Bacalum e David, 2018).

A EFS utiliza cartuchos descartáveis preenchidos com sorventes que permitem interações específicas, como apolares, polares ou iônicas. Um dos sorventes mais comuns é o octadecil (C18), ligado à sílica, amplamente utilizado em matrizes biológicas como urina e plasma. O processo de separação é similar ao visto na cromatografia, visto que é feito pela adsorção e partição dos componentes da amostra.

De forma geral, a EFS envolve etapas de ativação e condicionamento do cartucho, aplicação da amostra (com ou sem vácuo), limpeza (*clean-up*) para remover interferentes e eluição final dos analitos. No caso de cartuchos C18 e com matrizes biológicas, tais como urina e plasma, pode-se realizar o processo de ativação com metanol e condicionamento com água ultrapura, visto que as matrizes das amostras são compostas majoritariamente de água. A etapa de eluição pode feita com um pequeno volume de solvente, concentrando, portanto, os componentes desejados (Jardim, 2010).

Em comparação à ELL, a EFS utiliza menor volume de solventes, oferece alta recuperação e efetiva concentração dos analitos. No entanto, o custo elevado dos

cartuchos e a necessidade de cuidados específicos, como evitar o ressecamento do cartucho antes da aplicação da amostra, são desvantagens a serem consideradas (Jardim, 2010; Nováková e Vlčková, 2009; Skoog *et al.*, 2006).

Apesar de mais simples que os preparos mostrados anteriormente, uma via tradicional de preparo de amostras é através da precipitação de proteínas, ou desproteinização. A sua simplicidade, aliada à rapidez e baixo custo, torna a técnica aplicável para análise de compostos hidrofílicos e hidrofóbicos. Para esta técnica, muitas vezes são utilizados solventes orgânicos, tais como metanol e acetonitrila, para realizar a desnaturação. A adição dos solventes promove a alteração da estrutura quaternária das proteínas e a remoção das ligações de hidrogênio tanto destas quanto das estruturas terciárias, ocasionando na precipitação. Também são vistos na literatura o uso de ácidos, como o ácido tricloroacético, e sais, como sulfato de zinco, para promover o mesmo efeito (Medvedovici, Bacalum e David, 2018; Nováková e Vlčková, 2009).

Como pontos negativos, o sobrenadante pode apresentar uma quantidade de precipitado de forma a promover o entupimento da coluna, no caso da CL. Para contornar este problema, geralmente também é adicionada posteriormente uma etapa de centrifugação. Além disso, os resíduos podem interferir na sensibilidade da análise cromatográfica, o que torna a técnica indicada apenas para compostos com concentração relativamente alta na amostra (Medvedovici, Bacalum e David, 2018; Nováková e Vlčková, 2009).

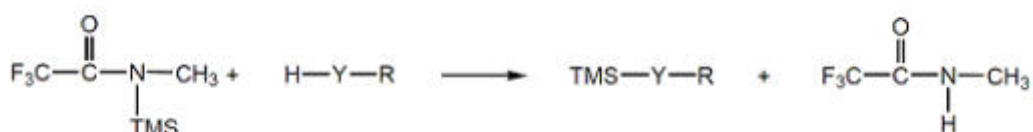
Na análise por CG, frequentemente se torna necessária a etapa de derivatização após o preparo das amostras. Essa etapa tem como objetivo modificar grupos funcionais polares (como carbonilas) ou capazes de formar ligações de hidrogênio, como hidroxilas, para torná-los mais voláteis e adequados à análise por CG. A derivatização forma derivados quimicamente similares à estrutura original das moléculas (Gutch, 2012).

A escolha do reagente de derivatização deve considerar a garantia de reações quase completas, evitar interações indesejáveis com a FE da coluna e produzir derivados suficientemente estáveis para suportar o tempo de análise sem degradação. As principais reações empregadas nessa etapa são alquilação,

acilação e sililação, cada uma com reagentes específicos para atender às características dos analitos (Gutch, 2012).

A sililação (Figura 9), uma das reações mais amplamente utilizadas, envolve a substituição dos hidrogênios ativos (-OH, -COOH, -NH, -NH₂, e -SH) por grupos trimetilsilila (TMS).

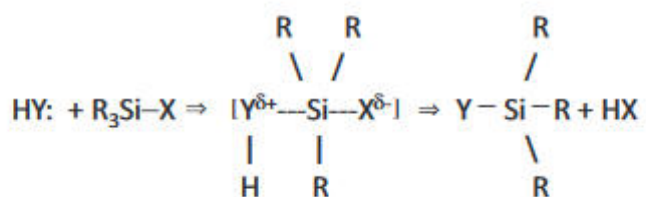
Figura 9. Reação de sililação com MSTFA. Y = O, S, NH, NR', COO.



Fonte: Retirado de Gutch, 2012.

O mecanismo ocorre por ataque nucleofílico do tipo SN₂, formando um intermediário bimolecular antes da estabilização do derivado. O grupo de saída deve apresentar baixa basicidade e alta capacidade de estabilizar a carga negativa no estado de transição (Gutch, 2012). O esquema geral está disposto na Figura 10.

Figura 10. Esquema do estado de transição em uma reação de sililação.



Fonte: Retirado de Poole, 2013.

Os reagentes de sililação mais utilizados são o N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) e o N-trimetilsilil-N-metil trifluoroacetamida (MSTFA). Esses reagentes reagem com álcoois e ácidos para formar éteres e ésteres trimetilsilil, respectivamente. Contudo, seus derivados apresentam baixa estabilidade frente à umidade e podem ser rapidamente hidrolisados na presença de

água ou contaminantes ácidos e básicos. Por essa razão, tanto a amostra quanto os solventes devem estar completamente secos, e os reagentes devem ser armazenados em recipientes hermeticamente fechados para evitar degradação (Poole, 2013).

A utilização de catalisadores é comum nesse processo, especialmente quando é necessário derivatizar grupos hidroxila terciários e também para facilitar a enolização de grupos carbonila. Na análise de esteroides, é comum utilizar uma mistura de MSTFA, iodeto de amônio (NH_4I) e um agente redutor. Nesta mistura, o iodeto de trimetilsilila (TMSI) é gerado pela reação entre NH_4I e MSTFA (Poole, 2013).

O TMSI é altamente sensível à hidrólise, decomposição por oxigênio e luz. Para minimizar a formação de subprodutos, como iodo, e prolongar a estabilidade da mistura, é comum adicionar agentes redutores, como ditioneitol, etanotiol ou 2-mercaptoetanol (Poole, 2013).

Embora menos frequente, a derivatização também pode ser empregada na cromatografia líquida, apresentando diversas vantagens em contextos específicos. Seu principal objetivo é aprimorar a sensibilidade, facilitar a quantificação, melhorar a simetria dos picos cromatográficos e otimizar a separação entre os compostos de interesse e interferentes (Higashi e Ogawa, 2020; Qi *et al.*, 2014).

A melhora da sensibilidade é particularmente relevante em análises de metabólitos presentes em baixas concentrações e em matrizes complexas, onde a derivatização pode aumentar significativamente a detectabilidade. Além disso, compostos derivatizados podem minimizar os efeitos de supressão iônica causada pela matriz, especialmente em sistemas de ionização por eletrospray (ESI) (Faqehi *et al.*, 2021; Higashi e Ogawa, 2020).

Outro benefício relevante é o aumento da interação dos compostos derivatizados com a fase estacionária da coluna cromatográfica, possibilitando maior retenção. Essa modificação também pode favorecer o uso de proporções mais elevadas de solventes orgânicos na fase móvel, o que melhora a eficiência do processo de dessolvatação na fonte ESI, resultando em sinais mais intensos (Higashi e Ogawa, 2020).

Para que um método analítico seja reconhecido como confiável, independentemente da técnica empregada ou do tipo de preparo das amostras, é indispensável que seja submetido a um rigoroso processo de validação. A validação, processo definido abaixo, assegura que os resultados obtidos sejam consistentes, precisos e adequados para a finalidade a que se destinam.

1.8. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

A definição de validação de uma metodologia analítica depende da literatura buscada. De forma ampla, pode ser considerada como o conjunto de testes realizados para garantir a eficácia e qualidade de uma medição química. Desta forma, os resultados provenientes desta medição podem ser considerados confiáveis e, no caso de testes quantitativos, próximos ao seu valor verdadeiro (Ribani *et al.*, 2004).

Este processo é essencial para que o laboratório seja acreditado (também chamado de credenciado) em uma agência regulatória, que pode ser nacional ou internacional, de forma que seja possível demonstrar de maneira legal sua aptidão a realizar o procedimento (Miller e Miller, 2010). No caso do Brasil, existem duas agências principais regulatórias: o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO) e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

Apesar de ser extremamente importante, a forma de serem verificadas as figuras de mérito (como são chamados os parâmetros a serem observados na validação) é inconsistente na literatura. Pode-se observar a variação de acordo com a norma seguida, agência regulatória, técnica analítica utilizada ou a finalidade do método proposto (Raposo e Ibelli-Bianco, 2020).

Em relação à métodos quantitativos, de forma geral, as figuras de mérito mais observadas são a seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação. Outros parâmetros como recuperação e robustez também podem ser requeridos de acordo com a norma (Raposo e Ibelli-Bianco, 2020; Ribani *et al.*, 2004).

Resumidamente, os conceitos das figuras de mérito encontram-se a seguir e foram baseadas, em sua maioria, no compêndio de terminologia química (*Gold Book*) da União Internacional de Química Pura e Aplicada (*International Union of Pure and Applied Chemistry* – IUPAC).

A seletividade indica a probabilidade de alguma substância interferir com a determinação da(s) substância(s) a ser(em) verificada(s). A linearidade (ou faixa linear) é a faixa de concentração na qual a intensidade do sinal obtido pelo instrumento é proporcional à concentração dos analitos. A precisão é a proximidade dos resultados obtidos em testes realizados de forma independente (replicatas), o qual pode ser relacionado ao desvio padrão observado. A exatidão (por vezes designada como acurácia) é a proximidade entre os resultados obtidos de uma medição e o valor esperado (dito como “valor verdadeiro”) (IUPAC, 2014).

O limite de detecção (LD), dentro desta literatura, se divide em algumas definições. Entre estas, o LD pode ser identificado como o resultado que pode ser distinguido de um valor de branco (amostra sem a fortificação da substância-alvo). O limite de detecção também pode ser definido como a menor concentração que pode ser detectável com exatidão razoável em um procedimento analítico (IUPAC, 2014).

De acordo com a ANVISA, o LD é a menor quantidade/concentração da molécula alvo detectada, mas não necessariamente quantificada, quando utilizado o método a ser validado (BRASIL, 2017).

O relatório técnico sobre guia de validação da IUPAC define o LD como sendo a menor concentração do analito que pode ser distinguível de zero. O mesmo atenta para o fato que, em muitos casos, o valor estimado nos testes experimentais pode não ser igual ao valor verdadeiro (Thompson, Ellison e Wood, 2002).

Apesar do limite de quantificação (LQ) não ser indicado no *Gold Book*, a definição do termo foi sugerida no relatório técnico como a menor concentração cuja precisão pode ser considerada adequada, dentro dos critérios estabelecidos pelo guia ou diretriz da agência regulatória (Thompson, Ellison e Wood, 2002).

Ainda com base nas figuras de mérito mencionadas pela ANVISA, em abril de 2024 foi lançado o guia para validação de métodos bioanalíticos e análise de amostras de estudo para submissões regulatórias de medicamentos industrializados

de uso humano. Este guia é não normativo, mas recomendado para casos de análises clínicas, incluindo por CLAE e CG. Também podem ser encontradas recomendações de análises e cuidados no preparo de amostras de matrizes secas (Brasil, 2024).

Além dos itens mencionados anteriormente, neste guia estão incluídos o efeito residual, integridade da diluição, estabilidade e reprodutibilidade da reinjeção. Este guia também indica a necessidade de adição de um padrão interno em todas as corridas, amostras, pontos da calibração e controle de qualidade, devendo ser justificado caso não haja (Brasil, 2024).

De forma breve, o padrão interno (PI) é uma substância adicionada à amostra em quantidade conhecida, cuja estrutura é similar à do analito de interesse. Em análises quantitativas, é comum utilizar a razão entre os sinais do analito e do padrão interno, pois essa abordagem reduz as flutuações na resposta, aumentando a precisão dos resultados. O PI ideal deve apresentar alta similaridade estrutural com o analito, mas com diferenças suficientes para permitir sua distinção, seja pelo tempo de retenção ou por valores distintos de m/z . Além disso, ele não deve estar naturalmente presente na matriz da amostra. Por essas razões, padrões internos deuterados são considerados os mais adequados (Keevil, 2013; Skoog *et al.*, 2006).

O guia também indica de forma mais explícita como realizar determinados ensaios, indicando a quantidade de replicatas necessária, formas de realização e parâmetros para aceitação, com sugestão de intervalos de confiança (Brasil, 2024).

Como mencionado anteriormente, a forma de verificar estes parâmetros, assim como os critérios de aceitabilidade, podem variar de acordo com a norma a ser seguida. Neste projeto, o guia escolhido como base para a validação dos métodos desenvolvidos foi da ANVISA (RDC 166/2017) (BRASIL, 2017). A análise das figuras de mérito das metodologias desenvolvidas foi um dos objetivos deste estudo.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o perfil endógeno esteroidal por plasma e urina em pacientes do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF- UFRJ), através das cromatografias líquidas e gasosas acopladas à espectrometria de massas.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver métodos para quantificação do cortisol em ambas as matrizes;
- Validar os procedimentos analíticos propostos segundo os critérios da agência regulamentadora (RDC 166/2017 - Agência Nacional da Vigilância Sanitária - ANVISA);
- Aplicar os procedimentos propostos em urinas e plasmas oriundas de pacientes do hospital e no grupo controle;
- Avaliar e comparar o perfil esteroidal entre os pacientes que possuem disfunção na glândula adrenal e controles.

3. JUSTIFICATIVA

A quantificação precisa do cortisol desempenha um papel essencial na avaliação de distúrbios adrenais, especialmente em condições como a SABC. O desenvolvimento de técnicas analíticas altamente sensíveis e específicas tem possibilitado avanços significativos na identificação precoce e no monitoramento dessas disfunções. Entre análises disponíveis, a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas tem se consolidado como parte da metodologia de referência para a quantificação do cortisol e de seus metabólitos, oferecendo maior precisão em comparação aos imunoensaios convencionais.

O monitoramento longitudinal dos níveis de cortisol é fundamental para detectar alterações sutis na secreção hormonal, que podem ter impacto significativo nos desfechos clínicos. Estudos demonstram que mesmo pequenos aumentos na concentração de cortisol estão associados a maior risco de complicações metabólicas e cardiovasculares. Indivíduos com SABC apresentam risco aumentado

de hipertensão arterial, resistência à insulina e eventos cardiovasculares, consequência direta da exposição crônica a níveis elevados de glicocorticoides (Dalmazi, Di *et al.*, 2014). Além disso, evidências apontam que a taxa de mortalidade é significativamente maior em indivíduos com secreção anômala de cortisol (Azmi *et al.*, 2021; Chiodini e Morelli, 2016).

A análise cromatográfica dessas amostras corrobora a hipótese de que os valores obtidos por imunoensaios convencionais podem superestimar as concentrações reais de cortisol, devido à presença de metabólitos com estruturas semelhantes, levando a resultados falseados por reatividade cruzada (Grassi *et al.*, 2020). Além disso, a cromatografia possibilita a quantificação de precursores esteroidogênicos e metabólitos derivados da esteroidogênese adrenal, como DHEA e androstenodiona, permitindo uma avaliação abrangente da função adrenal. Essa abordagem pode ser particularmente relevante na distinção entre pacientes com SABC e IANF, pois as condutas médicas são completamente distintas. Enquanto os pacientes com IANF podem ser apenas monitorados, aqueles com SABC podem necessitar de intervenções clínicas específicas, incluindo o controle rigoroso dos fatores de risco metabólicos ou até mesmo adrenalectomia, nos casos mais graves.

Neste contexto, a busca por alguma evidência esteroidal que facilite a distinção entre os dois e auxilie o diagnóstico clínico tornou-se o norte deste projeto. Em relação a este estudo, as moléculas-alvo foram quantificadas em amostras de urina e plasma por meio da utilização de soluções que mimetizam, de forma fidedigna, as matrizes biológicas reais e que, até o presente momento, não foram previamente vistas na literatura científica para essa finalidade em amostras de pacientes. Quando aplicadas adequadamente e livres de efeitos de matriz, tais soluções contribuem significativamente para a simplificação dos procedimentos analíticos, tanto na etapa de quantificação quanto no preparo das amostras, apresentando ainda vantagens adicionais como facilidade de preparo e armazenamento.

Além disso, atualmente há a falta de dados relacionados aos pacientes acometidos por tal síndrome no cenário brasileiro, fazendo com que este estudo auxilie e contribua positivamente para a comunidade médica.

O protocolo da metodologia adotada para a urina incluiu a realização de hidrólise enzimática como etapa preparatória essencial, a fim de assegurar a liberação eficiente do cortisol em sua forma conjugada. Foram analisadas amostras de urina coletadas no período matinal, antes e após a administração de dexametasona (DXT), em contraposição ao protocolo tradicional baseado na coleta urinária ao longo de 24 horas. Essa estratégia apresenta-se como uma alternativa inédita e possivelmente vantajosa, sobretudo por favorecer a adesão dos pacientes ao protocolo clínico, ao eliminar a necessidade de coleta prolongada, geralmente percebida como incômoda e de difícil execução.

4. METODOLOGIA

Os procedimentos mostrados neste item, quando não mencionados outro local de forma explícita, foram realizados no Laboratório Brasileiro de Controle de Dopagem (LBCD). Por utilizar amostras biológicas (sangue e urina), este projeto passou pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF) (número CAAE: 53138416.3.0000.5257).

4.1. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

4.1.1. Padrões

O padrão de cortisol foi obtido da empresa LGC Standards (São José dos Campos, Brasil). Do *National Measurement Institute* (NMI, Sydney, Austrália), foram utilizados os padrões de androstenodiona, testosterona (livre e glicuronídeo), androsterona (livre e glicuronídeo), eticolanolona (livre e glicuronídeo), 5 α -diol (livre e glicuronídeo), 5 β -diol (livre e glicuronídeo), DHEA, epitestosterona (livre e glicuronídeo) e DHT. Da marca Steraloids (NewPort, USA) foi obtido o padrão de estrona. Da marca Sigma-Aldrich (St. Louis, USA), foi utilizado o padrão de 17 β -estradiol.

Como padrões internos, foi utilizado o cortisol-D4, da marca Cerilliant (Round Rock, EUA). Também foram utilizados os padrões de androsterona-D4 glicuronídeo, eticolanolona-D5, 5 α -diol-D3, 5 β -diol-D5, epitestosterona-D3, androstenodiona-D3

e testosterona-D3, provenientes do NMI (Sydney, Austrália). O padrão de 17 β -estradiol-D3 foi de procedência da *European Union Community Reference Laboratory* (EU/CRL). À exceção do último, todos os padrões apresentavam certificado de qualidade.

4.1.2. Reagentes e solventes

Os reagentes, solventes e soluções utilizados para o preparo de amostras estão dispostos a seguir. Os solventes ácido fórmico P.A., formiato de amônio P.A., ácido tricloroacético, 2-mercaptoetanol e a enzima β -glicuronidase proveniente da *E.coli* foram obtidos da Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, EUA). Da mesma marca, também foram utilizados os reagentes para a preparação da urina e plasma sintéticos (ácido clorídrico, ácido oxálico, alanina, albumina bovina, bicarbonato de sódio, cloreto de magnésio hexahidratado, cloreto de cálcio, cloreto de potássio, cloreto de sódio, creatinina, glicina, glicose, fosfato de amônio, fosfato de potássio dibásico trihidratado, sulfato de sódio, tris-(hidroximetil)-aminometano, ureia, assim como os sais para os tampões (fosfato de sódio monobásico monohidratado, fosfato de sódio dibásico, carbonato de potássio) e o iodeto de amônio utilizado na solução derivatizante.

Bicarbonato de potássio e sulfato de sódio foram provenientes da marca Biograde (Gatineau, Canadá). O N-trimetilsilil-N-metil trifluoroacetamida (MSTFA) utilizado na mistura derivatizante foi obtido da marca Chemische Fabrik Karl Bucher (Waldstetten, Alemanha). Da marca Tedia (Fairfield, EUA), foram utilizados os solventes acetato de etila, acetona, acetonitrila, diclorometano, hexano, pentano, metanol e metil-terc-butil-éter (MTBE).

4.1.3. Equipamentos

A pesagem de materiais foi realizada em balanças analíticas com precisão de 0,001 mg (Excellence Plus XP26, Mettler Toledo, Alemanha) e 0,001 g (Excellence Plus XP6002S, Mettler Toledo, Alemanha). Os demais equipamentos utilizados para o preparo de amostras foram: agitador do tipo vortex (LP Vortex Mixer, Thermo Scientific, EUA), centrífuga (Heraeus Multifuge X3R, Thermo Scientific, EUA), centrífuga centrífuga (Bio-Rad DiaCent-12, Thermo Scientific, EUA), agitador

rotativo do tipo shaker (MaxQ2000, Thermo Scientific, EUA), cuba de extração (manifold) (HyperSep Glass Block, Thermo Scientific, EUA), evaporador com banho termostatizado (TurboVap LV, Biotage – Uppsala, Suécia), incubadora (Heratherm, Thermo Scientific, EUA), forno à vácuo (VacuTherm, Thermo Scientific, EUA), pipetas automáticas de volume variável, da marca Eppendorf (Stenavage, Inglaterra), pHmetro (Orion VersaStar, Thermo Scientific, EUA) e placa de aquecimento com agitação Cimatec, Thermo Scientific, EUA). O cartucho para extração em fase sólida (EFS) foi composto de 200 mg de fase estacionária do tipo C18, com 33 µm de poro e volume de amostra de até 6 mL, da marca Phenomenex (California, EUA). Tanto as amostras quanto as soluções padrão foram mantidas em freezer, da marca Thermo Scientific, EUA, a -30°C. O sistema de purificação de água para obtenção de água do tipo I (ultrapura) utilizada foi o Milli-Q, proveniente da Merck (Billerica, EUA).

4.1.4. Sistema cromatográfico e espectrômetro de massas

Para análise das amostras, foi utilizado o cromatógrafo gasoso *Trace 1310 GC*, com sistema de injeção automático TriPlus RSH e acoplado ao espectrômetro de massas do modelo TSQ 8000 *Evo Triple Quadrupole* (Thermo Scientific, EUA). Para o sistema de injeção, foi utilizado *liner* do tipo *splitless*, cone único, com lã de vidro e capacidade de 900 µL do tipo ultra inerte, da marca Agilent (Santa Clara, EUA). As colunas utilizadas para as análises por cromatografia gasosa também são provenientes da mesma marca. No caso das análises em urina, foi utilizada a coluna do tipo HP Ultra-1, sendo de fase estacionária do tipo 100% dimetilpolisiloxano (17 m de comprimento x 0,20 mm de diâmetro interno, 0,11 µm de espessura de filme); para as análises de plasma, foi utilizada a coluna do tipo DB-5ht (30 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro interno, 0,10 µm de espessura de filme), com (5%-fenil)-metilpolisiloxano.

O cromatógrafo líquido utilizado foi o Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA). A coluna analítica utilizada foi de fase estacionária do tipo octilsilano (C8), da marca *Synchronis* (Thermo Scientific, EUA), com 50 mm de comprimento x 2,1 mm de diâmetro interno e 1,7 µm de tamanho de partícula. Acoplado ao cromatógrafo, foi utilizado o espectrômetro de massas do tipo

triplo quadrupolo (*TSQ Quantiva Triple-Stage Quadrupole Mass Spectrometer*), da marca Thermo Scientific (Bremen, Alemanha) com ionização do tipo eletronebulização (*electrospray ionization* - ESI).

4.2. PREPARO DE SOLUÇÕES

Todas as soluções descritas abaixo foram pesadas ou transferidas com balanças analíticas, balões volumétricos e pipetas analíticas calibradas; as soluções padrão e amostras foram armazenadas em recipientes herméticos e dispostas sob refrigeração a -30°C até o momento de sua utilização. As soluções tampão, com validade de três meses, e a solução derivatizante de uso, com validade de um mês, foram deixadas em temperatura ambiente.

4.2.1. Preparo de soluções padrão e mixes de padrão

Para a solução inicial de cortisol usada no preparo das amostras de urina para análise por cromatografia líquida, foi pesado 1 miligrama de cortisol em uma balança analítica com precisão de 0,001 mg. O pó foi transferido para um balão volumétrico calibrado de 10 mL e então adicionado metanol até a altura do menisco. A solução foi homogeneizada e transferida para um recipiente adequado.

Para a preparação da curva de calibração de cortisol em urina, foram elaboradas duas soluções de modo a cobrir toda a faixa de trabalho. A primeira solução, com concentração de 20 µg/mL, foi obtida a partir de 2 mL da solução inicial, complementados com metanol em um balão volumétrico de 10 mL. A segunda solução, mais diluída, com concentração de 500 ng/mL, foi preparada a partir da solução de 20 µg/mL, mediante a transferência de 250 µL desta para um balão volumétrico de 10 mL, avolumando com metanol.

Para a obtenção da solução de padrão interno, procedeu-se com a diluição da ampola contendo cortisol-D4 a uma concentração inicial de 100 µg/mL. Foram utilizados 100 µL desta solução para preparar uma solução de trabalho com concentração final de 1 µg/mL, ajustada para um volume total de 10 mL.

Para a análise do cortisol e outros esteroides em plasma por cromatografia líquida, foram preparados seis mixes, um para cada ponto da curva de calibração.

Além disso, foram preparados três controles de qualidade, em baixa (CQB), média (CQM) e alta (CQA) concentração para serem utilizados como avaliação nos lotes de injeção cromatográfica das amostras dos pacientes.

Para o mix de padrões internos, foi utilizada uma solução metanólica de padrões deuterados, com concentração final na amostra de androstenodiona-D3 a 5,0 ng/mL, cortisol-D4 a 150 ng/mL, epitestosterona-D3 a 8,0 ng/mL e testosterona-D3 a 5,0 ng/mL.

Para a análise em urina dos esteroides, foram utilizados um mix de padrões internos, uma solução para estimativa de concentração de esteroides endógenos, uma solução de urina fortificada com os esteroides em alta concentração e um *pool* de urinas sem fortificação.

O mix de padrões internos utilizado nas análises de urina em cromatografia gasosa, também chamado de ISTD, é proveniente da análise de esteroides já comumente realizada dentro do LBCD. A solução metanólica é composta dos seguintes padrões: epitestosterona-D3 a 750 ng/mL; testosterona-D3 a 3000 ng/mL; eticolanolona-D5 a 25 µg/mL, androsterona-D4 glicuronídeo a 25 µg/mL (concentração referente à fração livre), 5α-diol-D3 a 4 µg/mL, 5β-diol-D5 a 9 µg/mL; 19-norandrosterona-D4 a 250 ng/mL salbutamol-D3 a 1000 ng/mL.

A estimativa de concentração dos esteroides endógenos em urina por CG foi realizada pelo método de análise já estabelecido no laboratório. Portanto, esta quantificação foi pontual, sendo o calibrante designado como CALEndo. Esta solução é preparada em urina sintética (mencionada adiante) fortificada com DHEA a 400 ng/mL, DHT a 400 ng/mL, androsterona e eticolanolona a 2000 ng/mL, testosterona e epitestosterona a 40 ng/mL, TH-cortisol a 1000 ng/mL, 5α e 5β androstanodiona a 200 ng/mL. Este controle também apresenta fortificação de outros analitos exógenos e endógenos não citados aqui, visto que não foram avaliados neste presente estudo.

O CQA é o controle de qualidade de alta concentração utilizado na rotina da triagem de esteroides anabolizantes do LBCD. O CQA, por ser marcador principalmente de esteroides exógenos, é fortificado em um *pool* de urinas com diversas substâncias proibidas avaliadas na triagem em concentração próxima ou

igual ao limite mínimo de desempenho (*minimum required performance levels* - MRPL) (World Anti-Doping Agency, 2022).

O CQN é o controle negativo utilizado na rotina da triagem de esteroides anabolizantes do LBCD. É composto apenas por um *pool* de urinas sem a presença das substâncias proibidas avaliadas na triagem de esteroides anabolizantes. É utilizado como marcador de baixa concentração do perfil endógeno.

O preparo das soluções utilizadas na análise de plasma por cromatografia gasosa está detalhado no estudo de Fontes, 2023. Abaixo estão resumidas as informações de cada solução utilizada nas análises por esta metodologia.

Para cada ponto da curva de calibração, foi preparado um mix de diferentes concentrações dos esteroides a serem avaliados, com 10,0 mL de volume final. Adicionalmente, foram utilizadas soluções de concentração baixa (CQB), média (CQM) e alta (CQA) para avaliação das corridas cromatográficas, sendo estas com volume final de 5,0 mL. Estes valores estão dispostos na Tabela 2.

Tabela 2. Concentrações utilizadas, em ng/mL, nos mixes para curvas de calibração e controles nas análises de plasma por cromatografia gasosa.

	P1	P2	P3	P4	P5	P6	CQB	CQM	CQA
androsterona glicuronídeo	15,0	100,0	300,0	500,0	700,0	900,0	30,0	450,0	800,0
etiocolanolona glicuronídeo	15,0	100,0	300,0	500,0	700,0	900,0	30,0	450,0	800,0
5α-diol glicuronídeo	7,0	20,0	50,0	80,0	120,0	160,0	12,0	70,0	140,0
5β-diol glicuronídeo	7,0	20,0	50,0	80,0	120,0	160,0	12,0	70,0	140,0
DHEA	4,0	20,0	50,0	80,0	110,0	150,0	8,0	70,0	130,0
epitestosterona glicuronídeo	2,0	4,0	6,0	8,0	10,0	12,0	3,0	7,0	11,0
DHT	4,0	6,0	8,0	10,0	13,0	16,0	5,0	9,0	14,0
Estrona	0,5	0,7	1,0	1,3	1,6	2,0	0,7	1,0	1,8
Androstenodiona	3,0	6,0	15,0	25,0	35,0	45,0	5,0	20,0	40,0
Testosterona Glicuronídeo	3,0	10,0	40,0	70,0	110,0	150,0	6,0	60,0	130,0
Estradiol	0,5	0,7	1,0	1,3	1,6	2,0	0,7	1,0	1,8

Para o mix de padrões internos, foi utilizada uma solução metanólica de 10,0 mL contendo androsterona-D4 glicuronídeo e etiocolanolona-D5 a 1333 ng/mL (sendo o

glicuronídeo referente à androsterona livre), epitestosterona-D3 a 117 ng/mL, 5 α -diol-D3 e 5 β -diol a 267 ng/mL, DHEA-D5 a 233 ng/mL, androstenodiona a 150 ng/mL, testosterona-D3 a 233 ng/mL, e estradiol-D3 a 25 ng/mL.

4.2.2. Preparo dos brancos de urina e plasma sintéticos

O preparo de urina sintética foi realizado com base em solução relatada por Brito e colaboradores (Brito *et al.*, 2021). Em um balão de capacidade de 1 litro, foram adicionados 1,73 g de fosfato de amônio monobásico, 14 g de ureia, 0,75 g de creatinina, 0,35 g de D-glicose, 0,70 g de glicina, 0,70 g de ácido oxálico, 0,70 g de L-alanina, 0,37 g de albumina e 0,30 g de cloreto de sódio. Foi adicionado água tipo I até a altura do menisco. A solução final foi homogeneizada, aliquotada e mantida em freezer até o momento de sua utilização.

O preparo da solução do branco de plasma utilizado foi descrito por Kokubo e Takadama, com adição de 7% (massa/volume) de albumina bovina, de forma a simular a concentração estimada de proteínas no plasma sanguíneo (Kokubo e Takadama, 2006). Em um recipiente de plástico, foram adicionados 700 mL de água ultrapura. Controlando a temperatura para que estivesse próxima a 36,5°C, foram adicionados, sob agitação, 8,035 g de cloreto de sódio, 355 mg de bicarbonato de sódio, 225 mg de cloreto de potássio, 231 mg de fosfato de potássio dibásico trihidratado, 311 mg de cloreto de magnésio hexahidratado, 39 mL de ácido clorídrico 1 mol/L, 292 mg de cloreto de cálcio, 72 mg de sulfato de sódio e adições concomitantes de 6,118 g de Tris e volume variável de 0 a 5 mL de ácido clorídrico 1 mol/L, de forma que a adição do Tris não aumentasse o pH para acima de 7,45. O pH final, após passar a solução para balão volumétrico de 1 litro e avolumar até o menisco, ficou em 7,40. O monitoramento do pH da solução durante todo o processo, assim como indicado pelo estudo mencionado, foi avaliado com o auxílio do pHmetro.

A esta solução foram adicionadas 70 gramas de albumina bovina até sua completa dissolução. A solução final foi aliquotada e mantida a -30°C até o momento de sua utilização.

4.2.3. Preparo dos tampões

Para o preparo da solução de tampão fosfato de sódio 0,8 M e pH = 7,0, foram utilizados 34,60 g de fosfato de sódio dibásico e 17,60 g de fosfato de sódio monobásico. Ambos foram pesados separadamente e então colocados em um recipiente contendo 460 g de água ultrapura. A solução foi deixada sob agitação com o auxílio de um agitador magnético e placa de agitação até a completa dissolução dos sais. A solução final teve seu pH aferido através de papel indicador de pH e deixada à temperatura ambiente até o momento de sua utilização.

Para a solução de tampão carbonato/bicarbonato de potássio a 20% (*m/m*) - pH = 10, foram utilizados 60,0 g de carbonato de potássio e 60,0 g de bicarbonato de potássio, pesados separadamente. Os sais foram adicionados a 480 g de água ultrapura e deixado sob agitação à temperatura ambiente até completa dissolução. A solução final teve seu pH aferido através de papel indicador de pH e deixada à temperatura ambiente até o momento de sua utilização.

4.2.4. Preparo da solução derivatizante de uso (SDU)

A SDU foi utilizada como parte do preparo de amostras para análise por cromatografia gasosa. 300 miligramas de iodeto de amônio (NH_4I) foram pesados e adicionados a um frasco âmbar comercial contendo 50 mL de N-trimetilsilil-N-metil trifluoroacetamida (MSTFA). Após, foram adicionados 600 μL de 2-mercaptoetanol. O frasco foi tampado, agitado e mantido sob aquecimento a 60°C até completa dissolução do iodeto de amônio. A proporção final da SDU é de 500:3:6 (v:m:v) de MSTFA: NH_4I :mercaptoetanol.

4.2.5. Preparo das soluções de fase móvel (SFM)

As soluções de fase móvel foram compostas de água ultrapura contendo 0,1% de ácido fórmico e 5 mmol/L de formiato de amônio (chamada de “fase A”) e de metanol com 0,1% de ácido fórmico (chamada de “fase B”).

A solução de formiato de amônio inicial utilizada foi de 5 mol/L, cujo preparo procedeu-se pesando 78,75 g de formiato de amônio PA e dissolvidos em 250 mL de água ultrapura.

Para o preparo da fase A, 900 mL de água ultrapura foram dispostos em uma proveta de 1000 mL. Neste recipiente foram adicionados 1000 μ L da solução de formiato de amônio 5 mol/L e o mesmo volume de ácido fórmico PA. A solução foi avolumada até seu ponto de aferição.

