



Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu*
Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia de Alimentos
Campus Rio de Janeiro

Felipe Rodrigues Costa Vicente

**VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA QUANTIFICAÇÃO DE METASTERONA EM
SUPLEMENTOS NUTRICIONAIS ADQUIRIDOS NA CIDADE DO RIO DE
JANEIRO**

Rio de Janeiro – RJ

2017

Felipe Rodrigues Costa Vicente

**VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA QUANTIFICAÇÃO DE METASTERONA EM
SUPLEMENTOS NUTRICIONAIS ADQUIRIDOS NA CIDADE DO RIO DE
JANEIRO**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos, no Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia de Alimentos, do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia (IFRJ).

Orientadoras: Prof^a. Dr^a. Renata Santana Lorenzo Raices

Prof^a. Dr^a. Monica Costa Padilha

RIO DE JANEIRO – RJ

2017

Felipe Rodrigues Costa Vicente

**VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA QUANTIFICAÇÃO DE METASTERONA EM
SUPLEMENTOS NUTRICIONAIS ADQUIRIDOS NA CIDADE DO RIO DE
JANEIRO**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos, no Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia de Alimentos, do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia (IFRJ).

Data de aprovação: 22/06/2017

Prof^ª. Dr^ª. Renata Santana Lorenzo Raices (Orientadora)
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro

Prof^ª. Dr^ª. Monica Costa Padilha
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof^ª. Dr^ª. Simone Lorena Quitério
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro

Prof^ª. Dr^ª. Simone Maria Ribas Vendramel
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro – RJ

2017

*Aos meus queridos avós: Dina e José Nunes
(in memoriam).*

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida e por me abençoar a cada dia. Por ter me concedido força e coragem para a conclusão de mais uma etapa em minha vida, muito obrigado Senhor!

Aos meus pais, Francisco e Creusa, pela dedicação, incentivo e amor.

Aos meus avós, Dina e José, pelo incentivo, amor e total dedicação desde o dia em que nasci até os últimos dias em que estiveram comigo nesta vida. Muito obrigado!

A minha esposa Ana Paula Vicente, companheira, amorosa, dedicada, amiga e grande incentivadora. Ao meu filho Miguel, pelo amor, amizade e carinho.

Aos meus irmãos, Anderson e Gefferson, minhas cunhadas Monique e Helen e aos meus queridos sobrinhos e sobrinhas pelo apoio.

A minha orientadora Prof^ª. Dra. Renata Raices pela energia positiva, otimismo, paciência e dedicação.

A minha co-orientadora Prof^ª. Dra. Monica Padilha, pela oportunidade, apoio e confiança. Obrigado por disponibilizar toda a estrutura do LBCD para a realização deste trabalho.

A prof^ª. Dra. Márcia Nogueira de la Cruz pelas correções, sugestões, apoio e amizade. A todos os colegas do Laboratório de Resíduos (LAB RES) do LADETEC.

Aos professores do IFRJ, Simone Alves, Clenilson Sousa, Florinda Cersósimo, Regina Fukuda e Istoni Santana.

A todos os professores do Programa de Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia de Alimentos do IFRJ pelos conhecimentos transmitidos, em especial ao Dr. Adriano Cruz e Dra. Marcia Cristina. Aos colegas da turma PCTA 2015 pelo adorável convívio.

Ao amigo e técnico do laboratório de análise instrumental do IFRJ, Jeremias Moraes, “valeu chefe”!

Ao LADETEC/LBCD pelo apoio e estrutura para a realização deste trabalho.

Aos amigos da “Triagem 4”, Rafael Rodrigues, Leonardo dos Santos e Giohanna Quitían pelo agradável convívio e por terem contribuído para o desenvolvimento do meu trabalho. As técnicas da “Triagem 4”, Natasha e Mariana, pelo incentivo.

Aos analistas da “Triagem 4”, Mestres Luis Felipe Jooris, Juliana Barrabin e Lucas Martins pelo auxílio na utilização do CG-EM/EM e pelas inúmeras dicas. De modo especial ao Dr. Gustavo Cavalcanti e o Mestre Márcio Vinícius, pela paciência, disponibilidade e comprometimento para que eu pudesse desenvolver o meu trabalho com qualidade.

*“Pense, ninguém pode se dar o que só você tem
Ninguém vai te dizer pra onde vai ou de onde vem
A estrada é pra caminhar”.* (Vander Lee)

VICENTE, F. R. C. *Validação de método para quantificação de metasterona em suplementos nutricionais adquiridos na cidade do Rio de Janeiro*. 108 p. Dissertação apresentada como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos, no Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia de Alimentos, do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia (IFRJ), Campus Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 2017.

RESUMO

Os produtos comercializados como suplementos, tais como: proteínas, carboidratos, lipídios, vitaminas e aminoácidos, devem ser utilizados para suprir nutrientes em indivíduos com carência alimentar. Os suplementos também podem ser utilizados para repor perdas nutricionais devido à intensa atividade física realizada por atletas de alto desempenho ou praticantes de determinado esporte. A indicação do suplemento ideal para cada indivíduo deve ser determinada por um médico ou nutricionista, de acordo com a deficiência específica. Porém, o consumo de suplementos vem se tornando cada vez mais comum por indivíduos que buscam melhorias estéticas ou atléticas, sem indicação de um profissional e sem relação direta com alguma carência nutricional. Diversas marcas de suplementos são vendidas livremente, principalmente pela *internet*, sem o controle de órgãos fiscalizadores sobre o conteúdo apresentado no rótulo ou sobre a presença de substâncias proibidas no meio esportivo. Algumas substâncias, como anabolizantes, podem aumentar o desempenho físico e a massa do usuário, porém a utilização destas substâncias é proibida pela Agência Mundial Antidopagem (AMA) por causarem prejuízo à saúde de atletas. O objetivo deste trabalho foi identificar e quantificar esteroides anabolizantes em suplementos nutricionais adquiridos em *sites* especializados e no comércio da cidade do Rio de Janeiro. Foram analisadas 10 marcas de suplementos. As amostras foram previamente tratadas e analisadas por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas (CG-EM/EM) seguindo o método de triagem utilizado no controle de dopagem do Laboratório Brasileiro de Controle de Dopagem (LBCD) para a identificação de 162 compostos entre anabolizantes e metabólitos em urina de atletas. A presença do anabolizante metasterona foi identificada em uma das marcas analisadas. A concentração da metasterona quantificada pelo método analítico desenvolvido neste trabalho foi de 1870 ng mL⁻¹. O procedimento foi validado de acordo com o documento orientativo do INMETRO (DOQ CGCRE 008).

Palavras-chave: Suplemento nutricional. Metasterona. Validação. Cromatografia a gás.

VICENTE, F. R. C. *Validação de método para quantificação de metasterona em suplementos nutricionais adquiridos na cidade do Rio de Janeiro*. 108 p. Dissertação apresentada como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos, no Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia de Alimentos, do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia (IFRJ), Campus Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 2017.

ABSTRACT

Products marketed as supplements, such as: proteins, carbohydrates, lipids, vitamins and amino acids, should be used to supply nutrients to individuals with food shortages. Supplements can also be used to restore nutritional losses due to intense physical activity performed by high-performing athletes or a particular sport. The indication of the ideal supplement for each individual should be determined by a physician or nutritionist, according to the specific disability. However, the consumption of supplements has become increasingly common for individuals seeking aesthetic or athletic improvements, without indication of a professional and without direct relation with some nutritional deficiency. Many brands of supplements are sold freely, mainly through the internet, without the control of inspection bodies on the content presented on the label or on the presence of prohibited substances in the sports environment. Some substances, such as anabolic steroids, can increase the user's physical performance and mass, but the use of these substances is prohibited by the World Anti-Doping Agency (WADA) because they cause harm to athletes' health. The objective of this work was to identify and quantify anabolic steroids in nutritional supplements purchased from specialized websites and in the city of Rio de Janeiro. 10 brands of supplements were analyzed. The samples were pretreated and analyzed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS/MS) following a screening method used in the doping control of the Brazilian Laboratory of Doping Control (LBCD) to identify 162 compounds between anabolic and urine metabolites in athletes. The presence of the anabolic methasterone was identified in one of the analyzed brands. The concentration of methasterone quantified by the analytical method developed in this work was 1870 ng mL⁻¹. The procedure was validated according to the INMETRO guideline document (DOQ CGCRE 008).

Keywords: Nutritional supplement. Methasterone. Validation. Gas chromatography.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Estrutura da metasterona	16
Figura 2	Estrutura geral dos esteroides e alguns EAA	22
Figura 3	Modificações na estrutura da testosterona	24
Figura 4	Estrutura do MSTFA	27
Figura 5	Mecanismo de reação do iodeto de trimetilsilila	27
Figura 6	Reação de sililação dos esteroides	28
Figura 7	Diagrama de blocos da CG	34
Figura 8	Esquema de análise por EM	36
Figura 9	Diagrama de blocos do espectrômetro de massas	36
Figura 10	Fluxograma de preparo dos brancos de amostra	48
Figura 11	Fluxograma das etapas do preparo das amostras	52
Figura 12	Cromatogramas do CQA e do “suplemento B”	67
Figura 13	Cromatogramas do CQA e “suplemento B” com PI	67
Figura 14	Espectro de massas da metasterona presente no “suplemento B”	68
Figura 15	Cromatogramas para avaliação da especificidade	69
Figura 16	Cromatograma do BA fortificado com metasterona e metiltestosterona	70
Figura 17	Curva analítica 1 (em solvente)	73
Figura 18	Curva analítica 2 (em matriz)	73
Figura 19	Gráfico de resíduos da curva em matriz	74
Figura 20	Curva analítica 3 (em matriz) para avaliação da precisão intermediária	77
Figura 21	Gráfico de resíduos da curva em matriz	77
Figura 22	Curva analítica 4	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Resumo das técnicas de análise de alguns trabalhos encontrados na Literatura	31
Tabela 2	Condições da análise cromatográfica do método de triagem em urina	49
Tabela 3	Concentrações e volumes utilizados na curva analítica 1	53
Tabela 4	Concentrações e volumes utilizados nas curvas analíticas 2, 3 e 4	54
Tabela 5	Condições cromatográficas do método de quantificação de metasterona em suplemento nutricional	59
Tabela 6	Comparação dos métodos de preparo de urina humana e suplementos	60
Tabela 7	Substâncias avaliadas no método de triagem	61
Tabela 8	Resultado do teste de <i>Grubbs</i> para a curva analítica 1 (solvente)	70
Tabela 9	Resultado do teste de <i>Grubbs</i> para a curva analítica 2 (matriz)	71
Tabela 10	Resultado do teste <i>F</i> para a avaliação do efeito de matriz	71
Tabela 11	Resultado do teste <i>t</i> (<i>Student</i>) para avaliação do efeito de matriz	71
Tabela 12	Resultados do teste de <i>Cochran</i> calculados para curva analítica 1 e 2	72
Tabela 13	Coefficientes angulares das curvas analíticas preparadas em matriz	74
Tabela 14	Desvio padrão do menor nível das três curvas analíticas preparadas em matriz	75
Tabela 15	Resultados do LD e LQ estimados para metasterona (ng mL ⁻¹)	75
Tabela 16	Resultados do estudo de recuperação	76
Tabela 17	Teste de <i>Grubbs</i> para os ensaios de recuperação e repetitividade	76
Tabela 18	Valores da curva analítica 3 preparada em matriz	76
Tabela 19	Resultado do teste de <i>Grubbs</i> da curva analítica 3	78
Tabela 20	Resultado do teste de <i>Grubbs</i> para o estudo de precisão intermediária	78
Tabela 21	Resultado do estudo de precisão intermediária	79
Tabela 22	Resultado da avaliação da robustez	79
Tabela 23	Resultado da curva analítica 4	80
Tabela 24	Teste <i>Grubbs</i> aplicado à curva analítica 4	81

LISTA DE EQUAÇÕES

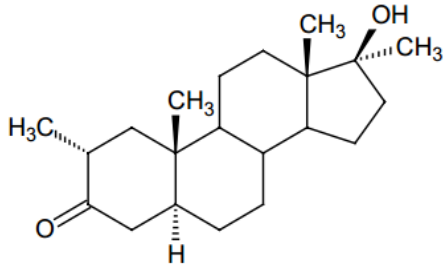
Equação 1	$y = ax + b$	40
Equação 2	$G_{\text{calculado}} = \frac{(x_i - \bar{x})}{s}$	41
Equação 3	$C_{\text{calculado}} = \frac{S^2_{\text{máx.}}}{\sum S^2}$	41
Equação 4	$LD = 3,3 s / b$	42
Equação 5	$LQ = 10 s / b$	42
Equação 6	$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{Valor observado} \times 100}{\text{Valor esperado}}$	43
Equação 7	$F_{\text{calculado}} = \frac{s_{\text{res1}}^2}{s_{\text{res2}}^2}$	55
Equação 8	$t = \frac{b_{11} - b_{12}}{\sqrt{s^2_{b_{11}} + s^2_{b_{12}}}}$	56
Equação 9	$t' = \frac{t_1 s^2 b_{11} + t_2 s^2 b_{12}}{s^2 b_{11} + s^2 b_{12}}$	72

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

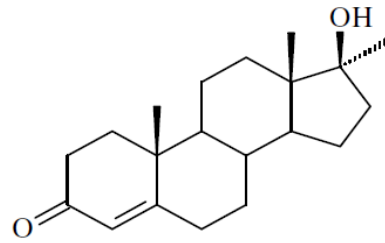
AMA	Agência Mundial Antidopagem
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
BA	Branco de amostra
BR	Branco de reagente
CG	Cromatografia a gás
CG-EM	Cromatografia a gás – Espectrometria de Massas
CG-EM/EM	Cromatografia a gás – Espectrometria de Massas/Massas
CL	Cromatografia líquida
CL-EM	Cromatografia líquida – Espectrometria de Massas
CL-EM/EM	Cromatografia líquida – Espectrometria de Massas/Massas
CG-QqQ	Cromatografia a gás – Triplo quadrupolo
CQA	Controle de qualidade de alta concentração
CQN	Controle de qualidade negativo
CRM	<i>Certified Reference Material</i> (material de referência certificado)
CV	Coefficiente de variação
DOQ-CGCRE	Documento orientativo – Coordenação Geral de Acreditação
DESVPAD	Desvio Padrão
DPR	Desvio Padrão Relativo
EAA	Esteroides anabólicos androgênicos
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> – Administração Federal de Alimentos e Medicamentos
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
ISO	<i>International Standard Organization</i>
LADETEC	Laboratório de Apoio ao Desenvolvimento Tecnológico
LBCD	Laboratório Brasileiro de Controle de Dopagem
LD	Limite de Detecção
LLE	<i>Liquid-liquid Extraction</i>
LQ	Limite de Quantificação
<i>m/z</i>	Massa/carga

MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MRM	Monitoramento de reações múltiplas
MSTFA	N-metil-N-trimetilsililtrifluoracetamida
PI	Padrão interno
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RJ	Rio de Janeiro
SPE	<i>Solid Phase Extraction</i>
TMSI	Iodeto de trimetilsilila
TMS	Trimetilsilil
t _R	Tempo de Retenção

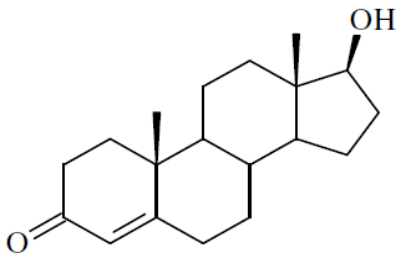
ESTRUTURA DOS COMPOSTOS CITADOS



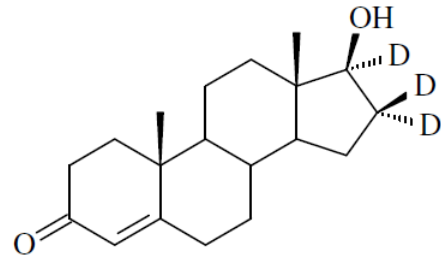
Metasterona



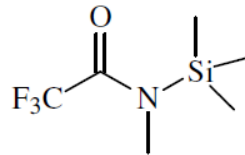
Metiltestosterona



Testosterona



Testosterona-D3



N-metil-N-trimetilsililtrifluoracetamida (MSTFA)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1 SUPLEMENTOS NUTRICIONAIS	18
2.1.1 Agentes ergogênicos	20
2.2 ANABOLIZANTES	21
2.2.1 Esteroides anabolizantes	21
2.2.2 Metasterona	23
2.3 ETAPAS DE PREPARO DA AMOSTRA	25
2.3.1 Preparo de amostras	25
2.3.2 Métodos de extração	25
2.3.3 Derivatização	26
2.4 MÉTODOS DE ANÁLISE DE ESTEROIDES ANABOLIZANTES	28
2.4.1 Metodologias analíticas de determinação de esteroides anabolizantes em diferentes matrizes	28
2.5 CROMATOGRAFIA	32
2.5.1 Cromatografia a gás	32
2.6 ESPECTROMETRIA DE MASSAS	35
2.6.1 Ionização eletrônica	37
2.6.2 Analisador de massas triplo quadrupolo	37
2.6.3 Espectrometria de massas em série (EM/EM)	37
2.6.3.1 Monitoramento de reações múltiplas (MRM)	38
2.7 VALIDAÇÃO DE MÉTODO	38
2.7.1 Especificidade	40
2.7.1.1 Efeito de matriz	40
2.7.2 Linearidade	40
2.7.3 Limite de detecção	42
2.7.4 Limite de quantificação	42
2.7.5 Exatidão	43
2.7.6 Precisão	43
2.7.6.1 Precisão intermediária	43
2.7.6.2 Repetitividade	44
2.7.7 Robustez	44

3 MATERIAIS E MÉTODOS	45
3.1 SOLVENTES E REAGENTES QUÍMICOS	45
3.1.1 Solventes	45
3.1.2 Reagentes químicos	45
3.2 MATERIAIS	46
3.2.1 Equipamentos	46
3.3 PREPARO DAS SOLUÇÕES	46
3.3.1 Solução padrão estoque de metasterona	46
3.3.2 Solução padrão de trabalho de metasterona	46
3.3.3 Solução de padrão interno	47
3.3.4 Solução derivatizante	47
3.3.5 Branco de amostra (BA)	47
3.4 MÉTODO DE ANÁLISE DE AGENTES DOPANTES EM URINA POR CG-EM/EM	48
3.5 PREPARO DAS AMOSTRAS DE SUPLEMENTOS NUTRICIONAIS	51
3.6 PROTOCOLO DE VALIDAÇÃO PARA ANÁLISE QUANTITATIVA	53
3.6.1 Curvas analíticas	53
3.6.2 Especificidade/Efeito matriz	54
3.6.3 Linearidade	56
3.6.4 Limite de detecção e Limite de quantificação	56
3.6.5 Exatidão	56
3.6.6 Robustez	57
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
4.1 ANÁLISE DOS SUPLEMENTOS NUTRICIONAIS	60
4.2 VALIDAÇÃO QUANTITATIVA DO MÉTODO ANALÍTICO	69
4.2.1 Especificidade/Efeito de matriz	69
4.2.2 Linearidade	72
4.2.3 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)	74
4.2.4 Exatidão	75
4.2.5 Robustez	79
4.3 QUANTIFICAÇÃO DA METASTERONA NO SUPLEMENTO	80
5 CONCLUSÃO	83
6 REFERÊNCIAS	84
7 ANEXOS	92

1 INTRODUÇÃO

O uso dos chamados agentes ergogênicos, substâncias ou artifícios que visam melhorar o desempenho físico ou ocupacional e retardar a fadiga física e mental (BIESEK *et al.*, 2015), tem se tornado cada vez mais frequentes entre os praticantes de esportes de alto rendimento e até mesmo nas academias de ginástica e musculação (CARVALHO, 2003; ABBATE *et al.*, 2014). Este fato é preocupante no que diz respeito ao uso indiscriminado de suplementos nutricionais com finalidades estéticas, como também ao combate à dopagem de atletas (BIESEK *et al.*, 2015).

Os suplementos nutricionais são denominados agentes ergogênicos nutricionais e são utilizados por atletas profissionais, amadores, frequentadores de academias de ginástica e de musculação e até mesmo por indivíduos que não praticam atividades físicas com frequência. A maioria das pessoas consome esses produtos por conta própria, sem a consulta de um médico ou nutricionista (MARCHIORO, 2015).

A indústria brasileira de suplementos nutricionais vem crescendo consideravelmente nos últimos sete anos, faturando um montante de aproximadamente 7,44 bilhões de reais. Diversos fatores estão relacionados a este crescimento, tais como: lançamento de novos produtos, inovação na fabricação, qualidade e segurança entre outros (BRASNUTRI, 2016).

Nem sempre os suplementos estão livres de substâncias não desejadas como: metais traço, micro-organismos, espécies botânicas e até mesmo esteroides anabolizantes, que é uma das classes de substâncias proibidas pelas organizações esportivas (VAN POUCKE *et al.*, 2007; HANS *et al.*, 2008; CASTANHO *et al.*, 2014; NEVES e CALDAS, 2015).

Segundo a Agência Mundial Antidopagem (AMA), configura-se *doping* o uso de substâncias proibidas, agentes ou métodos capazes de alterar o desempenho do atleta.