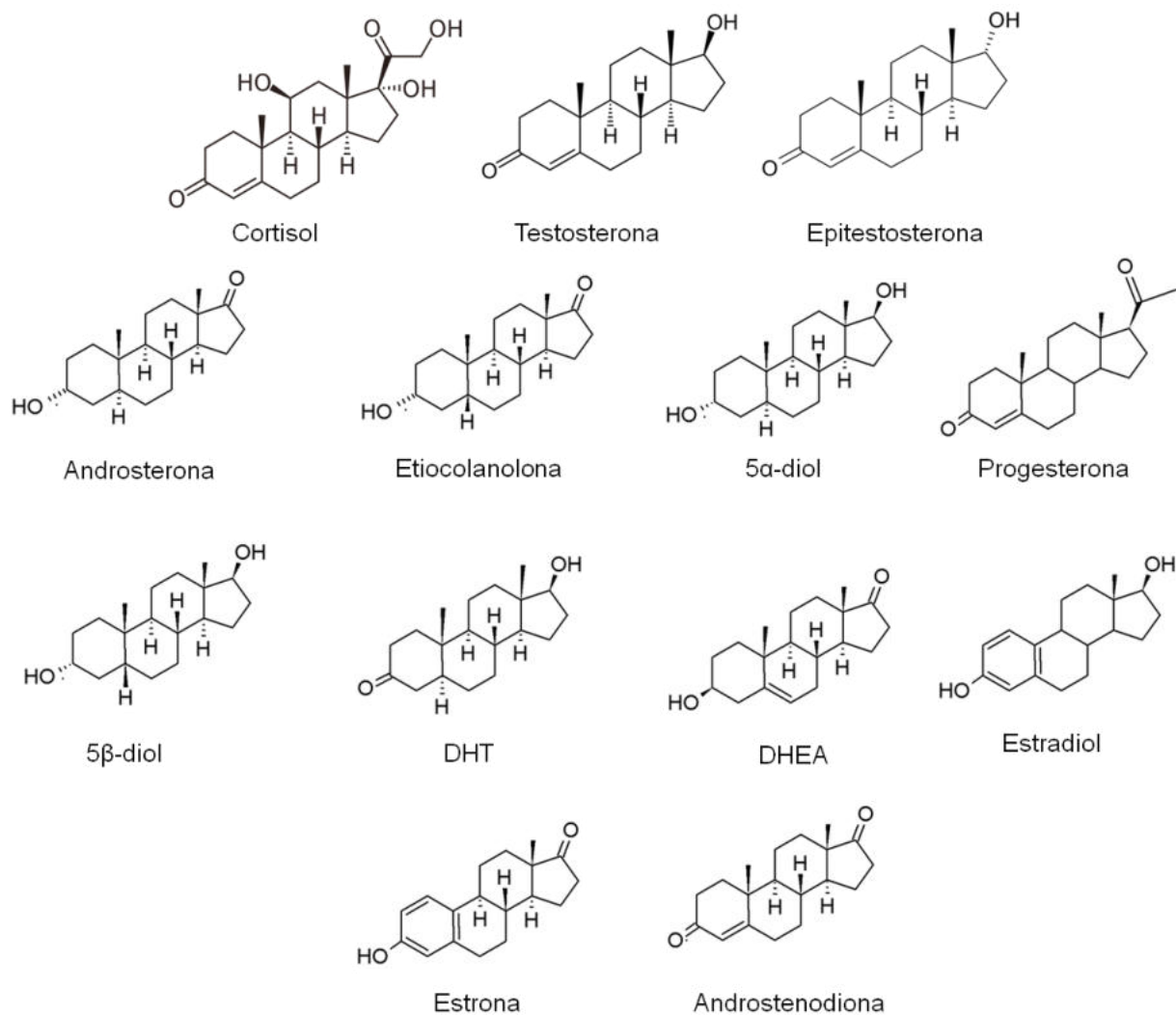
A fase B foi preparada adicionando 900 mL de metanol em uma proveta, adicionados 1000 μ L de ácido fórmico PA e avolumado até seu ponto de aferição.

A solução de fase móvel (SFM) utilizada para ressuspender as amostras ao final do processo de preparo é a junção de 70 mL da fase A com 30 mL de fase B, sendo em diante chamada de SFM 70:30.

4.3. ALVOS ANALÍTICOS

Os alvos analíticos que foram determinados por CLAE e CG estão dispostos na Figura 11 abaixo. Por CLAE, foi avaliado cortisol tanto na urina quanto em plasma. Na análise de urina por cromatografia gasosa, o perfil esteroidal foi avaliado através da testosterona, epitestosterona, androsterona, etiocolanolona, 5 α -diol, 5 β -diol, DHT e DHEA. Na análise de plasma por cromatografia gasosa, foram avaliados a testosterona, epitestosterona, androstenodiona, etiocolanolona, 5 α -diol, 5 β -diol, DHT, DHEA, estradiol, estrona e androstenodiona. Testosterona, androstenodiona, epitestosterona e progesterona também foram avaliados em plasma por CLAE.

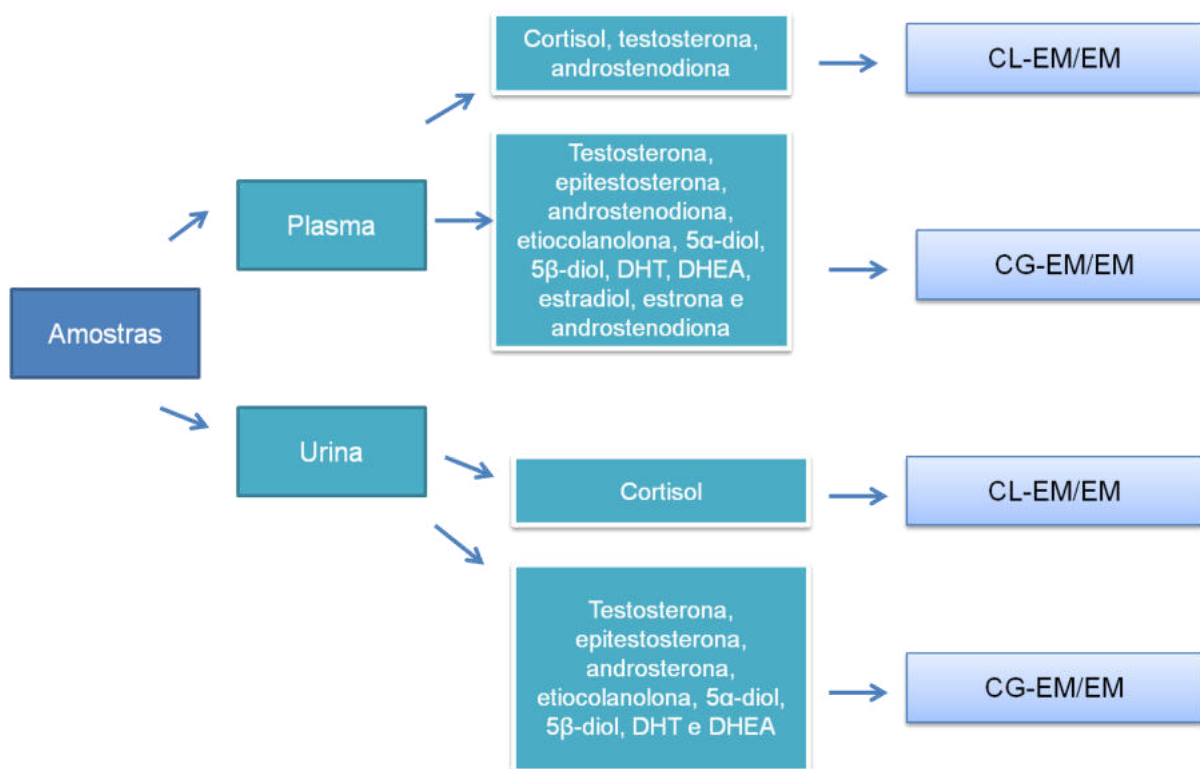
Figura 11. Moléculas alvo monitoradas nas análises por cromatografia gasosa e líquida.



Fonte: elaborada pela autora.

De forma geral, os testes foram divididos conforme a Figura abaixo, tendo o seu preparo de amostras e motivos para análise por diferentes técnicas explicados mais adiante.

Figura 12. Esquema das moléculas avaliadas em plasma e urina e as técnicas analíticas utilizadas.



Fonte: elaborada pela autora.

4.4. COLETA DE AMOSTRAS – PACIENTES E POPULAÇÃO DE REFERÊNCIA

Todos os voluntários do presente estudo assinaram um formulário de consentimento para uso das amostras biológicas nesta pesquisa.

As amostras de 107 pacientes foram coletadas em colaboração com o Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF), Rio de Janeiro, Brasil. A coleta destas amostras foi realizada no próprio hospital, chegando ao LBCD já separadas e prontas para a análise.

A amostragem, realizada com os pacientes sob jejum, foi procedida em dois momentos: em um primeiro momento, o paciente teve a amostra colhida para avaliação de cortisol basal, tanto em urina quanto em sangue, como em um exame rotineiro clínico. No segundo momento, esta amostragem foi realizada após o paciente administrar dexametasona de 1 mg às 23h do dia anterior da coleta. Devido à dificuldade de coleta em diferentes etapas, em alguns casos não foi possível retirar

as frações após a dexametasona. Todas as amostras, tanto urina quanto plasma, foram coletadas entre 7 e 10 horas da manhã devido ao pico do nível de cortisol no organismo compreendido neste horário. As urinas foram coletadas em recipientes plásticos e armazenadas até o momento de sua utilização. As amostras de sangue foram coletadas em tubos contendo EDTA, posteriormente centrifugados a 1500 rpm, 4°C por 15 minutos para o fracionamento do plasma. O plasma foi separado em *eppendorfs*, à temperatura ambiente, e armazenados a -30 °C até o momento de sua utilização.

Todos os voluntários tiveram o nível de cortisol previamente avaliado por imunoensaios (Cobas, Roche 2010 – Mannheim, Alemanha). Baseado nos resultados, os voluntários foram separados em grupos denominados como incidentalomas adrenais não funcionantes (IANF) (cortisol ≤ 50 nmol/L ou $\leq 1,8$ µg/dL), secreção autônoma branda de cortisol – SABC (cortisol entre 51–138 nmol/L ou $> 1,8$ µg/dL) ou portadores de Síndrome de Cushing (Fassnacht *et al.*, 2016). Adicionalmente, o grupo controle passou por exames de imagem para confirmar a ausência de massas anormais na glândula adrenal.

Paralelo aos controles obtidos pelo hospital, amostras de 21 pessoas saudáveis (urina e sangue) também foram coletadas no LBCD para avaliação dos esteroides apenas no nível basal (sem administração da dexametasona). Esta coleta foi realizada principalmente para contribuir para o desenvolvimento da metodologia a ser aplicada e foi denominada de população de referência (PR). Esta coorte compreendeu 15 homens e 6 mulheres, de idades entre 20 e 50 anos, e a coleta foi procedida de maneira análoga à citada anteriormente. Pequenas frações de plasma de cada indivíduo foram adicionadas em um recipiente para formar um *pool* de amostras, o qual foi utilizado para o desenvolvimento dos métodos com plasma e suas validações. A PR também foi posteriormente comparada com os grupos controles obtidos pelo HUCFF.

4.5. TESTES ANTERIORES À VALIDAÇÃO

4.5.1. Escolha da matriz sintética para plasma

A escolha da melhor matriz a sintetizar o plasma real foi realizada através da comparação do coeficiente angular das curvas de calibração do cortisol em diferentes matrizes. Este teste foi realizado em triplicata, visto que os demais testes estatísticos seriam avaliados na fase de validação do método. As curvas comparadas foram:

- a) Pool de plasma com retirada total do sobrenadante;
- b) Pool de plasma com retirada de alíquota (450 μ L);
- c) Solução de cloreto de sódio a 0,85% (m/v);
- d) Solução de SBF (*simulated body fluid*).

O procedimento de preparo de amostra seguiu da mesma forma indicada no item 4.6.3.

4.5.2. Métodos de preparação das amostras em plasma

Para avaliar a forma de preparo de amostra a ser escolhida para análise de plasma, os métodos abaixo foram realizados em 50 μ L de *pool*, em triplicata:

- a) Desproteinizando (como indicado no item 4.6.3);
- b) Extração líquido-líquido com Metil Terc-Butil Eter (MTBE): após desproteinização, foi realizado o teste de hidrólise enzimática com adição de 375 μ L de água ultrapura, 125 μ L de tampão fosfato pH 7,0 de concentração 0,8 mol/L, 25 μ L da enzima β -glicuronidase de *E. coli* e então incubados a 50°C por uma hora. Após, foram adicionados 125 μ L de tampão carbonato pH 10 e 1300 μ L de MTBE. A mistura foi agitada por cinco minutos em agitador orbital e então centrifugadas a 3000 rpm pelo mesmo tempo. A fase orgânica foi separada e seca em banho termostatizado a 40°C, sob fluxo de nitrogênio. As amostras foram ressuspendidas com 100 μ L da proporção inicial das fases móveis (metanol:água 70:30 com ácido fórmico 0,1% e 0,1 M de formiato de amônio) utilizadas na corrida cromatográfica.
- c) Extração líquido-líquido com pentano: mesmo procedimento que o descrito acima, mas utilizando pentano como solvente.

d) Extração em fase sólida (eluição com metanol): após processo de desproteinização, foram adicionados 250 μ L de água ultrapura e 750 μ L de tampão fosfato 0,8 M ao tubo seco. A amostra foi vertida em um cartucho contendo fase sólida C18, previamente condicionado com 2 mL de metanol e 4 mL de água ultrapura. O cartucho foi lavado com 2 mL de água e a eluição foi realizada com 2 mL de metanol. Os tubos foram secos sob fluxo de nitrogênio e reconstituídos com 100 μ L da fase móvel utilizada no início da corrida cromatográfica.

e) Extração em fase sólida (eluição com diclorometano:metanol 9:1 (v/v): após processo de desproteinização, foram adicionados 250 μ L de água ultrapura e 750 μ L de tampão fosfato 0,8 M ao tubo seco. A amostra foi vertida em um cartucho contendo fase sólida C18, previamente condicionado com 3 mL de metanol e 3 mL de água ultrapura. O cartucho foi lavado com 3 mL de água, 3 mL de metanol 30% (v/v) e a eluição foi realizada com 3 mL de diclorometanol:metanol 9:1 (v/v). Os tubos foram secos sob fluxo de nitrogênio e reconstituídos com 100 μ L da fase móvel utilizada no início da corrida cromatográfica.

f) Extrações combinadas (EFS metanol + ELL MTBE): após o processo de extração em fase sólida mencionada na letra d, 375 μ L de água ultrapura e 125 μ L de tampão fosfato pH 7,0 foram adicionados ao tubo seco. O preparo de amostra seguiu conforme o item b, utilizando MTBE como solvente.

g) Extrações combinadas (EFS metanol + ELL pentano): após o processo de extração em fase sólida mencionada na letra d, 375 μ L de água ultrapura e 125 μ L de tampão fosfato pH 7,0 foram adicionados ao tubo seco. O preparo de amostra seguiu conforme o item c, utilizando pentano como solvente.

h) Extrações combinadas (EFS diclorometano:metanol 9:1 + ELL MTBE): após o processo de extração em fase sólida mencionada na letra e, 375 μ L de água ultrapura e 125 μ L de tampão fosfato pH 7,0 foram adicionados ao tubo seco. O preparo de amostra seguiu conforme o item b, utilizando MTBE como solvente.

i) Extrações combinadas (EFS diclorometano:metanol 9:1 + ELL pentano): após o processo de extração em fase sólida mencionada na letra e, 375 μ L de água ultrapura e 125 μ L de tampão fosfato pH 7,0 foram adicionados ao tubo seco. O preparo de amostra seguiu conforme o item c, utilizando pentano como solvente.

j) Extrações baseadas em estudos da literatura: dois tipos de extrações foram realizadas baseados em estudos já publicados para análise de esteroides em plasma. Methlie e colaboradores realizaram uma extração líquido-líquido com mistura de acetato de etila e hexano na proporção 80:20 (Methlie *et al.*, 2013). Outra extração foi realizada de acordo com Ray e colaboradores, os quais realizaram uma EFS com o mesmo tipo de condicionamento indicado na letra d, mas eluindo com mistura de isopropanol e acetato de etila na proporção 15:85 (v/v).

4.5.3. Escolha do solvente de desproteinização

O solvente utilizado para averiguar a maior capacidade de desproteinização nas amostras de plasma foi avaliado. Em um *pool* de 50 µL de plasma, foram adicionados 75 µL de água e, em seguida, desproteinizado com 375 µL dos seguintes solventes: a) metanol, b) acetonitrila, c) ácido tricloroacético (TCA) a 10% (m/v), d) metanol/acetonitrila 2:1 e e) acetonitrila/metanol 2:1. Os sobrenadantes foram secos sob fluxo de nitrogênio e, em seguida, ressuspensos com 500 µL de água. A quantificação de proteínas nas amostras finais foi analisada em um fluorômetro Qubit® (ThermoFisher Scientific, Massachusetts, EUA), utilizando o Kit de Ensaio de Proteínas Qubit® (Número de catálogo: A50668, ThermoFisher Scientific, EUA), seguindo as orientações do fabricante.

4.6. PREPARO DAS AMOSTRAS

4.6.1. Preparo das amostras de urina

Em paralelo às amostras, foram avaliados também os controles CALEndo, CQA e CQN, conforme indicado na seção de preparo de soluções.

Em 2 mL de amostra ou controle, foram adicionados 40 µL do padrão interno (ISTD), 750 µL de solução tampão fosfato 0,8 M (pH 7) e 30 µL da enzima β-glicuronidase de *E. coli*. As amostras foram homogeneizadas em vórtex por 2 segundos e levadas para hidrólise enzimática em estufa a 50°C. Ao término deste tempo, as amostras foram retiradas, adicionou-se 500 µL de tampão carbonato de potássio a 20% (pH 9-10) e, em seguida, 5 mL de MTBE. As amostras foram agitadas por 5 minutos, a 300 rpm, em agitador orbital e então centrifugadas a 3000

rpm, por 5 minutos. A fase orgânica foi transferida para tubos limpos identificados e, posteriormente, os tubos foram levados à evaporação do solvente sob fluxo de N₂ em banho a 40°C. Após este processo, as amostras foram deixadas em dessecador à vácuo por um período de, no mínimo, 30 minutos. A etapa seguinte envolve o processo de derivatização das amostras, que consistiu em adicionar 100 µL de solução derivatizante de uso (SDU), tampar, homogeneizar as amostras em vórtex por 10 segundos e deixá-las em banho seco, a 60°C, por um período de 20 minutos. Após este tempo, as amostras foram transferidas para *vials* contendo *inserts* e levadas para a análise no cromatógrafo a gás.

O percentual da hidrólise nas amostras de CG foi controlado através da razão dos padrões internos androsterona-D4 glicuronídeo e eticolanolona-D5. Considerou-se como critério que o fator de hidrólise esteja acima de 80% para que o perfil endógeno seja considerado válido. Além disso, o controle da derivatização foi feito através da porcentagem da razão entre a eticolanolona-D5 mono TMS e o somatório da eticolanolona-D5 mono e bis TMS. Como critério de derivatização efetiva, foi considerado que esta razão deve estar abaixo de 5%.

4.6.2. Preparo das amostras de urina para avaliação de cortisol

Os tubos para os pontos da curva de calibração foram fortificados conforme indicado na tabela abaixo, utilizando as soluções de cortisol mencionadas no item 4.2.1.

Tabela 3. Pontos de fortificação da curva de calibração na metodologia de avaliação de cortisol em urina por cromatografia líquida.

Pontos	Concentração (ng/mL)	Volume (µL)	Solução utilizada
P1	1	4	500 ng/mL
P2	40	4	
P3	80	8	
P4	120	12	20 µg/mL
P5	160	16	
P6	200	20	

Após, os tubos de vidro foram levados para o banho de nitrogênio para retirada de metanol. Nestes pontos foram adicionados 2 mL de urina sintética. A partir desta etapa, os pontos da curva e as demais amostras são preparadas da mesma forma. Foram adicionados 20 µL de padrão interno (cortisol-D4) na concentração de 1000 ng/mL (concentração final de 10 ng/mL). Em seguida, amostras foram preparadas para a hidrólise, adicionando-se 500 µL de tampão de fosfato de sódio 0,8 mol L⁻¹ pH 7,0 e 100 µL da enzima β-glicuronidase de *E.coli*. As amostras foram agitadas em vórtex e deixadas sob incubação a 50°C por o período de uma hora.

Após, as amostras foram retiradas da incubadora e passam pelo processo de extração em fase sólida (EFS), utilizando cartuchos com fase composta de octadecilsilano (C18). Anterior à adição das amostras, os cartuchos foram ativados com 3 mL de metanol e condicionados com 3 mL de água tipo I. Em ambos os procedimentos a válvula de vácuo é fechada na altura do menisco entre o solvente e a fase estacionária, evitando a secura do cartucho. Após, as amostras foram vertidas e, em seguida, o cartucho é lavado com 3 mL de água tipo I e 3 mL de uma solução de metanol 30% (v/v). Nesta etapa, foi deixado que o solvente saísse totalmente do sistema. Foi realizada a troca para tubos limpos e então adicionado 3 mL da solução de diclorometano e metanol na proporção 9:1 (v/v). Foi deixado o cartucho secar e, após, os tubos foram deixados em atmosfera de nitrogênio até secura. As amostras dos tubos foram ressuspensas com 100 µL de uma solução de metanol e água na proporção 70:30 (v/v), contendo 0,1% de ácido fórmico e 5mM de formiato de amônio (fase móvel utilizada na parte inicial da corrida cromatográfica).

4.6.3. Preparo das amostras de plasma para cromatografia líquida

Em 50 µL de amostra/branco de plasma, foram adicionados 75 µL de água, 10 µL de mix de padrões internos e então adicionados 375 µL de acetonitrila gelada (mantida a -30°C). As amostras foram agitadas em vórtex por aproximadamente 10 segundos e então centrifugadas em uma microcentrífuga a 13000 g, 4°C por um período de 15 minutos. O sobrenadante foi recolhido e deixando sob fluxo de N₂, em banho termostatizado a 40°C, até a secura. Nos tubos secos, foram adicionados 100 µL de solução de fase móvel utilizada no início da coluna cromatográfica (água e

metanol na proporção 70:30). Essa solução foi levada novamente à centrifugação para evitar que houvesse precipitados e, por fim, a solução final foi transferida para *vials* contendo *inserts*, tampados e levados para serem analisados no cromatógrafo líquido.

4.6.4. Preparo das amostras de plasma para análise na cromatografia gasosa

O preparo das amostras de plasma seguiu de forma semelhante a de urina para análise no CG, mas com preparação de uma curva analítica. Em cada tubo da curva foi adicionado 50 µL dos mixes dos pontos da curva (P1 a P6 - Tabela 4); três tubos foram fortificados com 50 µL dos controles de baixa, média e alta concentração e todos foram levados ao evaporador sob fluxo de nitrogênio, em banho termostatzado a 40°C.

Tabela 4. Pontos de fortificação da curva de calibração na metodologia de avaliação de esteroides em plasma por cromatografia gasosa; a unidade das concentrações é de ng/mL.

	P1	P2	P3	P4	P5	P6
Androsterona	1,5	10	30	50	70	90
Etiocolanolona	1,5	10	30	50	70	90
5α-diol	0,7	2,0	5,0	8,0	12,0	16
5β-diol	0,7	2,0	5,0	8,0	12,0	16
DHEA	0,4	2	5	8	11	15
Epitestosterona	0,2	0,4	0,6	0,8	1	1,2
DHT	0,4	0,6	0,8	1	1,3	1,6
Estrona	0,05	0,07	0,1	0,13	0,16	0,2
Testosterona	0,3	1	4	7	11	15
Androstenodiona	0,3	0,6	1,5	2,5	3,5	4,5
17β-estradiol	0,05	0,07	0,1	0,13	0,16	0,2

Após secos, foram adicionados 500 µL de SBF com albumina a 7% (v/v) nos tubos, homogeneizados por 10 segundos no vórtex e então adicionados 15 µL de mix de PI em cada tubo. Foram adicionados 200 µL de tampão fosfato 0,8 M (pH 7), 100 µL da enzima β-glicuronidase de *E. coli*, agitados por 3 segundos e então

levados à hidrólise enzimática por 1 hora a 50°C. Após este tempo, em todos os tubos foram adicionados 100 µL de tampão carbonato de potássio a 20% (pH 9-10), 1,5 mL de MTBE, tampados e agitados em agitador orbital por 5 minutos a 300 rpm. Os tubos foram centrifugados a 3500 rpm por 7 minutos e a fase orgânica foi separada para novos tubos, os quais foram levados a banho termostatzado sob fluxo de nitrogênio a 40°C. Em seguida, os tubos foram deixados no dessecador por 50 minutos e, após este período, foi adicionado 50 µL de SDU para realizar a derivatização das amostras. Os tubos foram incubados a 60°C por 20 minutos. Por fim, a solução final foi transferida para *vials* contendo *inserts* e levados para análise por cromatografia gasosa.

4.7. CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS DO SISTEMA CROMATOGRÁFICO E DO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS

Para as análises do PE em urina, feita por CG, foi utilizada uma coluna de 100% dimetilpolisiloxano (HP Ultra-1, Agilent), com 17 metros de comprimento, 0,11 µm de espessura de filme e 0,2 mm de diâmetro de coluna, com 2 µL de volume de injeção da amostra. O gás carreador foi o Helio 5.0 e o encamisamento de vidro (*liner*) utilizado foi de 4 mm de diâmetro interno, com lã de vidro silanizada dentro do encamisamento. O modo de injeção foi com divisão de fluxo (*split*), com razão de 5:1, 50 psi de pressão de fluxo constante e tempo de pulso de 0,3 min. Foi usado *gas saver* (15 mL/minuto) por um período de 2 minutos. Em relação ao programa de temperatura, a temperatura do injetor foi de 280°C e a temperatura inicial da coluna foi de 140°C, aumentando a 40°C por minuto até a temperatura de 180 °C. Após, gradiente de 3°C por minuto até a temperatura de 230°C e, em seguida, gradiente de 40°C por minuto até 300°C, mantendo em isoterma por 2 minutos. O tempo total de corrida é de 21,42 minutos. Após a injeção, a seringa, de volume de 10 µL, foi lavada 10 vezes com 8 µL de acetona e acetato de etila, respectivamente.

Para a análise do PE em plasma por CG, a coluna utilizada foi com fase estacionária do tipo 5%fenil-metilpolisiloxano (DB-5ht), com dimensões de 30 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro interno x 0,10 µm espessura de filme. Foram injetadas 2 µL de amostra no modo *splitless* com fechamento de válvula por 0,75 minuto. O sistema de injeção teve sua temperatura de trabalho a 280°C e neste sistema foi utilizado *liner* contendo lã de vidro. Em relação à corrida cromatográfica,

a temperatura inicial do forno foi de 140°C, sendo aquecido até 195°C na taxa de 40°C/min. Após, aquecido até 235°C com taxa de 3°C/min, 235°C a 310°C em taxa de 80°C/min e mantido a esta temperatura por 3 minutos. Em relação ao espectrômetro de massas, a energia de colisão, temperaturas na linha de transferência e na fonte foram iguais às utilizadas na análise mencionada anteriormente. A lavagem da seringa antes das injeções foi realizada com três ciclos de 5 µL de acetona e acetato de etila, sequencialmente, e após as injeções com 10 ciclos contendo 8 µL dos mesmos solventes. O modo de análise no espectrômetro de massas também foi do tipo monitoramento de reações múltiplas (MRM). As transições utilizadas podem ser encontradas no Apêndice.

Em relação às análises por cromatografia líquida, ambas as corridas foram realizadas modo gradiente, com fase móvel A composta de solução de água deionizada com 0,1% de ácido fórmico e formiato de amônio a 5 mM e fase móvel B de metanol grau HPLC com ácido fórmico a 0,1%. O fluxo se manteve a 300 µL/minuto em toda a corrida e o forno foi aquecido a 40°C, com coluna do tipo C8.

Para as análises de cortisol em urina por CL, o volume de amostra foi de 10 µL. A corrida iniciou-se com 30% de B por um minuto, aumento gradual de 30% a 100% nos tempos de um a oito minutos, mantendo em 100% por um minuto, e por fim voltando à proporção inicial por dois minutos. O tempo total de corrida foi de 11 minutos.

Para as análises do PE em plasma por CL, o volume injetado de amostras foi de 20 µL. A corrida iniciou-se com 30% de B por um minuto, aumento gradual até 85% em 13,75 minutos, em seguida o aumento para 100% de B em 14 minutos, mantendo nesta proporção por um minuto e então a volta para a proporção inicial por um minuto, totalizando 16 minutos de corrida.

Para todas as análises por CL, as condições da fonte do espectrômetro de massas foram iguais. O gás de bainha (*sheath gas*) a foi configurado para 40, fluxo de gás auxiliar (*auxiliar gas*) a 10 e gás de varredura (*sweep gas*) a 2, todos em unidades arbitrárias. O tubo de transferência (*ion transfer*) foi ajustado para 350°C, o tubo vaporizador para 400°C e a voltagem do spray para 3,5 kV.

O modo de ionização foi em modo positivo $[M+H]^+$ para as amostras em urina e nos modos positivo e negativo $[M-H]^-$ para as amostras em plasma. O modo de aquisição foi por MRM.

As transições foram escolhidas com base em experimentos de infusão direta no espectrômetro de massas. Foram preparadas soluções de cada padrão e diluídas em fase móvel de modo a ter concentração final de 1000 ng/mL. As transições de quantificação e de qualificação foram escolhidas uma vez que apresentassem intensidade adequada e fossem seletivas. Para a análise em urina, foram monitoradas dez transições tanto para cortisol quanto para o PI. Para as análises em plasma, foram monitorados três transições todos os analitos. As transições utilizadas também estão disponíveis no Apêndice.

4.8. VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS DE CORTISOL EM URINA HUMANA E PLASMA

Para este tópico, é válido ressaltar que a análise do PE em urina já é um método validado tanto pela norma ABNT NBR ISO/IEC 17025 do INMETRO quanto pela Agência Mundial de Controle de Dopagem (WADA, do inglês *World Anti Doping Agency*), visto que é o método atual de análise de esteroides realizado no LBCE. O método de PE em plasma por cromatografia gasosa foi desenvolvido por uma aluna do grupo de pesquisa, sendo publicado em sua dissertação de mestrado. Apesar de ainda não ser oficialmente acreditado, este projeto também avaliou as figuras de mérito do método segundo a norma RDC 166/2017 da ANVISA, obtendo sucesso em sua avaliação. Mais detalhes sobre o desenvolvimento e validação deste procedimento podem ser encontrados em Fontes 2023.

O presente projeto avaliou as figuras de mérito para a validação do cortisol em urina e do PE em plasma por cromatografia líquida conforme indicado na RDC 166/2017. Os parâmetros avaliados foram seletividade, linearidade, efeito de matriz, precisão, exatidão, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ) e robustez, conforme detalhados nos itens abaixo. Os testes estatísticos foram realizados em triplicatas verdadeiras, com $\alpha = 0,05$.

4.8.1. Seletividade

Como os analitos são de origem endógena, a avaliação deste item foi realizada na matriz sintética. A seletividade foi verificada em ambos os métodos observando a ausência de interferentes no mesmo T_R ou em tempos próximos aos picos dos analitos nos brancos de matriz.

Desta forma, foram realizadas as comparações cromatográficas entre o controle não fortificado com os analitos (CQN) e amostras fortificadas, com e sem adição de PI. O uso de amostras sem PI tem como justificativa a verificação de presença de picos cromatográficos obtidos pela perda dos deutérios do PI.

4.8.2. Linearidade

A linearidade das curvas de calibração foi avaliada nas matrizes de urina sintética e plasma sintético. Para este ensaio, curvas de calibração foram preparadas com seis pontos de concentração, em triplicatas verdadeiras, fortificando as respectivas matrizes sintéticas com as soluções dos analitos a serem avaliados. Os dados das curvas estão dispostos na Tabela 5.

Tabela 5. Concentração dos pontos das curvas de calibração utilizadas na avaliação de linearidade.

Urina (concentração em ng/mL)							
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	PI [] final
Cortisol	1	40	80	120	160	200	Cortisol-D4 (20 ng/mL)
Plasma (concentração em ng/mL)							
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	PI
Cortisol	0,5	60	120	180	240	300	Cortisol-D4 (150 ng/mL)
Androstenodiona	0,05	1,5	3	6	9	12,0	Androstenodiona-D3 (5 ng/mL)
Testosterona	0,05	1,5	3	6	9	12	Testosterona-D3 (5 ng/mL)
Epitestosterona	0,1	0,2	0,5	0,8	1,1	1,4	Epitestosterona-D3 (8 ng/mL)
Progesterona	1	80	160	240	320	400	Testosterona-D3 (5 ng/mL)

Os níveis de concentração foram escolhidos com base na análise destes esteroides na literatura. Foi considerada como resposta da curva (y) a razão entre as áreas do analito sobre seu respectivo PI. A homocedasticidade das curvas foi avaliada usando teste de Cochran e a presença de valores atípicos através do Teste de Grubbs. Foi aplicada a regressão linear ponderada, utilizando peso de $1/x^2$ (mais detalhes na seção de Resultados e discussão).

Também foram avaliados os coeficientes de correlação (r), o qual deve ser maior ou igual a 0,99, e determinação (r^2), conforme indicado pela RDC 166/2017. Este documento também indica que o coeficiente angular deve ser estatisticamente diferente de zero; este teste foi realizado através dos programas gráficos indicados no item 4.10. Os resultados das curvas de calibração, assim como a análise de resíduos, foram dispostos de forma gráfica.

4.8.3. Efeito de matriz

Esta figura de mérito avalia se a matriz não apresenta algum outro componente que possa influenciar na resposta do sinal do analito dada pelo equipamento. Em casos de matrizes complexas esta observação pode ser válida, ocasionando em alteração do coeficiente angular entre uma curva de calibração realizada com um solvente ou branco de matriz e a curva preparada na matriz real.

Desta forma, este teste foi realizado preparando, em triplicata, curvas de calibração em branco de matriz e na própria matriz. Para a validação do cortisol em urina, a curva com a matriz verdadeira foi feita com um *pool* obtido no laboratório. Na validação do PE em plasma, a matriz real foi o *pool* de amostras da PR. A fortificação se deu conforme indicado no item 4.8.2.

A comparação dos coeficientes angulares foi realizada através do teste T de *student* para médias. O teste T necessita da avaliação primária das variâncias; portanto, o teste F também foi utilizado. Caso o teste T acusasse valor calculado maior que o T_{tabelado} (2,31), considera-se que as médias são diferentes; portanto, há efeito de matriz. Caso o $T_{\text{calculado}}$ seja menor que T_{tabelado} , foi considerado como não apresentando efeito de matriz. Ressalta-se que o uso deste teste estatístico para a avaliação da figura de mérito aqui explicitada é o indicado pela RDC 166/2017 e que

o cálculo do teste é alterado a depender se as variâncias são consideradas equivalentes ou diferentes.

4.8.4. Precisão

A precisão, neste projeto, foi avaliada através da análise da repetibilidade e da precisão intermediária dos métodos.

A precisão foi feita através da preparação de triplicatas verdadeiras de amostras em três níveis de concentração (CQB, CQM e CQA - Tabela 6), de forma a abranger toda a faixa da curva de calibração. Este procedimento foi feito em dias diferentes. No segundo dia, o preparo das replicatas foi realizado por um analista diferente do primeiro dia. A análise das replicatas do primeiro dia é comumente chamada de repetibilidade (feitas por um mesmo analista) e a comparação dos resultados entre os dias (analistas diferentes) de precisão intermediária.

Tabela 6. Concentrações dos analitos, em ng/mL, nos controles de qualidade baixo (CQB), médio (CQM) e alto (CQA) usados na análise de precisão.

Urina (concentração em ng/mL)			
Analito	CQB	CQM	CQA
Cortisol	10	80	150
Plasma (concentração em ng/mL)			
Analitos	CQB	CQM	CQA
Cortisol	10	150	270
Androstenodiona	0,5	4,5	10
Testosterona	0,5	4,5	10
Epitestosterona	0,15	0,65	1,2
Progesterona	10	200	360

Os valores das replicatas foram calculados através de uma curva de calibração (a mesma da linearidade) preparada em triplicata no primeiro dia e por uma curva em simplicata no segundo dia.

A análise dos resultados foi realizada através do desvio padrão relativo (DPR) em cada CQ, como disposto na equação abaixo:

$$\text{Desvio padrão relativo} = \frac{\text{Desvio padrão das replicatas}}{\text{Concentração média experimental}} \times 100$$

Para análise da repetibilidade, considerou-se o número de replicatas = 3; para a precisão intemediária, considerou-se o número = 6 (somatório dos dois dias). Como critério de aceitação, foi estipulado que o DPR deveria apresentar valor menor que 20%.

4.8.5. Exatidão

A exatidão indica a proximidade entre o valor de concentração obtido pelos dados experimentais e a concentração nominal, considerada como valor verdadeiro. Para esta análise, considerou-se os mesmos CQs indicados no item anterior. A avaliação se deu através da porcentagem da razão entre os valores encontrados e a concentração nominal, conforme descrito abaixo:

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{Concentração média experimental}}{\text{Concentração nominal}} \times 100$$

Como critério de aceitação, considerou-se esta figura de mérito admissível caso a exatidão esteja na faixa entre 80 a 120%.

4.8.6. Limites de detecção e de quantificação

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) indicam, como o próprio nome diz, a menor quantidade possível na qual um analito pode ser detectado e quantificado, respectivamente, de maneira inequívoca.

Para estes ensaios, as matrizes sintéticas foram fortificadas com concentrações baixas dos analitos, de forma a tornar-se cada vez mais diluído. O limite de quantificação foi considerado aquele cuja concentração apresenta como resultado a razão sinal/ruído maior ou igual a 10 para o segundo íon diagnóstico. Para o limite de detecção, esta razão foi considerada maior ou igual a 3. O procedimento de avaliar a transição diagnóstica em vez da transição de quantificação foi realizado para que as concentrações estipuladas forneçam maior confiabilidade nos resultados.

De acordo com a RDC 166/2017, é necessário avaliar também a precisão e exatidão na concentração estipulada como LQ. Desta forma, o LQ foi preparado em triplicatas verdadeiras e considerou-se como critério de aceitação o DPR maior que 30% e exatidão entre 80 e 120%.

4.8.7. Robustez

A robustez mostra se pequenas alterações, tanto no preparo quanto na injeção das amostras, levam a diferenças na quantificação dos analitos. Para esta análise, foram avaliados em triplicatas verdadeiras amostras nas concentrações do CQB, CQM e CQA indicados na Tabela 6. As alterações estão mostradas na Tabela 7.

Em relação às variáveis escolhidas, foram selecionados parâmetros passíveis de variações não intencionais durante o preparo das amostras e que apresentam potencial para interferir nos resultados analíticos. No caso das amostras de urina, alterações no volume de eluição podem ocasionar variações na massa final do analito recuperado. Em contrapartida, nas amostras de plasma, a quantidade de agente desproteinizante empregada pode resultar no aumento de interferentes, o que pode levar à redução da intensidade do sinal do analito no cromatograma. As variáveis da corrida cromatográfica são sugestões oferecidas pela própria RDC 166/2017.

Tabela 7. Variações realizadas para avaliação da robustez.

Matriz urina		
<i>Variável</i>	<i>Original</i>	<i>Alteração</i>
Volume de eluição SPE	3 mL	2 mL
Matriz plasma		
<i>Variável</i>	<i>Original</i>	<i>Alteração</i>
Volume de acetonitrila (desproteínização)	375 µL	400 µL
Tempo de centrifugação (desproteínização)	15 minutos, 4°C	20 minutos, 6°C
Ambas as matrizes		

<i>Variável</i>	<i>Original</i>	<i>Alteração</i>
Vazão da corrida	300 $\mu\text{L min}^{-1}$	280 $\mu\text{L min}^{-1}$
Temperatura do forno	40°C	42°C

Para a avaliação dos resultados, foram calculados o DPR e exatidão nas concentrações dos CQBs, CQMs e CQAs. Os critérios de aceitação foram os mesmos citados no item de precisão.

4.8.8. Arraste

O arraste indica se a injeção de uma amostra prévia pode alterar na quantificação da próxima análise; ou seja, se o conteúdo de uma injeção é “arrastada” para a seguinte. Para esta análise, foi avaliada uma injeção de fase móvel (SFM) logo após a injeção do maior ponto da curva de calibração (P6) de ambas as matrizes. Como critério de aceitação, o aumento da área nos T_R esperados não deve ser maior que 1,0%.

É válido ressaltar que esta figura de mérito não é mandatória para a RDC 166/2017; entretanto, como pretende-se utilizar os métodos em amostras reais, torna-se necessário a sua avaliação para não acarretar em quantificações errôneas.

4.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os testes estatísticos foram realizados com nível de significância de 5% ($\alpha = 0,05$), de acordo com o que é requerido pela RDC 166/2017 da ANVISA.

4.9.1. Teste de Grubbs

A avaliação de valores atípicos neste estudo se deu através do teste de Grubbs, o qual compara a distância do valor do resultado avaliado e a média das medidas, conforme equação abaixo.

$$G_{calc} = \frac{X - \bar{x}}{S}$$

Sendo X = valor avaliado como atípico, $\bar{x}$ = média das replicatas e S = desvio padrão. Os valores de corte ($G_{\text{crítico}}$) adotados foram de $G_{\text{crítico}} = 1,155$, quando o número de replicatas (n) = 3 e 1,481, quando $n = 4$.

4.9.2. Teste F de Snedecor

O teste F é utilizado para comparação de duas variâncias e é aplicada anteriormente ao teste T de comparação de médias (ver item abaixo). Seu cálculo leva em consideração o quadrado dos desvios padrões, como mostrado abaixo.

$$F_{\text{calc}} = \frac{S_1^2}{S_2^2}$$

É importante ressaltar que o $F_{\text{calculado}}$ deverá sempre ser maior do que 1; portanto, o que apresentar maior desvio padrão deverá ser posto como dividendo. Caso $F_{\text{calculado}}$ seja maior que o F_{tabelado} , a hipótese nula (de que as variâncias entre os conjuntos avaliados são iguais) é rejeitada.

4.9.3. Teste de Cochran

O teste de Cochran avalia a homogeneidade das variâncias entre um conjunto de dados, conforme indicado na equação abaixo.

$$C_{\text{calc}} = \frac{S_{\text{max}}^2}{\sum_{i=1}^N S_i^2}$$

No qual S_{max}^2 representa a maior variância presente no conjunto de dados e $\sum_{i=1}^N S_i^2$ é o somatório de todas as variâncias no conjunto de dados. Este valor é comparado com um valor tabelado; caso $C_{\text{calculado}}$ seja maior que C_{tabelado} , as variâncias são consideradas não homogêneas. Este teste é aplicado comumente na avaliação de homocedasticidade ou heterocedasticidade de curvas de calibração. Para este estudo, considerou-se que $C_{\text{tabelado}} = 0,616$ para seis pontos de concentração contendo três replicatas cada.

4.9.4. Testes de comparação de médias/medianas – Teste T, ANOVA, Mann-Whitney U e Kruskal-Wallis

A comparação de dois grupos de dados pode ser realizada pelo teste T. A hipótese nula é a de que as médias entre os conjuntos de dados não difira entre si ($\mu_1 = \mu_2$), sendo a diferença entre as médias próximas a zero. Para este teste, os resultados precisam apresentar desvios padrões estatisticamente diferentes entre si; desta forma, é necessário calcular o teste F anterior ao teste T. Caso sejam semelhantes, é realizada uma estimativa de desvio padrão agrupado, utilizando a fórmula abaixo.

$$S = \frac{(n_x - 1)s_x^2 + (n_y - 1)s_y^2}{n_x + n_y - 2}$$

O S encontrado é então colocada na fórmula do teste T para avaliação de diferença entre as médias do conjunto de dados, como disposto na equação abaixo:

$$t_{calc} = \frac{\bar{X} - \bar{Y}}{S \sqrt{\left(\frac{1}{n_x} + \frac{1}{n_y}\right)}}$$

No qual t apresenta $n_1 + n_2 - 2$ graus de liberdade.

Nos casos nos quais há a necessidade de comparar mais de dois grupos, foi realizado o teste de análise de variância (ANOVA). Este teste também tem como fim a comparação das médias dos grupos, porém o cálculo para tal é realizado através das variâncias.

É importante ressaltar que, para utilização destes testes, a análise deverá apresentar distribuição normal. Quando isso não é observado, deve-se então utilizar a estatística não paramétrica, os quais costumam embasar os cálculos na mediana em vez da média. Os testes de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis são os mais utilizados para avaliação entre 2 e 3 ou mais grupos, respectivamente, com dados não gaussianos e foram empregados onde foi observado esta natureza no conjunto de dados.

4.10. PROGRAMAS UTILIZADOS PARA PROCESSAMENTO DE DADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos dos cromatogramas e dos espectros de massa foram processados utilizando os softwares TraceFinder™ 4.1. Forensic e o modo Qual Browser do Xcalibur, ambos da Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, EUA). As análises gráficas e estatísticas univariadas foram feitas utilizando os softwares Microsoft Excel e o GraphPad Prism 9.4.0 (CA, EUA). As análises de *Principal component analysis* (PCA) foram realizadas com o auxílio do programa *MetaboAnalyst* 5.0.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. TESTES ANTERIORES À VALIDAÇÃO DAS METODOLOGIAS

5.1.1. Escolha da matriz sintética para o plasma

Para a preparação de uma curva de calibração e controles de qualidade, o ideal é que a matriz a ser utilizada para o preparo seja a mesma que se está analisando. Entretanto, os analitos deste estudo são de origem endógena; ou seja, inerentes à urina e plasma. Desta forma, sempre há uma quantidade significativa destes componentes de forma que interfira na sua quantificação.

Uma alternativa utilizada, em alguns casos, é a construção da curva com a fortificação do analito em alíquotas da própria amostra, conhecida como adição padrão (Skoog *et al.*, 2008). Hasegawa e colaboradores reportaram, em 2021, um conjunto de estudos que foram conduzidos por este procedimento, avaliando xenobióticos, etilenoglicol, dietilenoglicol e propilenoglicol. Foram utilizadas as mais diversas matrizes biológicas, como urina, plasma, cabelo e outros tecidos humanos (Hasegawa *et al.*, 2021).

Dentre as alternativas, ainda é possível usar a própria matriz ao construir a curva com um padrão marcado isotopicamente análogo ao analito que se deseja

quantificar. Este procedimento é chamado de *surrogate analyte* (“substituto do analito”, tradução nossa) (Jones *et al.*, 2012).

Apesar de serem possibilidades, estas formas de preparo não foram consideradas para o presente estudo. A escolha da adição padrão em análises cromatográficas costuma ser baixa, visto que muitas vezes são necessárias as avaliações de diversos lotes de amostras, tornando-se um preparo dispendioso (Raposo e Barceló, 2021). Para cada amostra, seria necessária a construção de uma curva de calibração, aumentando a quantidade de tempo para o preparo e usando significativos volumes das amostras dos pacientes, tornando-se inviável a sua utilização.

Outra alternativa para a construção da curva seria retirar os analitos da matriz através de algum processo de preparo de amostra, de forma que se pudesse utilizá-la. Na literatura, encontram-se estudos sobre o uso de carvão ativado, tanto em sangue quanto em urina (Wilde, De *et al.*, 2020). Foi realizada a tentativa de uso desta forma de *clean-up* da matriz utilizando um *pool* de soro disponibilizado comercialmente pela Sigma Aldrich. Apesar de soro e plasma serem diferentes, a distinção entre as duas matrizes é a presença de fibrinogênio (discutido mais adiante), o que tornaria uma matriz bastante similar a de trabalho.

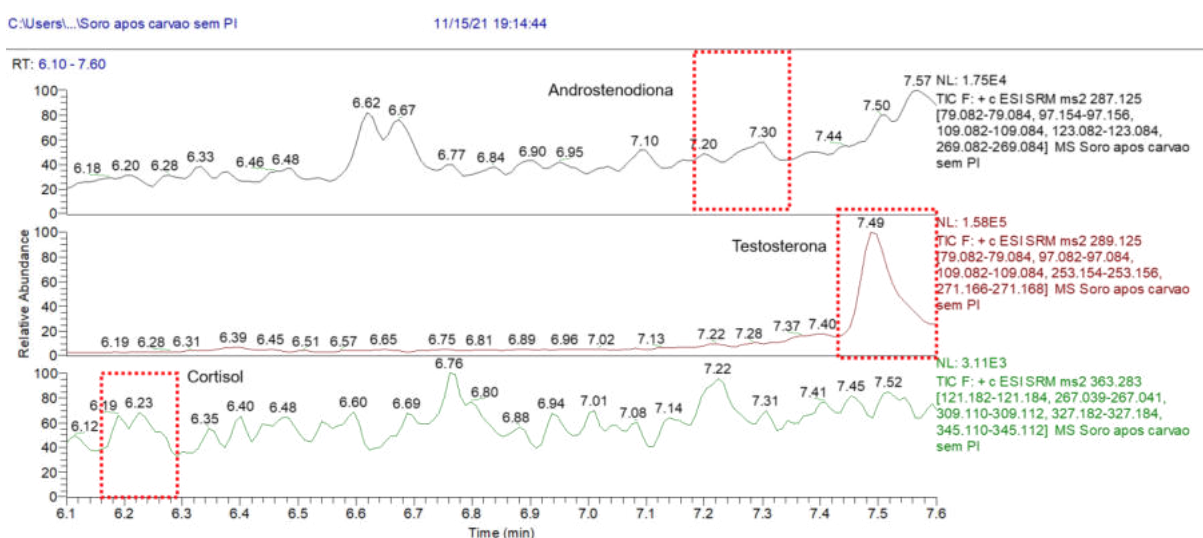
Foram utilizados dois estudos, ambos em equinos, como base para a proporção entre carvão ativado e soro a ser utilizado (AbuRuz *et al.*, 2003; Genangeli *et al.*, 2017). A metodologia de AbuRuz e colaboradores foi seguida, cujo teste indicou o de 4 gramas de carvão ativado para cada 100 mL de plasma. Portanto, foram utilizados neste experimento 20 mg para os 500 µL do teste. Diferente de AbuRuz, que deixou em agitação por 2 horas, o tubo foi deixado durante 24 horas e então centrifugado a 3000 rpm por 3 horas, conforme indicado na metodologia.

Os resultados estão mostrados na Figura 13. Vale ressaltar que os cromatogramas são de testes prévios; por este motivo, os tempos de retenção são distintos da corrida utilizada na validação. Nesta avaliação, a figura mostra o teste sem adição de padrão interno; desta forma os picos cromatográficos não são oriundos do analito sem deutério (D0). É possível observar que para o cortisol e

androstenediona o teste foi eficiente; entretanto, a testosterona ainda apresentou um pico significativo, o que acarretaria em dificuldade em sua quantificação.

É relatado que em alguns casos há resquícios dos analitos mesmo com este procedimento sendo realizado duas vezes (Andrew e Homer, 2020). Portanto, foram realizadas outras estratégias de limpeza da matriz.

Figura 13. Cromatograma de íons extraídos da androstenediona, testosterona e cortisol em soro humano após 24 horas com carvão ativado.



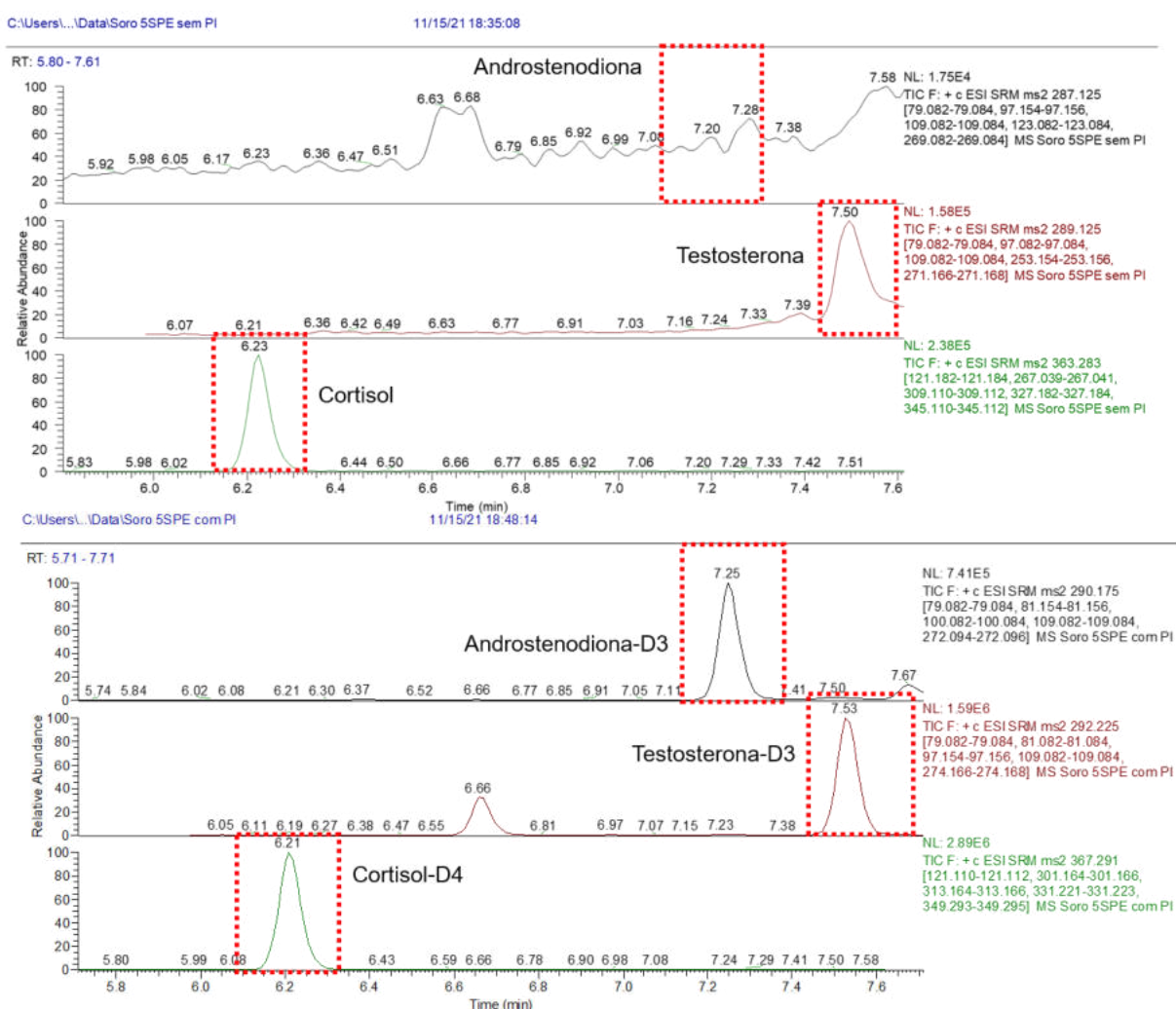
Fonte: elaborado pela autora.

Na tentativa de realizar outros testes com o uso do soro após procedimento de limpeza, foi realizada a avaliação do soro após etapas sucessivas de extração em fase sólida, com cartucho do tipo C18.

Para isso, o cartucho foi ativado e condicionado com 2 mL de metanol e 1 mL de água em seguida. Porém, ao invés de verter a amostra diretamente, o tubo de coleta foi trocado de forma a colher apenas a fração do soro que não interagiu com a fase estacionária do cartucho. Este procedimento foi repetido num total de 5 vezes, utilizando 1 mL inicial de soro. O resultado encontra-se na Figura 14. Na parte abaixo da figura, encontra-se o cromatograma com a amostra que passou pelo mesmo procedimento, mas com a adição dos padrões internos.

É possível perceber que ainda há resquícios de testosterona e cortisol. Para a testosterona, a área significativa pode ser devido à natureza do soro, visto que é um *pool* coletado de voluntários do sexo masculino. Em relação ao cortisol, devido a maior presença de hidroxilas, a interação com a fase estacionária do cartucho pode não ser tão efetiva, levando a área elevada mostrada abaixo.

Figura 14. Cromatograma de íons extraídos do soro humano após procedimento de extração em fase sólida feito por 5 vezes.



Fonte: elaborado pela autora.

Devido à dificuldade de encontrar formas de limpeza efetiva da matriz, foram realizados outros testes. A busca de alternativas para “mimetizar” a matriz

verdadeira é comumente chamada na literatura de *surrogate matrix* (substituto da matriz, tradução nossa) (Jones *et al.*, 2012).

Optou-se, portanto, por procurar alguma solução que sintetizasse o plasma real. Na literatura, podem ser encontradas soluções de tampão fosfato salino com albumina bovina a 4% (m/v) (Yin *et al.*, 2021), solução de cloreto de sódio próxima a 0,9% (m/v) (Häkkinen *et al.*, 2018; Merbel, van de, 2008), entre outros.

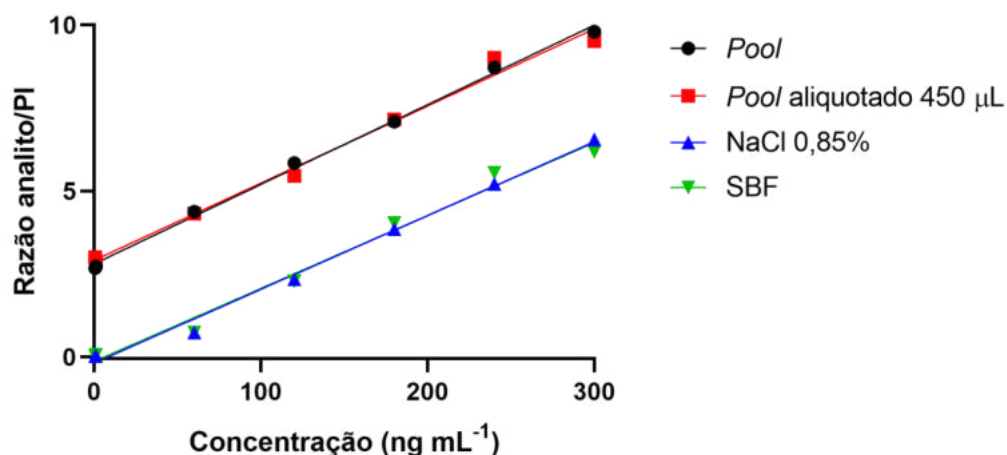
Como são matrizes sintéticas, não há o aumento significativo de área nos tempos de retenção avaliados, a menos que haja a sua fortificação com os analitos. Para este teste, foi realizada a comparação do coeficiente angular das curvas de calibração realizadas em matrizes sintéticas e em uma curva preparada em um *pool* de plasma. Espera-se, em soluções adequadas para servirem de *surrogate*, que a resposta seja similar a da matriz real, tendo a alteração apenas do coeficiente linear, devido a presença do analito na matriz real.

Desta forma, foram comparadas curvas preparadas em um *pool* de plasma, em cloreto de sódio 0,85% (soro fisiológico) e em uma solução designada de *Simulated body fluid* (SBF). Esse teste foi realizado avaliando as respostas do cortisol, visto que inicialmente este seria o único analito a ser visto por cromatografia líquida. Ao longo do projeto, foram adicionados os outros esteroides mencionados anteriormente.

Também foi preparada uma curva de calibração através de retirada de alíquotas em vez de retirar todo o sobrenadante, para ver se teria diferença na linearidade entre as duas formas. É importante ressaltar que para as análises de urina para este teste não foi realizado, uma vez que o uso da urina sintética para a quantificação de esteroides já é bem estabelecida e adotada nas análises de triagem e confirmação do laboratório. Além disso, demais testes referentes à sua utilização podem ser encontrados em Alves, 2012.

Esta avaliação com a matriz escolhida foi repetida no processo de validação, durante a análise de efeito de matriz; portanto, as curvas neste teste foram preparadas em simplicatas. Os resultados estão dispostos na Figura 15. Observa-se que não há diferença alíquotar uma fração do *pool* para a quantificação, assim como não é possível notar diferenças entre a curva preparada apenas com cloreto de sódio e o SBF.

Figura 15. Comparação das curvas analíticas em simplicatas nas três matrizes testadas para o cortisol: *pool* de plasma (retirada fixa e variável de alíquotas), solução de cloreto de sódio a 0,85% (*m/v*) e na matriz de plasma simulada (*simulated body fluid* - SBF).



Fonte: elaborado pela autora.

Também é possível notar através do gráfico que os coeficientes angulares das soluções aproximam-se do coeficiente da curva preparada em matriz real. Esta observação é reforçada pelo valor numérico ao comparar as curvas, como mostrado na Tabela 8. Essa avaliação prévia é positiva, visto que, para que não haja efeito de matriz, ocasionando em diferenças no processo de quantificação, as duas curvas devem apresentar este coeficiente estatisticamente igual.

Tabela 8. Comparação das curvas analíticas de fortificação de cortisol em diferentes matrizes. Comparação entre um *pool* de plasma, pool de plasma com retirada fixa de alíquotas, solução de cloreto de sódio a 0,85% (*m/v*) e na matriz de plasma simulada (*simulated body fluid* - SBF).

Matriz	Equação da reta	R ²
Pool	$y = 0,02400X + 2,801$	0,9971
Pool aliquoteado 450 µL	$y = 0,02325X + 2,911$	0,9891
NaCl 0,85%	$y = 0,02223X - 0,1875$	0,9931
SBF	$y = 0,02198X - 0,1361$	0,9851

A escolha entre NaCl e o SBF como a matriz sintética se deu à similaridade das soluções em relação ao plasma real. O plasma humano é constituído em torno de 90% de água, sendo o restante distribuído em proteínas (7 a 8%) e substâncias

de baixa massa molecular (2%). Dentro das proteínas, a albumina é a majoritariamente presente, representando em torno de 60% do total (Schmidt R. F. e Thews, 1989).

Em relação aos eletrólitos, presentes como parte das substâncias de baixa massa molecular, pode-se observar a similaridade das suas concentrações com as presentes na solução de SBF (Tabela 9). A solução de cloreto de sódio, apesar de apresentar alguns íons presentes no plasma, não representaria de forma fidedigna este fluido biológico.

Tabela 9. Comparação da concentração de íons presentes no plasma, SBF e NaCl a 0,85%.
Comparação entre plasma e SBF retirada de Kokubo e colaboradores, 2006.

Íons	Concentrações (mmol/L)		
	Plasma	SBF	NaCl 0,85%
Na^+	142,0	142,0	145,0
K^+	5,0	5,0	-
Mg^{2+}	1,5	1,5	-
Ca^{2+}	2,5	2,5	-
Cl^-	103,0	147,8	145,0
HCO_3^-	27,0	4,2	-
HPO_4^{2-}	1,0	1,0	-
SO_4^{2-}	0,5	0,5	-

O pH destas soluções também é similar: entre 7,2 a 7,4 no sangue e 7,4 no SBF. O preparo desta solução foi reportado por Kokubo e colaboradores, em 2006, como forma de simular o plasma da maneira mais verídica possível. Portanto, para o prosseguimento das demais etapas, foi escolhido o SBF como branco de plasma. Também foi adicionada albumina bovina a 7% (m/v) para esta solução, de forma a mimetizar a quantidade total de proteínas que são encontradas no plasma (Schmidt R. F. e Thews, 1989).

O plasma, que constitui aproximadamente 55% do volume sanguíneo, é composto predominantemente por água (92%), além de proteínas, glicose, sais minerais, hormônios e elementos celulares, como hemácias, leucócitos e plaquetas. Também representa o principal meio de transporte para a excreção de dióxido de

carbono no organismo. Em conjunto com o soro, o plasma é amplamente utilizado em pesquisas quantitativas de esteroides (Keevil, 2016; Niu *et al.*, 2018).

A principal diferença entre o plasma e o soro reside na presença de fibrinogênio no plasma. Enquanto o soro é obtido após o processo de coagulação do sangue, o plasma requer a adição de anticoagulantes, como o EDTA usado no tubo para a aliquotagem, para evitar a formação de coágulos. Após a coleta, recomenda-se o armazenamento do plasma a -20°C, a fim de prevenir a degradação proteica e garantir a integridade das análises subsequentes (Niu *et al.*, 2018).

Esta análise de matriz foi verificada apenas para o cortisol, visto que, em um primeiro momento, apenas este analito seria verificado no plasma. Entretanto, como dito anteriormente, a influência da matriz sintética também é avaliada durante o processo de validação. Portanto, o efeito de matriz foi reportado para os demais analitos posteriormente.

5.1.2. Comparação de métodos de extração dos endógenos em plasma

Os métodos de extração a serem comparados foram escolhidos tanto com base em métodos já estabelecidos no laboratório, quanto com estudos na literatura envolvendo cortisol, que foi a avaliada neste experimento prévio.

A área de cortisol após os experimentos realizados em triplicata, com diferentes formas de extração, está apresentada na Tabela 10. É possível observar que a ELL com pentano não foi eficiente. Isso se deve diferença de polaridade entre o cortisol e o pentano, levando a interações intermoleculares mais fracas e, consequentemente, levando à menor eficiência de extração. No entanto, em matrizes complexas com uma grande quantidade de interferentes, o pentano pode ser usado para reduzir a quantidade desses compostos indesejáveis, o que não foi visível neste experimento.

Tabela 10. Área obtida do cortisol em diferentes métodos de extração.

Método	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3	Média
ELL MTBE	5743994	6115303	6104794	5988030
ELL pentano	144847	139434	119617	134633
EFS metanol	6246048	6271532	6126638	6214739
EFS diclorometano:metanol 9:1	2615929	2585355	2986436	2729240
EFS metanol + ELL MTBE	4834510	5149831	5776009	5253450
Ray <i>et al.</i> , 2011	5188690	5144630	6036147	5456489
Methlie <i>et al.</i> , 2013	5174733	4049639	4312516	4512296
Desproteinizando	10794557	11763648	12302954	11620386

As extrações em fase sólida seguidas pela extração líquido-líquido com pentano não foram indicadas na tabela, uma vez que os picos cromatográficos mostraram baixa intensidade (devido à ineficiência da extração).

Neste teste de comparação de extração, as relações entre o padrão e o PI não foram utilizadas, pois o solvente que extrairá pior o analito também extrairá ineficientemente o padrão interno, resultando em razões padrão/padrão interno semelhantes em todos os testes. Portanto, o PI, apesar de adicionado nos testes, também foi avaliado como um analito.

Entre os métodos de extração, a extração em fase sólida usando metanol como solvente de eluição e a desproteínização se destacam como os melhores. Em casos onde o analito tem uma baixa concentração plasmática, a extração em fase sólida pode ser um método viável. No entanto, alguns estudos utilizam a desproteínização para avaliar o plasma (Hao *et al.*, 2018; Loh *et al.*, 2020; Park *et al.*, 2021) e, particularmente para o cortisol, que tem valores altos, a desproteínização pode ser usada (Keevil, 2016). Além disso, esta forma de preparação é menos dispendiosa, usa menores quantidades de solvente e as perdas de analitos são reduzidas (Everaert *et al.*, 2019).

Dentre as vantagens da desproteínização, pode-se citar a sua simplicidade, perda mínima de amostra (poucas ou nenhuma transferência), reagentes baratos, quantidade relativamente pequena de trabalho, aplicabilidade a uma ampla gama de químicas de analitos e facilidade de automação. Entretanto, deve-se avaliar se há a necessidade de concentrar analitos, o que não é feito com este preparo de

amostras. Além disso, também é relatada na literatura a supressão significativa de íons em matrizes biológicas, causada em grande parte pelos fosfolipídios do soro e plasma, levando à falta de robustez do método analítico (Stone, 2017).

Apesar dos últimos pontos mencionados, a desproteínização foi escolhida como forma de preparo de amostras de plasma devido à sua simplicidade e por ter mostrado os melhores resultados no teste anterior. Entretanto, existem diversas formas de promover a precipitação de proteínas; algumas foram testadas e estão dispostas a seguir.

5.1.3. Teste de desproteínização

O preparo de amostra através da desproteínização é eficaz em casos cuja matriz apresenta grande quantidade de proteínas, como visto no sangue total, soro e plasma. Dentre as formas de preparo, pode-se encontrar o uso de ácidos, sais, metais e solventes orgânicos como agentes desproteinizantes (Stone, 2017).

No caso dos sais, os sulfatos de zinco ou de amônio são bastante vistos na literatura como agentes desproteinizantes. Sua ação se baseia na diminuição da água na região hidrofóbica da proteína devido à solvatação do sal, levando a agregação das proteínas por conta da alteração das interações nas regiões hidrofóbicas. A adição de metais pode provocar a ligação entre estes e a proteína, alterando seu ponto isoelétrico e diminuindo sua solubilidade (Nair e Clarke, 2016; Shuguang e Chowdhury, 2020).

Já no caso da adição de solventes orgânicos, observa-se a diminuição na camada de solvatação da proteína, devido à troca das moléculas de água pelas de solventes orgânico. Este processo leva à agregação das proteínas pelas forças eletrostáticas atrativas. No caso de solventes orgânicos miscíveis em água, também observa-se a diminuição da constante isoelétrica das proteínas na água, fazendo com que essas possam se aproximar umas das outras, levando à sua agregação. (Novák e Havlíček, 2016).

A adição de ácidos provoca a alteração do pH do meio, deixando as proteínas abaixo de seu ponto isoelétrico e causando a formação de sais insolúveis entre o contraíon e as cargas positivas presentes no grupo amino das proteínas (Novák e

Havlíček, 2016; Shuguang e Chowdhury, 2020). O sólido é então retirado após a centrifugação do tubo.

Dentre as alternativas citadas anteriormente, é observado que o ácido tricloroacético (TCA) é o principal utilizado dentre os ácidos e que os solventes orgânicos, tais como metanol e acetonitrila, geralmente são utilizados na proporção de 3:1 entre solvente:amostra (Medvedovici, Bacalum e David, 2018). Desta forma, a avaliação de qual o melhor agente para desproteínizar foi realizada comparando os efeitos utilizando acetonitrila, TCA 10% (v/v), metanol:acetonitrila (1:2), metanol:acetonitrila e (2:1) e metanol puro. Todos estes foram adicionados na proporção de 3:1 entre solvente e amostra.

A quantificação foi realizada por fluorimetria, utilizando os reagentes próprios da análise de fluorescência para proteína no Qubit®. O resultado dos testes de desproteínização está demonstrado na Tabela 11.

Tabela 11. Resultados do teste de desproteínização com diferentes agentes.

	Concentração amostra ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Tubo Qubit ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
<i>Pool</i> (proteína total)	0,1900	19,0
Acetonitrila	0,0545	5,45
TCA 10%	0,0428	4,28
Metanol: acetonitrila (1:2)	0,0729	7,29
Metanol: acetonitrila (2:1)	0,0928	9,28
Metanol	0,1100	11,0

É possível observar que, dentre todos os agentes, o TCA a 10% (v/v) apresenta maior capacidade de desproteínizar, seguida da acetonitrila pura, mistura de metanol:acetonitrila (1:2), metanol:acetonitrila (2:1) e metanol puro.

O TCA, por apresentar baixa acidez, não é capaz de hidrolisar as ligações peptídicas das proteínas. Entretanto, sua adição é capaz de romper as ligações de hidrogênio entre as moléculas de água presentes na esfera de hidratação ao redor da proteína, levando à sua precipitação e desnaturação (Koontz, 2014).

Apesar de o TCA ser o mais eficiente, a acetonitrila foi escolhida como agente desproteinizante. Esta escolha se deu uma vez que a alteração de pH causada pela adição do TCA poderia ocasionar danos na coluna analítica utilizada na cromatografia.

De acordo com as especificações da coluna (*Synchronis*), sua faixa de pH de trabalho encontra-se entre 2,0 a 8,0. O ácido tricloroacético é considerado um ácido fraco, apresentando pKa de 0,66 a 20°C (Lide, 2005). O pH medido na solução aquosa a 10% é próximo a 2,0. O uso constante deste ácido, aliado ao processo simples de preparo de amostra, poderia levar ao dano permanente na fase estacionária da coluna e na diminuição da sua vida útil. Atrelado a este fator, a alteração do pH causado pela adição do TCA poderia acarretar na mudança da ionização dos analitos analisados e em problemas no equipamento. Desta forma, a acetonitrila foi utilizada para as demais etapas de preparo de amostra.

5.2. VALIDAÇÃO DOS ESTEROIDES EM URINA E PLASMA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA

5.2.1. Seletividade

Conforme mencionado no item 4.8, as figuras de mérito mencionadas na RDC 177/2017 da ANVISA foram avaliadas para a validação das metodologias. Em relação à seletividade, pode-se dizer que um método é considerado seletivo quando capaz de quantificar diversos analitos, porém distinguindo de forma inequívoca a resposta de cada um (INMETRO, 2018; Ribani et al., 2004). De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA),

para métodos quantitativos e ensaios limite, a seletividade deve ser demonstrada por meio da comprovação de que a resposta analítica se deve exclusivamente ao analito, sem interferência do diluente, da matriz, de impurezas ou de produtos de degradação (BRASIL, 2017).

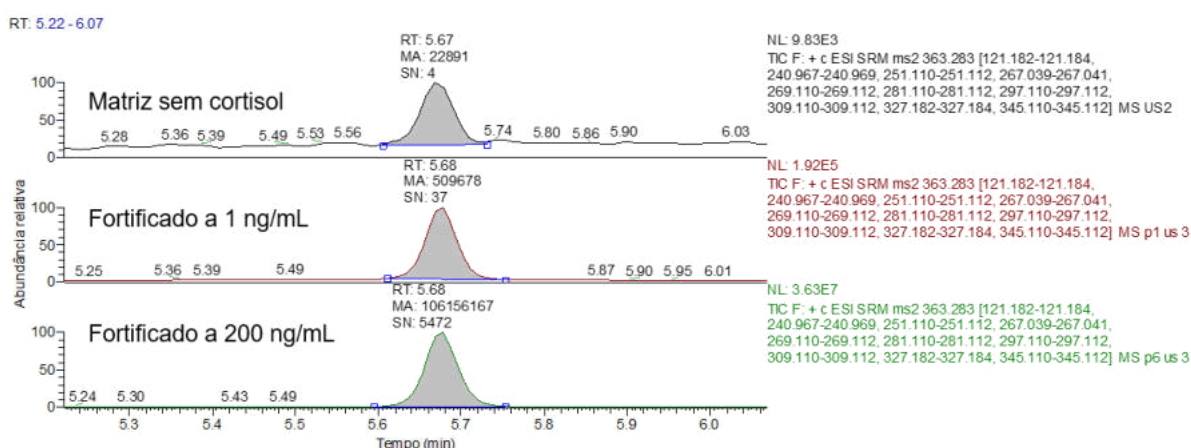
Para esta avaliação, foram comparadas amostras sem fortificação com os padrões dos analitos em matriz sintética, tanto de urina quanto de plasma, sendo estas chamadas de controle de qualidade negativo (CQN). Os cromatogramas dos CQNs foram comparados com as matrizes sintéticas fortificadas com os analitos na

concentração do maior ponto da curva analítica. A ausência de sinais que interfiram na detecção e quantificação dos analitos corrobora com a conclusão que o método consegue ser seletivo para os alvos selecionados.