Já existem estudos de laboratórios renomados como o do *Institute of Biochemistry, German Sport University, Cologne, Germany* (Instituto de Bioquímica da Universidade Esportiva em Colônia na Alemanha), que mostrou que alguns suplementos não contêm o que está descrito em seus rótulos, mas eventualmente possuem em sua formulação hormônios como: metasterona, metandienona, estanozolol, androstenodiona, boldenona, oxandrolona, dehidroclorometiltestosterona e etc. Substâncias estimulantes também foram encontradas, tais como: cafeína, efedrina, pseudoefedrina, metilefedrina e sibutramina. Além de uma substância vasodilatadora presente em medicamento destinado à pacientes asmáticos, o

clembuterol. Um fato preocupante é que alguns desses suplementos eram comercializados como vitamínicos e minerais (GEYER *et al.*, 2008).

A presença de esteroides anabolizantes em suplementos nutricionais é preocupante no ponto de vista da saúde dos usuários desses produtos, assim como na ética esportiva, uma vez que o uso de esteroides anabolizantes caracteriza o *doping*.

Existem muitos esteroides que são comercializados livremente em países como nos Estados Unidos da América, na forma de “suplementos nutricionais”. A comercialização de esteroides anabolizantes na forma de “suplementos nutricionais” gera dúvida por parte dos consumidores, uma vez que esses produtos são vendidos como anabolizantes com baixos efeitos colaterais ou até mesmo como “esteroides naturais”. A propaganda desses suplementos na *internet* apresenta produtos que sugerem resultados fantásticos como: a perda de peso, o ganho de massa muscular e baixo efeito colateral.

Entre os esteroides que são vendidos como suplementos nutricionais, comercializados principalmente pela *internet*, a metasterona (Figura 1) é classificada como um esteroide projetado, ou seja, substância sintética, tendo como base a testosterona, que sofre modificações estruturais com o objetivo de alterar a ação nos tecidos alvos (PARR *et al.*, 2006; GEYER *et al.*, 2008).

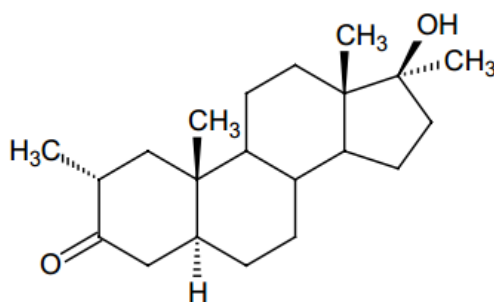


Figura 1. Estrutura da metasterona.

A partir de 2006, assim como outros esteroides, a metasterona passou a fazer parte da lista de substâncias proibidas pela Agência Mundial Antidopagem (AMA) (PADILHA, 2007).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), proíbe o consumo e a comercialização de anabolizantes. O uso dessas substâncias só é permitido com a prescrição e acompanhamento médico.

Este esteroide já foi encontrado em muitos suplementos e a partir do estudo de excreção após sua administração. A determinação de esteroides anabolizantes em suplementos nutricionais por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) é de

grande importância para o controle de qualidade destes produtos. (ABBATE *et al.*, 2014; CASTANHO *et al.*, 2014; GOMEZ *et al.*, 2014; NEVES e CALDAS, 2015).

Uma pesquisa realizada em dezembro de 2015, encomendada pela Associação Brasileira da Indústria de Alimentos para Fins Especiais e Congêneres (ABIAD), Associação Brasileira das Empresas do Setor Fitoterápico, Suplemento Alimentar e de Promoção da Saúde (ABIFISA) e Associação Brasileira das Empresas de Produtos Nutricionais (ABENUTRI), divulgada pela revista VEJA, mostrou que 54% dos brasileiros tomam algum tipo de suplemento, o que chama atenção para o consumo desnecessário e exagerado destas substâncias. Avaliar a qualidade destes produtos é imprescindível para saúde da população consumidora dos ergogênicos nutricionais (VEJA, 2015).

Este estudo tem como objetivo geral identificar e quantificar o esteroide anabolizante metasterona em diferentes suplementos nutricionais adquiridos em *sites* especializados e no comércio da cidade do Rio de Janeiro por cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas em série.

Entre os objetivos específicos deste estudo podemos destacar:

- a) Realizar uma análise qualitativa em diferentes suplementos nutricionais adquiridos na cidade do Rio de Janeiro utilizando um método de detecção de esteroides anabolizantes;
- b) Desenvolver e validar o método de quantificação do anabolizante metasterona identificado no suplemento nutricional seguindo o documento de orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos, DOQ-CGCRE-008, do INMETRO;
- c) Quantificar a metasterona identificada na amostra analisada.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 SUPLEMENTOS NUTRICIONAIS

De acordo com a resolução do Conselho Federal de Nutrição (CFN), nº380/2005, suplementos nutricionais são: “alimentos que servem para complementar, com calorias, e/ou nutrientes a dieta diária de uma pessoa saudável, em casos onde sua ingestão, a partir da alimentação, seja insuficiente, ou quando a dieta requerer suplementação [...]”.

O consumo dos suplementos nutricionais tem aumentado significativamente nos últimos anos e a difusão destes produtos se tornou mundial (CEGLIE *et al.*, 2015). A indústria de suplementos está investindo cada vez mais no desenvolvimento e na fabricação de novos produtos (LIDDLE e CONNOR, 2013), porém, observa-se um aumento lento no controle de qualidade (CEGLIE *et al.*, 2015).

Os suplementos estão presentes na dieta da maioria dos atletas, principalmente nas modalidades que exigem maior condicionamento físico do indivíduo, ou seja, necessidade de aumento da força muscular e agilidade (FAYH *et al.*, 2013). A melhora no desempenho desportivo é o principal motivo para o uso destas substâncias (LIDDLE e CONNOR, 2013).

Com exceção dos atletas, a maioria das pessoas que utiliza suplementos, o faz por conta própria, sem a consulta prévia a um nutricionista ou médico. Segundo pesquisa com 200 indivíduos, 55% dos jovens utilizam suplementos por simplesmente “ouvir falar” que são nutrientes que vão proporcionar ganho de massa muscular. O incentivo ao uso ocorre nas academias, através de conversa entre amigos ou por recomendação dos próprios professores de educação física, profissionais que não estão capacitados para prescrever tais suplementos (DOMINGUES *et al.*, 2007).

No ano de 2016, a indústria brasileira de suplementos nutricionais alcançou um crescimento de 10% em sua produção e um faturamento de aproximadamente R\$ 1,49 bilhão de reais (BRASNUTRI, 2016). O crescimento da indústria nacional pode ser relacionado a diversos fatores, tais como:

- Inovação na fabricação e lançamento de novos produtos, atendendo a vários perfis de consumidores;
- Preocupação das empresas em oferecer produtos com total qualidade e segurança nutricional ao consumidor;
- O aumento do número de academias de ginástica nos últimos anos;

- A mudança de hábito dos consumidores.

Os principais canais de distribuição dos suplementos nutricionais produzidos no Brasil são: lojas especializadas ou *body shops*; *e-commerce* (lojas virtuais); farmácias e drogarias; lojas de produtos naturais (BRASNUTRI, 2016).

Como os suplementos são considerados alimento, a comercialização destes se dá de forma livre, facilitando assim o acesso por parte da população em geral (FAYH *et al.*, 2013).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) dispõe de uma resolução (RDC nº 18 de 27 de abril de 2010) que trata dos alimentos destinados aos atletas. Esta resolução tem como objetivo classificar e designar os requisitos de composição e rotulagem destes alimentos. Essa classe de alimento visa atender às necessidades nutricionais de cada atleta, auxiliando no desempenho físico. Cabe ainda ressaltar que esta resolução não contempla: estimulantes, hormônios ou outras substâncias classificadas como proibidas pela Agência Mundial Antidopagem (AMA) e substâncias com finalidade terapêutica, como os fitoterápicos, mesmo que estejam associados a nutrientes (BRASIL, 2010a).

Dentre os requisitos gerais, além de atender à resolução, os alimentos para atletas devem atender às normas pertinentes a: aditivos alimentares, contaminantes, características macroscópicas, microscópicas e microbiológicas, rotulagem geral, rotulagem nutricional, embalagens e equipamentos, informação nutricional complementar, quando houver (BRASIL, 2010a).

Todos os ingredientes utilizados na produção dos suplementos devem ser seguros para o consumo humano. Quando houver a necessidade de adicionar ingredientes que não são utilizados tradicionalmente na indústria de alimentos, deve-se obter a autorização mediante a comprovação da segurança de uso em atendimento às normas regulatórias (BRASIL, 2010a).

As informações contidas no rótulo devem ser claras e não podem induzir o consumidor ao engano. Informações como: “Colorido artificialmente”; “Contem aromatizante...”; “Aromatizado artificialmente”; “Sabor de...”; “Sabor imitação ou artificial de...”, devem estar presentes no painel principal. Além dessas informações, nos rótulos não podem constar indicação terapêutica ou medicamentosa; efeitos como: perda de peso, ganho ou definição de massa muscular; referências a hormônios ou outras substâncias farmacológicas e ou do metabolismo e tão pouco expressões do tipo: “anabólico”, “anticatabólico”, “aumento da capacidade sexual”, “*fat burners*” (“queimadores de gordura”, substâncias que aceleram o metabolismo de gordura, promovendo o emagrecimento), “anabolizantes” e “hipertrofia muscular” (BRASIL, 2010a).

É importante destacar que no rótulo deve conter a seguinte informação: “Este produto não substitui uma alimentação equilibrada e seu consumo deve ser orientado por nutricionista ou médico” (BRASIL, 2010a).

Há ainda informações obrigatórias que devem constar no painel de identificação do produto como: lista de ingredientes, identificação da origem, dados do importador (quando o produto for importado), número do lote, data de validade e instruções sobre o uso (quando necessário) (BRASIL, 1969 e BRASIL, 2002).

Os suplementos nutricionais são um dos tipos de agentes ergogênicos que serão detalhados a seguir.

2.1.1 Agentes ergogênicos

O termo ergogênico é derivado de duas palavras gregas: “*ergon*”, que significa trabalho e “*gennan*” produção (SANTOS, 2002). Os agentes ergogênicos abrangem mecanismos de efeito fisiológico, nutricional ou farmacológico que tenha como objetivo melhorar o desempenho do indivíduo nas atividades físicas a que se propõe (BARROS NETO, 2001; BIESEK *et al.*, 2015).

Os agentes ergogênicos fisiológicos compreendem todo mecanismo ou adaptação fisiológica que seja capaz de melhorar o desempenho físico do indivíduo. O treinamento físico em uma área de grande altitude é um exemplo de agente ergogênico fisiológico. Nestas condições, há um aumento na produção dos glóbulos vermelhos, promovendo assim o aumento na capacidade de transportar o oxigênio pelo sangue. Quando o indivíduo retorna às baixas altitudes, há uma melhora no desempenho físico aeróbio enquanto o transporte de oxigênio no sangue estiver aumentado (BARROS NETO, 2001).

Os suplementos nutricionais são considerados ergogênicos nutricionais quando as substâncias contidas nos mesmos melhoram o rendimento desportivo de um indivíduo (metabolismo energético), ou seja, os suplementos ergogênicos podem intensificar o desempenho físico de um indivíduo saudável e eliminar as sensações de fadiga e cansaço físico e mental, além de aumentar a massa muscular. Os resultados variam de acordo com o grau de consumo do suplemento, intensidade e periodicidade dos exercícios além da alimentação adequada, já que a deficiência de nutrientes como: carboidratos, gorduras, proteínas, vitaminas, minerais e água podem prejudicar o desempenho físico (LINHARES e LIMA, 2006; BIESEK *et al.*, 2015). Alguns agentes ergogênicos nutricionais proporcionam o

aumento do tecido muscular, fornecem energia para o músculo durante as atividades físicas e potencializam os processos metabólicos de geração de energia (BIESEK *et al.*, 2015). Os ergogênicos nutricionais podem ser: carboidratos, proteínas, vitaminas, cafeína, creatina, aminoácidos, ácidos graxos específicos e etc. Geralmente são comercializados na forma de pó, cápsula, tablete, gel, ou ainda misturados em alimentos (BARROS NETO, 2001).

Os agentes ergogênicos farmacológicos compreendem toda e qualquer substância sintética capaz de promover uma melhora no rendimento físico (BALLISTRERI e WEBSTER, 2008). Dentre os ergogênicos farmacológicos, estão os esteroides anabolizantes. O uso destas substâncias merece uma atenção especial uma vez que são prejudiciais à saúde e são consideradas proibidas pela AMA (BARROS NETO, 2001).

2.2 ANABOLIZANTES

Os anabolizantes são diversas vezes confundidos com suplementos nutricionais com recursos ergogênicos. Ao contrário dos suplementos nutricionais, que auxiliam na alimentação, os anabolizantes são substâncias que atuam de forma semelhante ao principal hormônio masculino, a testosterona (DURANTE, 2014). O uso de anabolizantes só pode ser administrado com orientação médica a indivíduos com distúrbios fisiológicos, tais como: disfunção do sistema reprodutor, câncer de mama e anemia (URTADO, 2014). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) proíbe o uso de anabolizantes a indivíduos saudáveis. Apesar da proibição, atletas profissionais geralmente fazem uso dos anabolizantes para aumento do desempenho físico e delineamento do corpo respectivamente (CARMO *et al.*, 2012).

2.2.1 Esteroides anabolizantes

Após a Segunda Guerra Mundial soldados americanos faziam uso dos esteroides anabolizantes na tentativa de reabilitar os militares que se encontravam debilitados fisicamente. Os esteroides eram utilizados pelos militares com o objetivo do aumento da massa muscular e reestabelecimento das condições físicas (PEREIRA *et al.*, 2010).

Os resultados positivos do hormônio natural masculino (testosterona) na construção muscular são conhecidos desde 1935, quando foi sintetizado e purificado pela primeira vez por Ruckzika e Butenandt. Nas décadas de 1945 e 1955, a testosterona foi introduzida no

cenário esportivo. Em 1954, atletas da extinta União Soviética começaram a fazer o uso de esteroides anabolizantes para aumentar a massa e a força muscular (PEREIRA *et al.*, 2010; OLIVEIRA, 2015).

A testosterona é um hormônio sintetizado a partir do colesterol e é responsável pela diferenciação sexual na fase pré-natal, na maturidade sexual e durante a vida fértil dos homens adultos. Para mais, estimula o crescimento do corpo em jovens do sexo masculino durante a puberdade, proporcionando principalmente o aumento da força muscular, virilidade e agressividade (OLIVEIRA, 2015). Nos homens a testosterona é sintetizada nos testículos. Já nas mulheres, a testosterona está presente em pequenas quantidades sendo que a sua produção se dá nos ovários e na glândula adrenal (PADILHA, 2007).

Dentre as inúmeras consequências quanto ao uso dos esteroides anabolizantes, pode-se destacar as psicológicas e físicas tais como: aumento de pelos no corpo, engrossamento da voz (inclusive em mulheres), distúrbio das funções do fígado, tumores no fígado, coágulo sanguíneo, aumento da pressão arterial, dependência, dentre muitos outros (GRANJEIRO *et al.*, 2008; ALVES, 2012; URTADO, 2014).

Os esteroides anabólicos androgênicos (EAA) são um grupo de substâncias naturais e sintéticas que são quimicamente similares e mimetizam a ação da testosterona no organismo humano (URTADO, 2014).

A estrutura geral dos EAA tem como base o núcleo ciclopentanoperidrofenantreno, estrutura típica dos esteróides. A estrutura geral dos EAA indicando a classificação dos anéis A, B, C e D do núcleo básico e alguns exemplos de esteroides anabólicos androgênicos, são mostrados na figura 2 (CUNHA *et al.*, 2004).

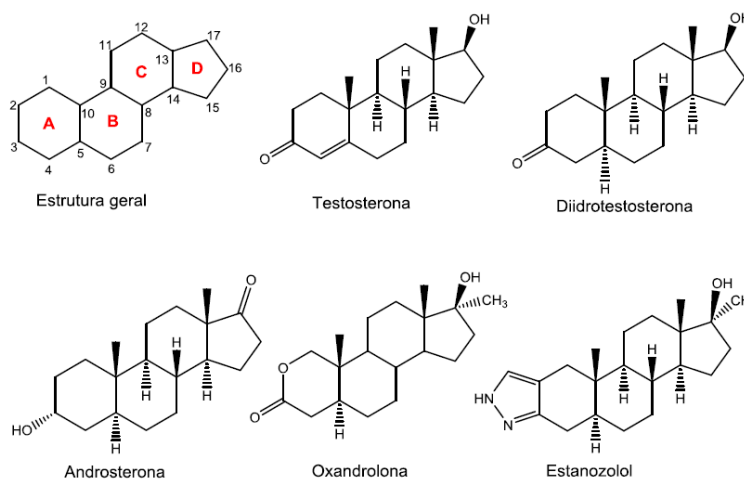


Figura 2. Estrutura geral dos esteroides e alguns EAA.

Esses hormônios possuem atividades androgênica e anabólica. A atividade androgênica está relacionada ao desenvolvimento das características sexuais masculinas, tais como: mudança da voz, crescimento de pelos, aumento da genital e produção de esperma. A atividade anabólica é responsável pela síntese de proteínas, crescimento dos músculos, produção de eritrócitos (eritropoiese), também conhecidos como hemácias ou glóbulos vermelhos e a estimulação ou inibição do processo do crescimento ósseo dos jovens (ALVES, 2012). O principal objetivo do uso dessas substâncias é o aumento da capacidade de treinamento, resistência física e melhora do desempenho das atividades desportivas (PADILHA, 2007).

Tendo como base a estrutura de substâncias semelhantes à testosterona, houve um advento na produção de novos esteroides sintéticos. Essas substâncias foram inseridas no ambiente desportivo com o objetivo de promover o aumento no desempenho dos atletas, proporcionando um aumento de massa muscular (OLIVEIRA, 2015).

Os esteroides projetados são um exemplo de anabólicos quimicamente modificados que tem como um dos objetivos burlar o controle de dopagem de atletas. Dentre os esteroides projetados comercializados livremente pela *internet* na forma de suplemento, pode-se destacar a metasterona (PADILHA, 2007).

2.2.2 Metasterona

A metasterona ($2\alpha,17\alpha$ -dimetil- 17β -hidroxi- 5α -androstan-3-ona), também conhecida como 17-metildrostanolona, foi sintetizada em 1956 pelos químicos Ringold e Rosenkranz e sua atividade anabólica foi descoberta em 1959 por Ringold e colaboradores. Este esteroide foi descrito como um potente agente anabólico e com baixa atividade androgênica quando testado em ratos machos castrados (RINGOLD e ROSENKRANZ, 1956; RINGOLD, *et al*, 1959). Porém, outros estudos farmacológicos foram realizados para avaliação dos efeitos androgênicos e anabólicos da metasterona, e nestes, foram observados que quando administrada por via cutânea ou oral, a metasterona impedia a atrofia da próstata ventral, vesículas seminais e músculo elevador do ânus de ratos machos castrados. Ensaio funcionais (ligação competitiva) foram realizados e foi constatado que a metasterona exibia afinidade para o receptor andrógeno comparável à testosterona (RINGOLD, *et al*, 1959; DEA, 2012).

A estrutura química da metasterona é semelhante à da testosterona, com algumas diferenças. A metasterona possui a presença do grupo α -metil no carbono 17 (C17), um α -metil no carbono 2 (C2) e ausência de uma dupla ligação entre o carbono 4 (C4) (DEA, 2012).

Modificações na estrutura da testosterona, ou seja, os esteroides sintéticos (esteroides projetados) podem alterar sua ação nos tecidos alvo. Tais mudanças aumentam os efeitos anabólicos, tais como: o crescimento dos músculos, o aumento da síntese de proteínas, elevação da taxa de glóbulos vermelhos no sangue. E a diminuição dos efeitos andrógenos, como: mudança da voz, crescimento exagerado de pelos, aumento da genital, entre outros. Este resultado ocorre devido à mudança de afinidade do esteroide em relação a diversos receptores celulares (ALVES, 2012). A figura 3 mostra o resumo dos efeitos das mudanças na estrutura da testosterona.

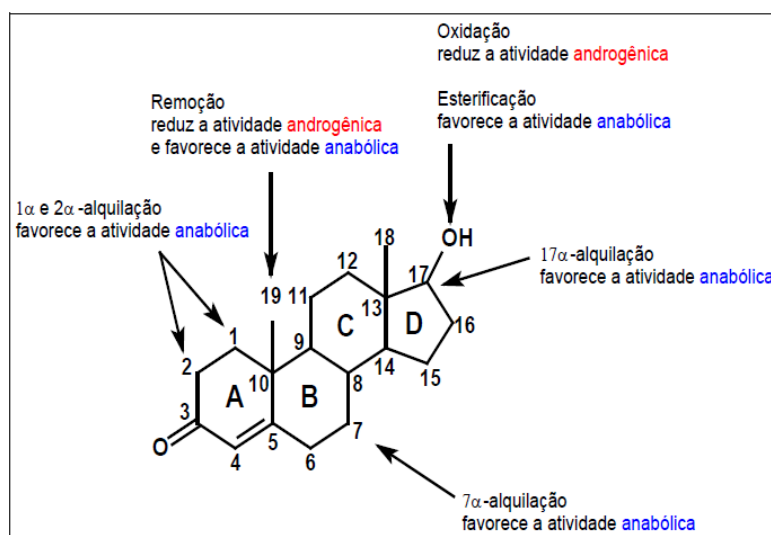


Figura 3. Modificações na estrutura da testosterona (ALVES, 2012).

A metasterona é um esteroide de desenho encontrada em suplementos nutricionais comercializados principalmente pela *internet* (PARR *et al.*, 2006; HANS *et al.*, 2008).

Os esteroides de desenho ou esteroides projetados são substâncias sintéticas com estrutura relacionada aos esteroides conhecidos, porém, com algumas modificações estruturais. Normalmente, essas substâncias apresentam a estrutura química análoga à da testosterona, e com ação semelhante no organismo (PEREIRA *et al.*, 2010).

Há uma hipótese de que metasterona sofra as reações metabólicas clássicas dos esteroides que possuem o grupo ceto no carbono 3 que é reduzido, formando o isômero 3 α -hidróxido (PADILHA, 2007).

2.3 ETAPAS DE PREPARO DA AMOSTRA

Os métodos analíticos são capazes de fornecer dados que auxiliam nas diferentes etapas de um processo tecnológico. Tais etapas podem variar desde o desenvolvimento e pesquisa de um novo produto, como na produção e no controle de qualidade (SILVA, 2014).

O emprego de técnicas analíticas sensíveis, seletivas e confiáveis, proporciona a obtenção de dados precisos e confiáveis, contribuindo para o desenvolvimento da ciência e tecnologia de alimentos (DORNE *et al.*, 2009).

A escolha da técnica analítica mais adequada para a análise em questão advém de uma série de fatores como: da exatidão necessária, do tempo de análise, da disponibilidade de recursos, complexidade e da quantidade de analitos existentes na amostra (SKOOG *et al.*, 2006).

2.3.1 Preparo de amostras

Para o estudo analítico, se faz necessário isolar parte do universo a que se propõe estudar. Esta porção deve ser homogênea e representativa do todo. Esta metodologia é denominada de amostragem (LANÇAS, 2009).

Antes da quantificação de um determinado analito supostamente presente na amostra, é importante a realização de um tratamento de modo a preparar a amostra para as etapas analíticas (VAN EENOO, P. *et al.*, 2012; SILVIA, 2014). O principal objetivo do preparo da amostra é tornar viável o composto de interesse presente na matriz analisada (PADILHA, 2007).

2.3.2 Métodos de extração

A técnica de extração por solvente auxilia na solubilização dos componentes de interesse presentes na matriz, tornando-os viáveis para a análise. A escolha do solvente para esta etapa é feita de forma empírica, com base nas propriedades físico-químicas do solvente e do soluto (PADILHA, 2007; SILVIA, 2014).

A extração líquido-líquido (ELL) é fundamentada na afinidade dos analitos entre dois solventes imiscíveis onde uma substância é extraída de um líquido para o outro. Uma das fases é aquosa e a outra orgânica. Os analitos extraídos na fase orgânica são isolados com a

evaporação do solvente existente na fase orgânica. A afinidade das substâncias pelos solventes envolvidos na separação definirá em que fase elas serão encontradas após a extração. É uma técnica simples, rápida e muito difundida na separação de analitos de interferentes presentes na matriz (ALVES, 2012; LABANCA, 2015).

A extração em fase sólida (EFS) passou a ser utilizada nos meados de 1970. É uma técnica muito utilizada em diferentes áreas tais como na toxicologia forense, controle de dopagem, análise de fármacos, análise de resíduos em alimentos, entre outras (PADILHA, 2007; PRESTES *et al.*, 2009; CALDAS *et al.*, 2011). Na EFS, os analitos presentes na matriz e que apresentem maior afinidade pela fase sólida (cartucho) são adsorvidos. Posteriormente é adicionado um solvente orgânico com maior afinidade pelo analito de interesse do que com a fase sólida. Esta técnica de separação baseia-se no mesmo princípio da cromatografia líquida de baixa pressão (CALDAS *et al.*, 2011).

Para a extração de esteroides anabolizantes são utilizadas diferentes técnicas na etapa de preparação da amostra. As técnicas mais utilizadas na extração em matrizes biológicas são a ELL e EFS. Esta etapa tem como principais objetivos a extração dos analitos de interesse e eliminação de possíveis interferentes presentes na matriz (PADILHA, 2007).

Por fim, a técnica de derivatização é indispensável para a análise de substâncias pouco voláteis ou termicamente instáveis por cromatografia a gás produzindo derivados voláteis e termicamente estáveis. Sendo assim, é necessário a derivatização da amostra para a obtenção de compostos com as características mencionadas (ALVES, 2012).

2.3.3 Derivatização

A derivatização dos analitos é a última etapa do processo de preparo da amostra antes da análise por cromatografia a gás. Nesta técnica de análise, é necessário que as substâncias sejam voláteis ou que possam ser transformadas em compostos voláteis e estáveis termicamente (LANÇAS, 1993; COLLINS *et al.*, 2006). Os grupos funcionais polares, tais como: hidroxila e carbonila, tem a propriedade de aumentar o ponto de ebulição das moléculas orgânicas devido as suas interações intermoleculares fortes. A derivatização modifica esses grupamentos favorecendo a formação de derivados voláteis e termicamente estáveis (COLLINS *et al.*, 2006; ALVES, 2012).

A reação de derivatização utilizada no presente trabalho é a siliilação. Esta reação tem como objetivo a substituição dos prótons lábeis (hidrogênio ácido) presentes nos compostos

polares pelo grupamento trimetilsilil ou trimetilsilila [-Si (CH₃)₃]. Assim, há uma diminuição das interações intermoleculares favorecendo a redução do ponto de ebulição das moléculas (LABANCA, 2015). O reagente derivatizante utilizado neste trabalho é o N-metil-N-trimetilsilil-trifluoroacetamida, MSTFA.

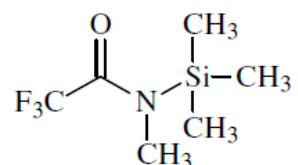


Figura 4. Estrutura do MSTFA.

A solução derivatizante é formada pelos reagentes MSTFA, iodeto de amônio e 2-mercaptoetanol (MSTFA:NH₄I:2-mercaptoetanol). O iodeto de trimetilsilila (TMSI) é formado pela reação do iodeto com o MSTFA com é ilustrado na Figura 5.

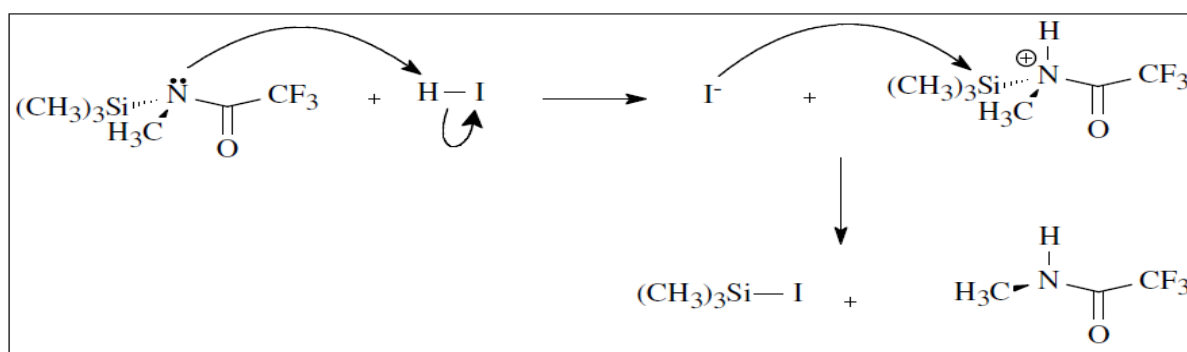


Figura 5. Mecanismo de reação do iodeto de trimetilsilila (VAN DE KERKOHOF, 2001).

De acordo com o mecanismo da reação, ocorre um ataque do par de elétrons livres presentes no nitrogênio do TMSI no hidrogênio do HI. O nucleófilo I⁻ se liga com o silício, formando o Iodeto de trimetilsilila (VAN DE KERKOHOF, 2001).

O TMSI é sensível à hidrólise e a decomposição pela ação do oxigênio e da luz. Sendo assim, é adicionado à solução derivatizante o reagente 2-mercaptoetanol, um agente redutor que minimiza a formação do iodo e conseqüentemente a oxidação do meio, evitando a degradação da solução derivatizante (VAN DE KERKOHOF, 2001; LABANCA, 2015).

Na derivatização de esteroides, ocorre a reação de sililação, ou seja, o grupamento Trimetilsilila (TMS), substitui um hidrogênio ácido, proveniente da hidroxila ou de grupamentos enólicos (resultante do equilíbrio cetoenólico do grupamento carbonila) (ALVES, 2012).

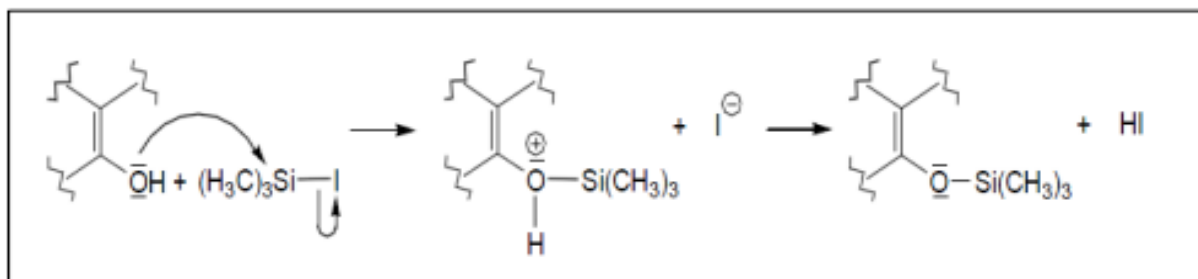


Figura 6. Reação de sililação dos esteroides (ALVES, 2012).

2.4 MÉTODOS DE ANÁLISE DE ESTEROIDES ANABOLIZANTES

A investigação de anabolizantes é de grande importância nas áreas de controle de dopagem esportivo, toxicologia forense e segurança alimentar. As análises são realizadas nas diferentes matrizes tais como: urina humana e animal, sangue, plasma, soro, fio de cabelo, carnes bovinas, suínas, frango, suplementos nutricionais entre outros produtos (DOMINGUES, 2015; OLIVEIRA *et al.*, 2007; AQUINO NETO *et al.*, 2002;). As técnicas analíticas comumente utilizadas são a cromatografia a gás e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplada à espectrometria de massas. A escolha do método analítico apropriado depende da natureza da matriz e da quantidade do analito que se espera encontrar na amostra (PARR *et al.*, 2006; GEYER *et al.*, 2008; VAN EENOO, P. *et al.*, 2012).

2.4.1 Metodologias analíticas de determinação de esteroides anabolizantes em diferentes matrizes

No ano de 2003, Geyer *et al.* analisaram diferentes suplementos nutricionais. A maioria dos produtos foram adquiridos nos Estados Unidos da América (EUA). Das 634 amostras analisadas, 94 (14,8%) continham pró-hormônios de nandrolona, boldenona e 5 α -dihidrotestosterona não declarados no rótulo. Não foi possível obter dados confiáveis de 66 amostras (10,4%) devido ao efeito de matriz. De todos os suplementos positivos 23 amostras (24,5%) continham pró-hormônios de testosterona e nandrolona, 64 amostras (68,1%) somente pró-hormônio de testosterona, 7 amostras (7,5%) somente pró-hormônio de nandrolona.

Em 2006, Baume e colaboradores em um laboratório de controle de dopagem na Suíça analisaram 103 suplementos nutricionais de vendidos na *internet*. Os suplementos foram

divididos em quatro categorias: Creatina, pré-hormonais (favorecem a produção de testosterona), aminoácidos e psicoestimulantes. O estudo se baseou na pesquisa de possíveis estimulantes e esteroides anabolizantes presentes nos produtos analisados. Três suplementos estavam contaminados com o esteroide anabolizante metandienona. Tais suplementos foram ingeridos por um grupo de pessoas como parte do estudo e foi verificada na urina dos voluntários, a presença de metabólitos de metandienona. Suplementos como a creatinina continham traços de hormônios. Também foi realizado um teste de ingestão destes produtos e metabólitos de nandrolona (19-norandrosterona e 19-noreticolanolona) foram detectados em urina.

Parr e colaboradores (2006) em Colônia, Alemanha, analisaram diferentes suplementos comercializados na *internet*, entre eles um produto contendo o esteroide de desenho metasterona. Além das análises realizadas nos produtos, os pesquisadores realizaram um estudo de excreção, verificando a presença de metabólitos de alguns esteroides nas urinas dos voluntários participantes do estudo. Foi verificada a presença de metasterona em alta quantidade em um dos suplementos e do metabólito 2α - 17α -dimetil- 5α -androstano- 3α , 17β -diol na urina. As análises dos suplementos foram realizadas solubilizando as cápsulas em metanol, separação da fração metanólica, derivatização e injeção no CG-EM. As urinas do estudo de excreção foram submetidas à extração por fase sólida, hidrólise enzimática, extração líquido-líquido com utilização do solvente *terc*-butilmetiléter (TBME), evaporação do solvente, secagem, derivatização e injeção por cromatografia a gás associada à espectrometria de massas acoplada a espectrometria de massas (CG-EM/EM).

Em 2008, na cidade de Kreischa na Alemanha, Anielski P. realizou um estudo para detectar esteroides anabolizantes em cabelo de equino e estimar a retrospectiva da data de uso do agente anabólico.

Cavalcanti e colaboradores no ano de 2012 analisaram um suplemento contendo o esteroide anabolizante metilestembolona como descrito no rótulo do produto. Também foi realizado um estudo de excreção humano após a ingestão do suplemento para a determinação dos metabólitos. O produto foi adquirido em uma loja de suplementos vendidos na *internet*. Foi confirmada a presença do esteroide anabolizante metilestembolona na cápsula do suplemento no tempo de retenção (t_R) de 15,62 minutos. Os metabólitos de metilestembolona foram detectados na urina em até 1 semana após a administração do suplemento.

Em 2013, na cidade do Rio de Janeiro, Garrido analisou um suplemento nutricional a fim de comprovar a presença de metasterona. Também foi realizado um estudo de excreção

para detectar os possíveis metabólitos do esteroide. A análise foi realizada em CG-EM. A análise da urina de excreção foi realizada por hidrólise enzimática, extração líquido-líquido, evaporação do solvente, secagem, derivatização e injeção no CG-EM. Os espectros e massas da metasterona e seu derivado trimetilsilila (OTMS) foram detectados na cápsula de suplemento.

Abbate e colaboradores, em 2014, analisaram 24 suplementos nutricionais vendidos em lojas especializadas de produtos *fitness* do Reino Unido suspeitos de conter esteroides anabolizantes. Dos 24 produtos analisados, 23 continham algum esteroide, e apenas um produto não continha nenhum esteroide. As técnicas analíticas utilizadas para a detecção dessas substâncias foram: cromatografia a gás acoplada ao espectrômetro de massas (CG-EM), a cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas (CL-EM), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando os detectores de rede de diodos e espectrofotométrico (UV-VIS), espectroscopia de ressonância nuclear magnética e a cristalografia de raios X. Os espectros de massa foram adquiridos no modo de varredura total de íons (*scan*) na faixa de m/z 80-650, utilizando o CG-EM *Agilent* 6890. Após a análise, verificou-se a presença de metasterona em 4 dos suplementos analisados. Não foi possível quantificar a quantidade de metasterona no “suplemento 12”, mas nos demais suplementos a quantidade foi de aproximadamente 2,4 mg no “suplemento 19”, 8 mg no “suplemento 20” e 5 mg no “suplemento 22”.

Diferentes métodos analíticos foram utilizados na determinação de esteroides anabolizantes em suplementos nutricionais. Quanto ao método de preparo da amostra, a utilização da ELL foi predominante na maioria dos trabalhos científicos citados neste item. A cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas foi utilizada na maioria dos métodos de análise de suplementos nutricionais citados acima. Mesmo com o avanço e desenvolvimento da CLAE-EM/EM, a CG-EM se destaca principalmente devido ao baixo custo desta técnica. É importante ressaltar que na análise de esteroides as ionizações ambientes (por exemplo, a *electrospray*) de alguns desses compostos é deficiente. Esse comportamento é devido ao baixo caráter ácido/base de alguns esteroides. A fragmentação induzida por ionização por elétrons dos derivados TMS é outro fator importante no uso da CG-EM, pois a pesquisa das fragmentações dos esteroides é muito estudada (CAVALCANTI, 2013). A técnica de CG-EM proporciona vantagens como a alta seletividade, sensibilidade, eficiência de separação, obtenção de informações estruturais dos compostos analisados, entre

outras. Por fim, é uma importante ferramenta no controle de qualidade de diferentes áreas como a ciência e tecnologia de alimentos.

A Tabela 1 apresenta o resumo de metodologias analíticas de determinação de esteroides anabolizantes em diferentes matrizes.

Tabela 1: Resumo das técnicas de análise de alguns trabalhos encontrados na literatura.

Referência	Matriz	Técnica Analítica	Preparo da Amostra
Geyer <i>et al.</i> 2003	Suplementos	CG-EM – HP 6890 (CG) / 5973 (EM)	Extração com metanol, NaOH, n-pentano e N,N-diisopropilamina-alcano
Baume <i>et al.</i> 2006	Suplementos	CG-EM – Agilent 5890 (GC) / 5971 (EM)	Extração com metanol, KOH e n-pentano
Parr <i>et al.</i> 2006	Suplementos e urina	CG-EM – Hewlett Packard 6890N (CG) / HP 5973 (EM) e CG-EM/EM - Finnigan	Extração com metanol (suplementos); EFS, hidrólise enzimática e extração com solvente TBME (urina)
Geyer <i>et al.</i> 2008	Suplementos	CG-EM e CL-EM/EM	Não informado
Anielski, 2008	Cabelo de cavalo	CG-EM (Alta resolução)	Lavagem, pulverização, extração com metanol, purificação com HPLC
Parr <i>et al.</i> 2011	Suplemento e urina	CG-EM e CG-EM/EM (Thermo Ficher QqQ)	Extração com metanol (suplemento) e TBME (urina)
Cavalcanti <i>et al.</i> 2012	Suplemento e urina	CG-EM/EM – Agilent 7890 (CG) e 7000A (EM)	Extração com metanol (suplemento) e TBME (urina)
Garrido, 2013	Suplemento e urina	CG-EM – Agilent 6890 (CG) / 5973MSD (EM)	Extração com metanol (suplemento); ELL (urina)
Abbate <i>et al.</i> 2014	Suplementos	CG-EM, CL-EM, CLAE-DAD/UV-VIS	Extração com metanol, KOH, NaCl, hexano
Kintz <i>et al.</i> 2015	Cabelo humano	CG-EM, CL-EM/EM	Lavagem, extração com solvente, hidrólise enzimática
Fragkaki <i>et al.</i> 2017	Urina e plasma de equino	CG-EM/EM e CL-EM/EM	Diluição, EFS ou ELL

2.5 CROMATOGRAFIA

A cromatografia é um método físico-químico de separação. Neste processo, ocorre a migração diferencial dos componentes de uma mistura por ação das interações entre as fases móvel e estacionária que devem ser imiscíveis (COLLINS *et al.*, 2006; PADILHA, 2007). Este método analítico instrumental é muito utilizado nas análises químicas, proporcionando a identificação de compostos de uma determinada amostra utilizando padrões existentes no mercado. Além disso, é possível purificar compostos, separar substâncias indesejadas entre outras aplicações no campo da pesquisa e desenvolvimento e no controle de qualidade de diversos produtos (LABANCA, 2015).

2.5.1 Cromatografia a gás

A cromatografia em coluna foi desenvolvida no ano de 1900 pelo químico D. T. Day e em 1906, o botânico polonês M. S. Tswett empregou as colunas de adsorção na pesquisa de pigmentos de plantas. O termo cromatografia criado pelo botânico polonês não tem uma origem precisa. Especula-se que ele tenha dado este nome pelo fato de ter realizado um estudo de separação de pigmentos de colorações diferentes ou porque o seu sobrenome (Tswett) significa “cor” em russo. No início da década de 1950 os químicos James e Martin iniciaram suas pesquisas utilizando a cromatografia a gás (AQUINO NETO *et al.*, 2003).

A cromatografia a gás é um método analítico instrumental utilizado em diversas áreas tais como: na química de polímeros, geoquímica, arqueologia, química de produtos naturais, controle de qualidade de produtos industriais, química de alimentos, química ambiental, toxicologia entre outras. É empregada na separação de gases ou de compostos que são capazes de se tornarem voláteis e termicamente estáveis nas condições de análise. A técnica possui alto poder de resolução e possibilita a detecção na concentração de nano a pictogramas em matrizes complexas (AQUINO NETO *et al.*, 2003; COLLINS *et al.*, 2006).

A separação dos componentes de uma amostra será resultado da diferença das constantes de equilíbrio de distribuição (K_D) entre as fases estacionária e móvel. Se um componente é mais retido pela fase estacionária, maior é a porcentagem das moléculas deste determinado componente que ficam retidas resultando em um retardamento na migração das moléculas. O segundo componente que for menos retido na fase estacionária terá uma porcentagem de moléculas maior na fase móvel em relação ao primeiro componente. As

moléculas do componente que não estão tão presas na fase estacionária se moverão a uma velocidade maior que o outro, resultando na migração dos componentes, ou seja, ocorre a migração dos analitos no leito da fase estacionária pela passagem da fase móvel, denominada eluição (PADILHA, 2007).