É importante frisar que, normalmente, a seletividade pode ser realizada na matriz verdadeira observando a presença de picos cromatográficos próximos ou junto ao T_R dos analitos em um determinado espaço amostral. Entretanto, uma vez que os analitos são endógenos; ou seja, presentes independente da urina ou plasma avaliados, a avaliação feita desta forma torna-se inviável.

Na Figura 16 encontra-se a avaliação da seletividade do cortisol em urina. Na primeira linha pode-se observar o cromatograma de íons extraídos da matriz sem a fortificação com padrão de cortisol e sem adição de padrão interno, visto que este poderia apresentar a contribuição do D0 para a intensidade do sinal. Observa-se a presença de um sinal de baixa intensidade no T_R (em torno de 5,68 minutos em urina) do analito. Apesar de presente, a área deste pico é mais de 20 vezes menor que o primeiro ponto da curva analítica (segunda linha), fortificada a 1 ng/mL, o que indica que não teria problema em utilizar a matriz sintética. Tanto a segunda quanto a terceira linha apresentam fortificação de padrão interno na amostra.

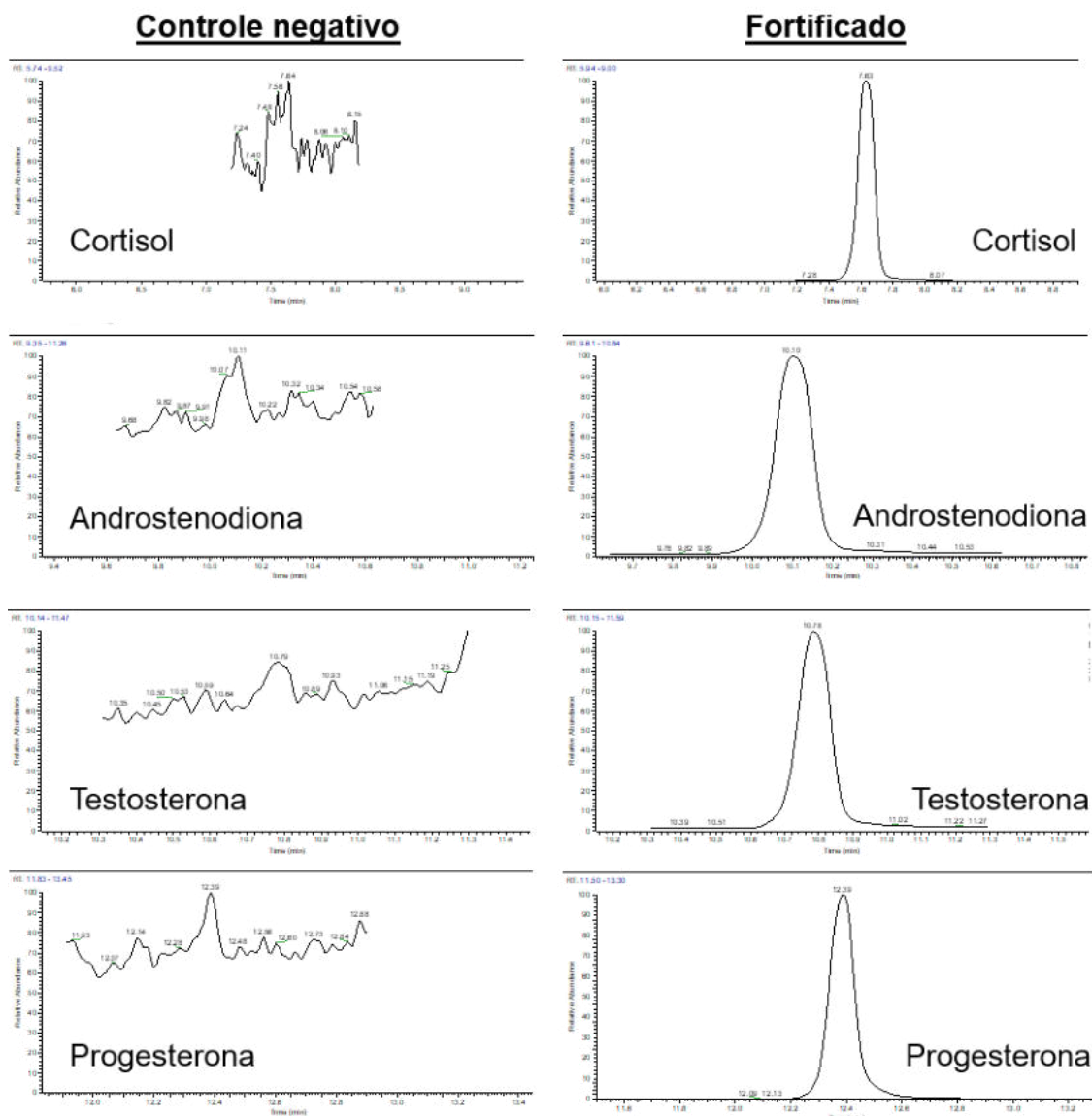
Figura 16. Seletividade do cortisol na urina.



Fonte: elaborado pela autora.

A resposta da avaliação de seletividade para os analitos em plasma, exceto epitestosterona, encontra-se na Figura 17. Nele, é mostrado o cromatograma de íons extraídos dos analitos e as janelas de detecção de cada um.

Figura 17. Avaliação de seletividade em plasma para os analitos cortisol, testosterona, androstenodiona e progesterona.



produtos de degradação, uma vez que a matriz escolhida para quantificação é sintética. Considerou-se, portanto, que o método é seletivo para estes alvos.

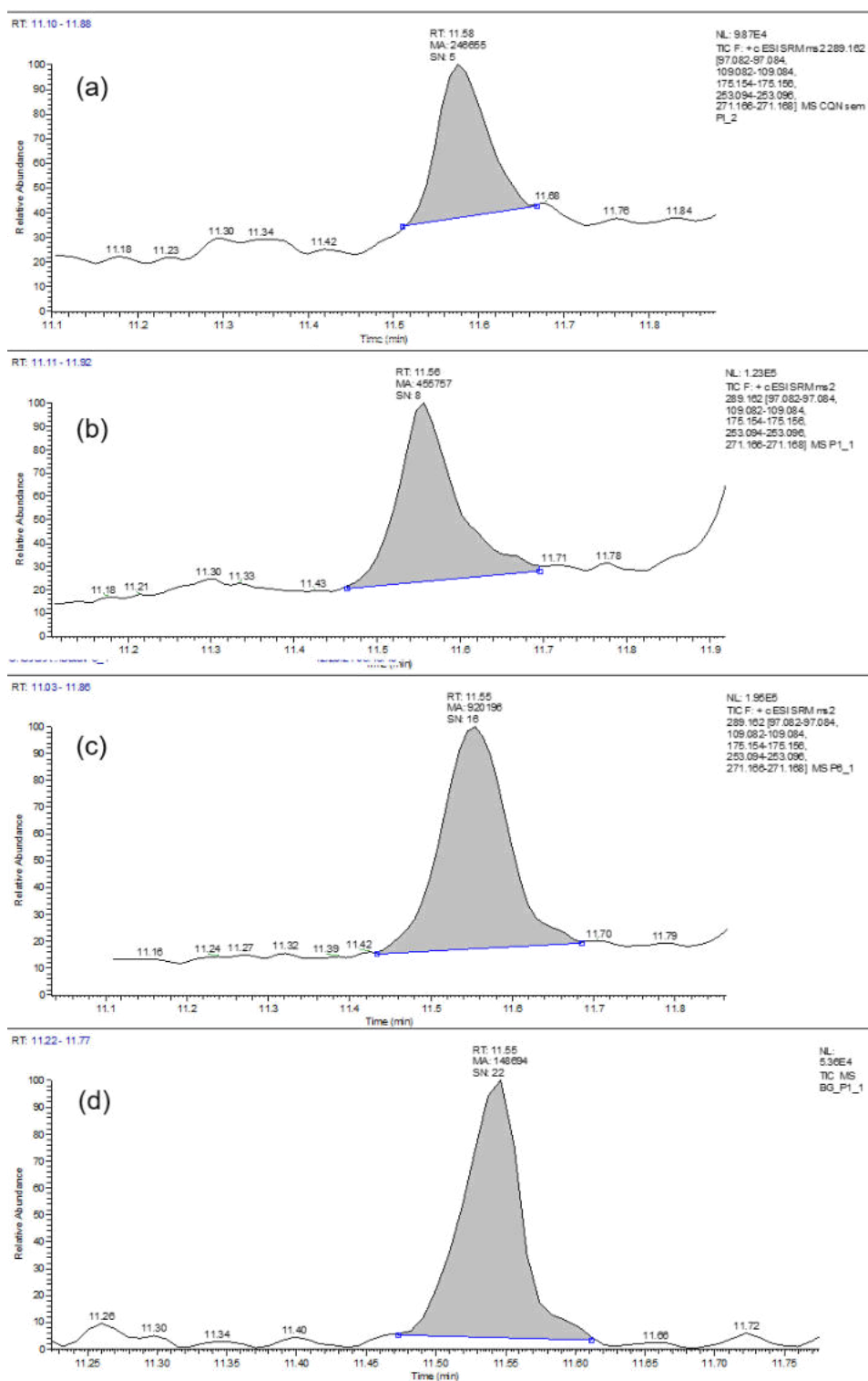
A avaliação da seletividade para a epitestosterona foi prejudicada, uma vez que foi observada a presença de sinal na área referente ao tempo de retenção deste analito, conforme indicado na Figura 18. Ao contrário do que foi visto para o cortisol em urina, nesta região há a presença de sinal significativo que poderia prejudicar a análise quantitativa. Na figura, a área referente à matriz isenta da fortificação representa cerca de 54% da área com fortificação de epitestosterona referente ao primeiro ponto da curva (0,1 ng/mL).

Este fator pode ser devido ao fato da epitestosterona sair em T_R maior que os demais analitos, levando ao aumento de possíveis interferentes com o aumento da fase móvel orgânica. Além disso, a presença de ruído muito alto a ponto de prejudicar a quantificação pode ser devido à baixa concentração utilizada na faixa de trabalho, visto que é esperada quantidades baixas deste analito ao analisar as amostras reais. O preparo simples de amostra, o qual é muitas vezes efetivo para os analitos de concentração mais alta, não foi eficaz para a retirada de possíveis interferentes para o analito em questão.

Desta forma, caso necessário, outros meios podem ser utilizados para a quantificação. Uma forma comum vista na literatura é o uso da subtração de *background*; ou seja, de retirada do sinal proveniente da matriz sem fortificação do analito (Thakare *et al.*, 2016). Como mostrado na figura indicada, o uso da subtração da matriz aumentou a razão sinal/ruído, como já se era esperado.

Apesar de ter formas para diminuir este efeito indesejado na análise por cromatografia, a quantificação deste analito em plasma também foi realizada por cromatografia gasosa, a qual apresentou resultados satisfatórios de seletividade, como demonstrado por (Fontes, 2023). Por este motivo, a quantificação deste esteroide nos pacientes e na população de referência foi realizada por CG-EM/EM. Apesar disso, os outros dados referentes a avaliação da epitestosterona por cromatografia líquida continuarão sendo expostos nos itens a seguir, junto com os demais analitos.

Figura 18. Avaliação de seletividade para epitestosterona em matriz sintética de plasma. (a) matriz SBF com albumina a 7% (m/v) sem adição de padrão. (b) Fortificação a 0,1 ng/mL do analito. (c) Fortificação a 1,2 ng/mL do analito. (d) Fortificação a 0,1 ng/mL do analito com subtração do sinal da matriz.



Fonte: elaborado pela autora.

5.2.2. Linearidade

De acordo com a RDC, uma resposta linear deve ser obtida em toda a faixa de concentração avaliada no método, utilizando-se, no mínimo, cinco pontos de concentrações diferentes feitas em triplicata. Devem ser apresentadas a representação gráfica das respostas em função da concentração, avaliação estatística e representação gráfica dos resíduos, assim como a equação da reta de regressão linear (BRASIL, 2017).

Na Figura 19, é possível observar o gráfico da linearidade realizado em triplicata para o cortisol em matriz sintética de urina e para os demais analitos avaliados na matriz sintética de plasma. Demais dados, como área do padrão e do padrão interno, estão dispostos no Apêndice C. Não foram encontrados valores atípicos, de acordo com o teste de Grubbs ($G_{\text{tab}} = 1,155$).

A homocedasticidade dos dados foi avaliada utilizando teste de Cochran com nível de significância de 5%. Além disso, também foi realizada a avaliação gráfica dos resíduos, disposta na Figura 20.

O que foi observado é que, exceto para o cortisol em urina ($C_{\text{calculado}} = 0,552$), androstenodiona ($C_{\text{calculado}} = 0,593$) e progesterona em plasma ($C_{\text{calculado}} = 0,579$), o restante dos analitos apresenta heterocedasticidade de acordo com o teste de Cochran. Esta tendência também é visível no gráfico de resíduos, nos quais são indicados o aumento da variância de acordo com o aumento de concentração, levando a heterocedasticidade. O cálculo da variância dos pontos longo da curva e o $C_{\text{calculado}}$ para cada analito estão dispostos no Apêndice C.

Mesmo acusando homocedasticidade, para estes analitos citados, foram observadas diferenças das respostas em relação ao valor nominal, principalmente nos primeiros pontos da curva, quando feitas curvas sem ponderação. Para a curva de calibração na urina, erros de precisão (aproximadamente 34,5%) foram observados no primeiro ponto de calibração ($1,0 \text{ ng mL}^{-1}$) quando nenhuma ponderação foi aplicada. Essa alteração na precisão pareceu ser ainda maior na análise do limite de quantificação (LOQ) na urina quando quantificado em uma curva não ponderada.

A mesma tendência foi observada para a androstenodiona e a progesterona, sendo essa discrepância ainda mais evidente nesses analitos. Com base nos

valores apresentados no Apêndice C, foi realizada a regressão linear simples. O erro no primeiro ponto da curva foi estimado inserindo a média da razão entre o padrão e o padrão interno, do primeiro ponto, na equação da reta. A concentração obtida foi então comparada à concentração nominal, com seu erro relativo calculado $[(C_{\text{encontrada}} - C_{\text{nominal}})/C_{\text{nominal}}] \times 100$.

Os resultados, apresentados na Tabela 12, indicam que as curvas de calibração subestimam a concentração real, resultando em valores inferiores aos esperados. Esse comportamento pode estar relacionado à ampla faixa de trabalho adotada, na qual os pontos de maior concentração apresentam maior variância, influenciando a inclinação da curva e comprometendo a acurácia das estimativas em concentrações mais baixas. Vale ressaltar que, apesar dessa tendência, os coeficientes de determinação (R^2) de todas as curvas realizadas por regressão linear simples permaneceram elevados, com valores acima de 0,98 ($R > 0,99$). Este resultado reitera que a avaliação de adequação da curva somente pelo R^2 não é eficiente.

Tabela 12. Estimativa do erro calculado nos primeiros pontos da curva de calibração utilizando a regressão linear simples.

	Regressão linear simples	Média da razão P/PI no P₁	[] encontrada (ng/mL)	[] nominal (ng/mL)	Erro relativo (%)
Cortisol em urina	$y = 0,1044x + 0,04562$	0,114	0,6550	1,0	-34,5%
Androstenodiona	$y = 0,1651x + 0,01715$	0,018	0,0051	0,05	-98,98%
Progesterona	$y = 0,06462x + 1,252$	0,085	-18,06	1,0	-1906,00%

Desta forma, optou-se por utilizar a regressão linear ponderada em todas as curvas analíticas. O uso da regressão ponderada costuma ser utilizada para que as variâncias dos valores encontrados tornem-se constante ao longo da curva (Sayago e Asuero, 2004).

As diretrizes reportadas pela União Internacional de Química pura e aplicada (IUPAC - *International Union of Pure and Applied Chemistry*) indicam que a linearidade pode ser feita em no mínimo duplicata, sendo o ideal em triplicata ou

mais, e que a ponderação na curva analítica pode ser utilizada principalmente em casos nos quais há erros exagerados nos primeiros pontos da curva; caso que foi visto para estes analitos (Thompson, Ellison e Wood, 2002).

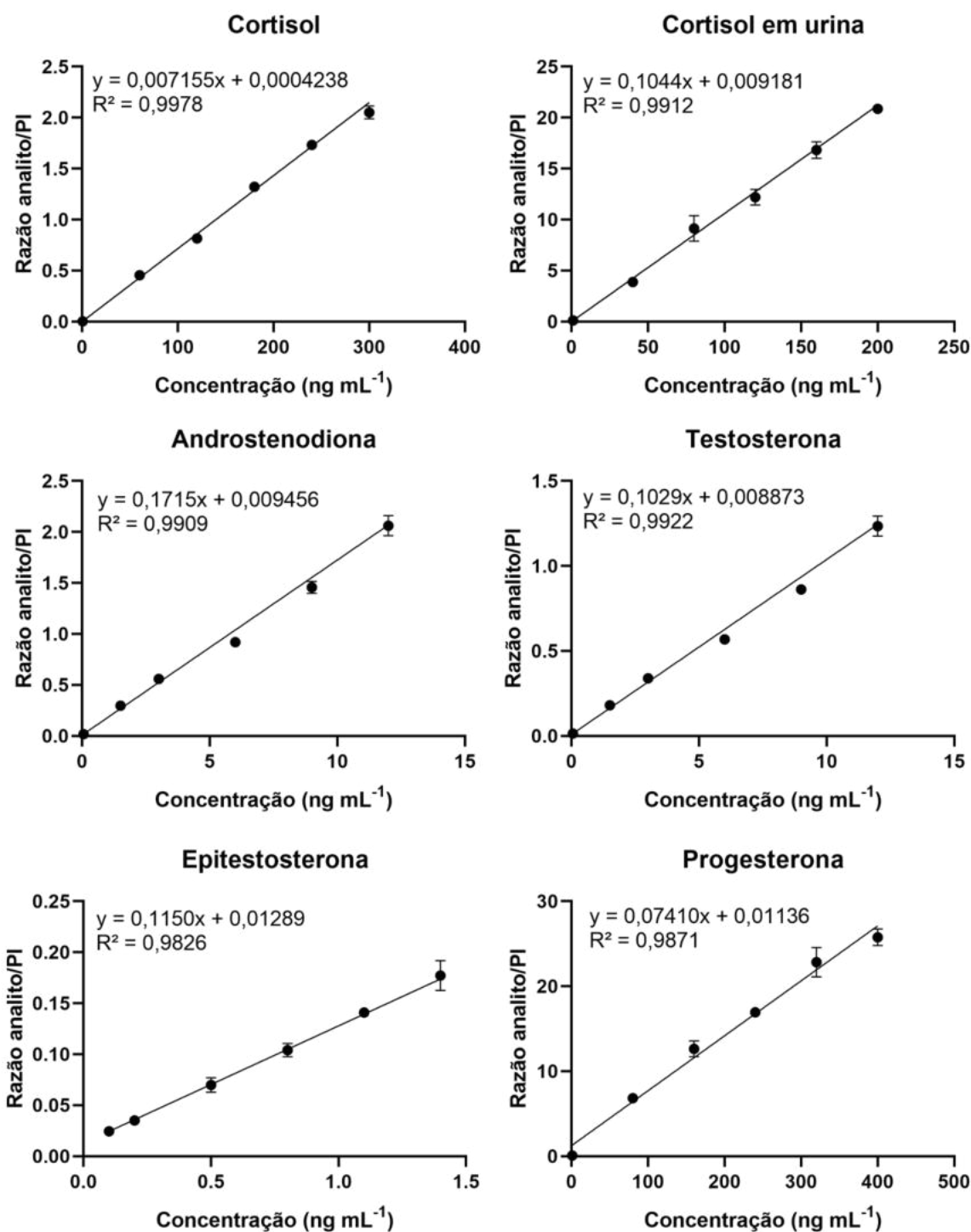
Esta ponderação levou em consideração o ajuste (*goodness of fit*) dos valores em relação à concentração esperada, levando a melhora na adequação do modelo, e também de acordo com a literatura para quantificações realizadas por cromatografia líquida.

É relatado na literatura que o peso correto influencia na quantificação das amostras, incluindo métodos bioanalíticos avaliados por cromatografia. O estudo reportado por Gu e colaboradores, de 2014, concluiu que a ponderação ideal para estes métodos é a de $1/x^2$ de forma a minimizar estes erros (Gu *et al.*, 2014). Portanto, este peso foi aplicado para todos os compostos avaliados.

Através desta alteração, houve diminuição dos erros observados nos primeiros pontos de todas as moléculas avaliadas, assim como em seus respectivos controles de qualidade de baixa concentração. As curvas de calibração de todos os analitos avaliados estão dispostos na Figura 19.

Os coeficientes de determinação da epitestosterona e da progesterona encontram-se abaixo de 0,99; entretanto, o coeficiente de correlação (r) está acima de 0,99 para todos os analitos, reiterando que os dados apresentados apresentam associação linear com a concentração.

Figura 19. Curvas analíticas do cortisol em urina e plasma, androstenodiona, testosterona, epitestosterona e progesterona em plasma.

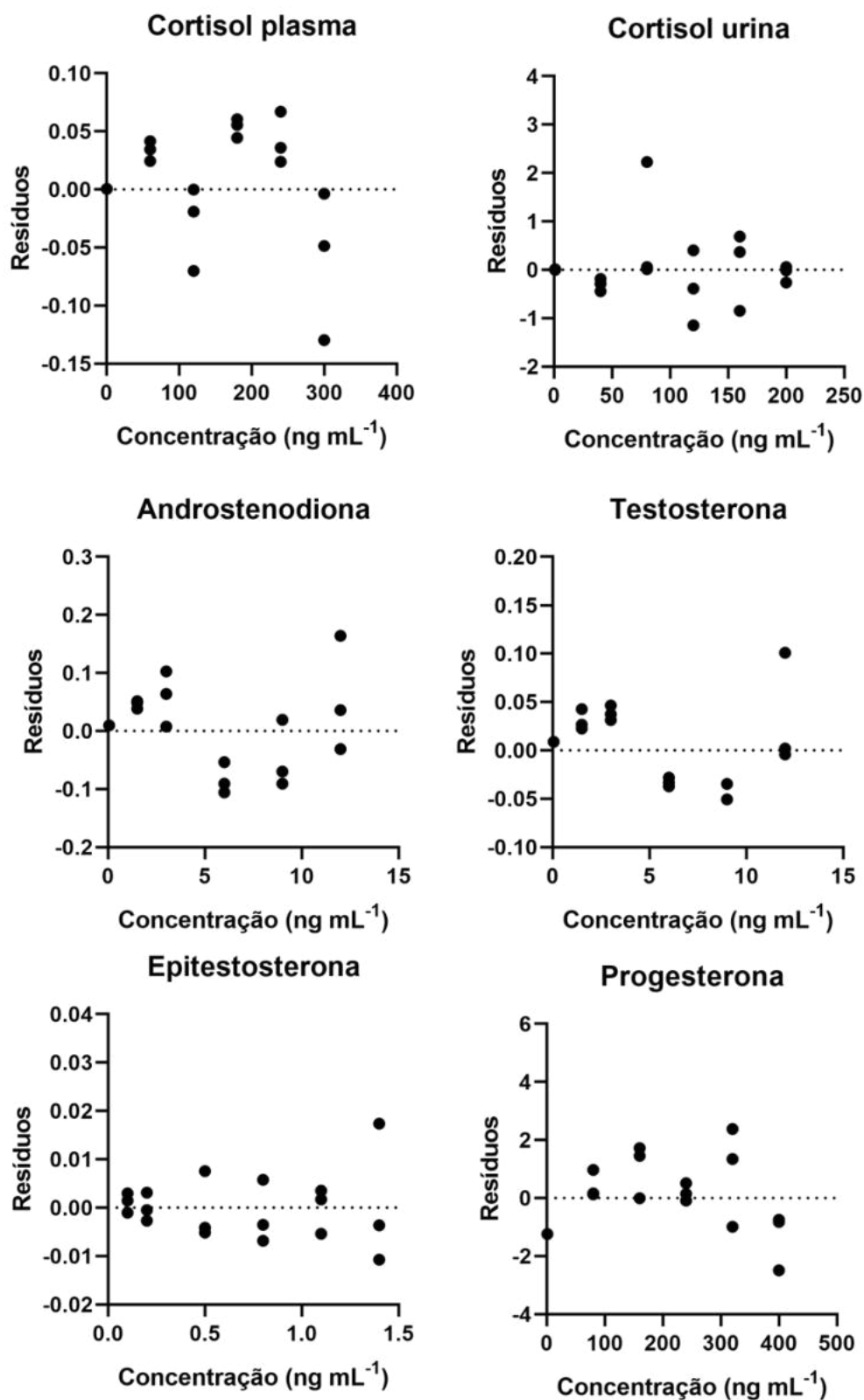


Fonte: elaborado pela autora.

Os gráficos dos resíduos, apresentados na Figura 20, ilustram a variação ao longo dos pontos das curvas de calibração. Em curvas que abrangem uma ampla

faixa de concentração, a heterocedasticidade é um comportamento esperado. Embora o teste de Cochran tenha indicado homocedasticidade, observa-se, pelos gráficos, uma tendência de aumento da variância à medida que a concentração de cortisol na urina e de androstenodiona em plasma se elevam. Mesmo dentro de uma faixa estreita de concentração, a epitestosterona também revela essa tendência.

Figura 20. Gráficos de resíduos dos analitos verificados.



Fonte: elaborado pela autora.

5.2.3. Efeito matriz

Em relação à construção da curva de calibração, a matriz utilizada pode influenciar nos resultados obtidos para a quantificação do analito, assim como apresentar interferentes que dificultam a quantificação das moléculas alvo na amostra. Para isso, foi avaliado o efeito de matriz em cada ponto da curva analítica.

De acordo com a RDC N°166, a avaliação deste efeito deve ser realizada comparando os coeficientes angulares das curvas realizadas em solvente (ou branco de matriz) e das curvas fortificando na própria matriz, como indicado abaixo:

Art. 29 O efeito matriz deve ser determinado por meio da comparação entre os coeficientes angulares das curvas de calibração construídas com a SQR do analito em solvente e com a amostra fortificada com a SQR do analito (BRASIL, 2017).

Sendo a SQR a solução química de referência.

A avaliação, portanto, foi realizada comparando os diferentes níveis de concentração da curva com urina real e urina sintética, assim como em plasma real e plasma sintético. A comparação estatística foi feita através do teste F de Snedecor para avaliação das variâncias (se podiam ser consideradas estatisticamente iguais) e em seguida aplicado o teste T de student, sendo utilizada a equação a depender do resultado das equivalências das variâncias. Em todos os casos, o nível de significância dos testes foi de 5%.

Abaixo, na Tabela 13, encontram-se os dados para a avaliação do coeficiente angular para o cortisol em plasma. Para os demais analitos, estas informações estão dispostas no Apêndice D.

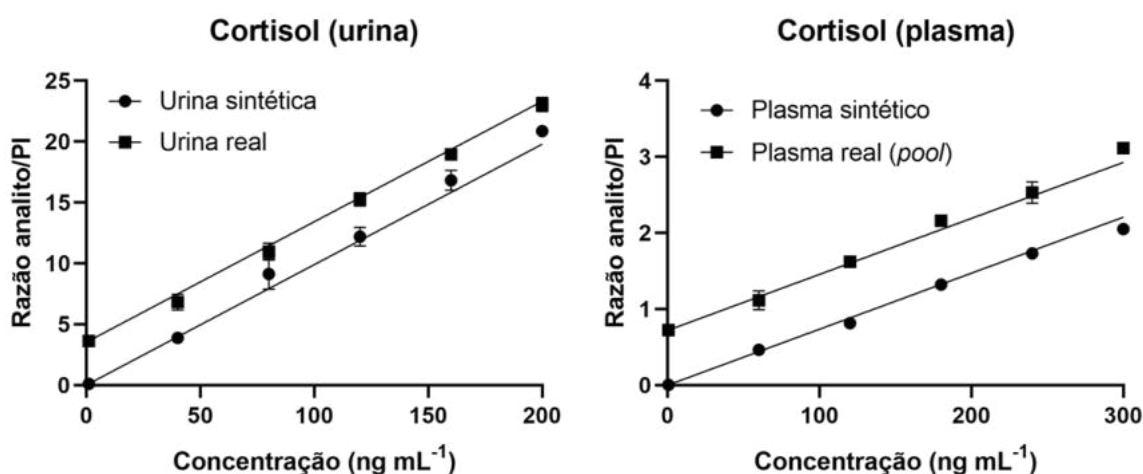
Tabela 13. Avaliação de paralelismo entre as curvas realizadas com plasma sintético e plasma real do cortisol.

Cortisol	Curva Plasma Real				Curva Plasma Sintético			
Concentração X_i	$Y_{i(pr)}$	$\hat{Y}_{i(pr)}$	$(Y_{i(pr)} - \hat{Y}_{i(pr)})^2$	Média $(Y_{i(pr)} - \hat{Y}_{i(pr)})^2$	$Y_{i(ps)}$	$\hat{Y}_{i(ps)}$	$(Y_{i(ps)} - \hat{Y}_{i(ps)})^2$	Média $(Y_{i(ps)} - \hat{Y}_{i(ps)})^2$
0,50	0,694		8,800E-04		0,004		8,986E-08	
0,50	0,751	0,724	7,472E-04	5,442E-04	0,004	0,004	5,837E-08	4,958E-08
0,50	0,726		5,455E-06		0,004		5,202E-10	
60,0	1,164		5,837E-05		0,464		1,207E-03	
60,0	0,973	1,172	3,946E-02	1,359E-02	0,447	0,430	3,059E-04	7,602E-04
60,0	1,207		1,250E-03		0,457		7,676E-04	
120,0	1,645		4,674E-04		0,845		1,993E-04	
120,0	1,617	1,623	4,258E-05	3,060E-04	0,775	0,859	7,006E-03	2,758E-03
120,0	1,603		4,080E-04		0,826		1,070E-03	
180,0	2,106		9,330E-04		1,328		1,610E-03	
180,0	2,156	2,075	6,559E-03	9,428E-03	1,323	1,288	1,235E-03	1,128E-03
180,0	2,219		2,079E-02		1,312		5,387E-04	
240,0	2,412		1,310E-02		1,714		1,538E-05	
240,0	2,497	2,527	8,681E-04	1,366E-02	1,757	1,718	1,588E-03	5,592E-04
240,0	2,691		2,699E-02		1,726		7,385E-05	
300,0	3,101		1,503E-02		2,109		1,404E-03	
300,0	3,148	2,979	2,882E-02	1,930E-02	1,983	2,147	2,679E-02	1,170E-02
300,0	3,097		1,404E-02		2,064		6,904E-03	
Comparação da inclinação das retas								
	$(X_i - \bar{X})^2$	a_{pr}	0,00753		S^2_{rpr}	1,420E-02		
	22375	b_{pr}	0,71990		S^2_{rps}	4,226E-03		
	8115	a_{ps}	0,00716		S^2_{pr}	2,260E-07		
	905	b_{ps}	0,000420		S^2_{ps}	6,725E-08		
	895,0				F_{calc}	3,361		
	8085				$t_{calc(0.05;8)}$	0,6906		
	22475							
Resultado: não há efeito matriz								

Nesta tabela, foram comparadas as médias entre cada ponto das curvas preparadas com a solução de SBF com albumina e a feita em plasma real. Como resultado desta tabela, o teste F indica que as variâncias residuais entre as duas retas são estatisticamente semelhantes, visto que o $F_{calculado}$, de 3,36, é menor que o $F_{tabelado}$, de 6,39. Com isso, foi aplicado o teste T de student presumindo variâncias equivalentes, chegando ao resultado de 0,6906. Este valor calculado é menor que o $T_{tabelado}$, de 2,31. Portanto, assume-se que os coeficientes angulares das curvas são estatisticamente iguais, levando a uma resposta similar independente de qual curva

fosse utilizada. Portanto, conclui-se que não há efeito de matriz, sendo possível quantificar os analitos utilizando a matriz sintética. Resultados semelhantes foram obtidos para o cortisol em urina e os demais analitos em plasma. A similaridade do coeficiente angular também é possível de ser visualizada graficamente, como mostrado na Figura 21 para o cortisol em ambas as matrizes.

Figura 21. Comparação das matrizes sintéticas utilizadas nas construções das curvas analíticas e as curvas em urina e plasma real para o cortisol.



Fonte: elaborado pela autora.

5.2.4. Precisão e exatidão

Com a equivalência das matrizes, foi dado prosseguimento às demais etapas da validação utilizando as matrizes sintéticas. No mesmo lote analítico, também foram realizados testes para avaliação da precisão.

A precisão indica a diferença obtida entre os resultados de uma mesma amostra repetidas diversas vezes, sob as mesmas condições de preparo (Ribani *et al.*, 2004). De acordo com a RDC N° 166, a precisão pode ser vista através da repetibilidade e da precisão intermediária (BRASIL, 2017):

Art. 34 A precisão deve ser expressa por meio da repetibilidade, da precisão intermediária ou da reprodutibilidade.

Art. 35 A precisão deve ser demonstrada pela dispersão dos resultados, calculando-se o desvio padrão relativo (DPR) da série de medições conforme a fórmula " $DPR = (DP/CMD) \times 100$ ", em que DP é o desvio padrão e CMD, a concentração média determinada.

Art. 38 A determinação da repetibilidade deve obedecer aos seguintes critérios:

I - avaliar as amostras sob as mesmas condições de operação, mesmo analista e mesma instrumentação, em uma única corrida analítica.

II - utilizar, no mínimo, 9 (nove) determinações, contemplando o intervalo linear do método analítico, ou seja, 3 (três) concentrações: baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas em cada nível ou 6 (seis) réplicas a 100% (cem por cento) da concentração do teste individualmente preparadas.

A repetibilidade foi realizada em triplicata, em três níveis de concentração, cobrindo toda a faixa de trabalho. A dispersão dos resultados foi expressa pelo desvio padrão relativo (DPR) e estão indicados da Tabela 14 a Tabela 18. Nelas, também é possível observar a exatidão dos resultados obtidos. Dados sobre as áreas dos analitos e dos padrões internos, assim como avaliação do teste de Grubbs, estão dispostos no Apêndice E.

A precisão intermediária indica como pequenas variações dentro do laboratório podem influenciar nos resultados das amostras. Geralmente é feito através da análise em dias diferentes, ou analistas diferentes, ou equipamentos distintos (Ribani *et al.*, 2004). A RDC N°166 adiciona a estes pontos que os testes devem contemplar o mesmo número de replicatas e as mesmas concentrações utilizadas nos testes de repetibilidade (Brasil, 2017).

A precisão intermediária para este projeto baseou-se em alterar os dias de produção das amostras, de injeção no equipamento e de analista. O preparo seguiu conforme mencionado anteriormente e também estão dispostos nas mesmas tabelas da repetibilidade.

Tabela 14. Avaliação de repetibilidade e precisão intermediária para o cortisol em urina e plasma.

Primeiro dia (Repetibilidade)					Segundo dia (Precisão intermediária)		
Controle de qualidade	[] _{nominal} (ng mL ⁻¹)	Valor medido ± DP (ng mL ⁻¹)	DPR (%)	Exatidão (%)	Valor medido ± DP (ng mL ⁻¹)	DPR (%)	Exatidão (%)
Cortisol em urina							
Baixo	10,0	9,44 ± 0,26	2,72	94,37	12,37 ± 1,10	9,48	124,22

Médio	80,0	74,28 ± 3,04	4,09	92,85	92,68 ± 8,38	8,97	115,89
Alto	150,0	142,90 ± 12,39	8,67	95,27	159,70 ± 12,68	7,94	106,47
DPR_{baixo}	16,51	DPR_{médio}	13,82	DPR_{alto}		9,58	
Cortisol em plasma							
Baixo	10,0	10,609 ± 0,361	3,407	106,09	9,64 ± 0,411	4,26	96,41
Médio	150,0	150,048 ± 3,86	2,57	100,03	151,50 ± 6,162	4,07	101,00
Alto	270,0	271,48 ± 3,38	1,25	100,55	280,21 ± 5,59	1,99	103,78
DPR_{baixo}	6,25	DPR_{médio}	3,10	DPR_{alto}		2,29	

Primeiro dia: $y = 0,1044x + 009181$; Segundo dia: $y = 0,07204x + 0,003722$ $R^2 = 0,9949$; Plasma primeiro dia: $y = 0,007155x + 0,00042$; Segundo dia: $y = 0,00663x + 0,00022$

Como se é esperado, foram observados os maiores valores de DPR nos menores pontos da faixa de trabalho. A RDC não estabelece um crivo numérico para a aceitação dos valores; o critério fica de acordo com o objetivo do método, concentração de trabalho e variabilidade intrínseca do método. Portanto, foi estabelecido que para o controle de qualidade baixo seriam aceitos valores de até 30% e para os controles médio e alto, 20%. O mesmo critério foi utilizado para a exatidão.

Ao final das tabelas, encontram-se os DPRs de cada um dos pontos considerando as seis replicatas totais (três do dia 1, três do dia 2). Todos os analitos se enquadraram dentro dos critérios estabelecidos.

A exatidão também está disposta nas mesmas tabelas, a qual indica a proximidade do valor encontrado com o valor “verdadeiro”, dito neste trabalho como concentração nominal (Ribani *et al.*, 2004). A RDC N°166 dispõe sobre o tópico a seguir:

Art. 46 A exatidão deve ser expressa pela relação percentual de recuperação do analito de concentração conhecida adicionado à amostra ou pela relação entre a concentração média, determinada experimentalmente, e a concentração teórica correspondente, dada pela fórmula 1 do Anexo II.

A fórmula 1 se refere à recuperação calculada por $(C_{\text{média encontrada}}/C_{\text{média nominal}})*100$. Estes resultados é o que estão indicados na coluna de Exatidão, tendo todos os valores encontrados dentro do esperado.

Tabela 15. Resultados da repetibilidade, Exatidão e precisão intermediária da testosterona em plasma.

Primeiro dia (Repetibilidade)					Segundo dia (Precisão intermediária)		
Controle de qualidade	[] nominal (ng mL ⁻¹)	Valor medido ± DP (ng mL ⁻¹)	DPR (%)	Exatidão (%)	Valor medido ± DP (ng mL ⁻¹)	DPR (%)	Exatidão (%)
Testosterona em plasma							
Baixo	0,5	0,503 ± 0,068	13,54	100,62	0,502 ± 0,003	3,12	102,93
Médio	4,5	4,738 ± 0,178	3,76	105,29	4,207 ± 0,073	2,99	95,22
Alto	10,0	10,814 ± 0,211	1,95	108,143	10,035 ± 0,089	0,89	100,35
DPR_{baixo}	8,79%	DPR_{médio}	6,30%		DPR_{alto}	4,32%	

Primeiro dia: $y = 0,1029x + 0,00887$ Segundo dia: $y = 0,1074x + 0,00522$

Tabela 16. Resultados da repetibilidade, Exatidão e precisão intermediária da androstenediona em plasma.

Primeiro dia (Repetibilidade)					Segundo dia (Precisão intermediária)		
Controle de qualidade	[] nominal (ng mL ⁻¹)	Valor medido ± DP (ng mL ⁻¹)	DPR (%)	Exatidão (%)	Valor medido ± DP (ng mL ⁻¹)	DPR (%)	Exatidão (%)
Androstenediona em plasma							
Baixo	0,5	0,529 ± 0,070	13,22	105,74	0,502 ± 0,003	0,58	100,39
Médio	4,5	4,398 ± 0,119	2,70	97,741	4,207 ± 0,073	1,73	93,49
Alto	10,0	10,444 ± 0,193	1,84	104,44	9,796 ± 0,311	3,18	97,96
DPR_{baixo}	9,04%	DPR_{médio}	3,18%		DPR_{alto}	4,18%	

Primeiro dia: $y = 0,1715x + 0,00946$ Segundo dia: $y = 0,1752x + 0,00248$

Tabela 17. Resultados da repetibilidade, Exatidão e precisão intermediária da epitestosterona em plasma.

Primeiro dia (Repetibilidade)					Segundo dia (Precisão intermediária)		
Controle de qualidade	[] nominal (ng mL ⁻¹)	Valor medido ± DP (ng mL ⁻¹)	DPR (%)	Exatidão (%)	Valor medido ± DP (ng mL ⁻¹)	DPR (%)	Exatidão (%)
Epitestosterona em plasma							
Baixo	0,15	0,141 ± 0,041	28,85	94,078	0,186 ± 0,033	17,63	124,29
Médio	0,65	0,676 ± 0,013	1,97	103,991	0,628 ± 0,022	3,52	96,61
Alto	1,20	1,34 ± 0,046	3,42	112,28	1,205 ± 0,017	1,38	100,39
DPR _{baixo}	25,26%	DPR _{médio}	4,75%		DPR _{alto}	6,59%	

Primeiro dia: $y = 0,1150x + 0,01289$ Segundo dia: $y = 0,1254x + 0,00699$

Tabela 18. Resultados da repetibilidade, Exatidão e precisão intermediária da progesterona em plasma.

Primeiro dia (Repetibilidade)					Segundo dia (Precisão intermediária)		
Controle de qualidade	[] nominal (ng mL ⁻¹)	Valor medido ± DP (ng mL ⁻¹)	DPR (%)	Exatidão (%)	Valor medido ± DP (ng mL ⁻¹)	DPR (%)	Exatidão (%)
Progesterona em plasma							
Baixo	10,0	12,450 ± 2,336	18,76	124,495	12,05 ± 0,315	2,63	120,152
Médio	200,0	210,173 ± 8,773	4,17	105,086	168,751 ± 12,802	7,59	84,38
Alto	360,0	399,466 ± 6,123	1,53	110,963	436,113 ± 2,527	0,73	96,14
DPR _{baixo}	12,34%	DPR _{médio}	13,047%		DPR _{alto}	7,91%	

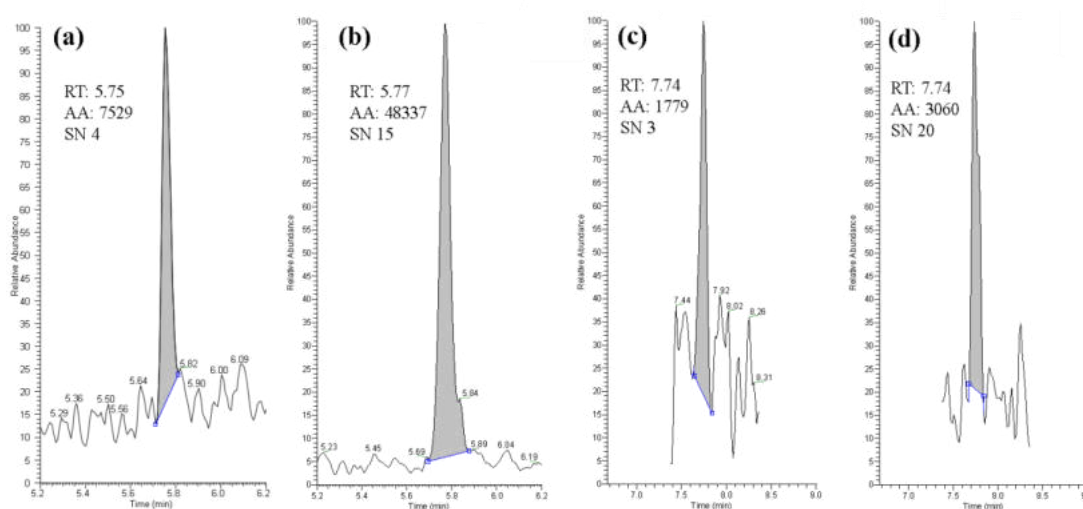
Primeiro dia: $y = 0,07410x + 0,01136$ Segundo dia: $y = 0,07933x + 0,00066$

5.2.5. Limites de detecção e de quantificação

O limite de quantificação (LQ) e o limite de detecção (LD) foram determinados através da adição de diferentes quantidades dos esteroides no branco de matriz. A concentração correspondente ao LD foi definida quando a razão sinal/ruído foi superior a 3, enquanto o LQ foi estabelecido quando essa razão ultrapassou 10, considerando o segundo pico de identificação de cada um.

A Figura 22 apresenta os valores de LD e uma replicação do LQ de cortisol obtidas em amostras de branco de urina e de plasma fortificados. Todos os picos correspondem à transição m/z 363 $\rightarrow$ 327.

Figura 22. LD de 0,033 ng/mL em branco de urina. LQ de 0,1 ng mL⁻¹ em branco de urina (b), LD no branco de plasma de 0,05 ng mL⁻¹ (c) LQ de 0,150 ng mL⁻¹ em branco de plasma (d).



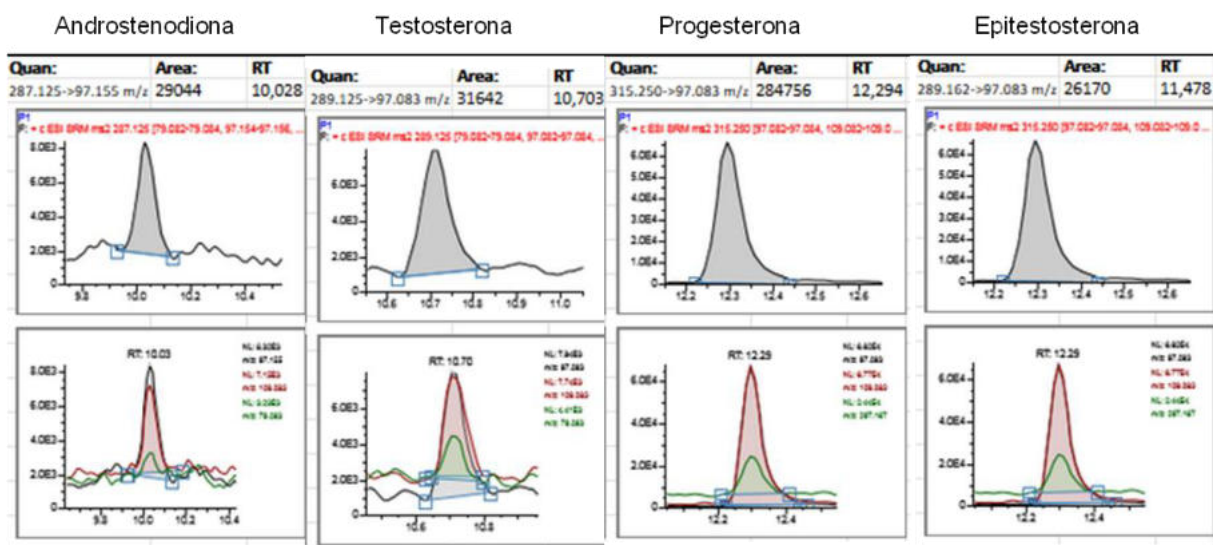
Fonte: elaborado pela autora.

A verificação do LQ foi realizada em triplicata, com os resultados dispostos na Tabela 19.

Tabela 19. Resultados do LQ para cortisol em urina e plasma.

Amostras de urina				
Concentração nominal (ng mL ⁻¹)	Concentração encontrada (ng mL ⁻¹)	Média ± DP	DPR (%)	Exatidão (%)
	0,100			
0,100	0,110	0,102 ± 0,007	6,650	102,43
	0,097			
Amostras de plasma				
Concentração nominal (ng mL ⁻¹)	Concentração encontrada (ng mL ⁻¹)	Média ± DP	DPR (%)	Exatidão (%)
	0,196			
0,150	0,159	0,157 ± 0,041	26,110	104,38
	0,115			

Para a testosterona, androstenodiona, progesterona e epitestosterona, devido à simetria dos picos e concentração do primeiro ponto consideravelmente baixa, foi considerado como LQ o primeiro ponto da curva, como mostrado na Figura 23.

Figura 23. Primeiros pontos da curva de calibração e LQs da androstenodiona, testosterona, progesterona e epitestosterona.

Fonte: elaborado pela autora.

Os cálculos para cada um desses analitos foram efetuados conforme indicado anteriormente e mostrados na Tabela 20.

Tabela 20. Resultados de LQ para androstenodiona, testosterona, epitestosterona e progesterona.

Androstenodiona							
Concentração	Replicata	Razão área P/PI	Concentração	Média	Desvio padrão	DPR	Exatidão
0,05	1	0,018	0,05	0,05	0,002	3,10	97,78
	2	0,018	0,05				
	3	0,018	0,05				

coef angular	0,1715
coef linear	0,00946

Testosterona							
Concentração	Replicata	Razão área P/PI	Concentração	Média	Desvio padrão	DPR	Exatidão
0,05	1	0,014	0,05	0,05	0,001	2,67	98,87
	2	0,014	0,05				
	3	0,014	0,05				

coef angular	0,1029
coef linear	0,00887

Epitestosterona							
Concentração	Replicata	Razão área P/PI	Concentração	Média	Desvio padrão	DPR	Exatidão
0,1	1	0,025	0,10	0,10	0,018	17,59	101,36
	2	0,022	0,08				
	3	0,026	0,12				

coef angular	0,115
coef linear	0,01289

Progesterona							
Concentração	Replicata	Razão área P/PI	Concentração	Média	Desvio padrão	DPR	Exatidão
1	1	0,081	0,93	1,00	0,073	7,35	99,62
	2	0,091	1,08				
	3	0,084	0,98				

coef angular	0,0741
coef linear	0,01136

Todos os analitos apresentaram exatidão dentro do esperado e precisão dentro da faixa estabelecida. Dentre as moléculas avaliadas, a epitestosterona apresentou o maior DPR, o que já se era esperado, devido à sua baixa

concentração. Entretanto, reitera-se que ela foi avaliada por cromatografia gasosa para as amostras da população de referência e dos pacientes.

5.2.6. Robustez

Em relação à mudança nas respostas dadas pelo método ao alterar de forma sutil parâmetros, tanto cromatográficos, quanto de preparo de amostra, é dado o nome de robustez. O ideal é que o método não seja afetado quando são realizadas estas alterações. De acordo com a RDC N° 166, o resultado das variações deve ser avaliado com os mesmos critérios utilizados para a exatidão, em caso de métodos quantitativos.

Vale ressaltar que o este documento usado como guia indica uma série de alterações de parâmetros cromatográficos, tais como variação do pH e composição da fase móvel, diferentes lotes e fabricantes de colunas, temperatura e fluxo da fase móvel.

Para esta avaliação, a mudança de temperatura do forno da coluna e o fluxo da fase móvel foram escolhidos como variação da corrida cromatográfica. Apesar de serem indicadas outras alterações, os lotes analíticos são criados a partir de um método salvo, com parâmetros fixos, o que dificulta a mudança por algum descuido por parte do analista. As fases móveis são comumente utilizadas em diversos outros métodos acreditados pelo laboratório e todas as colunas disponíveis são provenientes do mesmo fabricante, levando a menor capacidade de alteração dos resultados.

Na Tabela 21 estão dispostos os resultados dos testes de robustez para o cortisol em plasma. Para os demais analitos, os dados estão disponíveis no Apêndice. Sobre diminuição na mudança do fluxo cromatográfico, simulando um possível vazamento, não foram encontrados valores discrepantes, além da mudança já esperada no T_R em +0,25 minutos. Os maiores desvios foram vistos quando alterados o preparo de amostras, mas ainda dentro dos limites estabelecidos como válidos. Esta tendência foi observada também para os demais analitos.

Tabela 21. Dados de robustez para o cortisol em plasma.

CQM (150)					Grubbs		Concentração	Média	Desvio	DPR (%)	Erro em relacao ao CQM (%) (conc)
Robustez centrifugacao (20 min, 6 graus celcius, 13000 g)											
Replicata 1	1,208	Média	Desvio	Replicata 1	0,380	168,774					
Replicata 2	1,119	1,186	0,059	Replicata 2	1,134	156,335	165,652	8,214	4,959	110,43	
Replicata 3	1,230			Replicata 3	0,754	171,849					
Robustez acetonitrila (adicionado 400uL em vez de 375 uL)											
Replicata 1	1,102	Média	Desvio	Replicata 1	0,364	153,959					
Replicata 2	1,044	1,154	0,144	Replicata 2	0,767	145,853	161,273	20,102	12,464	107,52	
Replicata 3	1,317			Replicata 3	1,131	184,008					
Robustez temperatura do forno (42 C)											
Replicata 1	0,996	Média	Desvio	Replicata 1	1,154	139,198					
Replicata 2	1,065	1,042	0,039	Replicata 2	0,605	148,830	145,516	5,474	3,762	97,01	
Replicata 3	1,063			Replicata 3	0,549	148,521					
Robustez fluxo (280 uL/min)											
Replicata 1	1,008	Média	Desvio	Replicata 1	1,154	140,821					
Replicata 2	1,085	1,059	0,044	Replicata 2	0,579	151,602	148,001	6,218	4,201	98,67	
Replicata 3	1,085			Replicata 3	0,575	151,579					

Gcritico (n =): 1,155

Coeficiente angular 0,007155

Coeficiente linear 0,0004238

Na Tabela 22 está o resumo da recuperação de todos os analitos de acordo com as mudanças realizadas em parâmetros cromatográficos e em preparos de amostras. Os maiores valores de mudança na concentração esperada são vistos para a epitestosterona e para a progesterona. Considerando o intervalo esperado de 80 a 120%, todos se encontram no limite estabelecido.

Tabela 22. Dados de recuperação dos analitos.

Recuperação (%)						
Analito	Cortisol (urina)	Cortisol (plasma)	Androstenodiona	Testosterona	Epitestosterona	Progesterona
Centrifugação	---	110,43	100,74	106,08	114,16	115,81
Acetonitrila	---	107,52	101,52	106,80	113,71	115,11
T forno	85,99	97,01	89,28	93,58	105,69	99,59
Fluxo	94,75	98,67	89,04	91,83	101,23	105,59
Tempo de secagem e agitação	101,87	---	---	---	---	---
Hidrólise	106,03	---	---	---	---	---

É válido ressaltar que foram realizados testes anteriores à validação para verificar o volume ótimo de acetonitrila, velocidade e tempo de centrifugação. Não houve mudança significativa na precipitação com volumes acima da proporção de 3:1 entre solvente e amostra, assim como em tempos maiores que 15 minutos de centrifugação.

5.2.7. Arraste

Por fim, o arraste, caracterizado pela presença do analito em uma amostra devido à injeção de uma amostra anterior, não é um parâmetro exigido pela RDC N° 166. No entanto, considerando que serão realizadas avaliações quantitativas entre amostras, sua avaliação torna-se relevante para garantir a quantificação mais precisa dos analitos. Para isso, foi verificada a área dos analitos na injeção subsequente ao ponto 6 das curvas de calibração. Como critério, as áreas observadas devem ser inferiores a 1,0% da área correspondente ao maior ponto da curva. Os resultados, apresentados na Tabela 23, demonstraram conformidade satisfatória em todos os casos.

Tabela 23. Avaliação de arraste dos analitos.

Analito	Área P6	Área FM após	Diferença (%)
Cortisol (urina)	21508801	1226	0,006%
Cortisol (plasma)	8579727	44420	0,517%
Androstenodiona	3497732	14088	0,403%
Testosterona	3502573	23365	0,667%
Epitestosterona	222281	N/F	NF
Progesterona	87826564	245483	0,280%

5.3. ANÁLISE DAS AMOSTRAS

5.3.1. Resposta da população de referência

5.3.1.1. Dados gerais

A aplicação do método foi realizada primeiramente na população de referência, tendo os dados resumidos na Tabela 24; demais dados de cada um dos participantes estão fornecidos no APÊNDICE g.

Tabela 24. Informações gerais da população de referência.

	Mulheres (F)	Homens (M)
Quantidade	6	15
Média da idade	32	33
(menor idade – maior idade)	(23 – 45)	(22 - 49)

É importante ressaltar que houve a avaliação dos medicamentos utilizados por cada um dos voluntários. Um participante do sexo masculino fazia uso de undecanoato de testosterona por recomendação médica. Com exceção de uma participante do sexo feminino, todas faziam uso de medicamentos anticoncepcionais. Nenhum dos participantes fazia uso de glicocorticoides no momento de sua avaliação.

A PR, inicialmente, continha mais dois participantes, um de cada gênero. Entretanto, a falta de informações acerca de uso de medicamentos e outras informações pessoais levaram às suas exclusões, de forma a evitar a dubiedade dos resultados.

5.3.1.2. Resultados da População de Referência

Em relação à PR, as injeções foram feitas em um único lote analítico. A curva para urina e plasma foi realizada em simplicata e também foram injetados controles de qualidade nas três concentrações para avaliação durante as injeções (sendo considerado aceitável caso se enquadrasse em um erro de até 15%). Os resultados encontrados estão resumidos na Tabela 25. As demais informações de cada um dos participantes estão dispostas no APÊNDICE g.

Tabela 25. Dados da concentração da população de referência por cromatografia líquida.

Média (ng/mL) (máximo - mínimo)	Homens	Mulheres
Cortisol urinário	101,55 (22,55 - 283,60)	106,01 (40,02 - 156,65)
Cortisol em plasma	83,72 (11,77- 156,63)	144,78 (57,49 - 276,21)
Androstenodiona	0,58 (0,18 - 1,25)	0,59 (0,04* - 1,76)
Testosterona	4,40 (2,21 - 6,30)	0,20 (0,01* - 0,51)

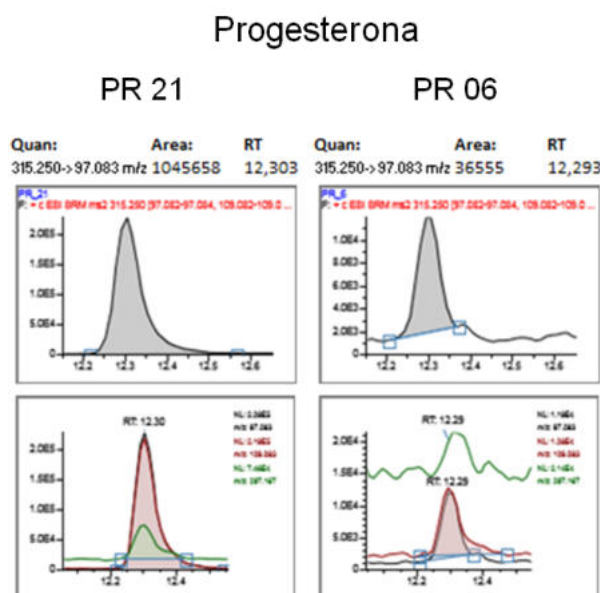
*Estimativa de concentração, visto que o primeiro ponto da curva é de 0,05 ng/mL.

A tabela indica que há uma tendência geral dos valores de cortisol nas mulheres serem mais elevados que nos homens, independente da matriz. A androstenodiona se mostrou similar em ambos os sexos e a testosterona mais elevada no sexo masculino, como já se era esperado.

Na tabela não estão expostos os valores de epitestosterona e progesterona. A epitestosterona no plasma foi quantificada por Fontes, 2023, e seus valores também estão dispostos no Anexo. Em relação à progesterona, dentre as participantes, apenas uma (PR 21) apresentou valores dentro da faixa de trabalho, em torno de 2,87 ng/mL. Este resultado pode ser atribuído aos medicamentos contraceptivos, visto que esta participante era a única a não fazer uso deste tipo de medicamento. Parte da eficácia de um anticoncepcional é a inibição da ovulação; portanto, a progesterona que normalmente seria liberada após este processo é diminuída (Fleischman, Navarrete e Fessler, 2010).

Outras participantes apresentaram sinais na região do analito; entretanto, por ter diminuição da simetria dos picos e estarem em concentração abaixo do ponto 1, apenas a PR 21 foi levada em consideração. Na Figura 24 é possível perceber o pico cromatográfico de uma das participantes; entretanto, é visto o ruído considerável, além da ausência da sua segunda transição de confirmação.

Figura 24. Avaliação de pico cromatográfico da progesterona na População de referência.



Fonte: elaborado pela autora.

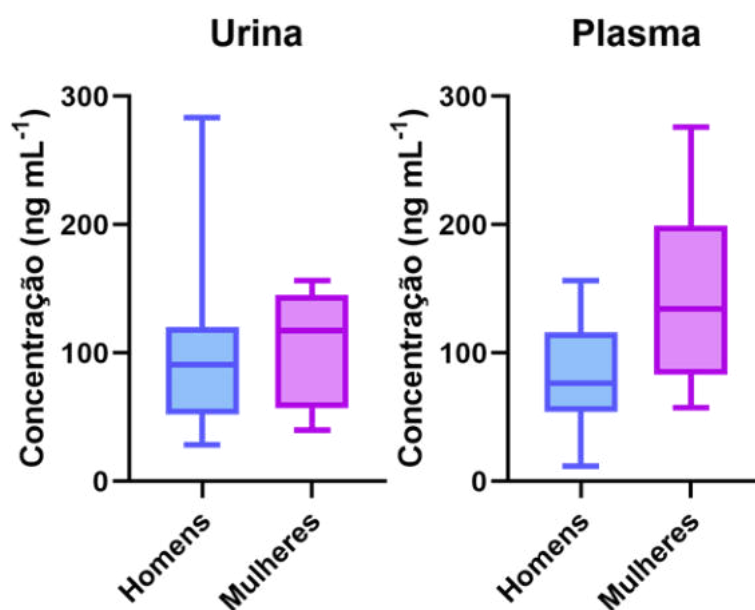
A normalidade dos dados foi verificada por meio do teste de Shapiro-Wilk, cujos resultados indicaram uma distribuição não normal para a urina masculina ($p = 0,0197$ para homens e $p = 0,5717$ para mulheres) e uma distribuição normal para o plasma ($p = 0,7958$ para homens e $p = 0,7172$ para mulheres). O mesmo procedimento foi realizado para a T e A4, que acusaram normalidade nos dados para ambos os sexos (testosterona: $p = 0,4165$ para homens e $p = 0,2199$ para mulheres; androstenodiona: $p = 0,0712$ para homens e $p = 0,1328$ para mulheres).

Para a comparação estatística dos dados, foi realizado o teste T para as amostras com distribuição normal e o Mann-Whitney onde foram observados valores não gaussianos. Como esperado, há diferença significativa da testosterona entre os sexos ($p < 0,0001$); não são vistas alterações na androstenodiona ao comparar a população masculina com a feminina ($p = 0,9202$).

Para o cortisol no plasma, houve diferença significativa entre os sexos ($p = 0,0279$), enquanto para a urina, embora os valores de cortisol tenham sido superiores nas mulheres, não foram vistas diferenças estatísticas significativas ($p = 0,5789$). A Figura 25 ilustra os gráficos de boxplot de cortisol para ambos os sexos nas análises de urina e plasma. Importante destacar que não foi observada

correlação entre as matrizes: o voluntário com os menores níveis de cortisol na urina, por exemplo, apresentou os segundos menores níveis no plasma.

Figura 25. Gráficos de boxplot com os valores de cortisol da população de referência na urina e plasma.



Fonte: elaborado pela autora.

El-Farhan e colegas indicam que o aumento do cortisol total nas mulheres pode ser devido ao uso de estrogênio oral, como no caso de pílulas anticoncepcionais. Na coorte deste estudo, cinco das seis mulheres estavam utilizando contraceptivos hormonais. Os principais compostos ativos incluem derivados do estradiol, como etinilestradiol e valerato de estradiol, além de progestágenos como drospirenona e gestodeno, juntamente com acetato de ciproterona e dienogeste. A administração desses hormônios na população feminina pode explicar os níveis significativamente mais altos de cortisol médios observados nesse gênero (El-Farhan, Rees e Evans, 2017).

Há informações conflitantes na literatura sobre qual sexo apresenta uma maior concentração de cortisol. Gunn e colegas relataram a avaliação de cortisol, por radioimunoensaio, em um grupo de 32 voluntários, tanto no plasma quanto na urina. Os resultados no plasma foram significativamente mais elevados nas

mulheres ao avaliar a matriz plasmática, enquanto os níveis foram mais altos nos homens ao avaliar o cortisol livre na urina. Este estudo também sugere que os resultados para mulheres sob administração de contraceptivos devem ser avaliados com cautela, uma vez que não há como saber se essa diferença estatística é devido ao uso de medicamentos ou ao metabolismo dos hormônios sexuais (Gunn *et al.*, 2016).

Ainda sobre o tema do gênero, Sofer e colegas afirmaram que o gênero deve ser considerado uma variável importante. Em seu estudo, foi realizada a análise de cortisol sérico basal e após estimulação com ACTH, excluindo mulheres que utilizavam contraceptivos. Os resultados de cortisol encontrados no estudo de Sofer foram mais elevados do que os nossos, assim como os de outros estudos mencionados (El-Farhan, Rees e Evans, 2017; Gunn *et al.*, 2016; Meijer *et al.*, 2021). Essa discrepância pode ser explicada pelo fato de que a medição do cortisol no grupo de Sofer foi realizada por imunoensaio de quimioluminescência (Sofer *et al.*, 2016).

As diferenças encontradas entre os estudos mencionados podem também ser atribuídas ao tipo de análise realizada. No caso de Gunn e colegas, amostras únicas de urina foram avaliadas, mas estudos geralmente relatam amostras de cortisol urinário coletadas ao longo de 24 horas. Esse tipo de análise considera a variação na liberação de cortisol ao longo do ciclo circadiano. As discrepâncias nos resultados sugerem que a avaliação do cortisol deve ser feita com cautela, uma vez que diversos fatores podem influenciar seus níveis no organismo. A literatura apresenta uma ampla gama de valores de corte, dependendo da matriz analisada e da técnica utilizada para a quantificação da amostra (Ceccato *et al.*, 2017). Essas diferenças ressaltam a importância de uma abordagem crítica ao tentar estabelecer um intervalo de referência para esse analito.

Quanto à concentração média de cortisol encontrada, alguns estudos relatam que os níveis normais de cortisol no sangue variam de 90,5 ng/mL (249,7 nmol/L) a 308 ng/mL (849,7 nmol/L) entre 8h e 10h da manhã (El-Farhan, Rees e Evans, 2017; Meijer *et al.*, 2021). Assim, os valores encontrados em nossa coorte de amostras estão dentro das faixas normais de concentração. Também é perceptível que há uma ampla gama de níveis de cortisol entre os indivíduos. Embora todas as amostras tenham sido coletadas pela manhã, vários fatores, como situações

estressantes e diferenças nos padrões de sono, podem alterar o nível desse hormônio (Athimulam, Grebe e Bancos, 2021; Casals e Hanzu, 2020; Keevil, 2016).

5.3.1.3. *Comparações de resultados CG x CL*

Como previamente mencionado, as análises de plasma dos pacientes também foram realizadas por cromatografia gasosa, a fim de avaliar os esteroides que não foram analisados por cromatografia líquida. No entanto, dois analitos — testosterona e androstenodiona — foram analisados por ambas as técnicas.

Em ambos os métodos de preparo, foram avaliados o desempenho na faixa de quantificação, sendo de 0,05 a 12,0 ng/mL para a CL e de 0,3 a 15,0 ng/mL para a CG, ambos tendo resultados satisfatórios. Entretanto, a comparação dos resultados obtidos para uma mesma amostra nas duas técnicas revelou diferenças consideráveis, como ilustrado na Tabela 26. Vale ressaltar que as análises da PR de plasma foram realizadas em triplicata, tanto neste estudo quanto por CG, sendo esta última detalhada por Fontes, 2023.

De forma geral, as análises de androstenodiona realizadas por cromatografia gasosa apresentaram valores consistentemente mais elevados do que aquelas realizadas por cromatografia líquida. Para a testosterona, com exceção de dois voluntários, observou-se uma tendência semelhante. As discrepâncias mais notáveis ocorreram na amostra PR15, que apresentou níveis baixos de todos os esteroides, com valores abaixo do primeiro ponto da curva para A4 e T. Esses níveis baixos de certo também influenciaram a diferença e a precisão dos resultados.

Tabela 26. Comparação dos resultados encontrados para androstenodiona e testosterona por cromatografia líquida e cromatografia gasosa. Valores em ng/mL.

	Androstenodiona			Testosterona		
	CL	CG	Dif %	CL	CG	Dif %
PR 1	0,73	0,87	16,42	3,71	3,96	6,27
PR 2	0,44	0,61	28,70	5,96	6,38	6,56
PR 3	1,25	1,42	11,49	2,38	2,56	7,14
PR 4	0,45	0,76	41,24	0,24	0,27	13,42
PR 5	0,22	0,33	34,74	0,13	0,18	26,50
PR 6	0,77	0,91	15,45	5,56	5,57	0,14
PR 7	0,39	0,56	29,81	3,69	3,95	6,45
PR 8	1,10	1,49	26,08	4,53	4,90	7,54
PR 9	0,42	0,56	25,07	5,55	5,90	5,96
PR 10	0,82	1,20	31,86	0,16	0,27	40,21
PR 11	0,71	0,98	27,53	4,17	4,60	9,19
PR 12	0,18	0,27	32,81	2,70	3,23	16,49
PR 13	0,28	0,42	34,05	3,87	4,10	5,55
PR 14	0,35	0,48	25,72	2,21	2,38	7,32
PR 15	0,04	0,11	64,38	0,01	0,02	56,67
PR 16	0,36	0,54	33,03	5,19	5,62	7,58
PR 17	0,47	0,64	25,94	6,30	6,41	1,64
PR 18	0,28	0,53	46,60	0,13	0,14	3,38
PR 19	0,42	0,51	18,65	5,79	5,87	1,52
PR 20	0,75	0,87	13,78	4,33	4,07	-6,17
PR 21	1,76	2,19	19,73	0,51	0,47	-8,73

Curiosamente, a maioria das divergências de valores, especialmente no caso da testosterona, foi observada em participantes do sexo feminino, como na PR 4, PR 5, PR 10 e PR 15. Embora notado, esse padrão não é uma tendência geral, já que PR18 e PR21, também do sexo feminino, não apresentaram a mesma diferença.

Outro aspecto relevante é relativo ao preparo das amostras para as análises. O processo de preparação para injeção na CL foi significativamente mais simples do que a realizada para a CG, a qual envolveu uma extração líquido-líquido. Dada essa diferença, era de se esperar que as áreas dos analitos obtidas pelos dois métodos não fossem idênticas, o que foi de fato observado. No entanto, um ponto de interesse é que o método de cromatografia gasosa incluiu uma etapa de hidrólise enzimática.

O esqueleto esteroidal é lipofílico, e, como esperado, uma fração dos esteroides presentes na urina está conjugada. Como mencionado anteriormente, para facilitar a excreção, esteroides podem ser conjugados com o ácido glicurônico (conhecido como metabolismo de fase 2), resultando em valores mais elevados dessa fração na urina em comparação com o plasma (Wang, Hartmann e Wudy, 2021a).

O preparo de amostras de plasma por cromatografia gasosa, por apresentar a hidrólise enzimática, promove quebra a fração conjugada, quantificando a fração livre mais a glicuronídeo. Este procedimento foi necessário para detectar alguns analitos, tais como androsterona e eticolanolona, cujas áreas sem hidrólise eram significativamente mais baixas. Em contrapartida, a desproteínização das amostras não promove essa quebra, o que pode explicar as diferenças observadas nos resultados entre as duas técnicas.

Embora existam poucos relatos na literatura sobre conjugação de esteroides em plasma, o estudo de Raps e colaboradores, de 2024, investigou essas frações (Raps, Kleider e Lehmann, 2024) em homens e mulheres pré-menopausa. Wang e colaboradores também mencionam a conjugação de alguns esteroides em sangue e em outras matrizes, embora a fração da testosterona glicuronídeo tenha sido observada apenas em estudos realizados em tecido e urina (Wang, Hartmann e Wudy, 2021a).

Portanto, a investigação da conjugação esteroidal em plasma continua a ser uma área relevante para estudos futuros, além da comparação dos resultados pelas duas técnicas analíticas. Para a avaliação destes dois analitos na etapa a seguir, foram utilizadas as respostas obtidas pela CL.

5.3.2. Comparação entre pacientes

Conforme descrito na metodologia, as amostras dos pacientes foram coletadas em dois momentos distintos. A primeira corresponde à concentração basal, obtida antes das 10h da manhã, conforme a rotina padrão. A segunda foi coletada após a administração de 1 mg de dexametasona na noite anterior, procedimento conhecido como teste de supressão. Esse teste é amplamente utilizado na prática clínica para avaliar distúrbios associados ao excesso de cortisol.

Em indivíduos saudáveis, a dexametasona inibe a secreção de ACTH, reduzindo os níveis de cortisol adrenal. Entretanto, em pacientes com possível disfunção do eixo HPA, os níveis de cortisol podem permanecer elevados, ultrapassando os valores normais estabelecidos pelos imunoensaios (>18 ng/mL ou 50 nmol/L) (Fassnacht *et al.*, 2016).

Vale destacar que a participação dos voluntários exige a administração prévia da medicação na noite anterior, o que nem sempre ocorreu, resultando na ausência de algumas amostras pós-teste. Além disso, para as amostras de plasma, o volume mínimo necessário para análise por CG era de 500 μ L, e nem todas atingiram esse critério. No caso das amostras de urina, a mesma limitação pode ter ocorrido devido à adesão variável dos participantes ao protocolo.