A introdução da amostra é umas das etapas importantes na garantia da alta resolução da cromatografia a gás. As condições de injeção, como por exemplo, volume de amostra, temperatura do injetor e tipo de injeção vão depender do estado físico da amostra a se analisada. Para as amostras líquidas é necessária a rápida volatilização das mesmas e para tal, a temperatura do injetor deve estar de 20 a 30 °C acima da temperatura de ebulição do componente menos volátil. Quando vaporizados os líquidos apresentam um elevado coeficiente de expansão, permitindo a injeção de pequenos volumes. Desta forma há um melhoramento na resolução do sistema contribuindo para a existência de picos cromatográficos com uma boa forma (estreitos). A câmara de vaporização precisa estar quente o suficiente para vaporizar a amostra em um espaço curto de tempo, evitando a eficiência, decomposição térmica ou rearranjos na amostra. A técnica de injeção mais adequada depende da natureza e concentração da amostra a ser analisada. A amostra é inserida no cromatógrafo através de um sistema de injeção manual (microseringa com agulha de ponta hipodérmica) ou automático (injetores). A injeção da amostra pode ser com ou sem divisão de fluxo. A injeção com divisão de fluxo (*split*) é utilizada com as colunas capilares e garante uma melhor resolução do cromatograma. Permite a análise de amostras concentradas ou de concentrações desconhecidas. A amostra é injetada com o injetor a uma temperatura acima de 200°C para favorecer a volatilização. O gás carreador flui transportando as moléculas presentes na amostra para o interior da coluna cromatográfica. A injeção sem divisão de fluxo (*split less*) é indicada para amostras mais diluídas (ALVES, 2012; LABANCA, 2015).

Na fase móvel, é utilizado um gás inerte que também é denominado gás de arraste ou gás carreador. Os gases mais utilizados são o hélio e hidrogênio. De modo geral, os gases devem ter alta pureza, sendo o grau de pureza dos gases dependente do tipo de detector acoplado (LABANCA, 2015).

A cromatografia a gás pode ser classificada de acordo com o tipo de fase estacionária utilizada. Quando a fase estacionária é um sólido, denomina-se cromatografia gás-sólido. Neste tipo de cromatografia, a fase estacionária é um sólido de grande área superficial onde ocorre a adsorção das substâncias. Na cromatografia gás-líquido a fase estacionária é um líquido de baixa volatilidade retido sob um suporte sólido. A separação é fundamentada pela

pressão de valor dos analitos e pela afinidade dos compostos entre a fase estacionária líquida (AQUINO NETO *et al.*, 2003; COLLINS *et al.*, 2006).

Na coluna cromatográfica é onde ocorre a separação dos componentes da amostra. A natureza do tubo, suporte sólido, o tipo e a quantidade da fase líquida, o recheio, o comprimento da coluna e a temperatura são elementos importantes que impactam na resolução do método. O material das colunas tubulares abertas normalmente é sílica fundida, vidro borossilicato, cobre, aço inoxidável e alumínio. O suporte inerte deve apresentar granulometria uniforme, resistência de modo a evitar quebras durante o processo e homogeneidade do leito da coluna.

Nas colunas tubulares abertas (colunas capilares), a fase estacionária é depositada na forma de um filme fino e uniforme no interior do tubo onde a parte central é oca. As colunas capilares têm como características: diâmetro interno menor que 0,3 mm, espessura do filme da fase estacionária menor que 0,5 mm, desativados com agentes silanizantes (PADILHA, 2007).



Figura 7. Diagrama de blocos da CG.

A amostra é introduzida no cromatógrafo a gás. Desta forma, há separação dos componentes da amostra pela técnica de cromatografia a gás e o espectro de massa de cada componente da mistura é determinado de forma individual (PAVIA *et al.*, 2010; LABANCA, 2015).

Um método de grande utilidade na identificação e quantificação de compostos químicos é a cromatografia a gás acoplada ao espectrômetro de massas, um detector muito utilizado na química analítica.

2.6 ESPECTROMETRIA DE MASSAS

No final do século XIX deu-se início ao desenvolvimento da espectrometria de massas, uma técnica analítica de grande importância na identificação de compostos desconhecidos, quantificação de substâncias conhecidas e no estudo das propriedades químicas e estruturais das moléculas. A ordem de grandeza que este método analítico pode detectar, dependendo do tipo de espectrômetro, é de pg mL^{-1} (parte por quatrilhão) (PADILHA, 2007; PAVIA *et al.*, 2010).

Acredita-se que a espectrometria de massas teve início no ano de 1906 com o pesquisador J. J. Thomson sendo agraciado com o Prêmio Nobel de física neste mesmo ano. Em 1913, Thomson observou pela primeira vez a dissociação de íons moleculares. Em 1918, A. J. Dempster desenvolveu o primeiro espectrômetro de massas com setor magnético com formato de 180° em direção ao foco servindo como um analisador de massas. F. W. Aston, aluno de Thomson, desenvolveu o primeiro espectrômetro com seleção de velocidade no ano de 1919. Neste mesmo ano, Aston confirmou que os íons de Neônio que fora descoberto por Thomson, eram realmente isótopos. Em 1922 Aston ganhou o Prêmio Nobel de física (PADILHA, 2007).

Na espectrometria de massa, a energia é transferida à amostra promovendo a sua ionização. Para que a amostra possa ser analisada por espectrometria de massas é necessária a formação de íons livres em fase gasosa. Os íons presentes na amostra são separados por campos elétricos e / ou magnéticos de acordo com a razão massa/carga (m/z). A princípio todas as moléculas que sofrem ionização são passíveis de serem analisadas por espectrometria de massas, o que torna a técnica analítica muito difundida nas diferentes áreas da química (AMARAL *et al.*, 2011 e PADILHA, 2007).

Um resumo do processo de análise por espectrometria de massa é ilustrado na Figura 8, onde “M” representa as moléculas de um composto puro na fase gasosa. Após a etapa de ionização da amostra, M^+ se decompõe formando íons de massas menores que detectados, geram um espectro de massas.

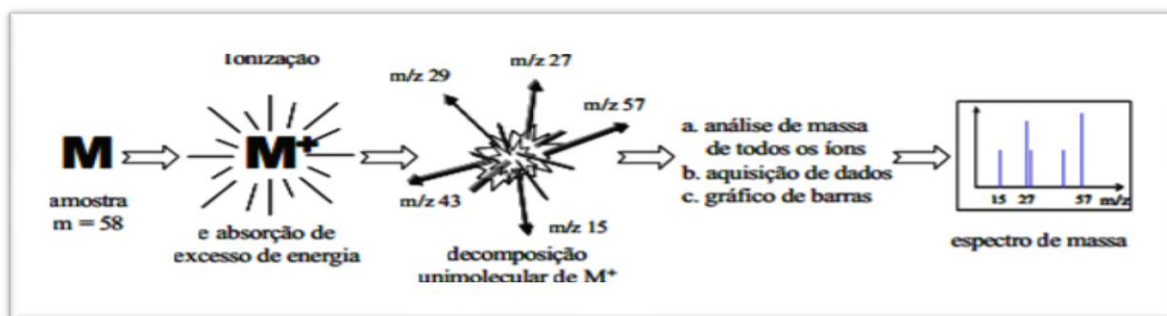


Figura 8. Esquema de análise por EM. Fonte: <https://pt.slideshare.net/evanielly/espectrometria-de-massas>

O espectrômetro de massas é um equipamento constituído por uma fonte de íons, analisador de massas, detector e um sistema de aquisição de dados. Na Figura 9, encontra-se o diagrama de blocos que ilustra os constituintes básicos do espectrômetro de massas. Na fonte de íons, os componentes da amostra são convertidos em íons com cargas positivas e negativas. Esses íons são acelerados e enviados para o analisador de massa. O analisador de massa tem como função a separação dos íons conforme a relação massa/carga. O detector recebe os íons separados pelo analisador de massa, convertendo a corrente de íons em sinais elétricos que são processados, gerando o espectro de massa (PADILHA, 2007).

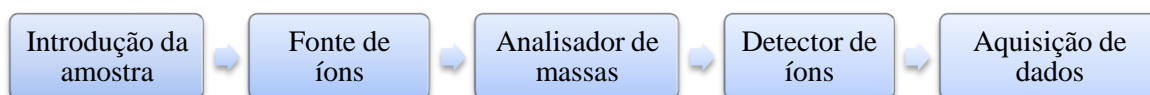


Figura 9. Diagrama de blocos do espectrômetro de massas.

Existem vários tipos de técnicas de ionização, tais como: ionização eletrônica (impacto por elétrons), *electrospray*, ionização química a pressão atmosférica, entre outras. A aparência do espectro de massa de uma espécie molecular é altamente dependente do método de ionização usado. Há também, diferentes analisadores de massas tais como o quadrupolo, triplo quadrupolo, armadilha de íons, tempo de voo, entre outros. Neste trabalho, a técnica de ionização utilizada foi a ionização eletrônica e o analisador de massas triplo quadrupolo.

2.6.1 Ionização eletrônica

Nesta técnica, as moléculas presentes na amostra são atingidas por um feixe de elétrons de alta energia. Com o impacto, um elétron é retirado de uma molécula criando uma carga positiva. A energia empregada para a retirada de um elétron é equivalente a seu potencial de ionização. No analisador, a energia cinética emitida às moléculas promove a fragmentação dos íons moleculares de acordo com suas relações m/z . A partir da fragmentação obtida é possível comparar os espectros de padrões conhecidos (PAVIA *et al.*, 2010; LABANCA, 2015).

2.6.2 Analisador de massas triplo quadrupolo

É constituído por três quadrupolos em série onde o último é o local onde ocorre a fragmentação dos íons que foram selecionados no primeiro quadrupolo por colisão com um gás, normalmente Ar, He ou N₂. O último quadrupolo também é denominado câmara de colisão. Os íons produzidos são encaminhados ao terceiro quadrupolo. Na dissociação induzida por colisão, o íon denominado precursor derivado do primeiro quadrupolo é acelerado por meio de um potencial elétrico e encaminhado para uma região de alto vácuo, na câmara de colisão. Lá, o íon sofre inúmeras colisões por meio de um gás inerte, o que aumenta a sua energia potencial, promovendo sua fragmentação e formando o íon produto (PAVIA *et al.*, 2010; LABANCA, 2015).

2.6.3 Espectrometria de massas em série (EM-EM)

Os analisadores de massas podem ser utilizados em apenas um e independente ou de forma acoplada, realizando experimentos em série. A este tipo de configuração, denomina-se espectrometria de massas em série (EM-EM) ou em *tandem*. Desta forma, é possível detectar um determinado íon e em seguida submetê-lo a uma etapa de fragmentação. Os íons separados são detectados por eletromultiplicadores (CARRILHO *et al.*, 2008).

A espectrometria de massas em série (EM-EM) pode ser aplicada em diversos experimentos analíticos. O monitoramento de reações múltiplas (MRM) foi o método de identificação utilizado nesta dissertação e será definido a seguir:

2.6.3.1 Monitoramento de reações múltiplas (MRM)

Segundo LABANCA (2015) denomina-se monitoramento seletivo de reações, quando se monitora a fragmentação de um determinado íon precursor no primeiro quadrupolo (Q1) com seus íons produtos correspondentes, e estes, atravessam o terceiro quadrupolo (Q3). O monitoramento de reações múltiplas (MRM) é derivado do monitoramento seletivo de reações. No MRM, ocorre o monitoramento da fragmentação de vários íons precursores conjuntamente. Estes modos de varredura têm como objetivo monitorar a existência e a intensidade da transição de um íon precursor para um íon produto (CHIARADIA *et al.*, 2008; KITTINGHAM *et al.*, 2009; ZHI *et al.*, 2011).

2.7 VALIDAÇÃO DE MÉTODO

A qualidade das medições químicas fundamentadas na comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade, está sendo cada vez mais reconhecida e exigida. De modo a obter informações confiáveis e interpretáveis sobre uma determinada amostra, o método analítico deve ser submetido à validação (RIBANI *et al.*, 2004). Entende-se por validação o conjunto de operações que são necessárias para demonstrar que um método de análise é adequado à aplicação a que se propõe (LBCD, 2011). Essas operações podem variar de acordo com o método, sendo este qualitativo, semi-quantitativo ou quantitativo. A validação de um método se inicia no planejamento da estratégia analítica e prossegue durante o desenvolvimento da metodologia. Quando um processo analítico é validado e dispõe de documentação organizada possibilita que as agências reguladoras considerem que o método analítico como um todo está em conformidade para o fim a que se propõe (RIBANI *et al.*, 2004).

Para que o processo de validação de um método analítico ocorra de forma satisfatória, é indispensável que a metodologia esteja descrita em um procedimento, que os equipamentos e instrumentos utilizados estejam funcionando corretamente e devidamente calibrados. O analista responsável deve ter experiência na área, ter conhecimento sobre o trabalho realizado e registrar todas as informações pertinentes ao processo de validação (INMETRO, 2016).

Organismos nacionais e internacionais definem de forma similar os objetivos da validação. No Brasil, órgãos ligados à legislação e a normalização definem validação da seguinte maneira:

ANVISA:

Ato documentado que atesta que qualquer procedimento, processo, equipamento, material, operação ou sistema realmente conduza aos resultados esperados (BRASIL, 2005).

INMETRO:

É a confirmação por exame e fornecimento de evidência objetiva de que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido são atendidos (INMETRO, 2016).

MAPA:

É um estudo experimental e documentado que objetiva demonstrar que o procedimento analítico avaliado é adequado à finalidade proposta, de forma a assegurar a confiabilidade dos resultados obtidos (BRASIL, 2011).

No Brasil há duas agências responsáveis na verificação de competência dos laboratórios de ensaios: a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO). Estes órgãos disponibilizam documentos para orientar a validação de métodos analíticos (RIBANI *et al.*, 2004).

Os parâmetros considerados para a validação de um método analítico podem variar, não há uma regra. Normalmente os ensaios avaliam a seletividade/especificidade, linearidade, faixa de trabalho, repetitividade, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação, recuperação e incerteza (RIBANI *et al.*, 2004; LABANCA, 2015).

No presente trabalho, os parâmetros que serão avaliados são: especificidade, efeito de matriz, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão, recuperação, precisão intermediária, repetitividade e robustez. Estes parâmetros serão definidos a seguir:

2.7.1 Especificidade

A amostra pode conter componentes que interferem no desempenho da medição. A aceitação da especificidade é atribuída à ausência de sinais interferentes no tempo de retenção da substância de interesse (RIBANI *et al.*, 2004).

2.7.1.1 Efeito de matriz

É possível que a amostra contenha componentes que possam interferir no método analítico, comprometendo o resultado da análise. Sendo assim, se faz necessário avaliar a existência do efeito de matriz (INMETRO, 2016).

2.7.2 Linearidade

Capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância analisada, dentro de uma determinada faixa de aplicação. A linearidade de um método pode ser verificada a partir do gráfico do ensaio em função da concentração da substância que está sendo analisada. Para tal, emprega-se a equação de regressão linear, determinada pelo método dos mínimos quadrados. É importante a verificação de valores discrepantes (*outliers*, termo em inglês) e a homocedasticidade dos dados através de tratamentos estatísticos antes mesmo de realizar a regressão linear.

A equação é obtida a partir de uma curva analítica com vários níveis de concentração. A equação da reta (equação 1) relaciona as variáveis x e y . A correlação entre os valores numéricos dessas variáveis são representados pelo coeficiente de correlação (r) e o coeficiente de determinação (R^2). O coeficiente de correlação linear é um bom indicativo do quanto a reta pode ser considerada apropriada como modelo matemático, mas não deve ser o único. A análise de resíduos deve ser avaliada graficamente, observando o comportamento aleatório dos dados (INMETRO, 2016; RIBANI *et al.*, 2004).

$$y = ax + b$$

(Equação 1)

Onde:

y = variável dependente (resposta analítica)

a = coeficiente angular (inclinação da reta)

x = variável independente (concentração do analito)

b = coeficiente linear (interseção)

O valor de r deve ser o mais próximo do valor de 1,0, o que indica menor dispersão dos valores experimentais, garantindo baixa incerteza dos coeficientes de regressão.

Os valores discrepantes ou aberrantes podem ser determinados pelo teste de *Grubbs* (INMETRO, 2016) pela equação (2):

$$G_{\text{calculado}} = \frac{(x_i - \bar{x})}{s}$$

(Equação 2)

Onde:

s = desvio padrão

x_i = valor observado (suspeito de ser aberrante)

\bar{x} = média dos valores obtidos

Os valores do G_{tabelado} são utilizados em função do número de replicatas (n) do experimento e do nível de significância. O critério de aceitação para exclusão é:

$G_{\text{calculado}} < G_{\text{tabelado}} \rightarrow$ o valor não é aberrante;

$G_{\text{calculado}} > G_{\text{tabelado}} \rightarrow$ o valor é considerado aberrante.

A homocedasticidade, igualdade estatística dos desvios-padrão das replicatas em diferentes concentrações, pode ser calculada pelo teste de *Cochran* (equação 3) com nível de significância $p = 0,05$ (95 % de confiança). Caso não se verifique esta igualdade, o método é considerado heterocedástico e o método dos mínimos quadrados ordinários não deve ser empregado (INMETRO, 2016; BRASIL, 2011).

A variância dos resíduos é dada pela diferença entre os valores observados e os estimados ao longo da curva analítica. As variâncias são consideradas homogêneas quando os erros nas medidas são constantes ao longo da curva analítica e quando há variação dos erros medidos são consideradas heterogêneas (BARROS NETO *et al.*, 2002).

$$C_{\text{calculado}} = \frac{S^2_{\text{máx.}}}{\sum S^2}$$

Equação (3)

Onde:

$S^2_{\text{máx.}}$ = variância máxima

$\sum S^2$ = somatório das variâncias

O critério de aceitação é:

$C_{\text{calculado}} < C_{\text{tabelado}} \rightarrow$ homocedástico, não há diferença significativa nas variâncias dos resíduos;

$C_{\text{calculado}} > C_{\text{tabelado}} \rightarrow$ heterocedástico, há diferença significativa nas variâncias dos resíduos (INMETRO, 2016).

2.7.3 Limite de detecção

O limite de detecção (LD) é a concentração mínima detectável, mas não obrigatoriamente quantificada. Indicação do nível em que a detecção do analito pode ser distinguida do sinal do branco e do ruído (RIBANI *et al.*, 2004).

O LD será estimado a partir da equação (4):

$$LD = 3,3 s / b$$

Equação (4)

Onde:

s = desvio padrão da resposta do branco

b = inclinação (coeficiente angular) da curva analítica

2.7.4 Limite de quantificação

O limite de quantificação (LQ) também conhecido como limite de determinação corresponde ao padrão de menor concentração com exceção do branco. Após a determinação do LQ é necessário um teste para verificar se a tendência e a precisão estão satisfatórias. A concentração do analito corresponde ao valor da média do branco mais 5, 6 ou 10 desvios padrão. Entretanto, a maneira mais efetiva é determinar o LQ experimentalmente baseado nos critérios pré-definidos (INMETRO, 2016). O limite de quantificação deve ser estabelecido de acordo com a equação (5):

$$LQ = 10 s / b$$

Equação (5)

Considerar:

s = desvio padrão da resposta do branco

b = inclinação (coeficiente angular) da curva analítica

2.7.5 Exatidão

É o grau de concordância entre os resultados encontrados em um dado ensaio e um valor de referência considerado como verdadeiro (RIBANI *et al.*, 2004). O ensaio de recuperação pode ser utilizado para determinar a exatidão de um método. A recuperação pode ser estimada a partir de amostras fortificadas com o analito em três diferentes concentrações: baixa, média e alta da faixa do método (INMETRO, 2016). O cálculo é dado pela equação (6):

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{Valor observado}}{\text{Valor esperado}} \times 100$$

Equação (6)

2.7.6 Precisão

“Normalmente determinada para circunstâncias específicas de medição e as três maneiras mais comuns de expressá-la são por meio da repetitividade, precisão intermediária e da reprodutibilidade, sendo usualmente expressas pelo desvio padrão e coeficiente de variação” (INMETRO, 2016).

2.7.6.1 Precisão intermediária

É a medida do erro aleatório expresso pela dispersão obtida em uma série de medidas repetidas, sob condições variadas, tais como: diferentes dias ou diferentes analistas ou diferentes equipamentos ou uma combinação dessas variáveis. É necessário determinar o desvio padrão amostral de cada concentração (RIBANI *et al.*, 2004; INMETRO, 2016).

2.7.6.2 Repetitividade

A repetitividade apresenta a variação em torno da média de uma série de amostras preparadas na mesma concentração pelo mesmo analista, mesmo instrumento sob as mesmas condições, mesmo local e no menor espaço de tempo possível. Pode ser determinada por meio da análise de padrões, material de referência ou adição de analito ao branco da amostra. Também é denominada precisão intra-ensaio e pode ser determinada através da estimativa do desvio padrão relativo (RIBANI *et al.*, 2004; INMETRO, 2016).