Os resultados completos estão apresentados no Apêndice G. Antes de proceder às comparações entre os grupos, é necessário discutir um aspecto fundamental. A análise das amostras, especialmente após a administração do medicamento, pressupõe que os voluntários seguiram corretamente as recomendações médicas antes da coleta sanguínea. No entanto, não há garantia de que não tenham ocorrido falhas na adesão ao protocolo, bem como possíveis erros no preparo das amostras. A seguir, destacam-se alguns pontos de atenção.

Duas pessoas do grupo controle (participantes 12 e 45) apresentaram níveis de cortisol superiores ao esperado após a administração de 1 mg de dexametasona. Esses valores diferiram significativamente dos obtidos na coleta basal, sem o medicamento, descartando a possibilidade de análise duplicada da mesma amostra. Como esses voluntários realizam exames de imagem para excluir alterações na glândula adrenal e não possuem disfunção que leve à secreção autônoma de cortisol, foi presumido que os participantes não tenham tomado a dexametasona conforme orientado. Por essa razão, suas amostras foram excluídas das análises pós-administração do fármaco.

De forma semelhante, a participante 43 foi excluída de ambas as análises, pois sua concentração basal estava similar a vista após a DXT. Esse achado sugere a possibilidade de erro na aliquotagem ou no preparo da amostra, uma vez que a repetição inadvertida da mesma amostra poderia justificar esse resultado atípico.

É importante destacar que todas as análises foram revisadas minuciosamente, sem evidências de falhas na integração das áreas cromatográficas do analito e do padrão interno. Além disso, as amostras foram processadas em lotes que incluíam controles de qualidade em três faixas de concentração, cujos resultados foram satisfatórios. Diante disso, considera-se que as alterações observadas possam ter resultado de falhas na administração do medicamento ou de erros na identificação, coleta ou processamento das amostras.

Outro fator relevante é que os voluntários desta coorte são oriundos do setor de endocrinologia do HUCFF, e alguns dos voluntários foram diagnosticados com hiperaldosteronismo primário. Esta condição se caracteriza pela secreção excessiva de aldosterona, independente do sistema renina-angiotensina, pelas glândulas adrenais (Funder, 2019). Como essa síndrome também pode impactar os níveis esteroidais, esses pacientes foram excluídos da comparação entre os grupos.

Abaixo será dada inicialmente ênfase na comparação dos níveis de cortisol entre as diferentes coortes. O resumo das amostras obtidas encontra-se na Tabela 27.

Tabela 27. Resultados de cortisol nas duas matrizes nas amostras obtidas do hospital, separadas por tipos de pacientes.

Urina

Parâmetros	Controles (n = 14)	Pacientes		
		Incidentalomas adrenais (IA)		SC (n=4)
		IANF (n =33)	SABC (n = 12)	
Mulheres	10	21	10	4
Idade	53 (31 – 79)	60 (38 – 79)	62 (46 – 80)	37 (31 – 43)
Cortisol basal (ng/mL)	88,96 (8,40 – 209,48)	86,79 (9,72 – 221,49)	72,86 (23,62 – 200,24)	240,34 (123,45 – 357,22)
Cortisol após DXT (ng/mL)	3,16 (0,88* - 4,71)	9,89 (1,35 – 45,13)	6,63 (1,70 – 15,60)	153,64 (103,52 – 203,76)

Plasma

Parâmetros	Controles (n = 17)	Pacientes		
		Incidentalomas adrenais (IA)		SC (n=5)
		IANF (n = 42)	SABC (n = 21)	
Mulheres	11	27	16	3
Idade	50 (31 – 79)	59 (33 – 79)	61 (35 – 80)	43 (31 – 67)
Cortisol basal (ng/mL)	83,06 (22,45 – 283,07)	66,41 (23,89 – 131,06)	73,24 (8,17 – 121,97)	252,06 (129,47 – 602,54)
Cortisol após DXT (ng/mL)	6,18 (1,65 – 18,50)	14,53 (4,63 – 60,02)	23,00 (6,39 – 41,21)	164,39 (132,02 – 214,65)

DXT = teste de supressão com 1 mg de dexametasona.; *estimativa, <P1.

Os resultados apresentados acima indicam um desalinhamento entre os valores de corte estabelecidos pelo imunoensaio e aqueles obtidos por LC-MS/MS. No grupo de pacientes classificados como IANF, o imunoensaio revelou valores abaixo do limite de corte (18 ng/mL ou 50 nmol/L), enquanto a análise cromatográfica apontou, para cinco integrantes deste grupo, valores superiores a esse limiar. Além disso, essa discrepância levanta preocupações para os pacientes situados entre a faixa de concentração normal e para o diagnóstico da SABC, pois

pode resultar na negligência de um tratamento essencial para mitigar os riscos associados à síndrome.

Entre os pacientes diagnosticados com SABC, quatro apresentaram valores inferiores a 18 ng/mL, embora todos estejam relativamente próximos desse limiar, como esperado com base nos resultados do imunoensaio. Vale destacar que esse teste foi realizado por um grupo de pesquisa colaborador neste projeto; portanto, não há informações adicionais sobre os resultados obtidos.

Na análise urinária, três pacientes apresentaram valores superiores ao limite estabelecido pelo imunoensaio. No entanto, é importante ressaltar que essa avaliação na matriz urinária possui apenas caráter indicativo, uma vez que os valores de referência foram definidos para amostras plasmáticas.

Ao comparar o grupo controle com a população de referência, observa-se que a média dos valores no grupo controle é ligeiramente inferior (103 ng/mL na urina para a população de referência vs. 89 ng/mL nos controles; e 114 ng/mL no plasma para a população de referência vs. 83 ng/mL nos controles). A diferença nos valores de cortisol entre as matrizes não foi substancialmente elevada.

Quanto às concentrações observadas entre os grupos, nota-se que, na matriz plasmática, os pacientes com SABC apresentam valores ligeiramente superiores aos dos pacientes IANF, conforme esperado. No entanto, essa tendência se inverte na análise dos valores urinários. Esse fenômeno pode ser atribuído a dois fatores: a diferença no número de pacientes testados para urina e plasma, resultando em variações nos valores; e a etapa de hidrólise enzimática na preparação das amostras urinárias, que promove a desconjugação do cortisol glucuronídeo.

Como mencionado no item anterior, a fração glucuronídeo é consideravelmente maior na urina do que no plasma, uma vez que a conjugação aumenta a solubilidade em água e facilita a excreção do esteroide (Bowers e Sanaullah, 1996; Wang, Hartmann e Wudy, 2021). A liberação de esteroides a partir da conjugação depende da atividade enzimática das uridinas difosfato (UDP)-glucuronosiltransferases (UGTs) e da β -glucuronidase, responsáveis pela glucuronização e hidrólise, respectivamente. Essa atividade varia entre indivíduos e depende da idade e do sexo da coorte.

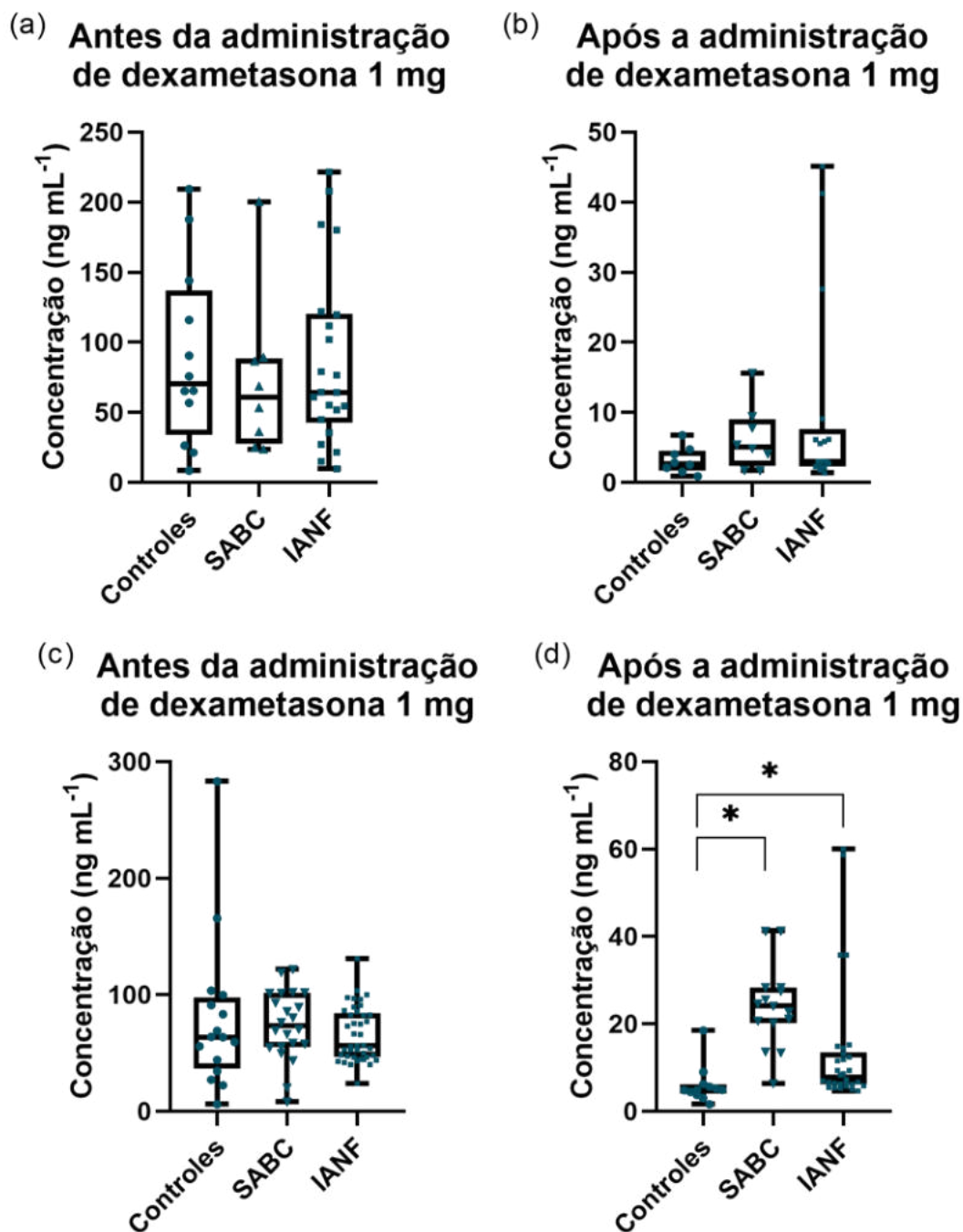
No caso das amostras plasmáticas, preparadas por desproteinização proteica, o uso de solvente orgânico promove a liberação do cortisol das proteínas às quais está ligada, principalmente à Globulina Ligadora de Cortisol (CBG) e, em menor proporção, à albumina (Keevil, 2016). Assim, é plausível supor que as amostras urinárias forneçam uma fração composta por cortisol livre e sua forma glucuronídeo, enquanto a análise plasmática revela predominantemente frações não conjugadas. Essa distinção pode explicar a disparidade identificada entre as matrizes.

Sobre os resultados e a prevalência de incidentalomas adrenais em relação ao sexo, a literatura permanece inconclusiva. Alguns estudos indicam a ausência de diferenças significativas entre homens e mulheres (Barzon *et al.*, 2003). Em contrapartida, outras pesquisas sugerem uma maior prevalência em mulheres, embora essa discrepância não tenha uma explicação causal definida, reforçando a necessidade de mais investigações (Audenet *et al.*, 2013). Estudos recentes relatam um aumento nos casos relatados entre mulheres, embora esse achado não seja corroborado por dados de autópsia (Sherlock *et al.*, 2020). A coorte deste estudo está alinhada com essa última tendência, apresentando uma predominância feminina de aproximadamente 69% entre os casos de incidentalomas adrenais. Quanto à síndrome de Cushing, a razão observada neste estudo segue as estatísticas previamente reportadas, com uma proporção de três mulheres para cada homem entre os indivíduos afetados (Hakami, Ahmed e Karavitaki, 2021; Steffensen *et al.*, 2010).

Os gráficos que ilustram a comparação entre os grupos com base nas concentrações de cortisol estão apresentados na Figura 26 abaixo. Como os dados não exibiram distribuição normal, foram empregados testes não paramétricos para as comparações. Foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis, que seria o equivalente a um teste ANOVA para dados não gaussianos.

A análise revelou diferenças estatisticamente significativas nos níveis basais de cortisol apenas entre o grupo controle e os pacientes com síndrome de Cushing no plasma. Nenhuma diferença significativa foi observada nos valores urinários basais.

Figura 26. Amostras de urina antes (a) e após (b) a administração de dexametasona; plasma antes (c) e após (d) a dexametasona. Os asteriscos indicam diferenças estatísticas entre os grupos mencionados.



Fonte: elaborado pela autora.

Em relação às amostras coletadas após o teste de supressão com DXT, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos controle e síndrome de Cushing na urina (valor de p ajustado = 0,1205). Esse achado sugere que a

avaliação de amostras pontuais de urina para comparação entre grupos e auxílio diagnóstico pode não ser eficaz. Em contraste, uma distinção estatisticamente significativa foi observada entre esses grupos na análise dos níveis plasmáticos (valor de p ajustado $< 0,0001$). Esse grupo não foi incluído na Figura 26 devido ao baixo número de amostras e ao seu potencial de distorcer a escala dos demais grupos.

Nas amostras plasmáticas, também foram observadas diferenças significativas nos níveis de cortisol pós-DXT 1 mg entre o grupo controle e o grupo IANF (valor de p ajustado $= 0,0375$), bem como entre o grupo controle e o grupo SABC (valor de p ajustado $< 0,0001$).

Em relação aos demais esteroides, na Tabela 28 é mostrado um resumo dos principais valores encontrados para os analitos plasmáticos. Entretanto, em diversas amostras, a concentração de alguns esteroides estava abaixo do limite de quantificação, como foi o caso do DHT, estrona e estradiol. Devido a isso, essas moléculas foram passíveis de serem quantificadas em um número reduzido de amostras.

Tabela 28. Resumo das informações de plasma, divididas entre grupos.

		ANTES DA DEXAMETASONA											
		A4	T	PROG	ANDRO	ETIO	5 α	5 β	DHEA	Epi	DHT	Estrona	Estradiol
Controle	N amostras	16	16	2	10	10	9	10	10	8	2	5	4
	Média total	0,482	1,540	7,220	11,611	10,672	0,914	1,143	2,869	0,162	0,569	0,112	0,112
	Média feminina	0,412	0,163	7,220	8,052	9,624	0,710	1,165	2,830	0,131	0,527	0,125	0,134
	Média masculina	0,636	4,570	ND	43,644	20,101	2,549	0,950	3,222	0,379	0,611	0,063	0,046
SABC	N amostras	21	21	0	15	15	14	15	14	10	5	6	3
	média total	0,389	0,960	ND	7,266	8,557	0,832	1,627	1,637	0,159	0,792	0,072	0,041
	Média feminina	0,365	0,182	ND	6,981	7,617	0,756	1,201	1,636	0,140	0,778	0,062	0,023
	Média masculina	0,466	3,451	ND	8,407	12,317	1,111	3,328	1,639	0,235	0,863	0,092	0,050
IANF	N amostras	42	42	2	33	34	33	34	33	24	14	21	14
	média total	0,545	1,514	10,489	11,864	11,431	1,847	2,764	1,766	0,679	0,831	0,092	0,056
	Média feminina	0,442	0,177	10,489	8,129	7,618	0,942	1,145	1,634	0,132	0,707	0,070	0,055
	Média masculina	0,697	3,479	ND	18,400	17,591	3,239	5,254	1,981	1,226	0,924	0,112	0,057
SC	N amostras	4	4	0	5	5	5	5	5	5	2	5	3
	média total	1,171	0,838	ND	7,470	15,096	1,373	3,525	2,193	0,234	0,680	0,144	0,154
	Média feminina	1,472	0,195	ND	4,775	13,177	0,754	1,326	2,532	0,137	0,801	0,144	0,075
	Média masculina	0,266	2,765	ND	11,512	17,976	2,303	6,823	1,685	0,380	0,558	0,144	0,311

Na comparação com os valores encontrados para a PR, mostrada na Tabela 25, foram vistos que os controles do hospital apresentaram resultados similares à população mencionada. Com exceção do 5α e 5β diol, os quais foram relativamente menores nos controles do hospital, observou-se a estabilidade dos resultados. É válido lembrar que estes resultados podem ser devidos ao baixo número de amostras nos quais foram possíveis quantificar estes analitos.

Realizando a comparação dos compostos da tabela entre os sexos, as maiores diferenças observadas foram nos níveis plasmáticos de androsterona e eticolanolona, metabólitos da testosterona, além da esperada discrepância nos valores deste último hormônio citado.

Em relação às amostras de urina, a comparação dos pacientes com os valores encontrados para a população de referência indicou a tendência de diminuição geral de valores de todos os esteroides, conforme Tabela 29. Entretanto, a análise com esta matriz não demonstrou mudanças estatisticamente significativas entre os diferentes grupos de pacientes.

Tabela 29. Média dos valores encontrados para os analitos em urina (valores basais – antes do uso do medicamento). Valores em ng/mL.

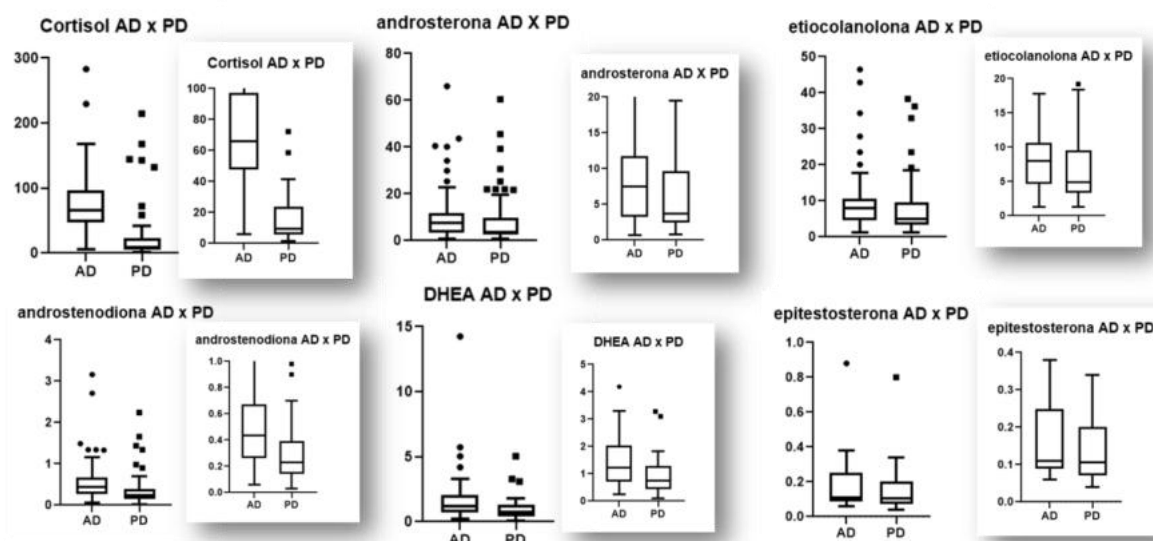
Analito	PR	HUCFF
Cortisol	103,60	95,70
DHEA	52,57	27,96
Testosterona	31,60	18,19
5α -diol	80,80	26,50
5β -diol	294,20	93,90
Androsterona	3743	1133
Etiocolanolona	2260	1256
Epitestosterona	21,70	12,23

Outra forma de comparação realizada nesta coorte de estudo foi a avaliação do nível dos esteroides de acordo com a administração da DXT. Para tal, foram consideradas apenas as amostras pareadas; ou seja, aqueles voluntários que

apresentavam a fração basal e a fração pós o medicamento. A intenção foi avaliar se, após o uso do fármaco, teria alguma mudança significativa na concentração de outro esteroide, de forma a auxiliar no diagnóstico clínico. Como já mencionado anteriormente, primeiramente foi avaliada a normalidade dos resultados; em caso negativo, foi aplicado o teste de Wilcoxon, sendo este equivalente ao teste T para amostras não paramétricas.

Foram observados um declínio estatisticamente significativo nos níveis de cortisol, androsterona, etiolanolona, androstenodiona e DHEA, todos com p valor <0,0001 (Figura 27). Embora a epitestosterona tenha apresentado uma redução na mediana pós-dexametasona, essa diferença não é tão significativa quanto as outras, além do número de amostras pareadas ser reduzida, conforme é possível ver no Apêndice G.

Figura 27. Comparações entre diferentes analitos antes e após a administração de dexametasona 1 mg. Ao lado, é indicado o zoom para observação da mudança da mediana entre as amostras. Testes feitos com amostras pareadas.



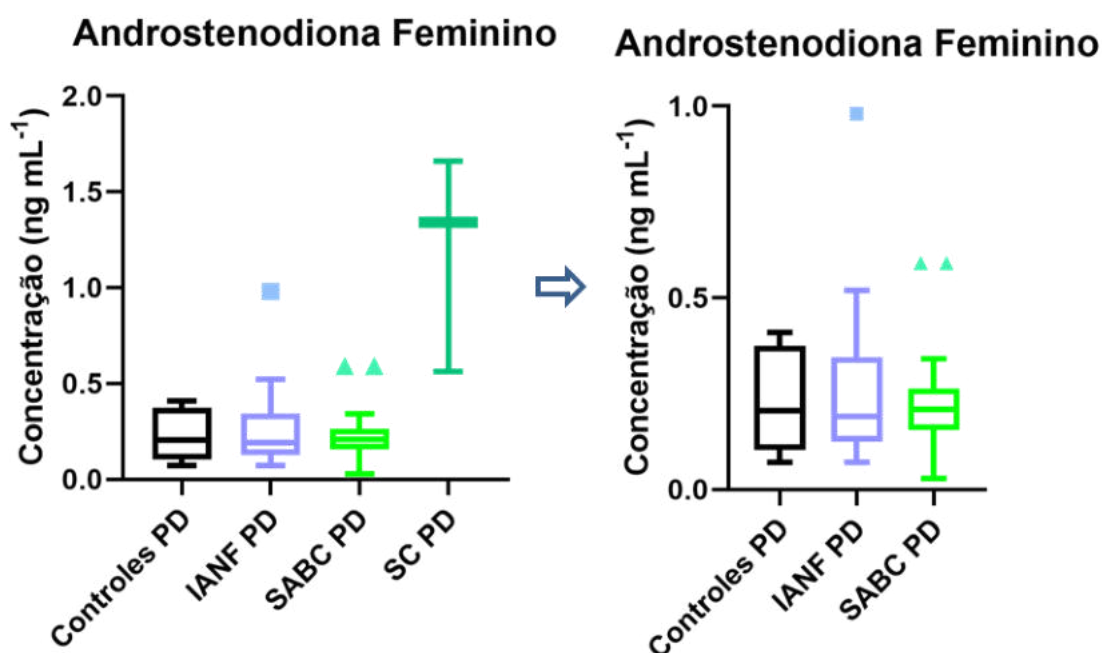
Fonte: elaborado pela autora.

Já para a testosterona, 5 α -diol e 5 β -diol não foram vistas variações significativas. Para DHT, estrona e estradiol também foi observada esta tendência, porém pode ser atribuído ao possivelmente devido ao baixo número de amostras quantificáveis.

O achado de que apenas alguns esteroides sofreram supressão não é fortuito. Todos os analitos significativamente reduzidos são diretamente influenciados pela diminuição do ACTH induzida pelo teste de supressão. Além do cortisol, a síntese do DHEA, que ocorre predominantemente na zona reticular do córtex adrenal, é fortemente regulada pelo ACTH. Consequentemente, a androstenediona, derivada do metabolismo do DHEA, também apresenta queda nos seus níveis (Schmidt R. F. e Thews, 1989). Estas alterações poderiam sugerir atenção a estes esteroides na hora de avaliar seus níveis em diferentes grupos de pacientes.

No entanto, ao estratificar a análise pelos diferentes grupos estudados e entre sexos, foi observada uma diferença estatisticamente significativa apenas nas amostras de androstenediona pós dexta, entre controles e pacientes com SC no sexo feminino (p-valor ajustado = 0,0267), como visto na Figura 28. Esse achado sugere que, apesar das alterações esperadas no eixo HPA, a avaliação esteroidal isoladamente não permitiu a identificação de um biomarcador claro para a síndrome investigada.

Figura 28. Avaliação de androstenediona no plasma feminino entre as diferentes coortes de pacientes. Na segunda coluna, foi retirada a classificação de SC para melhor visualização.



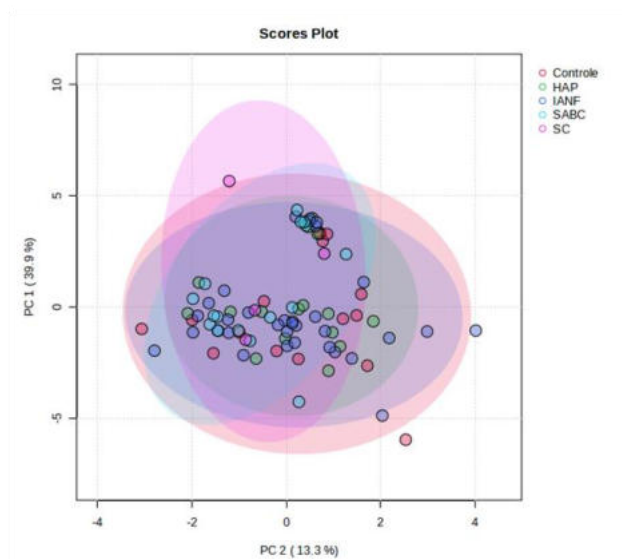
Fonte: elaborado pela autora.

Por fim, foi realizada a análise de componentes principais (PCA) das amostras pós-dexametasona, considerando a separação por sexo. O objetivo era identificar possíveis padrões ou agrupamentos entre as diferentes classes de pacientes. No entanto, como demonstrado na Figura 29, não foi observada nenhuma separação clara, independentemente do sexo.

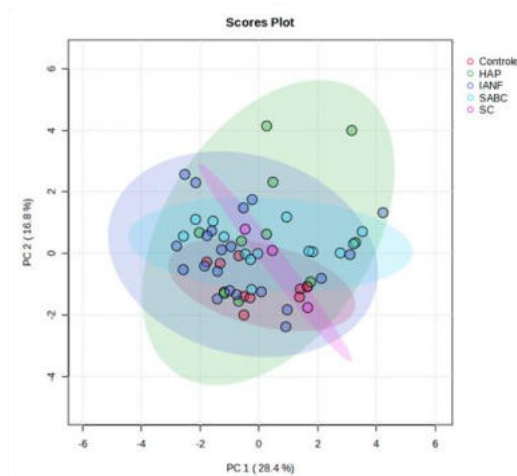
No caso dos homens, foram excluídas as amostras de SABC devido ao seu número reduzido, inviabilizando a análise estatística. Esse resultado reforça os achados prévios, indicando que os esteroides avaliados, tanto individualmente quanto em conjunto, não se mostraram eficazes como biomarcadores diagnósticos para a síndrome.

Diante disso, torna-se essencial a busca por novas estratégias de avaliação, além da ampliação do número amostral em cada grupo, a fim de aumentar a robustez estatística das análises. Embora o estudo tenha contado com um número expressivo de voluntários, a subdivisão entre os diferentes grupos dificultou a obtenção de significância estatística.

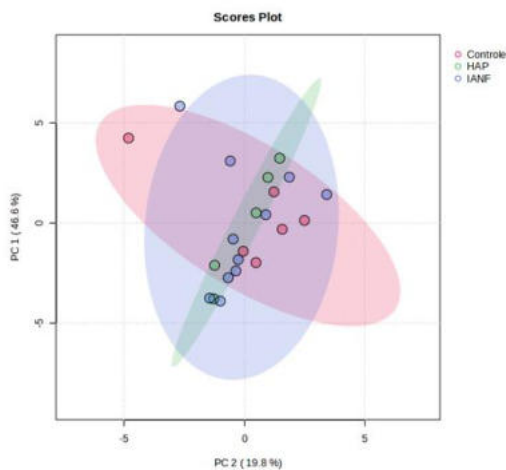
Figura 29. PCA das amostras de plasma pós dexametasona. *retirado o grupo SABC para as amostras masculinas.



Todos os grupos
(masculino + feminino)



Todos os grupos (feminino)



Todos os grupos* (masculino)

Fonte: elaborado pela autora.

6. CONCLUSÕES

Os métodos foram devidamente desenvolvidos e validados para plasma e urina. Os brancos sintéticos podem ser utilizados para a quantificação dos esteroides avaliados neste estudo, pois apresentam inclinações estatisticamente equivalentes às das matrizes reais. Ambas as matrizes demonstraram baixos limites de quantificação para cortisol. O método para plasma requer apenas 50 μ L de

amostra e envolve uma preparação simples, facilitando a quantificação dos esteroides nessa matriz por cromatografia líquida.

Os métodos validados foram empregados na avaliação da população de referência. Os resultados da PR indicaram uma alta variação entre indivíduos do mesmo sexo, em ambas as matrizes, o que está em concordância com estudos prévios. Em síntese, nossos achados corroboram a literatura estabelecida, uma vez que os valores de cortisol obtidos encontram-se majoritariamente dentro das faixas esperadas pelos imunoensaios.

Também foi observado que os níveis de cortisol plasmático em mulheres foram significativamente superiores aos dos homens na população de referência, diferença esta que pode estar relacionada à influência de anticoncepcionais na regulação do cortisol.

Na avaliação do grupo de pacientes provenientes do hospital, foram notadas discrepâncias significativas de cortisol entre os grupos de pacientes e controles. No entanto, ainda não há consenso na literatura quanto à faixa média de concentração esperada utilizando a abordagem cromatográfica, tampouco um método padronizado. Não foram observadas diferenças significativas para os demais esteroides, com a exceção da androstenodiona em amostras femininas, após o uso de dexametasona.

Na comparação entre os grupos de pacientes após o uso do medicamento, não foram encontradas diferenças estatísticas significativas de grande parte dos esteroides estudados neste trabalho. Para a avaliação de cortisol, os resultados foram interessantes, visto que foi possível diferenciar o grupo controle do grupo IANF. Esta avaliação é importante, pois para pacientes classificados como IANF, são realizados apenas exames periódicos de imagem e avaliações hormonais para monitoramento de eventuais mudanças no status da classificação. Em contrapartida, pacientes diagnosticados com SABC podem receber intervenções farmacológicas para reduzir o risco de complicações cardiovasculares, além de intervenção cirúrgica em casos mais graves. Consequentemente, aqueles situados no limiar podem postergar inadvertidamente o início de um tratamento necessário, potencialmente agravando a progressão da síndrome no futuro. Nestes casos, a análise por cromatografia poderia auxiliar no diagnóstico clínico.

REFERÊNCIAS

ABURUZ, S.; MILLERSHIP, J.; HEANEY, L.; MCELNAY, J. Simple liquid chromatography method for the rapid simultaneous determination of prednisolone and cortisol in plasma and urine using hydrophilic lipophilic balanced solid phase extraction cartridges. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 798, n. 2, p. 193–201, 2003.

ALVES, L. F. J. Desenvolvimento e validação de método analítico para estudo quantitativo de perfil esteroidal endógeno em urina humana. p. 1–4, 2012.

ANDREW, R.; HOMER, N. Z. M. Mass spectrometry: Future opportunities for profiling and imaging steroids and steroid metabolites. **Current Opinion in Endocrine and Metabolic Research**, v. 15, p. 71–78, 2020.

ARAUJO-CASTRO, M.; CASALS, G.; HANZU, F. A.; PASCUAL-CORRALES, E.; GARCÍA CANO, A. M.; LANZA, V. F.; LUIS DEL REY MEJÍAS, Á.; MARCHAN, M.; ESCOBAR-MORREALE, H. F.; VALDERRABANO, P. Characterisation of the urinary steroid profile of patients with nonfunctioning adrenal incidentalomas: A matched controlled cross-sectional study. **Clinical Endocrinology**, v. 98, n. 2, p. 165–176, 2023.

ARAUJO-CASTRO, M.; GARCÍA CANO, A. M.; ESCOBAR-MORREALE, H. F.; VALDERRABANO, P. Predictive model for autonomous cortisol secretion development in non-functioning adrenal incidentalomas. **Hormones**, v. 22, n. 1, p. 51–59, 2023.

ARAUJO-CASTRO, M.; PARRA RAMÍREZ, P.; MARTÍN ROJAS-MARCOS, P.; GARCÍA CENTENO, R.; GRACIA GIMENO, P.; TOMÉ FERNÁNDEZ-LADREDA, M.; SAMPEDRO NÚÑEZ, M. A.; HIGUERUELA, C.; ROBLES LÁZARO, C. Nonfunctioning adrenal incidentalomas with cortisol post-dexamethasone suppression test >0.9 $\mu\text{g/dL}$ have a higher prevalence of cardiovascular disease than those with values ≤ 0.9 $\mu\text{g/dL}$. **Endocrine**, v. 79, n. 2, p. 384–391, 2023.

ARAUJO-CASTRO, M.; PARRA RAMÍREZ, P.; ROBLES LÁZARO, C.; GARCÍA CENTENO, R.; GRACIA GIMENO, P.; FERNÁNDEZ-LADREDA, M. T.; SAMPEDRO NÚÑEZ, M. A.; MARAZUELA, M.; ESCOBAR-MORREALE, H. F.;

VALDERRABANO, P. Predictors of tumour growth and autonomous cortisol secretion development during follow-up in non-functioning adrenal incidentalomas. **Journal of Clinical Medicine**, v. 10, n. 23, p. 1–12, 2021.

ARAUJO-CASTRO, M.; PASCUAL-CORRALES, E.; LAMAS, C. Possible, probable, and certain hypercortisolism: A continuum in the risk of comorbidity. **Annales d'Endocrinologie**, v. 84, n. 2, p. 272–284, 2023.

ARAUJO-CASTRO, M.; SAMPEDRO NÚÑEZ, M. A.; MARAZUELA, M. Autonomous cortisol secretion in adrenal incidentalomas. **Endocrine**, v. 64, n. 1, p. 1–13, 2019.

ARIOLI, F.; GAMBERINI, M. C.; PAVLOVIC, R.; CESARE, F. DI; DRAGHI, S.; BUSSEI, G.; MUNGIGUERRA, F.; CASATI, A.; FIDANI, M. Quantification of cortisol and its metabolites in human urine by LC-MSn: applications in clinical diagnosis and anti-doping control. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 414, n. 23, p. 6841–6853, 2022.

ATHIMULAM, S.; GREBE, S.; BANCOS, I. Steroid profiling in the diagnosis of mild and overt Cushing's syndrome. **Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 35, n. 1, p. 101488, 2021.

ATHIMULAM, S.; GREBE, S.; ENDOCRINOLOGY, C. Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism Steroid profiling in the diagnosis of mild and overt Cushing's syndrome. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, n. xxxx, p. 101488, 2021.

AUDENET, F.; MÉJEAN, A.; CHARTIER-KASTLER, E.; ROUPRÊT, M. Adrenal tumours are more predominant in females regardless of their histological subtype: A review. **World Journal of Urology**, v. 31, n. 5, p. 1037–1043, 2013.

AZMI, N. A. S. M.; JULIANA, N.; AZMANI, S.; EFFENDY, N. M.; ABU, I. F.; TENG, N. I. M. F.; DAS, S. Cortisol on circadian rhythm and its effect on cardiovascular system. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 18, n. 2, p. 1–15, 2021.

BARZON, L.; SONINO, N.; FALLO, F.; PALÙ, G.; BOSCARO, M. Prevalence and natural history of adrenal incidentalomas. **European Journal of Endocrinology**, v. 149, n. 4, p. 273–285, 2003.

BOWERS, L. D.; SANAULLAH. Direct measurement of steroid sulfate and glucuronide conjugates with high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography B: Biomedical Applications**, v. 687, n. 1, p. 61–68, 1996.

BRASIL. Resolução Da Diretoria Colegiada - RDC N° 166, de 24 de Julho de 2017. **Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências.**, v. 2017, p. 1–21, 2017.

BRASIL, M. DA S. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 166. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, v. 2017, p. 1–22, 2017.

BRITO, D. M.; LEOGRANDE, P.; COLAMONICI, C.; CURCIO, D.; BOTRE, F.; LA TORRE, X. DE. Arimistane: Degradation product or metabolite of 7-oxo-DHEA? **Drug Testing and Analysis**, v. 13, n. 7, p. 1430–1439, 2021.

CASALS, G.; HANZU, F. A. Cortisol measurements in Cushing's syndrome: Immunoassay or mass spectrometry? **Annals of Laboratory Medicine**, v. 40, n. 4, p. 285–296, 2020.

CECCATO, F. *et al.* Diagnostic accuracy of increased urinary cortisol/cortisone ratio to differentiate ACTH-dependent Cushing's syndrome. **Clinical Endocrinology**, v. 87, n. 5, p. 500–507, 2017.