2.7.7 Robustez

A robustez de um método mede a sensibilidade que este apresenta quando é submetido a pequenas variações (RIBANI *et al.*, 2004). Quanto maior for a robustez menor a variação sob a precisão mesmo sob determinadas alterações analíticas (INMETRO, 2016).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Os procedimentos analíticos descritos nessa dissertação foram realizados no Laboratório Brasileiro de Controle de Dopagem (LBCD) do Instituto de Química da UFRJ, credenciado pelo INMETRO, tanto para ensaios quanto para calibração segundo a norma ISO 17025. O LBCD também é credenciado pela Agência Mundial Antidopagem (AMA) para o controle de dopagem em atletas, pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para análise de resíduos em alimentos e pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para análises toxicológicas. Além disso, o laboratório é acreditado pelo Conselho Regional de Química – Terceira Região para atividades de análise química, físico-química, químico-biológica, toxicológica, bromatológica e legal, padronização e controle de qualidade de produtos químicos; além de vistoria, perícia, avaliação, arbitragem, elaboração de pareceres, laudos e atestados da especialidade.

3.1 SOLVENTES E REAGENTES QUÍMICOS

3.1.1 Solventes

Acetona e metanol foram adquiridos da Tedia (Fairfield, EUA). O acetato de etila utilizado foi da marca Sigma (St. Louis, MO, EUA). Todos os solventes adquiridos e utilizados com grau pesticida para análise de resíduos, *HPLC* ou espectroscópico.

3.1.2 Reagentes químicos

Os reagentes químicos utilizados para o preparo da solução de derivatização foram: o N-metil-N-trimetilsililtrifluoroacetamida (MSTFA) da marca Chem Fabrik (Waldstetten, Alemanha), iodeto de amônio e 2-mercaptoetanol, ambos da Sigma (St. Louis, MO, EUA).

O padrão interno de metasterona foi adquirido do *National Measurement Institute* – NMI (Sidney, Austrália) com pureza de $96,1 \pm 2,4\%$.

3.2 MATERIAIS

3.2.1 Equipamentos

Para o preparo das amostras foram utilizados os seguintes equipamentos: Balança analítica da marca *METTLER TOLEDO*, modelo *XP 205*; Agitador orbital marca *THERMO SCIENTIFIC*, modelo *MAXQ 2000*; Agitador de tubos (vórtex) da *THERMO SCIENTIFIC*, modelo *LP VORTEX MIXER*; Evaporador *BIOTAGE*, modelo *TUBO VAP LV*; Banho seco da *THERMO SCIENTIFIC*, modelo *MULTI BLOCK*; Centrífuga *THERMO SCIENTIFIC*, modelo *HERAEUS MULTIFUGE X3R*; Dessecador a vácuo da marca *THERMO SCIENTIFIC*, modelo *VACUMTHERM*.

Para as análises instrumentais, foram utilizados os equipamentos: Cromatógrafo a gás *AGILENT*, modelo *6890*, acoplado a um espectrômetro de massas triplo quadrupolo modelo *5973*. Este sistema foi equipado com um injetor automático, *AGILENT* modelo *G4513A*.

3.3 PREPARO DAS SOLUÇÕES

3.3.1 Solução padrão estoque de metasterona

A solução padrão estoque de metasterona foi preparada na concentração de 1,000 mg mL⁻¹ em metanol grau pesticida, a partir do padrão de referência. O procedimento desenvolveu-se da seguinte forma: em uma “barquinha” de vidro pesou-se 10,000 mg do padrão de referência em balança analítica com 5 casas decimais de precisão (com a balança devidamente calibrada, e tarada). Depois o padrão foi transferido para um balão de 10,00 mL e o volume foi completado com metanol grau pesticida. A solução resultante foi homogeneizada em vórtex por 20 segundos. Obteve-se assim, 10,00 mL de solução estoque com concentração de 1,000 mg mL⁻¹. A solução foi armazenada em frasco de vidro âmbar com tampa e mantida sob refrigeração a – 20 ° C, com validade de 3 anos.

3.3.2 Solução padrão de trabalho de metasterona

Foi preparada uma solução padrão diluída a partir das soluções padrão estoque.

- **Solução padrão de 10 ng μL^{-1} :** em um balão volumétrico de 10,00 mL, foram adicionados, através de uma pipeta automática e devidamente calibrada, 100 μL da solução padrão estoque de metasterona. O volume foi completado com metanol grau pesticida. A solução resultante foi homogeneizada em agitador vórtex por 20 segundos.

3.3.3 Solução de Padrão Interno

Foi utilizado um padrão interno de metiltestosterona na concentração de 20 ng μL^{-1} . Primeiramente foi feito 2,00 mL de uma solução inicial na concentração de 1 mg mL^{-1} , pesando 2,00 mg do padrão e transferindo para um balão volumétrico de 2,00 mL. Depois, foi feita uma diluição dessa solução inicial: 200 μL foram transferidos para um balão volumétrico de 10,00 mL e o mesmo foi avolumado com metanol.

3.3.4 Solução derivatizante

- **Solução inicial:** Em um frasco de vidro âmbar com tampa, pesou-se 20,00 mg de NH_4I , adicionou-se 1 mL de MSTFA e 60 μL de 2-mercaptoetanol. A mistura foi agitada em vórtex por 20 segundos e aquecida até total solubilização do NH_4I . Armazenou-se em dessecador contendo sílica gel azul.
- **Solução de uso:** Pipetou-se 1 mL, com pipeta graduada de 1 mL, devidamente calibrada, da solução derivatizante inicial e transferiu-se para um frasco de vidro âmbar com tampa. Foram adicionados, com pipeta graduada de 10 mL, devidamente calibrada, 9 mL de MSTFA. Agitou-se em vórtex por 20 segundos. Armazenou-se em dessecador contendo sílica gel azul. A solução derivatizante de uso possui validade de 7 dias.

3.3.5 Branco de amostra (BA)

Branco de amostra são suplementos nutricionais que foram produzidos em um laboratório de manipulação. Foram manipuladas 15 amostras contendo os mesmos excipientes presentes na cápsula dos suplementos analisados. As 15 amostras foram previamente

analisadas e não apresentaram nenhuma substância anabolizante ou qualquer outra substância considerada interferente frente aos analitos monitorados no método de triagem de agentes dopantes em urina utilizada no LBCD. O preparo dos brancos de amostras foi realizado da seguinte forma: uma cápsula de cada branco de amostra foi transferida quantitativamente para um tubo de ensaio de vidro (16 x 125 mm) com tampa, em seguida solubilizada em 5 mL de metanol grau de pureza pesticida e homogeneizado com o auxílio de um agitador de tubos (*vortex*) por 20 segundos. Logo após, os tubos contendo as amostras foram levados ao agitador *shaker* por 5 minutos e centrifugados por 5 minutos a uma força gravitacional de 1512 g. A fração metanólica foi transferida para um novo tubo de ensaio de vidro (16 x 125 mm). Uma alíquota de 1 mL de cada branco de amostra foi retirada e transferida para um outro tubo de ensaio para serem utilizadas no processo de validação. Na Figura 10 está descrito o fluxograma do preparo dos brancos de amostra.

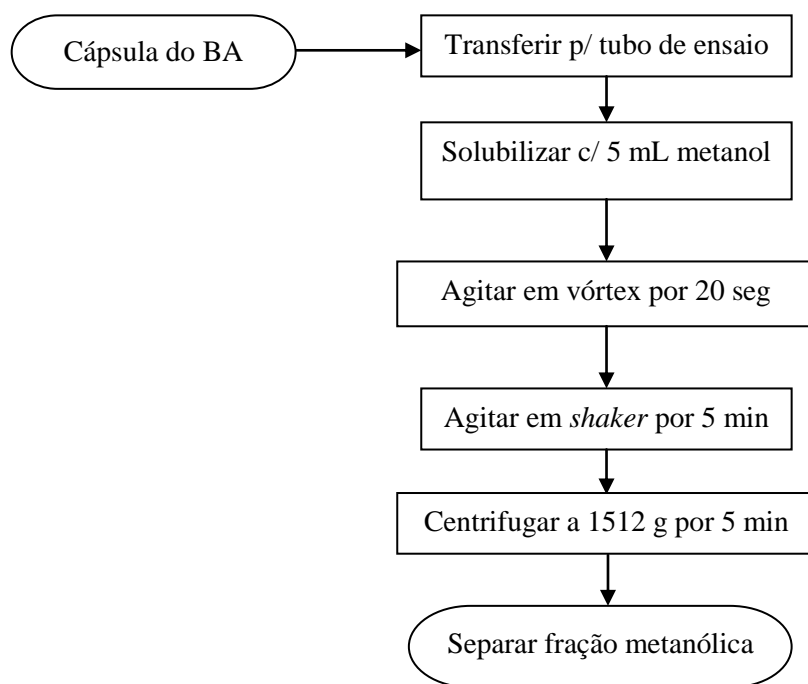


Figura 10: Fluxograma de preparo dos brancos de amostra.

3.4 MÉTODO DE ANÁLISE DE AGENTES DOPANTES EM URINA POR CG-EM/EM

As amostras dos suplementos nutricionais foram analisadas através do método de análise de agentes dopantes em urina humana, denominado método de triagem utilizado na rotina do LBCD. Este método é validado de acordo com as normas do INMETRO e da AMA.

Em urina, o preparo da amostra consiste em: fortificação com padrão interno, hidrólise enzimática com β -glicuronidase de *E. coli*, extração líquido-líquido (ELL) dos compostos livres com o solvente *tert*-butil metil éter em meio alcalino, (pH 9-10) e evaporação do extrato etéreo até a secura. O resíduo final é derivatizado e analisado por CG-EM/EM utilizando o modo de detecção de monitoramento de reações múltiplas.

A solução de padrão interno utilizada no método de triagem (em urina humana) é uma mistura de padrões deuterados denominada de ISTD2. Essa solução é constituída dos seguintes padrões: epitestosterona-D3 (0,75 ng μL^{-1}), testosterona-D3 (3,0 ng μL^{-1}), eticolanolona-D5 (25 ng μL^{-1}), androsterona glicuronídeo-D4 (25 ng μL^{-1}), 5 alfa-androstanodiol (4 ng μL^{-1}) e 5 beta-androstanodiol (9 ng μL^{-1}).

Controles de qualidade são utilizados no método de detecção de anabolizantes em urina humana. O controle de qualidade de alta concentração (CQA) dos esteróides endógenos é o controle positivo de substâncias exógenas. A composição do CQA pode ser visualizada no Anexo 1. O controle de qualidade negativo (CQN) para as substâncias exógenas é preparado a partir de um branco de urina masculina. Antes de ser utilizado na rotina o CQN é avaliado quanto à presença de substâncias proibidas monitoradas pelo método de triagem. Um calibrante de esteróides endógenos denominado CALEndo também é utilizado no método (LBCD, 2017). O método de análise de agentes dopantes por CG-EM/EM em urina humana monitora 162 substâncias.

As condições instrumentais (CG-EM/EM) do método de triagem para análise de anabolizantes em urina humana estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2: Condições da análise cromatográfica do método de triagem em urina.

Instrumento: CG-EM/EM – Método de triagem de análise de agentes dopantes em urina	
Coluna analítica	
Tipo	Capilar, 100% polimetilsiloxano (Ultra-1®, 17 m x 0.2 mm x 0.11 μm ; <i>J&WScientific, Agilent Technologies Inc.</i>)
Gás carreador	Hélio (ultrapuro 99,9999%)
Pressão	9,453 psi
Modo de pressão	Fluxo constante
Fluxo nominal	0,6 mL/min.
<i>Liner</i>	Com divisão de fluxo, 4 mm D.I. com lã de vidro silanizada.

Tabela 2 (Continuação): Condições da análise cromatográfica do método de triagem em urina.

Modo de injeção	Pulsado com divisor de fluxo (“ <i>Pulsed Split</i> ”)
Divisor de fluxo	10:1
Pressão de pulso	50 psi
Tempo de pulso	0,3 min.
Septo	Septo de sangramento baixo
Temperatura do injetor	280 °C
Volume de injeção	3 µL
Programa de temperatura	
Temperatura inicial	140 °C
Tempo	0 min
Razão 1	40 °C/min
Temperatura	180 °C
Razão 2	3 °C/min
Temperatura	230 °C
Razão 3	40 °C/min
Temperatura final	300 °C
Tempo final	2 min
Tempo total de corrida	21,42 min
Tamanho da seringa	10 µL
Solvente A	Acetona
Solvente B	Acetato de etila
Parâmetros EM:	
Tipo de ionização	Ionização eletrônica 70 eV
Temperatura da fonte iônica	<i>Set point</i> 280 °C
Temperatura dos quadropolos (Q1 e Q2)	<i>Set point</i> 150 °C
Temperatura da interface	300 °C
Corrente de emissão	35 µA
Modo de aquisição	MRM e (<i>scan</i>) <i>m/z</i> 50 - 750
Análise dos dados	<i>Enhanced Chem Station software (Agilent Technologies)</i>

3.5 PREPARO DAS AMOSTRAS DE SUPLEMENTOS NUTRICIONAIS

Os suplementos utilizados nesta pesquisa foram adquiridos na cidade do Rio de Janeiro. As 10 amostras receberam as letras do alfabeto como forma de codificação, evitando assim a exposição das marcas e fabricantes. A codificação utilizada foi: “suplemento A”, “suplemento B”, “suplemento C”, “suplemento D”, “suplemento E”, “suplemento F”, “suplemento G”, “suplemento H”, “suplemento I” e “suplemento J”.

Uma cápsula de cada suplemento foi aberta e o conteúdo foi pesado em balança analítica. Cerca de 10,00 mg de cada amostra foi pesada em balança analítica e transferida quantitativamente para um tubo de ensaio de vidro (16 x 125 mm) com tampa. Logo após, foi adicionado 5 mL de metanol grau de pureza pesticida e homogeneizado com o auxílio de um agitador de tubos (*vortex*) por 20 segundos. Foi adicionado 50 µL da solução de padrão interno (testosterona-D3), obtendo a concentração final de 10 ng mL⁻¹. A mistura foi homogeneizada em *vortex* por 20 segundos. Em seguida, os tubos contendo as amostras foram levados ao agitador *shaker* por 5 minutos e centrifugados por 5 minutos a uma força gravitacional de 1512 g. A fração metanólica foi transferida para um novo tubo de ensaio de vidro (16 x 125 mm). Uma alíquota de 1 mL de cada amostra foi retirada e transferida para um outro tubo de ensaio. As alíquotas foram evaporadas com fluxo de nitrogênio a 40 °C durante 10 minutos. Em seguida, as amostras foram acondicionadas no dessecador a vácuo a temperatura ambiente por 30 minutos, derivatizadas com 100 µL de solução derivatizante composta de N-metil-N-trimetilsililtrifluoroacetamida, iodeto de amônio e 2-mercaptoetanol (MSTFA/NH₄I/2-mercaptoetanol, 1000:2:6, v:p:v) e submetidas ao aquecimento a 60°C por 20 minutos por meio de um banho seco (PEREIRA *et al.*,2002). As amostras foram transferidas com pipeta *Pasteur* para um tubo *vial* e o volume de 3 µL foi injetado no cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massas com analisador do tipo triplo quadrupolo (CG-EM/EM). Os espectros de massas foram adquiridos no modo de detecção de monitoramento de reações múltiplas (MRM), mesmo método de análise de agentes dopantes em urina por CG-EM/EM utilizado no LBCD, e no modo de varredura total de íons (*scan*) na faixa de *m/z* 50-700. Na Figura 11, está apresentado o fluxograma com as etapas do processo de preparação das amostras.

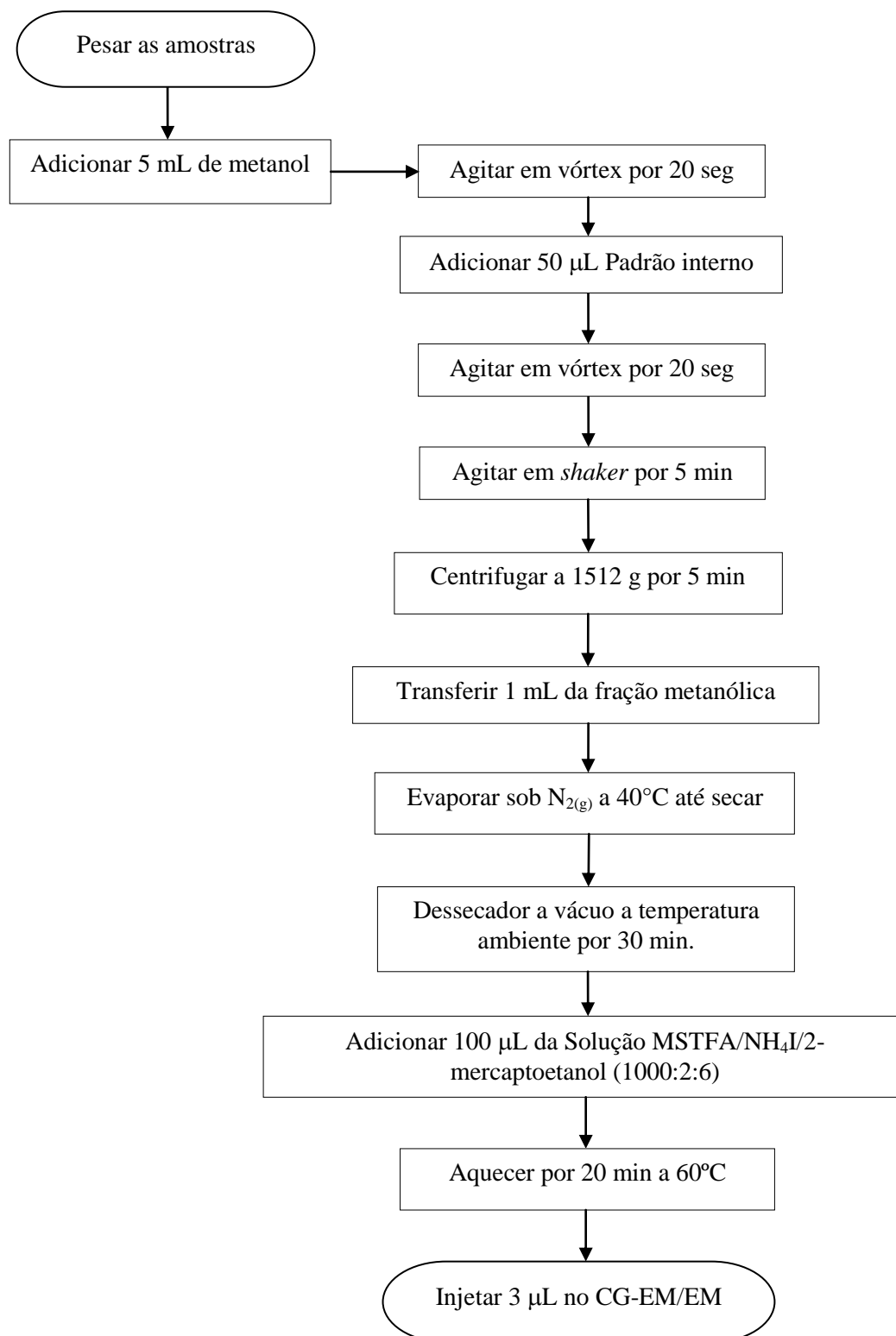


Figura 11: Fluxograma das etapas do preparo das amostras.

3.6 PROTOCOLO DE VALIDAÇÃO PARA ANÁLISE QUANTITATIVA

O protocolo de validação de métodos para análise quantitativa envolve uma série de experimentos. Os procedimentos foram realizados em dois dias consecutivos onde foram avaliados os seguintes parâmetros: especificidade, efeito de matriz, linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), exatidão, repetitividade, precisão intermediária e robustez.

3.6.1 Curvas analíticas

Foram preparadas quatro curvas analíticas. A curva analítica 1 foi preparada em solvente (metanol) e as curvas analíticas 2, 3 e 4 foram preparadas em branco de amostra. Com exceção da curva analítica 3 (em simplicata), as demais foram preparadas em triplicata. Para o preparo das curvas de calibração foi utilizada uma solução padrão de metasterona na concentração inicial de $10 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$.

Nas Tabelas 3 e 4 é possível evidenciar as concentrações e os volumes da solução padrão de metasterona e PI que foram adicionados para o preparo das curvas analíticas.

Tabela 3: Concentrações e volumes utilizados na curva analítica 1.

Curva analítica 1 em solvente (metanol)				
Conc. metasterona (ng mL^{-1})	Vol. metasterona (μL)	Conc. PI (ng mL^{-1})	Vol. de PI (μL)	Vol. de solvente (μL)
250	25	250	12,5	1000
500	50	250	12,5	1000
750	75	250	12,5	1000
1000	100	250	12,5	1000
1250	125	250	12,5	1000

Tabela 4: Concentrações e volumes utilizados nas curvas analíticas 2, 3 e 4.

Curva analítica em Branco de Amostra (BA) – Curva 2, 3 e 4				
Conc. metasterona (ng mL⁻¹)	Vol. metasterona (µL)	Conc. PI (ng mL⁻¹)	Vol. de PI (µL)	Vol. de BA (µL)
250	25	250	12,5	1000
500	50	250	12,5	1000
750	75	250	12,5	1000
1000	100	250	12,5	1000
1250	125	250	12,5	1000
1500	150	250	12,5	1000

No preparo da curva analítica 1 após a fortificação descrita na Tabela 3, os tubos foram submetidos a evaporação sob fluxo de N_{2(g)} a 40 °C por 10 minutos até a secura. Em seguida, foram para o dessecador e mantidos por 30 minutos. A derivatização se deu com a adição de 100 µL de solução derivatizante composta de MSTFA/NH₄I/2-mercaptoetanol (1000:2:6, v:p:v) e submetidas ao aquecimento a 60 °C por 20 minutos por meio de um banho seco. A análise foi realizada no CG-EM/EM no modo MRM.

As curvas analíticas 2, 3 e 4 foram preparadas a partir dos brancos de amostra. O preparo está descrito no fluxograma ilustrado na Figura 10. Em seguida, foi realizada a fortificação dos níveis da curva como está descrito na Tabela 4. Após a fortificação, as curvas foram submetidas ao mesmo processo descrito no parágrafo anterior, ou seja, evaporação, derivatização e análise no CG-EM/EM no modo MRM.

3.6.2 Especificidade/Efeito de matriz

A avaliação da especificidade foi realizada a partir da comparação do branco de amostra sem a presença do analito (metasterona) e do padrão interno (metiltestosterona), com um branco de amostra contendo o analito e o padrão interno. Para isso, foram analisados cinco brancos de amostra sem a adição do analito e do padrão interno e um branco de amostra contendo o analito na concentração de 750 ng mL⁻¹ e o padrão interno a 250 ng mL⁻¹. Os brancos de amostra utilizados foram preparados de acordo com o item 3.3.5 (Figura 10). A fortificação com a solução padrão de metasterona foi realizada com a adição de 75 µL da

solução de uso (concentração inicial de 10 ng μL^{-1}) e 25 μL de metiltestosterona (concentração inicial de 1 ng μL^{-1}) em 1000 μL de BA. Os tubos foram submetidos a evaporação sob fluxo de $\text{N}_{2(\text{g})}$ a 40 °C por 10 minutos até a secura. Em seguida, foram para o dessecador e mantidos por 30 minutos. A derivatização se deu com a adição de 100 μL de solução derivatizante composta de MSTFA/ NH_4I /2-mercaptoetanol (1000:2:6, v:p:v) e submetidas ao aquecimento a 60 °C por 20 minutos por meio de um banho seco. A análise foi realizada no CG-EM/EM no método de quantificação de metasterona em suplemento nutricional.

O estudo de efeito de matriz foi realizado a partir da preparação de duas curvas analíticas. Uma curva em triplicata com cinco níveis de concentração preparada em metanol (curva analítica 1) e outra com seis níveis de concentração preparada em branco de amostra (matriz). As leituras das curvas analíticas foram comparadas a fim de verificar se a matriz causaria interferência, aumentando ou diminuindo o sinal do analito. Para a verificação da existência de valores aberrantes (*outlier*) foi empregado o teste de *Grubbs*, considerando-se a média e o desvio padrão de cada nível da curva de calibração. O cálculo do teste de *Grubbs* foi determinado pela equação (2).

O teste *F* (*Snedecor*) de homogeneidade das variâncias por nível de concentração foi realizado para a avaliação do efeito de matriz. O cálculo foi realizado no *software* Excel®. Para a realização do teste de *F* foi utilizada a equação (7).

$$F_{\text{calculado}} = \frac{s_{\text{res1}}^2}{s_{\text{res2}}^2} \quad (\text{Equação 7})$$

Onde:

s_{res1}^2 = estimativa do desvio padrão residual da curva 1 ($S_1 > S_2$)

s_{res2}^2 = estimativa do desvio padrão residual da curva 2

Para dar continuidade na avaliação do efeito de matriz, foi realizada a comparação da inclinação das retas das curvas analíticas 1 e 2. Esta comparação foi realizada por meio do teste *t* (*Student*). O cálculo foi realizado no *software* Excel®.

$$t = \frac{b_{11} - b_{12}}{\sqrt{s^2_{b_{11}} + s^2_{b_{12}}}}$$

(Equação 8)

Onde:

b_{11} = coeficiente angular da reta 1

b_{12} = coeficiente angular da reta 2

$s^2_{b_{11}}$ = variância agrupada da reta 1

$s^2_{b_{12}}$ = variância agrupada da reta 2

3.6.3 Linearidade

A linearidade não pode ser avaliada apenas pela análise da curva de calibração. Antes da regressão linear, foi verificada a ausência de valores aberrantes e a homocedasticidade dos dados. A verificação de valores aberrantes foi realizada utilizando o teste de *Grubbs* (equação 2). As curvas analíticas foram construídas utilizando o método dos mínimos quadrados ordinários, obtendo a faixa de trabalho, as equações da reta e os coeficientes de correlação (r) e determinação (R^2). Foi realizado o teste de *Cochran* (equação 3) para verificar a homocedasticidade das curvas analíticas.

3.6.4 Limite de detecção (LD) e Limite de quantificação (LQ)

Os cálculos foram realizados a partir da média dos coeficientes angulares das três curvas analíticas preparadas em matriz (curvas 1, 3 e 4).

O LD estimado foi determinado a partir da equação (4) e o LQ pela equação (5). Cabe ressaltar que para o valor do “ s ” da equação, foi adotado o sinal do desvio padrão do menor nível (250 ng mL^{-1}) das curvas analíticas preparadas em matriz. O mesmo foi adotado no cálculo do LQ estimado.

3.6.5 Exatidão

A avaliação da exatidão foi realizada pelo estudo da recuperação, repetitividade e precisão intermediária.

No ensaio de recuperação e repetitividade do analito, foram analisados dez brancos de amostra fortificados com o padrão de metasterona (concentração final de 1000 ng mL⁻¹) e metiltestosterona na concentração de 250 ng mL⁻¹. A concentração de metasterona foi lida na curva analítica 2 preparada em matriz. Todos os procedimentos para avaliação de valores discrepantes, homocedasticidade, linearidade e análise de resíduos da curva estão descritos no item 4.2.2. O teste de *Grubbs*, equação (2), foi aplicado às respostas cromatográficas com o objetivo de detectar algum *outlier*.

A recuperação foi calculada segundo a equação (6) utilizando o *software* Excel[®]. Para a avaliação da repetitividade, o critério de aceitação adotado foi o coeficiente de variação (CV) inferior a 11 % (AOAC, 2016).

No estudo da precisão intermediária, foram analisados dez brancos de amostra fortificados com metasterona a 1000 ng mL⁻¹ e metiltestosterona a 250 ng mL⁻¹ em um dia subsequente ao estudo de recuperação e repetitividade e executado por um analista diferente. Para a avaliação deste parâmetro, foi preparada uma curva analítica em matriz (curva analítica 3) com seis níveis de concentração em simplicata.

3.6.6 Robustez

A avaliação da robustez foi realizada através da análise de três brancos de amostra fortificados com o analito a 1000 ng mL⁻¹ e padrão interno a 250 ng mL⁻¹. A fortificação foi realizada com a adição de 100 µL da solução de uso de metasterona (concentração inicial de 10 ng µL⁻¹) e 25 µL de metiltestosterona (concentração inicial de 1 ng µL⁻¹) em 1000 µL de BA. Os tubos foram submetidos a evaporação sob fluxo de N_{2(g)} a 40 °C por 10 minutos até a secura. Em seguida, foram para o dessecador e mantidos por 30 minutos. A derivatização se deu com a adição de 100 µL de solução derivatizante composta de MSTFA/NH₄I/2-mercaptoetanol (1000:2:6, v:p:v) e submetidas ao aquecimento a 60 °C por 20 minutos por meio de um banho seco. A análise foi realizada no CG-EM/EM no modo de MRM.

Outro conjunto de três brancos de amostra foi fortificado com o analito e padrão interno e preparado de acordo com a descrição acima, com uma modificação analítica: o tempo de derivatização. Na referida etapa, as amostras foram submetidas ao aquecimento a 60 °C durante 40 minutos por meio do banho seco. As amostras foram transferidas com pipeta *Pasteur* para um tubo *vial* e o volume de 1 µL foi injetado no CG-EM/EM no modo MRM.

Para calcular a concentração de metasterona foi utilizada a curva analítica 3, a mesma curva utilizada na avaliação da precisão intermediária. Os cálculos foram realizados com o auxílio do *software* Excel[®].

As condições cromatográficas do método de quantificação de metasterona em suplemento nutricional estão descritas na Tabela 5.

Tabela 5: Condições cromatográficas do método de quantificação de metasterona em suplemento nutricional.

Instrumento: CG-EM/EM – Método de quantificação de metasterona em suplemento	
Coluna analítica	
Tipo	Capilar, 100% polimetilsiloxano (Ultra-1®, 17 m x 0.2 mm x 0.11 µm; <i>J&WScientific, Agilent Technologies Inc.</i>)
Gás carreador	Hélio (ultrapuro 99,9999%)
Pressão	9,453 psi
Modo de pressão	Fluxo constante
Fluxo nominal	0,6 mL/min.
<i>Liner</i>	Com divisão de fluxo, 4 mm D.I. c/ lâ de vidro silanizada.
Modo de injeção	Pulsado com divisor de fluxo (“ <i>Pulsed Split</i> ”)
Divisor de fluxo	10:1
Pressão de pulso	50 psi
Tempo de pulso	0,3 min.
Septo	Septo de sangramento baixo
Temperatura do injetor	280 °C
Volume de injeção	1 µL
Programa de temperatura	
Temperatura inicial	140 °C
Tempo	0 min
Razão 1	40 °C/min
Temperatura	180 °C
Razão 2	3 °C/min
Temperatura	230 °C
Razão 3	40 °C/min
Temperatura final	300 °C
Tempo final	2 min
Tempo total de corrida	21,42 min
Tamanho da seringa	10 µL
Solvente A	Acetona
Solvente B	Acetato de etila
Parâmetros EM:	
Tipo de ionização	Ionização eletrônica 70 eV

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ANÁLISE DOS SUPLEMENTOS NUTRICIONAIS

As dez amostras de suplementos nutricionais foram analisadas pelo método de monitoramento de agentes dopantes por CG-EM/EM em matriz de urina humana utilizado na rotina do LBCD. Além das amostras de suplementos foi analisado o controle de qualidade negativo (CQN) e o controle de qualidade de alta concentração (CQA).

É importante ressaltar que o preparo das amostras de suplemento é mais simples e rápido se comparado à extração de urina humana. A comparação dos métodos de preparo das amostras de suplemento e urina humana está descrita na Tabela 6.

Tabela 6: Comparação dos métodos de preparo de urina humana e suplementos.

Preparo de urina humana	Preparo de suplementos nutricionais
Fortificação com PI	Pesagem da amostra
Adição de Tampão Fosfato de sódio 0,8 M pH 7,0	Adição de metanol
Adição de enzima β -glicuronidase de <i>E. coli</i>	Adição do PI
Agitação em <i>vortex</i>	Agitação em <i>vortex</i>
Hidrólise por 1 hora a 50 °C	Agitação em <i>shaker</i>
Adição de Tampão Carbonato/Bicarbonato de Sódio – pH 10	Centrifugação
Adição de TBME	Separação da fração metanólica
Centrifugação	Evaporação sob N _{2(g)}
Separação da fase orgânica	Dessecador a vácuo por 30 min.
Evaporação sob N _{2(g)}	Derivatização / Aquecimento
Dessecador a vácuo por 30 min.	Injeção no CG-EM/EM
Derivatização / Aquecimento	---
Injeção no CG-EM/EM	---

O método de monitoramento de agentes dopantes em urina monitora 162 substâncias de diversas classes, dentre as quais destacam-se anabolizantes, narcóticos, canabinóides, beta-bloqueadores, entre outros. Para a análise dos suplementos nutricionais foram retirados os

metabólitos do método de aquisição, já que estas substâncias não são encontradas em suplementos. Sendo assim, o método monitorou 78 substâncias descritas na Tabela 7:

Tabela 7: Substâncias avaliadas no método de monitoramento de agentes dopantes.

Composto	t_R (min)	Íon Precursor (m/z)	Íon Produto (m/z)
Terbutalina	3,15	356	355
		356	267
Etamivan	3,13	295	265
		295	223
		294	264
		294	249
Salbutamol	3,81	369	207
		369	191
		369	163
Oxilofrina/Etilefrina	2,34	382	147
		130	45
		130	43
Mabuterol	2,73	369	334
		369	261
Norfenefrina	3,43	174	86
		174	100
		174	59
Carfedon	3,68	272	229
		272	198
		272	104
		257	229
Clenbuterol	4,48	335	227
		335	300
		337	227
		337	229
		337	302
Octopamina	3,95	174	100
		174	86
		174	59
Androstenol-16	5,5	241	145
		241	159

Tabela 7 (Continuação): Substâncias avaliadas no método de monitoramento de agentes dopantes.

Brombuterol	6,21	427	273
		427	346
		425	352
		425	273
		425	271
Probenicida	6,54	328	103
		328	257
		328	193
Metadona	6,05	296	281
		296	191
Zilpaterol	7,38	291	219
		308	217
		308	203
		308	218
Desoximetiltestosterona	8,23	345	255
		345	201
Aminoglutetimida	8,66	520	491
Codeína	9,08	371	229
		371	234
Etilestrenol	9,25	241	185
		241	145
		270	241
		331	241
Carteolol	9,41	421	220
		421	365
		436	379
		436	235
Mono TMS Androsterona	9,45	347	253
		272	257
5 beta-diona	6,61	290	275
		290	185
		290	155
		432	417
Hidromorfona	10,14	429	234
		429	357
Oxicodona	10,33	459	368
		459	312
Morfina	10,45	429	287
		429	220

Tabela 7 (Continuação): Substâncias avaliadas no método de monitoramento de agentes dopantes.

Bolandioli	11,55	420	240
		330	225
		330	240
Androsterona/Etiocolanolona	10,91	434	329
		434	239
1-Androstenodiona	12,04	194	179
		415	193
		415	221
5a/b-androstano-3a,17b-diol	11,27	256	157
		256	185
Oximorfona	11,56	517	502
		517	412
		517	355
		502	70
Efaproxiral	12,26	326	160
		485	326
Bambuterol	12,37	354	72
		354	282
1-Testosterona	12,39	194	105
		432	206
		432	194
DHEA/Prasterona	12,18	432	327
		432	237
16,16,17-D3 Epitestosterona	12,66	435	209
		435	330
Boldiona	12,9	428	191
		428	323
		428	206
1-Androstenodioli	12,55	434	405
		434	377
		405	167
DHT	12,93	434	195
		434	182
Boldenona	13,28	430	206
		430	191
Estemبولona	13,4	446	208
		446	193

Tabela 7 (Continuação): Substâncias avaliadas no método de monitoramento de agentes dopantes.

Metenolona	14,18	208	119
		446	195
		446	179
		446	208
Metil-1-Testosterona	14,18	446	206
		356	206
		356	192
16,16,17-D3 Testosterone	13,50	435	209
		435	330
Epitestosterona	12,69	432	327
		432	209
Testosterona	13,51	432	209
		432	327
Drostanolona	13,85	448	405
		448	433
		405	167
11b-OH-androsterona	13,9	522	417
		522	507
11b-OH-Etiocolanolona	14,14	522	417
		522	507
Metandriol	14,27	268	197
		358	253
Mestanolona	14,67	318	127
		448	216
		448	419
Mibolona	14,74	446	431
		446	341
		446	301
Metildienolona	15,25	430	285
		430	340
Metil-P	15,32	446	301
		446	198
Calusterona	15,74	460	445
		460	355
		460	315
		355	183
		445	355
Metasterona	15,62	462	141
		462	156

Tabela 7 (Continuação): Substâncias avaliadas no método de monitoramento de agentes dopantes.

Oxandrolona	15,66	308	176
		363	273
		363	213
		363	161
Metilestebolona	15,1	460	220
		460	208
		460	193
Bolasterona	15,55	460	445
		460	315
		445	225
Etisterona	15,77	456	301
		456	316
Metandienona	14,98	206	191
		206	165
		444	206
		444	191
Pregnanodiol	15,86	117	73
		117	91
		117	58
Oxabolona	16,29	506	147
		506	195
		506	93
Triantereno	16,94	454	171
		454	340
		454	297
Formestano	17,11	518	221
		518	190
4OH-Testosterona	17,51	520	431
		520	225
Zeranol	17,2	433	295
		433	309
Norclostebol	17,27	452	216
		452	321
Taleranol	17,51	433	295
		433	309

Tabela 7 (Continuação): Substâncias avaliadas no método de monitoramento de agentes dopantes.

Fenoterol Penta-TMS	18,36	308	207
		308	179
DHCMT	18,42	240	225
		240	189
		478	240
		478	225
Norboletona	18,45	460	301
		460	370
		460	341
Fluoximesterona	18,5	552	462
		552	407
		552	357
		552	319
Oximesterona	18,57	389	301
Finasterida	18,55	444	429
		444	142
4OH-Tamoxifeno	18,82	459	72
		459	58
Oximesterona	18,57	534	444
		534	389
		534	355
		534	239
Norbuprenorfina	20,11	524	102
		524	468

A avaliação do resultado foi feita a partir da comparação dos cromatogramas de íons da janela de aquisição do analito na amostra com o controle de qualidade negativo (CQN) e o controle de qualidade positivo (CQA). O tempo de retenção do padrão interno utilizado no método de triagem (testosterona-D3) não diferiu em +/- 0,3 minutos do valor esperado, assim como a sua abundância. Os cromatogramas do CQA, do “suplemento B” e do padrão interno (testosterona-D3) encontram-se nas Figuras 12 e 13 respectivamente.

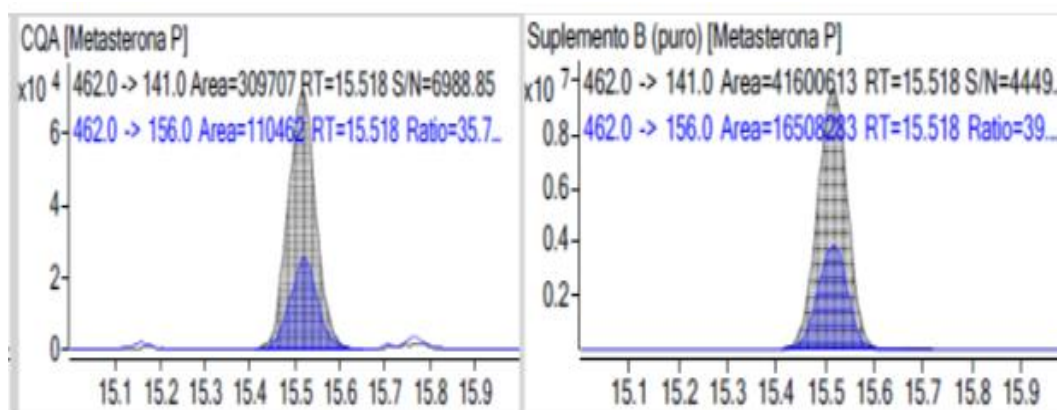


Figura 12: Cromatogramas do CQA e do “suplemento B”.

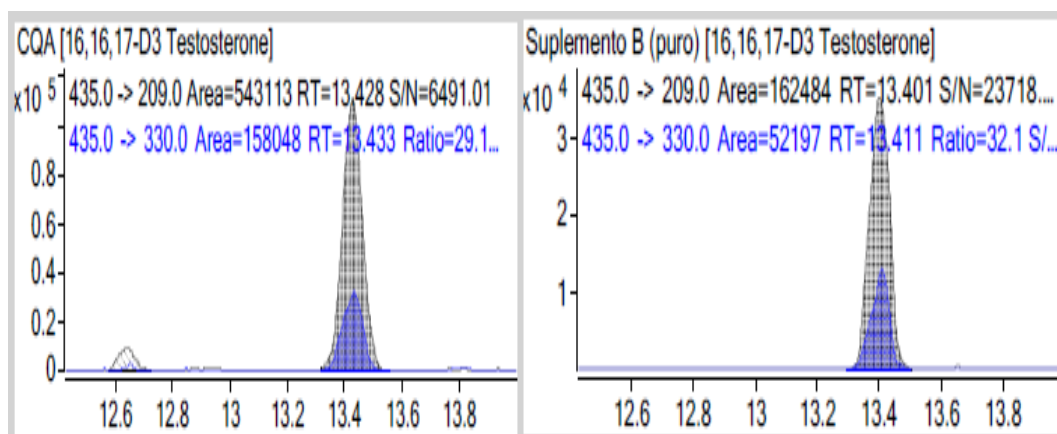


Figura 13: Cromatogramas do CQA e do “suplemento B” com padrão interno.

Das dez amostras analisadas por CG-EM/EM utilizando o método de monitoramento de análise de agentes dopantes do LBCD, apenas uma amostra (“suplemento B”) foi detectada a presença do anabolizante metasterona. No rótulo do “suplemento B” está descrito que cada cápsula contém 10 mg de metasterona. O espectro de massa do derivado trimetilsilila (OTMS) da metasterona detectado na cápsula do “suplemento B” está apresentado na Figura 14.

O íon molecular em m/z 462 está de acordo com a massa esperada para o derivado OTMS da metasterona e a fragmentação do anel D leva à formação do íon m/z 143 o que é característico da fragmentação de esteroides 17-metil,17-hidroxilados (FRAGKAKI *et al.*, 2009b) além do íon m/z 332 o qual também é proveniente da fragmentação do anel D. O íon m/z 73 é um fragmento presente em derivados TMS.