CHIODINI, I.; MORELLI, V. Subclinical hypercortisolism: How to deal with it? **Frontiers of Hormone Research**, v. 46, p. 28–38, 2016.

CHIODINI, I.; VAINICHER, C. E.; MORELLI, V.; PALMIERI, S.; CAIROLI, E.; SALCUNI, A. S.; COPETTI, M.; SCILLITANI, A. Endogenous subclinical hypercortisolism and bone: A clinical review. **European Journal of Endocrinology**, v. 175, n. 6, p. R265–R282, 2016a.

COLLINS; C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas, São Paulo: Editora UNICAMP, 2006.

CUTHBERTSON, D. J.; ALAM, U.; DAVISON, A. S.; BELFIELD, J.; SHORE, S. L.; VINJAMURI, S. Investigation and assessment of adrenal incidentalomas. **Clinical Medicine, Journal of the Royal College of Physicians of London**, v. 23, n. 2, p. 135–140, 2023.

DALMAZI, G. DI; VICENNATI, V.; GARELLI, S.; CASADIO, E.; RINALDI, E.; GIAMPALMA, E.; MOSCONI, C.; GOLFIERI, R.; PACCAPELO, A.; PAGOTTO, U.; PASQUALI, R. Cardiovascular events and mortality in patients with adrenal incidentalomas that are either non-secreting or associated with intermediate phenotype or subclinical Cushing's syndrome: A 15-year retrospective study. **The Lancet Diabetes and Endocrinology**, v. 2, n. 5, p. 396–405, 2014.

EL-ANEED, A.; COHEN, A.; BANOUB, J. Mass Spectrometry, Review of the Basics: Electrospray, MALDI, and Commonly Used Mass Analyzers. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 44, n. 3, p. 210–230, abr. 2009.

EL-FARHAN, N.; REES, D. A.; EVANS, C. Measuring cortisol in serum, urine and saliva – are our assays good enough? **Annals of Clinical Biochemistry**, v. 54, n. 3, p. 308–322, 2017.

ELHASSAN, Y. S.; ALAHDAB, F.; PRETE, A.; DELIVANIS, D. A.; KHANNA, A.; PROKOP, L.; MURAD, M. H.; O'REILLY, M. W.; ARLT, W.; BANCOS, I. Natural History of Adrenal Incidentalomas with and without Mild Autonomous Cortisol Excess A Systematic Review and Meta-analysis. **Annals of Internal Medicine**, v. 171, n. 2, p. 107–116, 2019.

EVERAERT, I. *et al.* Development and validation of a sensitive LC–MS/MS assay for the quantification of anserine in human plasma and urine and its application to pharmacokinetic study. **Amino Acids**, v. 51, n. 1, p. 103–114, 2019.

FAQEHI, A. M.; DENHAM, S. G.; NAREDO, G.; COBICE, D. F.; KHAN, S.; SIMPSON, J. P.; SABIL, G.; UPRETI, R.; GIBB, F.; HOMER, N. Z.; ANDREW, R. Derivatization with 2-hydrazino-1-methylpyridine enhances sensitivity of analysis of 5 α -dihydrotestosterone in human plasma by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1640, 2021.

FASSNACHT, M. *et al.* European Society of Endocrinology clinical practice guidelines on the management of adrenal incidentalomas , in collaboration with the European Network for the Study of Adrenal Tumors. **European Journal of Endocrinology**, v. 189, n. 1, p. 1–42, 2023.

FASSNACHT, M.; ARLT, W.; BANCOS, I.; DRALLE, H.; NEWELL-PRICE, J.; SAHDEV, A.; TABARIN, A.; TERZOLO, M.; TSAGARAKIS, S.; DEKKERS, O. M.

Management of adrenal incidentalomas: European Society of Endocrinology Clinical Practice Guideline in collaboration with the European Network for the Study of Adrenal Tumors. **European Journal of Endocrinology**, v. 175, n. 2, p. G1–G34, 2016.

FAVERO, V.; CREMASCHI, A.; FALCHETTI, A.; GAUDIO, A.; GENNARI, L.; SCILLITANI, A.; VESCINI, F.; MORELLI, V.; ARESTA, C.; CHIODINI, I. Management and medical therapy of mild hypercortisolism. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 21, 2021.

FAVERO, V.; CREMASCHI, A.; PARAZZOLI, C.; FALCHETTI, A.; GAUDIO, A.; GENNARI, L.; SCILLITANI, A.; VESCINI, F.; MORELLI, V.; ARESTA, C.; CHIODINI, I. Pathophysiology of Mild Hypercortisolism: From the Bench to the Bedside. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 2, p. 1–27, 2022.

FLEISCHMAN, D. S.; NAVARRETE, C. D.; FESSLER, D. M. T. Oral contraceptives suppress ovarian hormone production. **Psychological Science**, v. 21, n. 5, p. 750–752, 2010.

FONTES, J. G. B. **Avaliação quantitativa do perfil endógeno em plasma de pacientes com doença de Parkinson por GC-MS/MS**. [s.l: s.n.].

FRASER, L.-A.; UUM, S. VAN. Work-up for Cushing syndrome. **Canadian Medical Association Journal**, v. 182, n. 6, p. 584–587, 2010.

FRIES, E.; HESSE, J.; HELLHAMMER, J.; HELLHAMMER, D. H. A new view on hypocortisolism. **PNEC**, v. 30, n. 10, p. 1010–1016, 2005.

FULLER, P. J.; YOUNG, M. J. Mechanisms of mineralocorticoid action. **Hypertension**, v. 46, n. 6, p. 1227–1235, 2005.

FUNDER, J. W. **Primary Aldosteronism: Present and Future**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2019. v. 109

GAO, S.; ZHANG, Z. P.; KARNES, H. T. Sensitivity enhancement in liquid chromatography/atmospheric pressure ionization mass spectrometry using derivatization and mobile phase additives. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 825, n. 2, p. 98–110, 2005.

GENANGELI, M.; CAPRIOLI, G.; CORTESE, M.; LAUS, F.; MATTEUCCI, M.; PETRELLI, R.; RICCIUTELLI, M.; SAGRATINI, G.; SARTORI, S.; VITTORI, S. Development and application of a UHPLC-MS/MS method for the simultaneous determination of 17 steroidal hormones in equine serum. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 52, n. 1, p. 22–29, 2017.

GRASSI, G.; MORELLI, V.; CERIOTTI, F.; POLLEDRI, E.; FUSTINONI, S.; D'AGOSTINO, S.; MANTOVANI, G.; CHIODINI, I.; AROSIO, M. Minding the gap between cortisol levels measured with second-generation assays and current diagnostic thresholds for the diagnosis of adrenal insufficiency: a single-center experience. **Hormones**, v. 19, n. 3, p. 425–431, 2020.

GROSS, J. H. **Mass spectrometry - A textbook**. [s.l.] Springer, 2004.

GRUMBACH, M. M.; BILLER, B. M. K.; BRAUNSTEIN, G. D.; CAMPBELL, K. K.; CARNEY, J. A. NIH Conference Management of the Clinically Inapparent Adrenal Mass. **Ann Intern Med**, v. 138, p. 424–429, 2003.

GU, H.; LIU, G.; WANG, J.; AUBRY, A. F.; ARNOLD, M. E. Selecting the correct weighting factors for linear and quadratic calibration curves with least-squares regression algorithm in bioanalytical LC-MS/MS assays and impacts of using incorrect weighting factors on curve stability, data quality, and assay perfo. **Analytical Chemistry**, v. 86, n. 18, p. 8959–8966, 2014.

GUNN, P. J.; MIDDLETON, B.; DAVIES, S. K.; REVELL, V. L.; SKENE, D. J. Sex differences in the circadian profiles of melatonin and cortisol in plasma and urine matrices under constant routine conditions. **Chronobiology International**, v. 33, n. 1, p. 39–50, 2016.

GUTCH, P. K. **Advanced Gas Chromatography - Progress in Agricultural, Biomedical and Industrial Applications**. [s.l.] InTech, 2012.

HAKAMI, O. A.; AHMED, S.; KARAVITAKI, N. Epidemiology and mortality of Cushing's syndrome. **Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 35, n. 1, p. 101521, 2021.

HÄKKINEN, M. R.; HEINOSALO, T.; SAARINEN, N.; LINNANEN, T.; VOUTILAINEN, R.; LAKKA, T.; JÄÄSKELÄINEN, J.; POUTANEN, M.; AURIOLA, S. Analysis by LC–MS/MS of endogenous steroids from human serum, plasma, endometrium and

endometriotic tissue. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 152, p. 165–172, 2018.

HÁNA, V.; JEŽKOVÁ, J.; KOSÁK, M.; KRŠEK, M.; HÁNA, V.; HILL, M. Novel GC-MS/MS Technique Reveals a Complex Steroid Fingerprint of Subclinical Hypercortisolism in Adrenal Incidentalomas. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 104, n. 8, p. 3545–3556, 2019.

HANUKOGLU, I. Steroidogenic enzymes: Structure, function, and role in regulation of steroid hormone biosynthesis. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 43, n. 8, p. 779–804, 1992.

HAO, C.; ENG, M. L.; SUN, F.; MORRISSEY, C. A. Part-per-trillion LC-MS / MS determination of neonicotinoids in small volumes of songbird plasma. **Science of the Total Environment**, v. 644, p. 1080–1087, 2018.

HASEGAWA, K.; MINAKATA, K.; SUZUKI, M.; SUZUKI, O. The standard addition method and its validation in forensic toxicology. **Forensic Toxicology**, v. 39, n. 2, p. 311–333, 2021.

HIGASHI, T.; OGAWA, S. Derivatization-based sample-multiplexing for enhancing throughput in liquid chromatography/tandem mass spectrometry quantification of metabolites: an overview. **Journal of Chromatography A**, v. 1634, 2020.

IUPAC. **Compendium of Chemical Terminology (Gold Book)**. [s.l: s.n.].

JARDIM, I. C. S. F. Extração em Fase Sólida: Fundamentos Teóricos e Novas Estratégias para Preparação de Fases Sólidas. **Scientia Chromatographica**, v. 2, n. 1, p. 13–25, 2010.

JAVANMARD, P.; DUAN, D.; B. GEER, E. Mortality in Patients with Endogenous Cushing's Syndrome. **Endocrinology and Metabolism Clinics of NA**, v. 47, n. 2, p. 313–333, 2018.

JONES, B. R.; SCHULTZ, G. A.; ECKSTEIN, J. A.; ACKERMANN, B. L. Surrogate matrix and surrogate analyte approaches for definitive quantitation of endogenous biomolecules. **Bioanalysis**, v. 4, n. 19, p. 2343–2356, 2012.

KANU, A. B. Recent developments in sample preparation techniques combined with high-performance liquid chromatography: A critical review. **Journal of**

Chromatography A, v. 1654, p. 462444, 2021.

KARACHALIOU, C. E.; KOUKOUVINOS, G.; GOUSTOURIDIS, D.; RAPTIS, I.; KAKABAKOS, S.; PETROU, P.; LIVANIOU, E. Cortisol Immunosensors: A Literature Review. **Biosensors**, v. 13, n. 2, p. 1–17, 2023.

KATSU, Y.; IGUCHI, T. **Cortisol**. [s.l.] Elsevier Inc., 2016.

KATSU, Y.; IGUCHI, T.; KENDALL, C.; REICHSTEIN, T.; SHOWALTER, P. **Corticosteroids**. [s.l.] Elsevier Inc., 2016.

KEEVIL, B. G. Novel liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) methods for measuring steroids. **Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 27, n. 5, p. 663–674, 2013.

____. LC-MS/MS analysis of steroids in the clinical laboratory. **Clinical Biochemistry**, v. 49, n. 13–14, p. 989–997, 2016.

KIM, J. H.; MIN JOO KIM; LEE, J. H.; YOON, J. W.; SHIN, C. S. Nonfunctioning adrenal incidentalomas are not clinically silent: A longitudinal cohort study. **Endocrine Practice**, v. 26, n. 12, p. 1406–1415, 2020.

KOKUBO, T.; TAKADAMA, H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? **Biomaterials**, v. 27, n. 15, p. 2907–2915, 2006.

KONERMANN, L.; AHADI, E.; RODRIGUEZ, A. D.; VAHIDI, S. Unraveling the Mechanism of Electrospray Ionization. **Analytical Chemistry**, v. 85, n. 1, p. 2–9, 2 jan. 2013.

KOONTZ, L. TCA precipitation. **Methods in Enzymology**, v. 541, p. 3–10, 2014.

LI, C.; CHU, S.; TAN, S.; YIN, X.; JIANG, Y.; DAI, X.; GONG, X.; FANG, X.; TIAN, D. Towards Higher Sensitivity of Mass Spectrometry: A Perspective From the Mass Analyzers. **Frontiers in Chemistry**, v. 9, n. December, p. 1–21, 2021.

LIDE, D. R. **CRC Handbook of Chemistry and Physics**. [s.l.] CRC Press: Boca Raton, 2005.

LOH, G. O. K.; WONG, E. Y. L.; TAN, Y. T. F.; LEE, Y. L.; PANG, L. H.; CHIN, M. C.; DAMENTHI, N.; PEH, K. K. Simple and rapid LC-MS/MS method for determination of sitagliptin in human plasma and application to bioequivalence study. **Journal of**

Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, v. 1159, n. June, p. 122337, 2020.

MEDVEDOVICI, A.; BACALUM, E.; DAVID, V. Sample preparation for large-scale bioanalytical studies based on liquid chromatographic techniques. **Biomedical Chromatography**, v. 32, n. 1, p. 1–23, 2018.

MEIJER, O. C.; KOORNEEF, L. L.; KROON, J.; AZMI, N. A. S. M.; JULIANA, N.; AZMANI, S.; EFFENDY, N. M.; ABU, I. F.; TENG, N. I. M. F.; DAS, S. Cortisol on circadian rhythm and its effect on cardiovascular system. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 18, n. 2, p. 1–15, 2021.

MERBEL, N. C. VAN DE. Quantitative determination of endogenous compounds in biological samples using chromatographic techniques. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 27, n. 10, p. 924–933, 2008.

METHLIE, P.; HUSTAD, S.; KELLMAN, R.; ALMÅS, B.; ERICHSEN, M. M.; HUSEBYE, E. S.; LØVÅS, K. Multisteroid LC–MS/MS assay for glucocorticoids and androgens and its application in Addison's disease. **Endocrine Connections**, v. 2, n. 3, p. 125–136, 2013.

MILLER, J. N.; MILLER, J. C. **Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry**. [s.l: s.n.].

MILLER, W. L.; AUCHUS, R. J. The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. **Endocrine Reviews**, v. 32, n. 1, p. 81–151, 2011.

MOLINA, P. E. **Fisiologia Endócrina**. [s.l: s.n.].

NAIR, H.; CLARKE, W. **Mass Spectrometry for the Clinical Laboratory**. [s.l.] ESI is perhaps the most commonly used ionization technique in clinical MS. It is a sensitive ionization technique for analytes that exist as ions in the LC eluent. In ESI, a solvent spray is formed by the application of a high voltage potential held bet, 2016.

NASCIMENTO, R. F. DO; LIMA, A. C. A. DE; BARBOSA, P. G. A.; SILVA, V. P. A. DA. **Cromatografia gasosa Aspectos teóricos e práticos**. [s.l: s.n.].

NIEMAN, L. K.; BILLER, B. M. K.; FINDLING, J. W.; NEWELL-PRICE, J.; SAVAGE, M. O.; STEWART, P. M.; MONTORI, V. M.; EDWARDS, H. The diagnosis of

Cushing's syndrome: An endocrine society clinical practice guideline. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 93, n. 5, p. 1526–1540, 2008.

NIU, Z.; ZHANG, W.; YU, C.; ZHANG, J.; WEN, Y. Recent advances in biological sample preparation methods coupled with chromatography, spectrometry and electrochemistry analysis techniques. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 102, p. 123–146, 2018.

NORMAN, A. W.; HENRY, H. L. **Hormones (Third Edition)**. [s.l.: s.n.].

NOVÁK, P.; HAVLÍČEK, V. Protein Extraction and Precipitation. **Proteomic Profiling and Analytical Chemistry: The Crossroads: Second Edition**, p. 52–62, 2016.

NOVÁKOVÁ, L.; VLČKOVÁ, H. A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: Chromatography and sample preparation. **Analytica Chimica Acta**, v. 656, n. 1–2, p. 8–35, 2009.

PAPPACHAN, J. M.; HARIMAN, C.; EDAVALATH, M.; WALDRON, J.; HANNA, F. W. Cushing's syndrome: A practical approach to diagnosis and differential diagnoses. **Journal of Clinical Pathology**, v. 70, n. 4, p. 350–359, 2017.

PARK, I.; PARK, JIN-WOO; CHUNG, H.; KIM, J.; LEE, S.; KIM, K.; PARK, JI-YOUNG. Development and validation of LC – MS / MS method for simultaneous determination of dabigatran etexilate and its active metabolites in human plasma, and its application in a pharmacokinetic study. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 203, p. 44–50, 2021.

PAYNE, A. H.; HALES, D. B. Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones. **Endocrine Reviews**, v. 25, n. 6, p. 947–970, 2004.

PIZZORNO, L.; PIZZORNO, J. Subclinical Hypercortisolism: An Important, Unrecognized Dysfunction. **Integrative medicine (Encinitas, Calif.)**, v. 21, n. 3, p. 8–15, 2022.

POOLE, C. F. **The Essence of Chromatography**. [s.l.] Elsevier, 2003.

_____. Alkylsilyl derivatives for gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1296, p. 2–14, 2013.

QI, B. L.; LIU, P.; WANG, Q. Y.; CAI, W. J.; YUAN, B. F.; FENG, Y. Q. Derivatization for liquid chromatography-mass spectrometry. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 59, p. 121–132, 2014.

RAPOSO, F.; BARCELÓ, D. Challenges and strategies of matrix effects using chromatography-mass spectrometry: An overview from research versus regulatory viewpoints. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 134, 2021.

RAPOSO, F.; IBELLI-BIANCO, C. Performance parameters for analytical method validation: Controversies and discrepancies among numerous guidelines. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 129, p. 115913, 2020.

RAPS, M.; KLEIDER, C.; LEHMANN, L. Quantitative analysis of 34 sex (pro)hormones, conjugates and bioactive oxidation products thereof in human plasma by GC- and LC-MS/MS and systematic investigation of overestimations of analyte concentrations not accounted for by method validation. **Steroids**, v. 208, n. March, p. 109441, 2024.

RIBANI, M.; GRESPAN BOTTOLI, C. B.; COLLINS, C. H.; FONTES JARDIM, I. C. S.; COSTA MELO, L. F. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quimica Nova**, v. 27, n. 5, p. 771–780, 2004.

SANDEEP, T. C.; WALKER, B. R. Pathophysiology of modulation of local glucocorticoid levels by 11 β -hydroxysteroid dehydrogenases. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 12, n. 10, p. 446–453, 2001.

SAYAGO, A.; ASUERO, A. G. Fitting straight lines with replicated observations by linear regression: Part II. Testing for homogeneity of variances. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 34, n. 3–4, p. 133–146, 2004.

SCHÄNZER, W. Metabolism of anabolic androgenic steroids. **Clinical Chemistry**, v. 42, n. 7, p. 1001–1020, 1996.

SCHMIDT R. F.; THEWS, G. **Human Physiology**. [s.l: s.n.]. v. 2

SHERLOCK, M.; SCARSBROOK, A.; ABBAS, A.; FRASER, S.; LIMUMPORNPETCH, P.; DINEEN, R.; STEWART, P. M. **Adrenal incidentaloma**. [s.l: s.n.]. v. 41

SHUGUANG, M.; CHOWDHURY, S. K. **Identification and quantification of drugs**,

metabolites, drug metabolizing enzymes, and transporters - Concepts, Methods and Translational Sciences. [s.l.] Elsevier, 2020.

SILVERTHORN, D. U. **Fisiologia Humana: Uma Abordagem Integrada.** [s.l.: s.n.].

SIMPSON, V.; BROOKE, A. M. Addison's disease. **Medicine (United Kingdom)**, v. 49, n. 8, p. 498–501, 2021.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Principles of Instrumental Analysis.** [s.l.: s.n.].

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; COUCH, S. R. **Fundamentos de Química Analítica.** 8. ed. [s.l.] Thomson, 2006.

SKOOG, D.; WEST, A.; HOLLER, D. M.; CROUCH, S. R. **Fundamentos de Química Analítica.** oitava edi ed. [s.l.] Thomson, 2008.

SOFER, Y.; OSHER, E.; LIMOR, R.; SHEFER, G.; MARCUS, Y.; SHAPIRA, I.; TORDJMAN, K.; GREENMAN, Y.; BERLINER, S.; STERN, N. Gender Determines Serum Free Cortisol: Higher Levels in Men. **Endocrine practice : official journal of the American College of Endocrinology and the American Association of Clinical Endocrinologists**, v. 22, n. 12, p. 1415–1421, 2016.

STASHENKO, E.; REN, J. Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *In: Advances in Gas Chromatography.* [s.l.] InTech, 2014. .

STEFFENSEN, C.; BAK, A. M.; ZØYLNER RUBECK, K.; JØRGENSEN, J. O. L. Epidemiology of Cushing's syndrome. **Neuroendocrinology**, v. 92, n. SUPPL. 1, p. 1–5, 2010.

STONE, J. **Sample preparation techniques for mass spectrometry in the clinical laboratory.** [s.l.] Elsevier Inc., 2017.

THAKARE, R.; CHHONKER, Y. S.; GAUTAM, N.; ALAMOUDI, J. A.; ALNOUTI, Y. Quantitative analysis of endogenous compounds. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 128, p. 426–437, 2016.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, n. 5, p. 835–855, 2002.

TOUCHSTONE, J. C. History of Chromatography. **Journal of Liquid Chromatography**, v. 16, n. 8, p. 1647–1665, 1993.

TUNA, M. M.; IMGA, N. N.; DOĞAN, B. A.; YILMAZ, F. M.; TOPÇUOĞLU, C.; AKBABA, G.; BERKER, D.; GÜLER, S. Non-functioning adrenal incidentalomas are associated with higher hypertension prevalence and higher risk of atherosclerosis. **Journal of Endocrinological Investigation**, v. 37, n. 8, p. 765–768, 2014.

TURPEINEN, U.; HÄMÄLÄINEN, E. Determination of cortisol in serum, saliva and urine. **Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 27, n. 6, p. 795–801, 2013.

VESSECCHI, R.; LOPES, N. P.; GOZZO, F. C.; DÖRR, F. A.; MURGU, M.; LEBRE, D. T.; ABREU, R.; BUSTILLOS, O. V.; RIVEROS, J. M. Nomenclaturas de espectrometria de massas em língua portuguesa. **Química Nova**, v. 34, n. 10, p. 1875–1887, 2011.

WANG, J.; ZHU, Y.; WANG, Z.; LIU, C.; LIU, S.; LI, X.; CHEN, R.; ZHAN, Y.; WANG, S.; ZENG, X. Hypertension Resolution after Laparoscopic Adrenal Tumor Resection in Patients of Adrenal Incidentaloma with Normal Hormone Levels. **Urologia Internationalis**, v. 107, n. 2, p. 193–201, 2023.

WANG, R.; HARTMANN, M. F.; WUDY, S. A. Targeted LC–MS/MS analysis of steroid glucuronides in human urine. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 205, n. October 2020, p. 105774, 2021a.

_____. Targeted LC–MS/MS analysis of steroid glucuronides in human urine. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 205, n. September 2020, p. 105774, 2021b.

WILDE, L. DE; ROELS, K.; RENTERGHEM, P. VAN; EENOO, P. VAN; DEVENTER, K. Steroid profiling in urine of intact glucuronidated and sulfated steroids using liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1624, p. 461231, 2020.

WOODS, A. G.; DARIE, C. C. **Advancements of Mass Spectrometry in Biomedical**. Second edi ed. [s.l.] Springer Nature, 2019.

WORLD ANTI-DOPING AGENCY (WADA). WADA Technical Document –

TD2022MRPL Minimum Required Performance Levels and applicable Minimum Reporting Levels for non-threshold substances analyzed by Chromatographic - Mass Spectrometric analytical methods. 1.0. p. 1–12, 2022.

WUDY, S. A.; CHOI, M. H. Steroid LC – MS has come of age. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 162, p. 1–3, 2016.

YIN, F.; LING, Y.; MARTIN, J.; NARAYANASWAMY, R.; MCINTOSH, L.; LI, F.; LIU, G. Quantitation of uridine and L-dihydroorotic acid in human plasma by LC–MS/MS using a surrogate matrix approach. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 192, p. 113669, 2021.

ZAVATTA, G.; DALMAZI, G. DI. Recent Advances on Subclinical Hypercortisolism. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, p. 1–9, 2018.

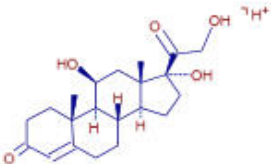
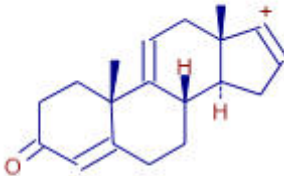
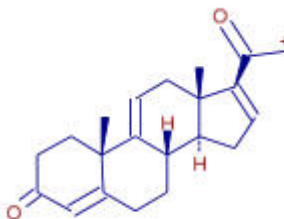
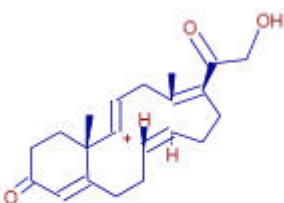
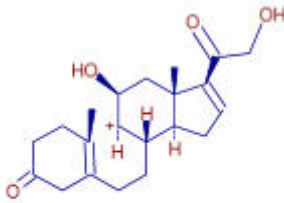
ZEAL, M.; BELLAGAMBI, F. G.; BEN, H.; ZINE, N.; JAFFREZIC-RENAULT, N.; VILLA, R.; GABRIEL, G.; ERRACHID, A. Trends in Analytical Chemistry Electrochemical sensors for cortisol detections : Almost there. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 132, 2020a.

_____. Trends in Analytical Chemistry Electrochemical sensors for cortisol detections : Almost there. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 132, p. 116058, 2020b.

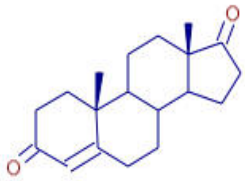
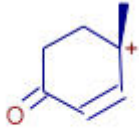
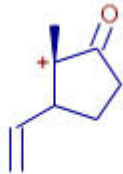
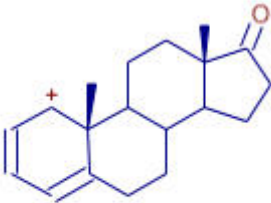
ZEIGER, M. A.; THOMPSON, G. B.; DUH, Q. Y.; HAMRAHIAN, A. H.; ANGELOS, P.; ELARAJ, D.; FISHMAN, E.; KHARLIP, J. American Association of Clinical Endocrinologists and American Association of Endocrine Surgeons Medical Guidelines for the Management of Adrenal Incidentalomas: Executive summary of recommendations. **Endocrine Practice**, v. 15, n. 5, p. 450–453, 2009.

APENDICE A – SUGESTÕES DE FRAGMENTAÇÃO DOS ANALITOS AVALIADOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA. ESTRUTURAS OBTIDAS COM O SOFTWARE MASSFRONTIER.

Cortisol

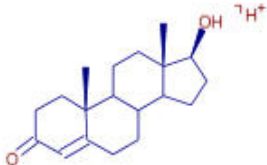
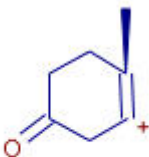
Íon precursor	Sugestões de fragmentação
 [C₂₁H₃₀O₅ + H]⁺ m/z 363.21660	 C₉H₁₃⁺ m/z 121.10118  C₁₉H₂₃O⁺ m/z 267.17434  C₂₁H₂₅O₂⁺ m/z 309.18491  C₂₁H₂₇O₃⁺ m/z 327.19547  C₂₁H₂₉O₄⁺ m/z 345.20604

Androstenodiona

Íon precursor	Sugestões de fragmentação
 $[C_{19}H_{26}O_2+H]^+$ m/z 287.20056	 $C_6H_9O^+$ m/z 97.06479  $C_7H_9O^+$ m/z 109.06479  $C_8H_{11}O^+$ m/z 123.08044  $C_{19}H_{25}O^+$ m/z 269.18999

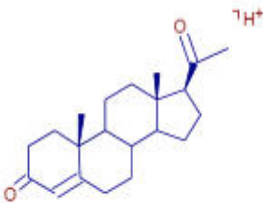
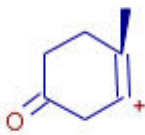
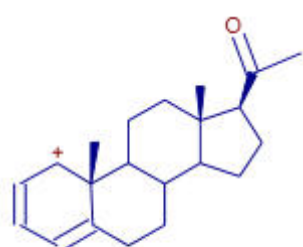
- O íon de m/z 79 não foi sugerido pelo software.

Testosterona

Íon precursor	Sugestões de fragmentação
 $[C_{19}H_{28}O_2+H]^+$ m/z 289.21621	 $C_7H_9O^+$ m/z 109.06479  $C_{19}H_{25}^+$ m/z 253.19508  $C_{19}H_{27}O^+$ m/z 271.20564

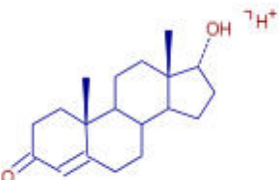
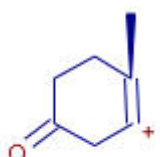
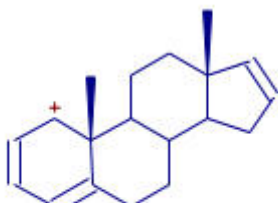
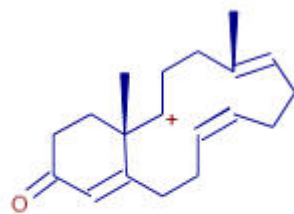
- Os íons de m/z 79 e 97 não foram sugeridos pelo software. Entretanto, devido à similaridade estrutural, o íon m/z 97 pode ser considerado o mesmo da androstenodiona.

Progesterona

Íon precursor	Sugestões de fragmentação
 $[C_{21}H_{30}O_2+H]^+$ m/z 315.23186	 $C_7H_9O^+$ m/z 109.06479  $C_{19}H_{27}^+$ m/z 255.21073  $C_{21}H_{29}O^+$ m/z 297.22129

- Os íons m/z 97 e 279 não foram sugeridos pelo software. Entretanto, devido à similaridade estrutural, o íon m/z 97 pode ser considerado o mesmo da androstenodiona.

Epitestosterona

Íon precursor	Sugestões de fragmentação
 $[C_{19}H_{28}O_2+H]^+$ m/z 289.21621	 $C_7H_9O^+$ m/z 109.06479  $C_{19}H_{25}^+$ m/z 253.19508  $C_{19}H_{27}O^+$ m/z 271.20564

- Os íons m/z 97 e 175 não foram sugeridos pelo software. Entretanto, devido à similaridade estrutural, o íon m/z 97 pode ser considerado o mesmo da androstenodiona.

APÊNDICE B – TEMPOS DE RETENÇÃO DOS ANALITOS, PADRÕES INTERNOS E PARÂMETROS DO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS NAS ANÁLISES POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA.

Substância	Tempo de retenção (min)	Polaridade	Íon precursor (m/z)	Íons produto (m/z)	Energia de colisão (V)	RF Lens (V)
Androstenodiona	10,03	Positivo (M+H+)	287	79, 97, 109, 123, 269	42, 24, 24, 24, 16	59
Androstenodiona D3	10,00	Positivo (M+H+)	290	79, 81, 100, 109, 272	15, 38, 19, 17, 15	62
Cortisol D4	5,86 (urina) 7,56 (plasma)	Positivo (M+H+)	367	121, 301, 313, 331, 349	24, 18, 16, 16, 14	82
Cortisol	5,87 (urina) 7,58 (plasma)	Positivo (M+H+)	363	121, 267, 309, 327, 345 (121,240, 251, 267, 269, 281, 297, 309, 345, 327)	26, 18, 15, 14, 13	88
Epitestosterona	11,48	Positivo (M+H+)	289	97, 109, 175, 253, 271	24, 27, 20, 17, 16	58
Epitestosterona D3	11,45	Positivo (M+H+)	292	97, 109, 178, 256, 274	24, 26, 20, 18, 15	56
Progesterona	12,33	Positivo (M+H+)	315	97, 109, 255, 279, 297	22, 25, 18, 16, 15	62
Testosterona	10,71	Positivo (M+H+)	289	79, 97, 109, 253, 271	43, 22, 25, 17, 15	59
Testosterona D3	10,68	Positivo (M+H+)	292	79, 81, 97, 109, 274	41, 39, 23, 25, 16	61

**APÊNDICE E – DADOS DOS PARÂMETROS DE REPETIBILIDADE E PRECISÃO INTERMEDIÁRIA DOS ANALITOS
AVALIADOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA**

Cortisol (plasma)

Controle	Concentração nominal (ng/mL)	Área padrão	Área PI	Razão	Concentração experimental (ng/mL)	Média	Desvio padrão	G _{calculado}	DPR	Recuperação (%)
Primeiro dia (analista A)										
CQB	10,00	309797	4078429	0,076	10,557	10,609	0,361	0,145	3,407	106,094
		291714	3944436	0,074	10,277					
		314228	3973204	0,079	10,994			1,064		
CQM	150,00	4557936	4344281	1,049	146,577	150,048	3,859		2,572	100,032
		4606197	4308384	1,069	149,364			0,177		
		4716561	4273214	1,104	154,204			1,077		
CQA	270,00	7302430	3774370	1,935	270,345	271,484	3,381	0,337	1,246	100,550
		7879460	4095731	1,924	268,819					
		7982006	4051561	1,970	275,288			1,125		
Curva	y =	0,007155x	0,00042							
Segundo dia (analista B)										
CQB	10,00	142340	2347727	0,061	9,167	9,641	0,411	1,152	4,267	96,412
		294346	4492965	0,066	9,848			0,503		
		290837	4412600	0,066	9,908					
CQM	150,00	3517573	3377118	1,042	157,131	151,500	6,164		4,069	101,000
		3320928	3456760	0,961	144,914			1,068		
		3711308	3669686	1,011	152,456			0,155		
CQA	270,00	7581619	4050686	1,872	282,320	280,208	5,587	0,378	1,994	103,781
		8081729	4450148	1,816	273,873			1,134		
		7769704	4120762	1,886	284,431					
Curva	y =	0,00663x+	0,00022							

Androstenediona (plasma)

Controle	Concentração nominal (ng/mL)	Área padrão	Área PI	Razão	Concentração experimental (ng/mL)	Média	Desvio padrão	G _{calculado}	DPR	Recuperação (%)
Primeiro dia (analista A)										
CQB	0,50	121771	1403719	0,087	0,451	0,529	0,070	1,116	13,220	105,743
		149879	1363950	0,110	0,586					
		135007	1301183	0,104	0,550					
CQM	4,50	1152617	1556058	0,741	4,264	4,398	0,119	1,131	2,700	97,741
		1171329	1502933	0,779	4,489					
		1167580	1513921	0,771	4,442					
CQA	10,00	2428005	1344031	1,807	10,478	10,444	0,193	0,366	1,844	104,438
		2624702	1487111	1,765	10,236					
		2703465	1477128	1,830	10,617					
Curva	y =	0,1715x +	0,00946							
Segundo dia (analista B)										
CQB	0,50	131721	1459105	0,090	0,501	0,502	0,003	0,301	0,5816	100,387
		142083	1578487	0,090	0,500					
		142846	1577749	0,091	0,505					
CQM	4,50	864974	1158803	0,746	4,243	4,207	0,073	1,116	1,7283	93,493
		864974	1158803	0,746	4,243					
		868973	1161403	0,748	4,255					
CQA	10,00	863664	1191024	0,725	4,124	9,796	0,311	0,497	3,1797	97,964
		863664	1191024	0,725	4,124					
		2657171	1519488	1,749	9,968					
CQA	10,00	2833592	1711178	1,656	9,437	9,796	0,311	0,550	3,1797	97,964
		2833592	1711178	1,656	9,437					
		2720652	1553307	1,752	9,985					
Curva	y =	0,1752x+	0,00248							

Testosterona (plasma)

Progesterona (plasma)

Controle	Concentração nominal (ng/mL)	Área padrão	Área PI	Razão	Concentração experimental (ng/mL)	Média	Desvio padrão	G _{calculado}	DPR	Recuperação (%)
Primeiro dia (analista A)										
CQB	10,00	2024477	2416461	0,838	9,77	12,450	2,336	1,146	18,763	124,495
		2581360	2317646	1,114	13,50			0,449		
		2540844	2196512	1,157	14,08					
CQM	200,00	39263077	2626901	14,947	200,17	210,173	8,773	1,140	4,174	105,086
		40203467	2487461	16,162	216,58					
		40668075	2549206	15,953	213,76			0,409		
CQA	360,00	66498390	2250003	29,555	397,32	399,466	6,123	0,351	1,533	110,963
		73235520	2494282	29,361	394,71					
		75402939	2494647	30,226	406,37			1,128		
Curva	y =	0,07410 +	0,01136							
Segundo dia (analista B)										
CQB	10,00	2327647	2498428	0,932	11,74	12,015	0,315	1,084	2,626	120,152
		2548199	2597659	0,981	12,36			0,198		
		2535516	2672133	0,949	11,95					
CQM	200,00	29668177	2038361	14,555	183,46	168,751	12,802	1,149	7,586	84,376
		25442332	1971954	12,902	162,63			0,478		
		25602181	2014952	12,706	160,16					
CQA	360,00	69422007	2535900	27,376	345,08	346,113	2,527	0,409	0,7301	96,142
		76956523	2779594	27,686	348,99			1,140		
		72598329	2658174	27,311	344,27					
Curva	y =	0,07933x	0,00066							

Repetibilidade dos controles de qualidades nos dois dias de validação

Cortisol (urina)

	Pontos	CQB	CQM	CQA
Dia 1	1	9,717	70,890	157,214
	2	9,211	75,202	135,681
	3	9,383	76,752	135,819
Dia 2	1	13,016	88,366	142,575
	2	12,991	87,335	140,054
	3	11,092	102,329	134,176
Média		10,902	83,479	140,920
Desvio		1,757	11,544	8,578
DPR (%)		16,119	13,828	6,087

Cortisol (plasma)

	Pontos	CQB	CQM	CQA
Dia 1	1	10,557	146,577	270,345
	2	10,277	149,364	268,819
	3	10,994	154,204	275,288
Dia 2	1	9,167	157,131	282,320
	2	9,848	144,914	273,873
	3	9,908	152,456	284,431
Média		10,125	150,774	275,846
Desvio		0,633	4,668	6,316
DPR (%)		6,256	3,096	2,290

Androstenediona (plasma)

	Pontos	CQB	CQM	CQA
Dia 1	1	0,451	4,264	10,478
	2	0,586	4,489	10,236
	3	0,550	4,442	10,617
Dia 2	1	0,501	4,243	9,968
	2	0,500	4,255	9,437
	3	0,505	4,124	9,985
Média		0,515	4,303	10,120
Desvio		0,047	0,137	0,424
DPR (%)		9,041	3,180	4,185

Testosterona (plasma)

	Pontos	CQB	CQM	CQA
Dia 1	1	0,425	4,534	10,796
	2	0,534	4,819	10,613
	3	0,550	4,862	11,034
Dia 2	1	0,533	4,310	10,137
	2	0,505	4,398	9,973
	3	0,506	4,146	9,995
Média		0,509	4,512	10,425
Desvio		0,045	0,284	0,451
DPR (%)		8,787	6,304	4,323

Epitestosterona (plasma)

	Pontos	CQB	CQM	CQA
Dia 1	1	0,174	0,676	1,297
	2	0,096	0,662	1,358
	3	0,153	0,689	1,387
Dia 2	1	0,212	0,602	1,204
	2	0,149	0,641	1,189
	3	0,199	0,641	1,222
Média		0,164	0,652	1,276
Desvio		0,041	0,031	0,084
DPR (%)		25,260	4,746	6,589

Progesterona (plasma)

	Pontos	CQB	CQM	CQA
Dia 1	1	9,773	200,175	397,317
	2	13,498	216,584	394,707
	3	14,078	213,760	406,374
Dia 2	1	11,736	183,465	345,078
	2	12,357	162,630	348,993
	3	11,953	160,159	344,267
Média		12,232	189,462	372,789
Desvio		1,510	24,720	29,522
DPR (%)		12,341	13,047	7,919

APÊNDICE F - DADOS DE ROBUSTEZ DOS ANALITOS AVALIADOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA.