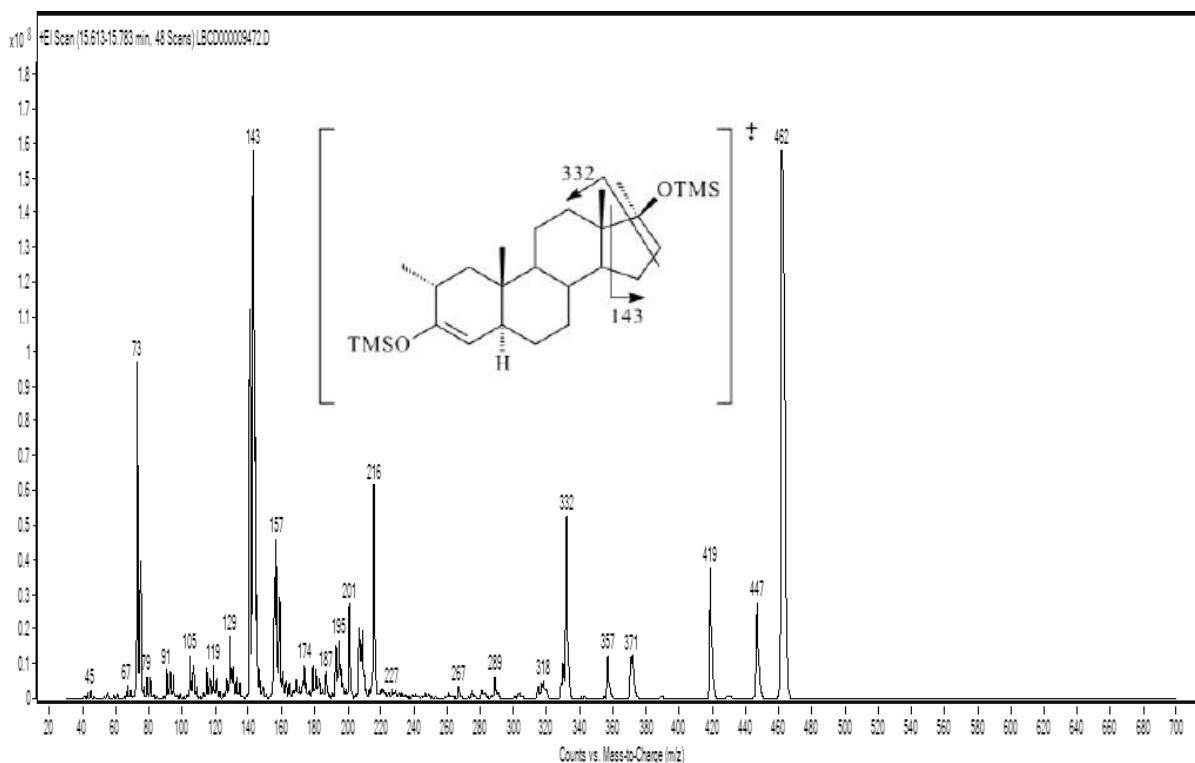


Figura 14: Espectro de massas da metasterona presente no “suplemento B”.

A partir da análise dos suplementos nutricionais pelo método de triagem de agentes anabolizantes em urina por CG-EM/EM, foi desenvolvido um método para quantificar metasterona em suplementos nutricionais. Com base na revisão bibliográfica dos diferentes métodos existentes na literatura, foi realizada a validação de um método quantitativo utilizando a CG-EM/EM.

Para o processo de validação do método foi seguido o documento orientativo sobre métodos analíticos do INMETRO DOQ-CGCRE-008, revisão 05, de agosto de 2016.

4.2 VALIDAÇÃO QUANTITATIVA DO MÉTODO ANALÍTICO

4.2.1 Especificidade/Efeito de matriz

Após a análise dos cromatogramas não foram detectados sinais interferentes no tempo de retenção da metasterona (t_R 15,62 minutos), conforme pode ser verificado na Figura 15.

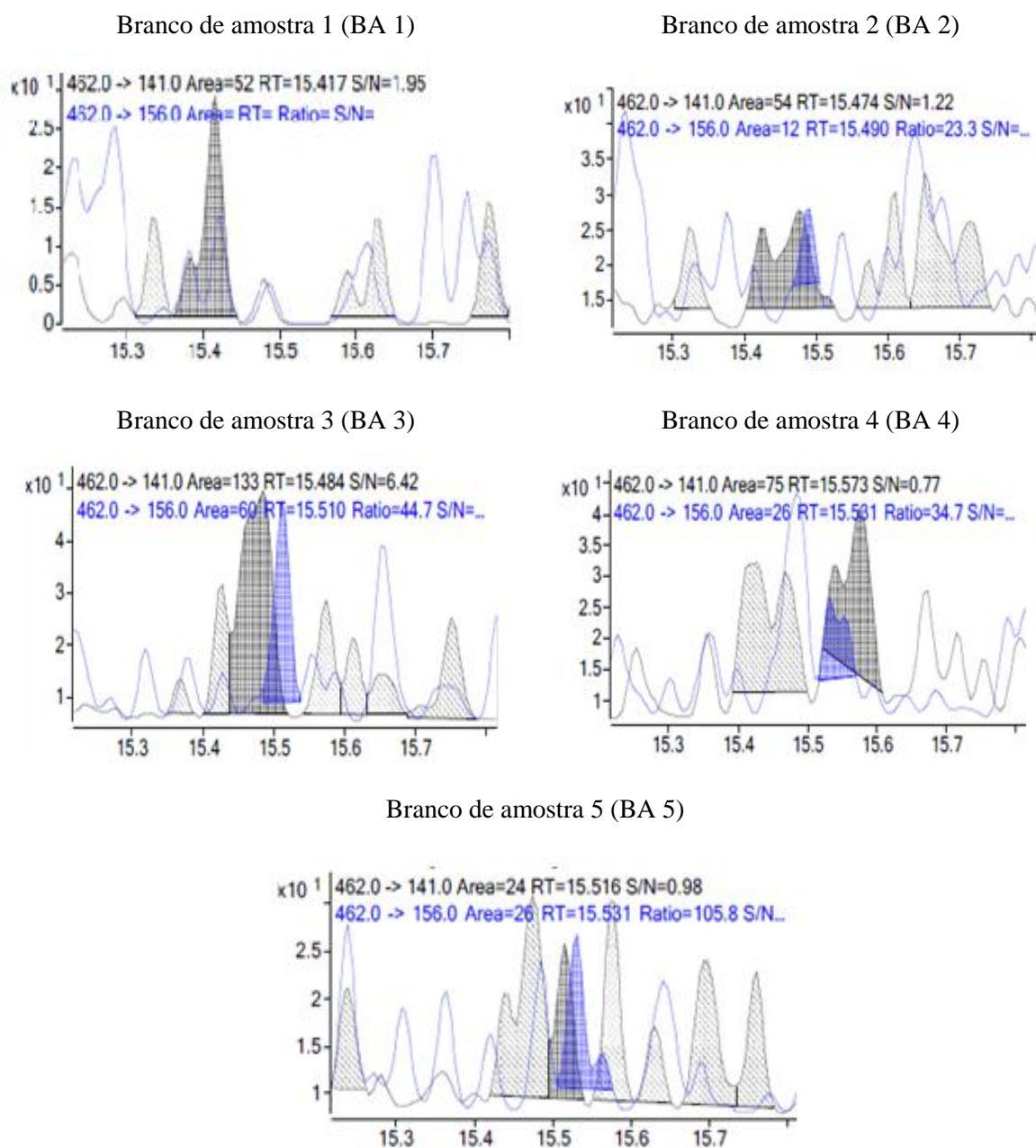


Figura 15: Cromatogramas para avaliação da especificidade.

Na Figura 16, pode ser verificado o cromatograma de um branco de amostra fortificado com metasterona e o padrão interno metiltestosterona. É possível evidenciar a metasterona próxima ao tempo de retenção característico.

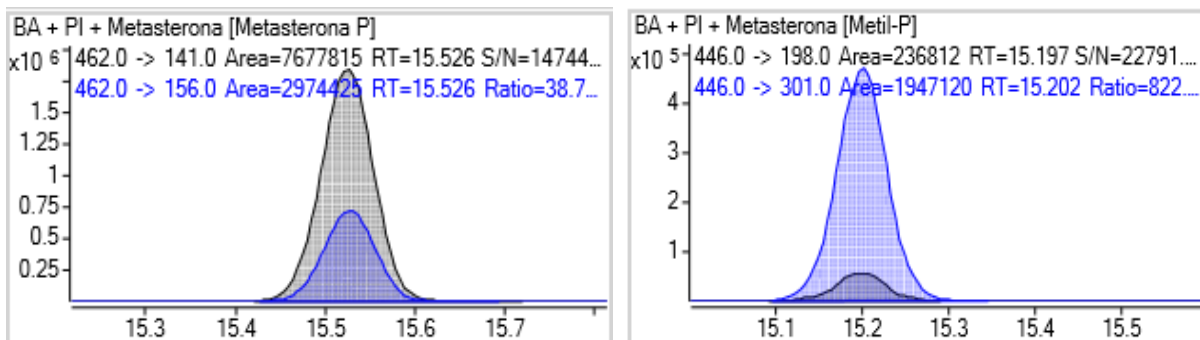


Figura 16: Cromatograma do BA fortificado com metasterona (à esquerda) e metiltestosterona (à direita).

Através do teste de *Grubbs* foi verificado que não houve valor discrepante nas leituras das duas curvas analíticas. Todos os valores do G calculado (G_{calc}) foram menores que o de G tabelado (G_{tab}). Para os três números de medidas, o valor do G_{tab} é de 1,153 para 5% de nível de significância.

Tabela 8: Resultado do teste de *Grubbs* para a curva analítica 1 (solvente).

Média Analito/PI	Desvio padrão A/PI	G_{calc} ($G_{tab} = 1,153$)	Conclusão
1,8309	0,0818	0,190	OK
		0,892	OK
		1,081	OK
5,8309	0,3251	1,103	OK
		0,847	OK
		0,257	OK
10,9710	0,4336	0,986	OK
		0,028	OK
		1,013	OK
17,0622	0,7367	0,258	OK
		0,845	OK
		1,104	OK
25,0872	0,6607	0,116	OK
		1,053	OK
		0,937	OK

Tabela 9: Resultado do teste de *Grubbs* para a curva analítica 2 (matriz).

Média Analito/PI	Desvio padrão A/PI	G_{calc} ($G_{\text{tab}} = 1,153$)	Conclusão
0,7754	0,0145	1,140	OK
		0,729	OK
		0,411	OK
2,4842	0,2939	0,025	OK
		0,987	OK
		1,012	OK
3,9563	0,1416	0,718	OK
		0,424	OK
		1,142	OK
6,0517	0,2163	0,735	OK
		1,139	OK
		0,404	OK
7,8491	0,6030	0,662	OK
		1,150	OK
		0,488	OK
10,1167	0,6286	0,846	OK
		1,104	OK
		0,257	OK

O teste F (*Snedecor*) de homogeneidade das variâncias por nível de concentração foi realizado para a avaliação do efeito de matriz. O cálculo foi realizado no *software* Excel®. Na Tabela 10 encontra-se o resultado do teste F .

Tabela 10: Resultado do teste F para a avaliação do efeito de matriz.

F_{tabelado}	$F_{\text{calculado}}$
2,51	9,63

O valor do $F_{\text{calculado}}$ é maior que o F_{tabelado} , o que indica que as variâncias residuais das curvas analíticas preparadas em solvente e matriz são estatisticamente diferentes. O nível de significância considerado foi de 95%.

A comparação da inclinação das retas das curvas analíticas 1 e 2. Esta comparação foi realizada por meio do teste t (*Student*). Na Tabela 11 encontra-se o resultado do teste t .

Tabela 11: Resultado do teste t (*Student*) para avaliação do efeito de matriz.

t'	$t_{\text{calculado}}$
2,15	0,32

Cabe ressaltar que foi realizado o cálculo do t' . Este cálculo foi utilizado porque as variâncias residuais das curvas foram diferentes estatisticamente. A equação (9) demonstra como foi realizado o cálculo.

$$t' = \frac{t_1 s^2 b_{11} + t_2 s^2 b_{12}}{s^2 b_{11} + s^2 b_{12}}$$

(Equação 9)

Onde:

b_{11} = coeficiente angular da reta 1

b_{12} = coeficiente angular da reta 2

t_1 = t_{tabelado} para (n_1-2) graus de liberdade

t_2 = t_{tabelado} para (n_2-2) graus de liberdade

$s^2 b_{11}$ = variância agrupada da reta 1

$s^2 b_{12}$ = variância agrupada da reta 2

Foi realizada a comparação dos valores do t' e $t_{\text{calculado}}$. O valor do t' é maior que o $t_{\text{calculado}}$. Sendo assim, é possível concluir que os coeficientes angulares das duas curvas são estatisticamente diferentes. Deste modo, como as variâncias das curvas analíticas foram estatisticamente diferentes (Tabela 10) assim como as inclinações das curvas analíticas (Tabela 11), pode-se afirmar que a matriz causa efeito sobre a precisão por nível de concentração, ou seja, há efeito de matriz no método analítico. Portanto, todo o procedimento analítico foi preparado na matriz.

4.2.2 Linearidade

Após o cálculo de verificação de *outliers*, foi realizado o teste de *Cochran* (equação 3) para verificar a homocedasticidade das curvas analíticas. Os resultados encontram-se na Tabela 12.

Tabela 12: Resultados do teste de *Cochran* calculados para curva analítica 1 e 2.

Tipo de curva	Valor $C_{\text{calc.}}$	Valor $C_{\text{tab.}}$	Resultado
Solvente	0,4241	0,6838	Homocedástico
Matriz	0,4332	0,6161	Homocedástico

Pelo teste de *Cochran* verifica-se que os valores do $C_{\text{calculado}}$ são menores que o C_{tabelado} . Sendo assim, pode-se dizer que tanto a curva preparada em matriz quanto a curva em solvente apresentam comportamento homocedástico.

As Figuras 17 e 18 mostram as curvas 1 e 2, seus coeficientes de correlação e as respectivas equações da reta.

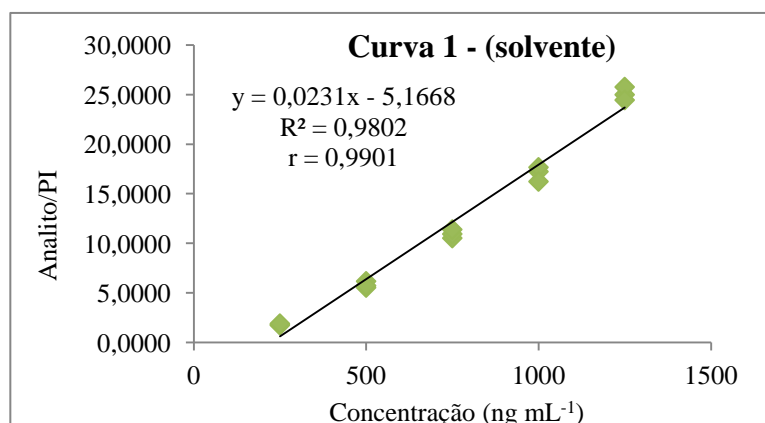


Figura 17: Curva analítica 1 (em solvente).

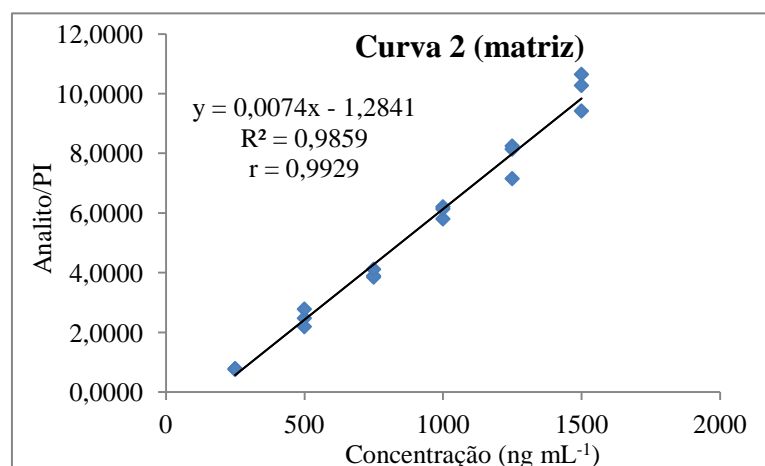


Figura 18: Curva analítica 2 (em matriz).

Como podem ser observados nas Figuras 17 e 18, os coeficientes de correlação linear (r) para as duas curvas foram maiores que 0,99.

Conforme os dados adquiridos das curvas analíticas, equações da reta, r e R^2 , concluiu-se que o modelo de regressão linear utilizado no método foi satisfatório.

Os resíduos (diferença entre o valor observado e o valor calculado pela equação da reta para cada valor de x) também foram calculados. Os resíduos e coeficiente de correlação linear são indispensáveis para a avaliação da linearidade do método.

Pode ser observado na Figura 19 que os resíduos apresentam um comportamento aleatório, não havendo nenhum tipo de tendência, demonstrando que o modelo linear é adequado.

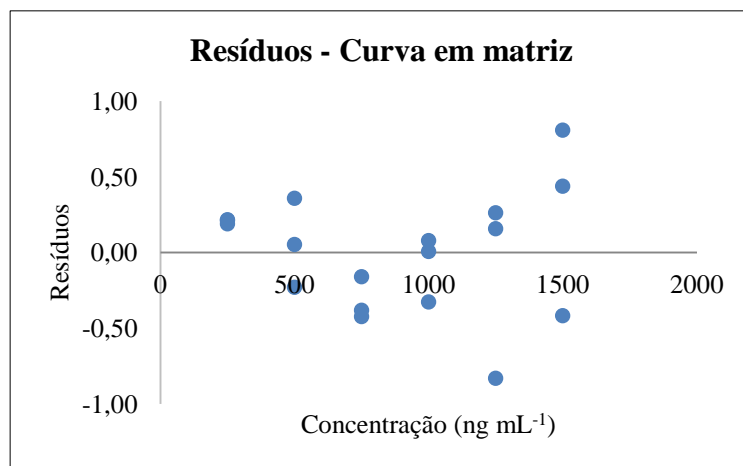


Figura 19: Gráfico de resíduos da curva em matriz.

4.2.3 Limite de detecção (LD) e Limite de quantificação (LQ)

Foi considerado o valor da média dos coeficientes angulares das três curvas analíticas preparadas em matriz (curvas 2, 3 e 4). Os valores dos coeficientes angulares estão descritos na Tabela 13.

Tabela 13: Coeficientes angulares das curvas analíticas preparadas em matriz.

Curvas em matriz	Coefficiente angular
Curva 2	0,007417
Curva 3	0,005942
Curva 4	0,010132
	Média = 0,007830

Na Tabela 14 é possível observar o valor do desvio padrão calculado considerando o menor nível (250 ng mL⁻¹) das três curvas analíticas preparadas na matriz da amostra.

Tabela 14: Desvio padrão do menor nível das três curvas analíticas preparadas em matriz.

Concentração	A/PI
250 ng mL ⁻¹	0,758886
	0,785951
	0,781346
	0,780453
	0,921436
	1,023048
	1,060557
DESVPAD	0,127543

Os valores de LD e LQ estimados encontram-se na Tabela 15. Para a quantificação de metasterona em suplemento nutricional, o LD e LQ estão dentro da faixa de trabalho do método.

Tabela 15: Resultados do LD e LQ estimados para metasterona (ng mL⁻¹).

Faixa de trabalho (ng mL⁻¹)	LD (ng mL⁻¹)	LQ (ng mL⁻¹)
250 - 1500	53,75	162,88

4.2.4 Exatidão

A avaliação da exatidão foi realizada pelo estudo da recuperação, repetitividade e precisão intermediária.

A recuperação foi calculada segundo a equação (6) utilizando o *software* Excel[®] e o valor calculado foi de 103 %, valor dentro da faixa de aceitação estabelecido pela AOAC. Para a avaliação da repetitividade, o critério de aceitação adotado foi o coeficiente de variação (CV) inferior a 11 % (AOAC, 2016). Os resultados ficaram dentro da faixa estabelecida nos critérios de aceitação como demonstra a Tabela 16.

Tabela 16: Resultados do estudo de recuperação.

Média das concentrações calculadas	DP	Recuperação	CV
1032,86 ng mL ⁻¹	44,58	103 %	4,32 %

A verificação de valores *outliers* foi realizada pelo teste de *Grubbs*. Na Tabela 17 encontra-se o resultado do teste de *Grubbs* onde se observa que não há valores *outliers*.

Tabela 17: Teste de *Grubbs* para os ensaios de recuperação e repetitividade.

Concentração (ng mL ⁻¹)	Razão analito/PI	Média	Desvio padrão	G _{calc} (G _{tab} = 2,290)	Conclusão
1000	6,5684	6,3763	0,3307	0,581	OK
1000	6,8560			1,451	OK
1000	6,1427			0,707	OK
1000	6,5279			0,458	OK
1000	6,0820			0,890	OK
1000	6,6405			0,799	OK
1000	6,6435			0,808	OK
1000	6,3978			0,065	OK
1000	5,7917			1,768	OK
1000	6,1128			0,797	OK

No estudo da precisão intermediária, foram analisados dez brancos de amostra fortificados com metasterona a 1000 ng mL⁻¹ e metiltestosterona a 250 ng mL⁻¹ em um dia subsequente ao estudo de recuperação e repetitividade e executado por um analista diferente. Para a avaliação deste parâmetro, foi preparada uma curva analítica em matriz (curva analítica 3) com seis níveis de concentração em simplicata. Na Tabela 18 é possível observar os resultados obtidos a partir da avaliação da curva analítica 3.