Androstenodiona (plasma)

CQM (5,0)				Grubbs		Concentração	Média	Desvio	DPR (%)	Erro em relacao ao CQM (%) (conc)
Robustez centrifugacao (20 min, 6 graus celcius, 13000 g)										
Replicata 1	0,885	Média	Desvio	Replicata 1	0,231	5,105	5,037	0,295	5,848	100,74
Replicata 2	0,818	0,873	0,051	Replicata 2	1,095	4,715				
Replicata 3	0,917			Replicata 3	0,864	5,292				
Robustez acetonitrila (adicionado 400uL em vez de 375 uL)										
Replicata 1	0,834	Média	Desvio	Replicata 1	0,348	4,808	5,076	0,771	15,180	101,52
Replicata 2	0,777	0,880	0,132	Replicata 2	0,779	4,475				
Replicata 3	1,029			Replicata 3	1,128	5,945				
Robustez temperatura do forno (42 C)										
Replicata 1	0,741	Média	Desvio	Replicata 1	1,056	4,266	4,464	0,188	4,204	89,28
Replicata 2	0,779	0,775	0,032	Replicata 2	0,124	4,487				
Replicata 3	0,805			Replicata 3	0,932	4,639				
Robustez fluxo (280 uL/min)										
Replicata 1	0,779	Média	Desvio	Replicata 1	1,134	4,487	4,452	0,031	0,693	89,04
Replicata 2	0,771	0,773	0,005	Replicata 2	0,378	4,440				
Replicata 3	0,769			Replicata 3	0,756	4,429				

Gcritico (n =): 1,155

Coefficiente angular 0,1715

Coefficiente linear 0,00946

Testosterona (plasma)

CQM (5,0)				Grubbs		Concentracao	Media	Desvio	DPR (%)	Erro em relacao ao CQM (%) (conc)
Robustez centrifugação (20 min, 6 graus celcius, 13000 g)										
Replicata 1	0,564	Média	Desvio	Replicata 1	0,355	5,395	5,304	0,255	4,814	106,08
Replicata 2	0,525	0,555	0,026	Replicata 2	1,129	5,016				
Replicata 3	0,575			Replicata 3	0,774	5,502				
Robustez acetoneitrila (adicionado 400uL em vez de 375 uL)										
Replicata 1	0,538	Média	Desvio	Replicata 1	0,273	5,142	5,340	0,725	13,578	106,80
Replicata 2	0,496	0,558	0,075	Replicata 2	0,835	4,734				
Replicata 3	0,641			Replicata 3	1,108	6,143				
Robustez temperatura do forno (42 C)										
Replicata 1	0,479	Média	Desvio	Replicata 1	1,149	4,569	4,679	0,096	2,049	93,58
Replicata 2	0,495	0,490	0,010	Replicata 2	0,473	4,724				
Replicata 3	0,497			Replicata 3	0,676	4,744				
Robustez fluxo (280 uL/min)										
Replicata 1	0,455	Média	Desvio	Replicata 1	1,123	4,336	4,591	0,228	4,965	91,83
Replicata 2	0,489	0,481	0,023	Replicata 2	0,327	4,666				
Replicata 3	0,500			Replicata 3	0,796	4,773				

Gcritico (n =): 1,155

Coefficiente angular 0,1029

Coefficiente linear 0,00887

Progesterona (plasma)

CQM (200)				Grubbs		Concentracao	Media	Desvio	DPR (%)	Erro em relacao ao CQM (%) (conc)
Robustez centrifugacao (20 min, 6 graus celcius, 13000 g)										
Replicata 1	17,113	Média	Desvio	Replicata 1	0,119	230,791				
Replicata 2	16,697	17,174	0,510	Replicata 2	0,935	225,177	231,610	6,879	2,970	115,81
Replicata 3	17,711			Replicata 3	1,054	238,862				
Robustez acetoneitrila (adicionado 400uL em vez de 375 uL)										
Replicata 1	16,621	Média	Desvio	Replicata 1	0,176	224,152				
Replicata 2	14,768	17,071	2,558	Replicata 2	0,900	199,145	230,229	34,526	14,997	115,11
Replicata 3	19,825			Replicata 3	1,076	267,391				
Robustez temperatura do forno (42 C)										
Replicata 1	12,255	Média	Desvio	Replicata 1	1,151	165,231				
Replicata 2	16,192	14,771	2,185	Replicata 2	0,650	218,362	199,185	29,487	14,804	99,59
Replicata 3	15,866			Replicata 3	0,501	213,963				
Robustez fluxo (280 uL/min)										
Replicata 1	14,814	Média	Desvio	Replicata 1	1,130	199,766				
Replicata 2	15,928	15,660	0,748	Replicata 2	0,359	214,799	211,178	10,101	4,783	105,59
Replicata 3	16,237			Replicata 3	0,771	218,970				

Gcritico (n =): 1,155

Coeficiente angular 0,0741

Coeficiente linear 0,01136

Epitestosterona (plasma)

CQM (0,65)				Grubbs		Concentracao	Media	Desvio	DPR (%)	Erro em relacao ao CQM (%)
Robustez centrifugacao (20 min, 6 graus celcius, 13000 g)										
Replicata 1	0,096	Média	Desvio	Replicata 1	0,927	0,722	0,742	0,022	2,949	114,16
Replicata 2	0,098	0,098	0,003	Replicata 2	0,132	0,739				
Replicata 3	0,101			Replicata 3	1,060	0,765				
Robustez acetoneitrila (adicionado 400uL em vez de 375 uL)										
Replicata 1	0,091	Média	Desvio	Replicata 1	0,445	0,678	0,739	0,137	18,490	113,71
Replicata 2	0,087	0,098	0,016	Replicata 2	0,700	0,643				
Replicata 3	0,116			Replicata 3	1,145	0,896				
Robustez temperatura do forno (42 C)										
Replicata 1	0,092	Média	Desvio	Replicata 1	0,000	0,687	0,687	0,061	8,861	105,69
Replicata 2	0,085	0,092	0,007	Replicata 2	1,000	0,626				
Replicata 3	0,099			Replicata 3	1,000	0,748				
Robustez fluxo (280 uL/min)										
Replicata 1	0,091	Média	Desvio	Replicata 1	1,121	0,678	0,658	0,018	2,751	101,23
Replicata 2	0,088	0,089	0,002	Replicata 2	0,320	0,652				
Replicata 3	0,087			Replicata 3	0,801	0,643				

Gcritico (n =): 1,155

Coeficiente angular 0,115

Coeficiente linear 0,013

APÊNDICE G – RESULTADOS DA POPULAÇÃO DE REFERÊNCIA

Resultados no plasma – Cromatografia líquida

População de referência								
			Urina	Plasma				
	Sexo	Idade	Cortisol	Cortisol	Androstenediona	Testosterona	Progesterona	Epitestosterona
PR 1	M	30	87,18	76,57	0,73	3,71	ND	ND
PR 2	M	25	283,60	116,01	0,44	5,96	ND	ND
PR 3	M	31	114,46	112,06	1,25	2,38	ND	ND
PR 4	F	28	141,22	149,25	0,45	0,24	ND	ND
PR 5	F	36	62,91	57,49	0,22	0,13	ND	ND
PR 6	M	46	74,19	94,89	0,77	5,56	ND	ND
PR 7	M	26	48,46	54,01	0,39	3,69	ND	ND
PR 8	M	37	*	154,47	1,10	4,53	ND	ND
PR 9	M	29	*	64,91	0,42	5,55	ND	ND
PR 10	F	30	40,02	91,84	0,82	0,16	ND	ND
PR 11	M	27	155,77	156,63	0,71	4,17	ND	ND
PR 12	M	49	100,08	11,77	0,18	2,70	ND	ND
PR 13	M	41	56,03	36,84	0,28	3,87	ND	ND
PR 14	M	29	115,64	62,01	0,35	2,21	ND	ND
PR 15	F	45	124,77	173,82	0,04	0,01	ND	ND
PR 16	M	31	28,55	46,13	0,36	5,19	ND	ND
PR 17	M	22	90,86	80,46	0,47	6,30	ND	ND
PR 18	F	23	156,65	276,21	0,28	0,13	ND	ND
PR 19	M	26	40,55	68,58	0,42	5,79	ND	ND
PR 20	M	44	124,83	120,43	0,75	4,33	ND	ND
PR 21	F	28	110,48	120,05	1,76	0,51	2,87	ND

**APÊNDICE H – RESULTADO DAS AMOSTRAS DOS PACIENTES DO HOSPITAL (PLASMA BASAL E APÓS DEXAMETASONA;
URINA BASAL E APÓS DEXAMETASONA)**

Concentração das amostras de plasma (ng/mL)																
Número	Classificação	Idade	Sexo	Cortisol	A4	T	Prog	Antes da Dexametasona								
								Andro	Etio	5alfa	5beta	DHEA	Epi	DHT	Estrona	Estradiol
1	HAP	60	F	82,94	0,26	0,08	ND	4,33	5,29	0,86	0,83	0,81	0,07	ND	0,07	0,02
2	Controle	79	M	99,83	0,41	1,77	ND									
3	HAP	85	M	77,58	0,22	0,34	ND	3,18	3,76	1,03	0,93	0,37	0,08	ND	0,052	0,02
4	Controle	38	F	69,18	0,58	0,12	7,67	2,96	2,82	0,43	0,86	1,35	0,11	ND	0,15	0,14
5	IANF	52	F	54,03	0,24	0,14	ND	5,67	4,35	0,58	0,52	1,10	0,13	ND	0,16	0,15
6	HAP	74	F													
7	MACS	68	F	54,80	0,23	0,09	ND									
8	IANF	73	F	48,38	0,47	0,10	ND	4,42	6,18	0,72	0,92	1,37	0,09	ND	0,06	0,02
9	IANF	45	F	89,28	0,74	0,55	ND	34,17	34,34	2,58	0,99	4,19	0,37	ND	0,07	0,04
10	SC	43	M	129,47	ND	ND	ND	5,35	3,26	1,37	2,11	3,29	0,23	ND	0,1	ND
11	IANF	44	F	23,89	0,39	0,12	ND	6,31	5,62	1,05	0,46	1,56	0,20	ND	0,04	0,02
12	Controle	40	F	59,52	0,45	0,13	6,77	13,06	27,89	0,88	1,74	2,15	0,20	0,53	0,25	0,21
13	IANF	79	F	52,84	0,36	0,11	ND	5,51	3,26	1,27	1,06	1,48	ND	ND	ND	ND
14	Controle	35	F	165,56	0,68	0,14	ND									
15	HAP	63	F	35,67	ND	2,17	ND	8,48	5,62	2,29	1,93	0,91	0,26	ND	0,13	0,05
16	IANF	71	M	85,64	0,30	1,83	ND	8,17	6,01	1,91	1,70	1,67	0,22	ND	0,07	0,04
17	IANF	65	M	82,55	0,46	7,06	ND	9,59	9,37	2,70	5,45	1,22	0,35	1,25	0,07	0,05
18	Controle	71	F	27,22	0,16	0,1	ND	13,57	15,90	1,09	1,69	0,97	ND	ND	ND	ND
19	IANF	62	M	75,38	0,48	2,83	ND	25,31	22,93	4,05	5,36	6,29	11,17	ND	ND	ND
20	MACS	61	M	89,31	0,6	6,12	ND	19,44	16,83	2,36	4,35	2,67	0,26	0,86	0,08	0,05
21	MACS	62	F	102,04	0,43	0,15	ND	8,79	17,67	0,94	1,72	3,86	0,44	ND	ND	ND
22	Controle	61	F	63,50	0,14	0,31	ND	3,21	3,57	0,77	0,35	1,26	ND	ND	ND	ND
23	MACS	67	F	69,39	0,14	0,1	ND									
24	MACS	59	F	80,29	0,52	0,12	ND	4,33	8,40	0,57	0,52	2,67	ND	ND	ND	ND

25	MACS	73	M	85,64	0,75	4,50	ND	4,10	18,18	0,74	4,29	1,71	0,21	ND	0,10	0,05
26	Controle	51	F	103,64	0,44	0,17	ND	8,31	12,88	0,34	0,75	14,26	0,23	ND	ND	ND
27	IANF	59	M	48,16	0,35	0,10	ND	7,85	7,95	0,68	0,49	2,22	ND	ND	ND	ND
28	IANF	57	M	46,73	0,36	2,81	ND									
29	HAP	70	F	133,96	0,27	0,89	ND	10,42	7,58	1,15	1,68	0,81	ND	ND	ND	ND
30	IANF	67	F	74,77	0,36	0,14	ND	2,23	7,21	0,46	1,14	1,68	ND	ND	ND	ND
31	HAP	54	M	83,43	0,69	6,02	ND	130,06	69,04	7,05	12,39	4,56	0,38	ND	0,97	0,44
32	MACS	35	M	88,34	0,54	3,48	ND									
33	Controle	56	M	34,56	0,89	8,73	ND									
34	HAP	57	F	145,26	0,81	0,25	ND	7,21	11,18	0,96	1,69	5,73	ND	ND	ND	ND
35	SC	33	F	229,73	2,71	0,25	ND	7,08	17,83	1,08	1,41	5,73	0,25	ND	0,11	0,04
36	IANF		F	43,29	0,42	0,23	ND	4,09	1,40	0,86	0,47	0,46	ND	ND	ND	ND
37	IANF	52	M	96,23	0,76	2,09	ND	16,00	12,32	3,03	9,58	4,43	0,2	ND	0,12	ND
38	IANF	69	M	40,06	0,24	2,86	ND									
39	HAP	62	F	64,79	0,22	0,07	ND	29,91	10,27	2,31	3,73	1,60	ND	0,85	ND	ND
40	IANF	63		52,97	0,39	0,11	ND									
41	HAP	60	F	71,15	0,31	0,13	ND	1,24	2,81	0,63	0,45	0,74	ND	0,84	ND	ND
42	HAP	55	M	112,38	0,70	5,06	ND	12,13	17,50	2,59	4,01	2,16	0,36	0,71	0,09	ND
43	Controle	63	F	6,14	0,09	0,03	ND									
44	HAP	54	M	50,42	0,68	4,80	ND	3,34	46,46	0,68	7,89	2,12	0,52	0,72	0,17	0,06
45	Controle	32	M	91,10	0,98	4,77	ND									
46	IANF	54	M	65,83	0,49	2,96	ND	22,68	9,28	8,43	9,15	1,24	0,15	0,96	0,13	0,06
47	IANF	68	M	96,84	1,49	3,40	ND	66,06	89,34	4,36	12,39	0,54	0,88	1,67	0,13	0,09
48	IANF	64	M	41,76	0,44	3,31	ND	0,73	13,82	0,43	4,00	0,58	0,11	ND	0,06	ND
49	MACS	80	M	55,46	0,25	3,09	ND									
50	Controle	62	F	83,43	0,32	0,17	ND	5,10	4,43	0,55	1,57	0,57	0,07	ND	0,04	ND
51	IANF	40	F	42,96	0,86	0,25	9,45	7,81	9,50	0,93	2,64	3,31	ND	0,26	0,12	0,11
52	IANF	65	F	44,41	0,16	0,17	ND	1,98	3,06	0,48	1,43	0,43	0,06	ND	0,05	0,02
53	MACS	59	M	57,77	0,19	0,07	ND	1,69	1,94	0,23	1,34	0,54	ND	ND	ND	ND

83	IANF	77	M	77,19	0,40	4,45	ND	13,80	15,22	1,26	2,59	0,66	0,19	0,46	0,1	ND
84	IANF	56	M	98,24	0,72	3,58	ND	18,19	9,19	3,44	2,91	2,39	0,27	0,61	0,14	ND
85	Controle	67	F	63,85	0,20	0,13	ND	10,51	6,52	1,08	1,51	1,33	0,10	ND	ND	ND
86	HAP	24	M	46,37	0,58	6,92	ND	40,17	17,66	3,89	5,79	2,95	0,36	0,95	0,06	0,05
87	IANF	64	F	46,32	0,14	0,06	ND	1,61	1,83	ND	ND	0,32	ND	ND	ND	ND
88	SC	31	F	130,73	0,55	0,14	ND	4,11	11,11	0,44	1,02	0,66	0,07	0,80	0,15	ND
89	MACS	60	F	93,04	0,16	0,06	ND	2,04	4,66	ND	0,36	0,39	ND	ND	ND	ND
90	MACS	66	F	119,19	0,50	0,18	ND	6,01	10,35	0,61	2,24	1,91	0,07	ND	0,07	ND
91	MACS	59	F	121,97	0,59	0,62	ND	4,80	6,57	0,51	1,23	1,49	0,16	ND	0,07	ND
92	IANF	55	M	103,58	3,16	4,08	ND									
93	SC	67	M	602,54	0,27	2,77		17,68	32,70	3,24	11,54	0,08	0,53	0,56	0,19	0,31
94	Controle	44	M													
95	Controle	41	M	55,85	0,33	4,56	ND	43,64	20,10	2,55	0,95	3,22	0,38	0,61	0,06	0,05
96	MACS	46	F	66,24	0,26	0,07	0,21	3,28	4,79	0,47	0,66	1,22	0,08	ND	ND	ND
97	HAP	63	F	58,68	0,4	0,23	0,20	3,45	9,24	0,60	4,58	1,01	0,06	ND	0,07	ND
98	HAP	42	F	87,19	0,64	0,05	1,74									
99	Controle	56	F	22,45	0,23	0,21	ND	4,32	3,87	0,55	0,61	0,93	0,12	ND	0,06	0,06
100	Controle	42	F	44,21	0,79	0,05	ND									
101	IANF	48	F	47,39	0,16	0,05	ND	9,81	8,41	0,90	1,42	1,79	0,11	ND	0,04	ND
102	MACS	58	F	102,28	0,55	0,23	ND	6,33	6,43	0,85	0,71	2,81	0,10	0,79	0,06	0,02
103	IANF	69	F	82,65	0,12	0,04	ND	2,49	3,14	0,61	1,05	0,46	ND	0,79	0,06	ND
104	MACS	48	F	70,30	0,58	0,17	0,20									
105	MACS	64	F	20,18	0,06	0,01	ND	0,96	1,11	0,13	0,27	ND	ND	0,64	ND	ND
106	IANF	66	M	73,11	0,41	3,64	ND	21,51	8,81	3,10	5,76	0,79	0,29	0,97	0,19	0,04
107	IANF	48	M	82,39	0,94	6,88	ND	10,93	13,54	3,21	3,36	2,78	0,40	0,65	0,13	0,07

Amostras de plasma																	
Sigla Paciente	Número	Paciente			Cortisol	A4	T	Prog	Andro	Após a Dexametasona							
										Etio	5alfa	5beta	DHEA	Epi	DHT	Estrona	Estradiol
AAO	1	HAP	60	F	8,60	0,14	0,08	ND	2,24	2,67	0,75	0,58	0,49	0,08	ND	0,08	ND
AS	2	Controle	79	M	5,65	0,20	1,77	ND	1,11	8,13	0,62	2,59	0,29	ND	ND	0,09	0,05
ASL	3	HAP	85	M	14,63	0,14	0,34	ND	2,24	2,69	0,92	0,77	0,32	0,13	ND	0,05	ND
ABM	4	Controle	38	F	9,02	0,37	0,10	ND	2,55	2,75	0,90	0,69	0,79	0,14	ND	0,11	0,12
ACPSA	5	IANF	52	F	6,55	0,17	0,09	ND	3,73	3,35	0,68	0,53	1,14	0,05	ND	0,07	ND
AEJM	6	HAP	74	F	7,64	0,15	0,27	ND	2,00	4,12	0,95	1,46	1,02	ND	ND	0,04	ND
ALSG	7	SABC	68	F	24,07	0,21	0,08	ND									
AMNF	8	IANF	73	F	14,88	0,16	0,04	ND	3,49	4,57	0,64	0,94	1,55	0,09	ND	0,05	ND
APCS	9	IANF	45	F	5,21	0,30	0,46	ND	21,97	6,45	2,13	0,64	1,29	0,11	ND	0,07	ND
ARD	10	SC	43	M	167,83	2,57	0,67	ND									
AAG	11	IANF	44	F	4,63	0,16	0,09	ND	3,21	2,85	0,66	0,24	1,18	0,05	ND	0,04	ND
AMFJ	12	Controle	40	F	72,33	0,41	0,11	2,83	16,89	38,34	1,20	3,44	1,55	0,08	ND	0,38	0,16
AML	14	Controle	35	F	5,26	0,18	0,07	ND									
AACP	15	HAP	63	F	9,45	0,72	2,32	ND	7,74	5,10	2,20	1,71	1,07	0,19	0,38	0,11	0,05
AGS	16	IANF	71	M	8,65	0,16	2,37	ND	8,95	7,22	2,77	2,86	0,78	0,13	ND	0,08	ND
ASM	17	IANF	65	M	35,74	0,41	6,81	ND	8,93	8,08	3,98	9,49	1,12	0,15	1,19	0,08	0,06
CLSR	21	SABC	62	F	25,60	0,26	0,17	ND									
CDS	22	Controle	61	F	4,46	0,08	0,14	ND	1,74	2,04	0,52	0,27	0,31	0,11	ND	ND	ND
CCFR	24	SABC	59	F	27,47	0,21	0,09	ND	3,90	7,47	0,93	0,67	0,43	ND	ND	ND	ND
DVC	25	SABC	73	M	41,32	0,46	3,19	ND									
EM	26	Controle	51	F	4,80	0,13	0,10	ND	4,89	8,34	0,83	0,85	1,81	ND	ND	ND	ND
ELN	27	IANF	59	M	7,33	0,13	0,08	ND	4,76	5,03	0,75	0,43	0,48	ND	ND	ND	ND

EBS	28	IANF	57	M	9,38	0,90	3,26	ND	18,39	15,30	4,10	5,17	0,70	ND	ND	0,15	0,08
EAV	29	HAP	70	F	24,10	0,12	0,23	ND									
ESC	30	IANF	67	F	15,21	0,13	0,08	ND	1,17	2,98	0,86	0,39	0,28	ND	ND	ND	ND
FGL	31	HAP	54	M	8,24	0,37	4,95	ND									
GLPB	33	Controle	56	M	3,01	0,29	4,55	ND	18,70	5,05	10,46	5,42	0,70	ND	ND	0,09	0,06
GCC	34	HAP	57	F	7,44	0,15	0,06	ND									
HSH	35	SC	33	F	143,04	1,34	0,24	ND	7,65	17,18	1,08	1,41	3,10	ND	ND	0,26	ND
HO	38	IANF	69	M	6,73	0,16	2,84	ND	1,36	6,81	0,47	2,37	0,22	ND	ND	0,05	ND
ITM	39	HAP	62	F	98,12	0,20	0,20	ND	2,41	2,66	0,63	0,64	0,52	ND	ND	ND	ND
IN	40	IANF	63		14,51	0,22	0,07	ND	5,86	4,83	0,51	1,93	0,85	ND	0,88	ND	ND
IMVM	41	HAP	60	F	24,65	0,10	0,17	ND	1,24	1,77	0,49	0,50	0,43	ND	0,94	ND	ND
IJS	42	HAP	55	M	8,36	0,27	4,08	ND	9,92	12,78	2,59	4,31	1,25	ND	0,54	0,08	ND
IPS	43	Controle	63	F	6,22	0,07	0,03	ND									
JC	44	HAP	54	M	6,55	0,56	5,05	ND	2,67	36,22	0,66	7,32	1,45	0,10	0,78	0,19	0,07
JTM	45	Controle	32	M	144,31	1,44	4,70	ND	28,30	31,56	2,91	5,60	5,04	0,09	0,52	ND	0,05
JDR	46	IANF	54	M	4,97	0,24	4,69	ND	19,51	8,78	8,47	7,56	0,90	0,05	0,91	0,11	0,06
JFM	47	IANF	68	M	58,68	2,24	4,10	ND	60,43	132,82	2,88	13,28	0,81	0,06	0,42	0,09	ND
JPF	48	IANF	64	M	5,86	0,37	4,24	ND	0,78	13,82	0,51	3,88	0,44	ND	ND	0,07	ND
JCPG	51	IANF	40	F	6,65	0,35	0,18	8,22	2,76	9,50	0,75	2,01	0,77	0,18	0,19	0,08	0,07
JRP	52	IANF	65	F	12,44	0,12	0,15	ND	1,53	3,06	0,48	1,30	0,33	ND	ND	0,03	ND
JBA	53	SABC	59	M	13,63	0,10	0,06	ND	1,20	1,94	0,27	0,97	0,32	ND	ND	N/F	ND
KVS	54	SABC	57	F	14,02	0,14	0,16	ND	1,96	9,17	0,91	1,58	0,16	ND	ND	N/F	ND
KMS	55	IANF	51	F	6,41	0,52	0,07	0,32	7,07	9,61	1,36	2,88	0,77	ND	ND	0,39	0,32
LACS	56	SC	41	F	214,65	1,66	0,21	1,54	2,82	10,59	0,40	1,08	0,61	0,02	ND	0,27	0,18
LVN	57	Controle	43	M	8,26	0,25	3,25	ND	11,01	4,92	3,52	1,57	1,15	ND	ND	0,06	ND
LSS	59	IANF	61	F	35,74	0,27	0,15	ND	3,20	3,19	0,69	2,23	1,22	ND	ND	ND	ND
LCS	60	IANF	56	F	9,38	0,07	0,09	ND	1,18	1,25	0,60	0,79	0,09	ND	ND	ND	ND
MAL	61	IANF	38	F	5,34	0,98	0,54	ND	16,15	10,55	2,79	8,18	1,28	0,05	0,27	0,46	0,28

MMCS	63	SABC	64	F	22,78	0,19	0,31	ND	4,53	3,39	0,60	0,36	0,53	ND	ND	ND	ND
MAS	64	IANF	67	F	7,40	0,12	0,10	ND	9,03	7,42	0,86	2,54	1,14	ND	0,87	0,13	0,08
MASP	66	IANF	33	F	5,43	0,46	0,15	ND									
MCAB	67	IANF	54	F	11,55	0,43	0,34	ND									
MCCOS	68	HAP	49	F	13,35	0,41	0,35	ND	45,50	32,94	2,47	3,90	0,78	ND	0,95	0,93	0,38
MCSMM	69	SABC	64	F				ND	21,72	11,44	1,19	1,10	0,59	ND	0,89	0,06	ND
MCFM	70	HAP	57	F	29,07	0,20	0,08	ND	5,52	4,22	0,59	0,40	0,46	ND	0,90	ND	ND
MAS	72	IANF	70	F	47,91	0,19	0,08	ND	2,45	4,99	0,76	1,00	0,45	ND	0,84	ND	ND
MFD	74	SABC	56	F	20,24	0,34	0,19	ND	5,30	3,34	0,79	0,30	1,60	ND	ND	ND	ND
MDM	76	IANF	63	F	13,17	0,12	0,11	ND	3,72	3,44	0,93	0,42	0,27	ND	0,81	ND	ND
MEAB	77	IANF	53	F	6,26	0,24	0,15	ND	15,40	8,15	1,43	0,73	2,43	ND	0,74	0,08	ND
MLM	78	SABC	80	F	28,39	0,16	0,17	ND	2,31	3,86	ND	0,72	0,46	ND	0,88	ND	ND
MTS	79	HAP	61	F	143,10	0,70	0,09	ND	1,56	2,26	ND	0,45	0,83	ND	0,88	ND	ND
MVSS	80	IANF	53	F	6,16	0,33	0,14	ND	2,40	3,87	ND	0,50	0,52	ND	N/F	ND	ND
MCTV	81	Controle	31	F	18,50	0,26	0,13	ND	4,14	4,85	ND	1,45	1,31	ND	N/F	ND	ND
MSV	82	IANF	64	F	60,02	0,34	0,14	ND									
MJS	85	Controle	67	F	4,86	0,11	0,13	ND	4,78	2,61	0,73	0,58	0,58	ND	ND	ND	ND
MSB	86	HAP	24	M	5,83	0,39	6,83	ND	39,26	18,42	4,71	7,66	1,71	0,03	0,96	0,08	0,07
MSP	87	IANF	64	F	8,29	0,11	0,05	ND	1,79	2,55	ND	ND	0,37	ND	ND	ND	ND
NMS	88	SC	31	F	132,02	0,56	0,08	ND	3,16	6,85	0,53	0,79	0,53	ND	ND	0,14	ND
NSPD	89	SABC	60	F	20,68	0,06	0,03	ND	1,49	3,11	ND	ND	0,24	ND	0,82	ND	ND
OCMC	90	SABC	66	F	41,21	0,22	0,11	ND									
OBS	91	SABC	59	F	6,39	0,27	0,64	ND	2,68	3,55	0,74	0,64	0,56	0,09	ND	0,07	ND
OCF	92	IANF	55	M	11,85	0,30	2,91	ND									
RFP	94	Controle	44	M				ND	22,07	18,23	8,12	7,36	1,23	ND	ND	0,14	0,05
RG	95	Controle	41	M	3,76	0,53	5,31	ND	30,66	19,23	2,60	1,09	1,83	ND	0,62	0,08	0,06
RSS	96	SABC	46	F	24,65	0,23	0,08	ND	2,46	3,72	0,33	0,58	0,73	ND	ND	ND	ND
RS	98	HAP	42	F	6,72	0,16	0,11	ND	5,05	4,29	0,51	1,22	0,72	0,03	ND	0,13	0,12

RSM	99	Controle	56	F	4,91	0,23	0,07	ND									
SCMM	100	Controle	42	F	1,65	0,39	0,08	ND									
SLA	101	IANF	48	F	6,97	0,14	0,05	ND	5,56	4,16	0,53	1,02	1,34	ND	0,79	3,05	0,49
TCAM	104	SABC	48	F	21,16	0,59	0,33	ND	11,20	8,16	1,76	1,96	2,20	0,03	0,63	0,08	ND
VLOS	105	SABC	64	F	13,40	0,03	N/F	ND									
VFS	106	IANF	66	M	5,79	0,26	4,51	ND									
WLC	107	IANF	48	M				ND	9,46	14,57	2,76	6,14	3,28	ND	0,84	0,20	0,09

ANEXO - RESULTADOS DO PLASMA DA POPULAÇÃO DE REFERÊNCIA – CROMATOGRAFIA GASOSA (RETIRADO DE FONTES, 2023).

Voluntário	Sexo	Idade	Concentração (ng.mL ⁻¹)										
			androsterona	etiocolanolona	5α-diol	5β-diol	DHEA	epitestosterona	DHT	estrone	androstenediona	testosterona	estradiol
PR01	M	30	37,382	28,624	7,263	22,132	5,174	0,337	0,561	0,082	0,873	3,963	0,0327
PR02	M	25	36,039	9,881	9,224	6,659	4,915	0,460	0,850	0,031	0,611	6,379	0,0225
PR03	M	31	13,222	7,642	3,877	4,499	3,618	0,209	0,258	0,131	1,416	2,558	0,0369
PR04	F	28	5,081	5,461	0,040	1,290	2,174	0,010	0,040	0,0402	0,759	0,275	0,0606
PR05	F	36	11,841	9,266	1,227	1,693	2,582	0,117	0,040	5,3618	0,332	0,176	0,9766
PR06	M	46	27,662	11,548	10,750	13,198	4,091	0,292	0,918	0,136	0,912	5,568	0,0650
PR07	M	26	15,805	8,665	4,679	4,209	4,991	0,389	0,329	0,004	0,558	3,949	0,0040
PR08	M	37	41,850	19,577	10,773	8,942	6,861	0,385	0,546	0,140	1,495	4,903	0,0559
PR09	M	29	30,638	18,482	6,209	8,673	3,110	0,467	0,592	0,114	0,565	5,905	0,0322
PR10	F	30	18,721	11,830	6,531	1,722	7,752	0,258	0,276	0,3532	1,202	0,267	0,2575
PR11	M	27	54,484	23,465	12,098	28,275	8,195	0,253	0,894	0,100	0,982	4,596	0,0409
PR12	M	49	7,438	5,849	1,658	2,916	0,535	0,064	0,269	0,054	0,274	3,234	0,0216
PR13	M	41	18,000	5,333	5,332	4,229	1,606	0,192	0,675	0,004	0,418	4,097	0,0040
PR14	M	29	20,317	11,540	4,803	4,243	2,669	0,205	0,345	0,107	0,477	2,385	0,0326
PR15	F	45	0,433	0,856	0,868	1,644	0,104	0,010	0,040	0,0040	0,110	0,020	0,0040
PR16	M	31	30,337	5,465	3,607	1,397	2,249	0,304	0,731	0,049	0,542	5,618	0,0220
PR17	M	22	82,528	27,892	9,514	7,205	3,292	0,260	0,871	0,180	0,636	6,407	0,0851
PR18	F	23	4,519	2,384	0,552	1,651	1,315	0,010	0,040	0,0040	0,525	0,138	0,0040
PR19	M	26	65,150	10,270	8,928	5,481	2,888	0,386	0,971	0,059	0,513	5,875	0,0254
PR20	M	44	15,176	8,027	2,642	1,389	2,881	0,109	0,512	0,060	0,875	4,074	0,0291
PR21	F	28	28,989	14,564	1,473	2,059	6,087	0,252	0,346	0,3874	2,188	0,468	0,1321