Tabela 18: Valores da curva analítica 3 preparada em matriz.

Curva analítica 3 (matriz)							
Concentração (ng mL ⁻¹)	Área analito	Área PI	Razão A/PI	Conc. Calc.	Recuperação	y _i Calc.	Resíduos
250	5271402	6754287	0,7805	289,27	86,4	0,55	0,23
500	14095279	7102854	1,9845	491,89	101,6	2,03	-0,05
750	21867432	6440724	3,3952	729,29	102,8	3,52	-0,12
1000	32643422	6880719	4,7442	956,31	104,6	5,00	-0,26
1250	44795055	6995151	6,4037	1235,59	101,2	6,49	-0,09
1500	56743052	6871299	8,2580	1547,64	96,9	7,97	0,28

Na Figura 20 encontra-se o gráfico da curva analítica 3. Os coeficientes de determinação e correlação linear foram considerados satisfatórios, ou seja, foram superiores a 0,99.

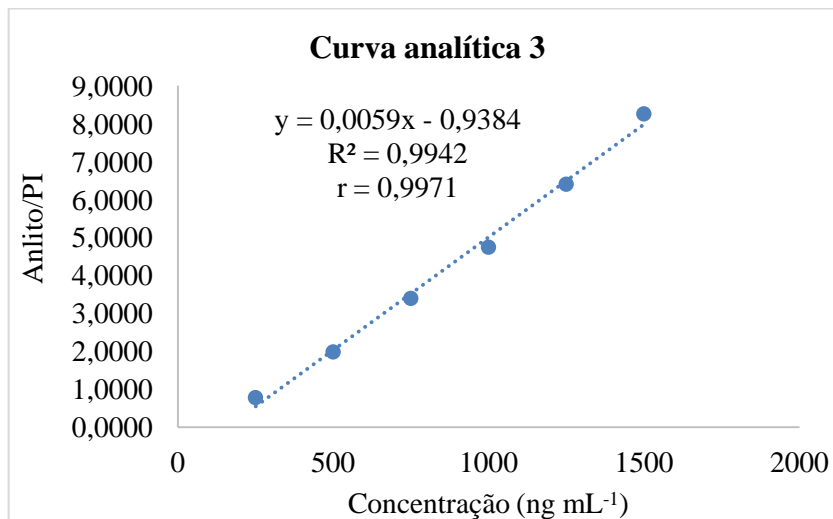


Figura 20: Curva analítica 3 (em matriz) para avaliação da precisão intermediária.

A partir da avaliação do gráfico de resíduos da curva analítica 3 ilustrado na Figura 21, é possível observar que há um comportamento aleatório, não havendo nenhum tipo de tendência dos valores.

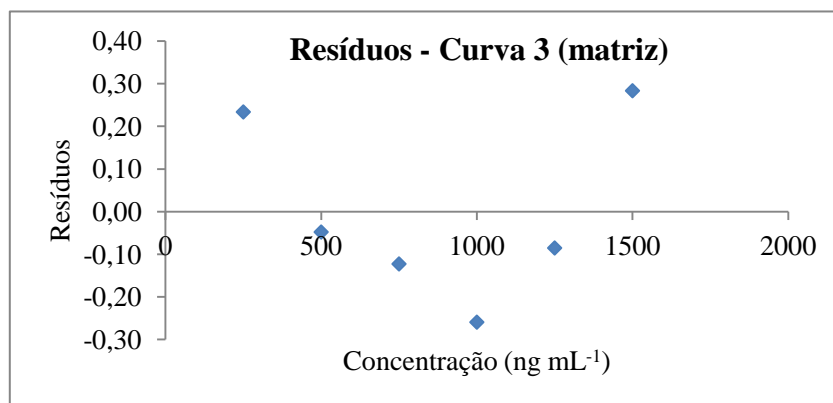


Figura 21: Gráfico de resíduos da curva em matriz.

O teste de *Grubbs* foi aplicado na curva analítica 3 e nenhum *outlier* foi detectado como mostra a Tabela 19.

Tabela 19: Resultado do teste de *Grubbs* da curva analítica 3.

Teste de <i>Grubbs</i> – Curva analítica 3				
Concentração (ng mL⁻¹)	Analito/PI	DP	G_{calc} (G_{tab} = 1,89)	Conclusão
250	0,7805	2,79	1,25	OK
500	1,9845		0,82	OK
750	3,3952		0,31	OK
1000	4,7442		0,17	OK
1250	6,4037		0,77	OK
1500	8,2580		1,43	OK
Média A/PI	4,2610			

Na Tabela 20 encontra-se o resultado do teste de *Grubbs* aplicado ao estudo de precisão intermediária. Não houve a presença de *outliers* na avaliação deste parâmetro de validação.

Tabela 20: Resultado do teste de *Grubbs* para o estudo de precisão intermediária.

Teste de <i>Grubbs</i> - Precisão intermediária					
Concentração (ng mL⁻¹)	A/PI	Média A/PI	DP (A/PI)	G_{calc} (G_{tab} = 2,290)	Conclusão
1000	4,9762			1,958	OK
1000	4,5963			0,792	OK
1000	4,5399			0,618	OK
1000	4,3440			0,017	OK
1000	4,5047	4,3386	0,3256	0,510	OK
1000	3,8833			1,398	OK
1000	4,0022			1,033	OK
1000	4,1057			0,715	OK
1000	4,1511			0,576	OK
1000	4,2822			0,173	OK

A concentração de metasterona foi lida na curva analítica 3 e o valor do coeficiente de variação (CV) foi inferior a 10 % o que foi considerado satisfatório.

Não foram observadas diferenças relevantes nos dois dias da análise da exatidão. Os coeficientes de variação foram inferiores a 10 %. Os resultados podem ser visualizados na Tabela 21.

Tabela 21: Resultados do estudo de precisão intermediária.

Concentração (ng mL ⁻¹)	Analito	PI	Analito/PI	Conc. Calculada (ng mL ⁻¹)
1000	30845596	6198664	4,9762	995,35
1000	31640968	6883947	4,5963	931,43
1000	27498685	6057154	4,5399	921,93
1000	30063837	6920758	4,3440	888,97
1000	30047674	6670320	4,5047	916,01
1000	32437543	8353138	3,8833	811,43
1000	32611670	8148355	4,0022	831,45
1000	31462673	7663080	4,1057	848,87
1000	31179602	7511149	4,1511	856,51
1000	30528567	7129225	4,2822	878,56
Média Conc. Calculada (ng mL⁻¹)				888,05
Desvio Padrão				54,79
CV (%)				6,17

4.2.5 Robustez

O desvio padrão dos dois grupos de amostras não apresentou diferenças significativas. Os coeficientes de variação calculados ficaram abaixo de 10 %, indicando que o método foi considerado robusto como mostra a Tabela 22.

Tabela 22: Resultados da avaliação da robustez.

Controle de robustez	Média da concentração calculada	DP	CV
Condições normais	884,19 ng mL ⁻¹	22,06	2,50 %
Condições modificadas	861,33 ng mL ⁻¹	19,93	2,31 %

4.3 QUANTIFICAÇÃO DA METASTERONA NO SUPLEMENTO

A quantificação do anabolizante metasterona presente no “suplemento B” foi realizada a partir da curva analítica 4 preparada em branco de amostra. A curva analítica preparada em triplicata apresentou comportamento homocedástico, coeficiente de correlação maior que 0,99 e o gráfico de resíduos indicou um comportamento aleatório, demonstrando que o modelo linear foi satisfatório. Os resultados da curva analítica 4 estão descritos na Tabela 23.

Tabela 23: Resultados da curva analítica 4.

Concentração (ng mL⁻¹)	Área Analito	Área PI	Razão Analito/PI
250	2328220	2526731	0,9214
250	2927616	2861660	1,0230
250	2703408	2549045	1,0606
500	7065238	2526253	2,7967
500	8979285	2933335	3,0611
500	7525674	2622895	2,8692
750	12492918	2426644	5,1482
750	12900843	2403540	5,3674
750	12245714	2456379	4,9853
1000	17773176	2124888	8,3643
1000	20252034	2905548	6,9701
1000	19135530	2521217	7,5898
1250	28175326	2532727	11,1245
1250	27905983	2736260	10,1986
1250	29351529	2782531	10,5485
1500	35026426	2468943	14,1868
1500	40214357	3051227	13,1797
1500	37081947	2755058	13,4596

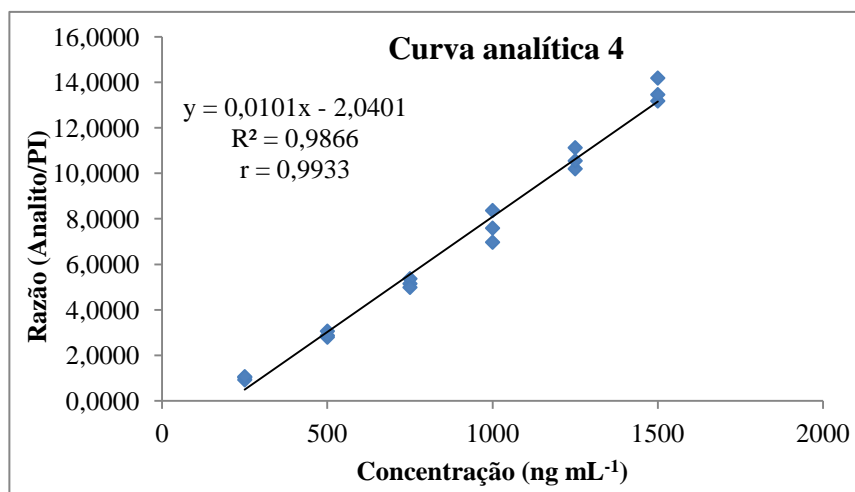


Figura 22: Curva analítica 4.

O teste de *Grubbs* por nível de concentração foi aplicado e nenhum valor aberrante foi detectado. Os resultados encontram-se a seguir na Tabela 24.

Tabela 24: Teste de *Grubbs* aplicado à curva analítica 4.

Concentração (ng mL ⁻¹)	Analito/PI	Média Analito/PI	DP A/PI	G _{calc} (G _{tab} = 1,153)	Conclusão
250	0,9214	1,0017	0,0720	1,115	OK
250	1,0230			0,297	OK
250	1,0606			0,818	OK
500	2,7967	2,9090	0,1366	0,822	OK
500	3,0611			1,113	OK
500	2,8692			0,291	OK
750	5,1482	5,1670	0,1918	0,098	OK
750	5,3674			1,045	OK
750	4,9853			0,948	OK
1000	8,3643	7,6414	0,6985	1,035	OK
1000	6,9701			0,961	OK
1000	7,5898			0,074	OK
1250	11,1245	10,6239	0,4675	1,071	OK
1250	10,1986			0,910	OK
1250	10,5485			0,161	OK
1500	14,1868	13,6087	0,5198	1,112	OK
1500	13,1797			0,825	OK
1500	13,4596			0,287	OK

A partir da equação dos dados obtidos da equação da reta ($y = ax+b$), foi determinada a concentração de metasterona presente na cápsula do “suplemento B”. A concentração calculada é de aproximadamente 1870 ng mL^{-1} .

No rótulo do “suplemento B” está descrito que há uma quantidade de 10 mg de metasterona presente na cápsula. Considerando a concentração calculada a partir da curva analítica 4, é possível evidenciar que a quantidade em massa de metasterona é inferior a descrita no rótulo. De acordo com o método de quantificação, há 0,00935 mg de metasterona na cápsula analisada.

A metasterona não deveria estar presente no suplemento e tão pouco poderia ser comercializado no Brasil, uma vez que esta classe de substância é controlada pela ANVISA. Porém, esse tipo de suplemento é comercializado de forma livre, principalmente através de *sites* especializados em suplementos nutricionais e *fitness*. Esta é uma questão alarmante, pois expõe a falta de uma gestão governamental que controle a entrada dos suplementos nutricionais no Brasil.

5 CONCLUSÃO

Foi realizada uma análise qualitativa por CG-EM/EM utilizando um método de triagem já empregado na rotina de determinação de agentes dopantes do LBCD. Dentre os dez suplementos nutricionais adquiridos na cidade do Rio de Janeiro em apenas um foi identificado o anabolizante metasterona. O método de quantificação da metasterona na matriz de suplemento nutricional foi desenvolvido e validado tendo como base o documento de orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos DOQ-CGCRE-008, do INMETRO. O procedimento analítico se mostrou simples, rápido, específico, com linearidade satisfatória, boa recuperação e preciso. A quantidade de metasterona presente na amostra analisada foi inferior à quantidade informada no rótulo do suplemento.

Conclui-se que o método proposto neste trabalho mostrou-se satisfatório para a detecção e quantificação de metasterona em suplemento nutricional e que o mesmo pode ser desenvolvido para a quantificação de outros esteroides anabolizantes possivelmente presentes em suplementos nutricionais.

6 REFERÊNCIAS

ABBATE, V; A. T. KICMAN, M. EVANS-BROWN, J. MCVEIGH, D. A. COWAN, C. WILSON, S. J. COLES AND C. J. WALKER. Anabolic steroids detected in bodybuilding dietary supplements—a significant risk to public health. *Drug Testing and Analysis* (2014).

AIRES, ANDRÉIA GOMES. *O soro de leite como suplemento proteico para atletas*. Monografia (Graduação em Engenharia de Alimentos). Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2010. Disponível em: <<http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/28405/000769907.pdf?sequence=1>>. Acesso em: 05 de mai. 2015.

ALVES, LUIS FELIPE JOORIS. *Desenvolvimento e validação de método analítico para estudo quantitativo de perfil esteroide endógeno em urina humana*. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

AMARAL, Priscila O; et al. *Diferentes técnicas de varredura de íons no espectrômetro de massas aplicadas à análise de organoclorados via GC/MS*. 2011. International Nuclear Atlantic Conference – INAC. Belo Horizonte, MG, Brasil. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE ENERGIA NUCLEAR – ABEN. ISBN: 978-85-99141-04-5

ANIELSKI, P. *Hair analysis of anabolic steroids in connection with doping control – results from horse samples*. *Journal of mass spectrometry*. 2008; 43: 1001–1008.

AOAC International., *Official methods of analysis of AOAC International, in Guidelines for Standard Method Performance Requirements (Appendix F)*. Gaithersburg: AOAC International, 2016.

AQUINO NETO F. R; et al. Controle de dopagem no esporte: aspectos químicos e farmacológicos que afetam a detecção de drogas no cabelo. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. volume 38, n. 3, jul./set., 2002.

AQUINO NETO F. R.; SOUZA MARQUES D. S. *Cromatografia Princípios Básicos e Técnicas Afins*. Rio de Janeiro: Interciência, 2003.

BALLISTRERI, M.C; WEBSTER, C. M. C. Ouso de bebidas energéticas entre estudantes de educação física. *Revista Latino-Americana de Enfermagem*. 2008; 16 (especial). Disponível em: <http://www.eerp-usp.br/rlae>>. Acesso em: 07 de jul. 2015.

BARROS NETO, TURIBIO LEITE DE. A controvérsia dos agentes ergogênicos: estamos subestimando os efeitos naturais da atividade física? *Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo [online]*. 2001, volume 45, n.2, pp. 121-122. ISSN 1677-9487. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0004-27302001000200002&script=sci_arttext>. Acesso em: 04 de jul. 2015.

BARROS NETO, B.; PIMENTEL, M. F.; ARAUJO, M.C.U. Recomendações para calibração em química analítica: parte I. Fundamentos e calibração com um componente (calibração univariada). *Química Nova*, v. 25, n. 5, p. 856-865, 2002.

BIESEK, SIMONE; ALVES, LETÍCIA AZEN; GUERRA, ISABELA. *Estratégias de nutrição e suplementação no esporte* – 3ª edição revisada e atual – Barueri, SP: Manole, 2015.

BRASIL. Decreto – Lei nº 986, de 21 de outubro de 1969. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto-lei/De10986.htm>. Acesso em: 27 de ago. 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 259 de 20 de setembro de 2002. Disponível em: <http://www.ibravim.org.br/downloads/RDC_259%20de%2020%20de%20setembro%20de%202002.pdf>. Acesso em: 30 de ago. 2015.

BRASIL. Decreto – Lei nº 10.674, de 16 de maio de 2003. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/2003/L10.674.htm>. Acesso em: 03 de set. 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 249, de 13 de setembro de 2005. Regulamento técnico das boas práticas de fabricação de produtos intermediários e insumos farmacêuticos ativos. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/RDC_249_2005.pdf/f0b8874a-6239-458f-b85b-409faadb860d> Acesso em 03 de set. 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 18, de 27 de abril de 2010. Alimentos para atletas. Diário Oficial da União, Brasília, n. 79, 28 abr. 2010 (a). Seção 1. p. 211. Disponível em: <http://www.crn3.org.br/legislacao/doc/RDC_18_2010.pdf>. Acesso em: 27 de ago. 2015.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Manual de garantia da qualidade analítica. Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília: MAPA/ACS, 2011. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Manual_Garantia_Analitica.pdf>. Acesso em: 05 de jul. 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 27, de 17 de maio de 2012. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/564310004b60537e891f9baf8fded4db/RDC+27+12+Valida%C3%A7%C3%A3o+de+M%C3%A9todos+Bioanal%C3%ADticos.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 26 de ago. 2015.

BRASNUTRI. Associação Brasileira dos Fabricantes de Suplementos Nutricionais e Alimentos para fins especiais. Dados da Indústria de Suplementação – Panorama do Setor, 2016. Disponível em: http://www.brasnutri.org.br/arquivos/numeros_setor/2017_atualizado.pdf. Acesso em 04 de mar. 2017.

BYLINA DV, GRYN SV, TKACHUK AA. Detection of the methasterone and its metabolite in human urine by the gas chromatography/high resolution mass spectrometry (HRMS) method. *Methods and Objects of Chemical Analysis* 2012; 7:87–93.

CALDAS, SERGIANE, S. *et al.* Principais técnicas de preparo de amostra para a determinação de resíduos de agrotóxicos em água por cromatografia líquida com detecção por

arranjo de diodos e por espectrometria de massas. *Química Nova*, Vol. 34, No. 9, 1604-1617, 2011.

CARMO, EVERTON CRIVOI DO; FERNANDES, TIAGO; OLIVEIRA, EDILAMAR MENEZES DE. Esteroides anabolizantes: do atleta ao cardiopata. *Revista de Educação Física/UEM*, v. 23, n. 2, p. 307-318, 2012.

CARVALHO, TALES DE; MARA, LOURENÇO SAMPAIO DE. Hidratação e Nutrição no Esporte. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte* – Vol. 16, Nº 2 pp. 144-148. ISSN 1517-8692. Mar/Abr, 2010. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbme/v16n2/14.pdf>>. Acesso em: 12 de jan. 2016.

CARVALHO, TALES DE. Modificações dietéticas, reposição hídrica, suplementos alimentares e drogas: comprovação de ação ergogênica e potenciais riscos para a saúde - Vol. 9, Nº 2 – Mar/Abr, 2003. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbme/v9n2/v9n2a02.pdf> >. Acesso em: 22 de jan. 2016.

CARRILHO, E; CANTÚ, M. D; WULFF, N. A; PALMA, M.S. Sequenciamento de peptídeos usando espectrometria de massas: um guia prático. *Química Nova*, Vol. 31, No. 3, 669-675, 2008.

CASTANHO, G. K. F; FONTES, E. B; FERNANDES, P. T. O perigo da contaminação de suplementos alimentares com substâncias ilícitas para os praticantes de exercício físico e esporte. *Revista da Faculdade de Educação Física da UNICAMP*, Campinas, v. 12, n. 1, p. 161-180, jan/mar. 2014.

CAVALCANTI, GUSTAVO DE ALBUQUERQUE. *et al.* Detection of designer steroid methylstenbolone in ‘‘nutritional supplement’’ using gas chromatography and tandem mass spectrometry: Elucidation of its urinary metabolites. *Steroids*. Volume 78, Issue 2, 2012, Pages 228–233

CAVALCANTI, GUSTAVO DE ALBUQUERQUE. Aplicação da espectrometria de massas na investigação do metabolismo dos esteróides. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química, Programa de Pós-Graduação Química. Rio de Janeiro: UFRJ, 2013.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P. S.; Fundamentos de Cromatografia. Editora da UNICAMP, Edição 1, 2006.

CONSELHO FEDERAL DE NUTRICIONISTAS (CFN). Resolução CFN nº 380/2005. Disponível em: <http://www.cfn.org.br/novosite/pdf/res/2005/res380.pdf>>. Acesso em: 10 de jul. 2015.

DOMINGUES, SABRINA F.; MARINS, JOÃO C. B. Utilização de recursos ergogênicos e suplementos alimentares por praticantes de musculação em Belo Horizonte - MG. *Fitness Performance Journal*. 2007;6(4):218-26. Disponível em: <<http://fpjournal.org.br/painel/arquivos/463-2%20Musculacao%20Rev%204%202007.pdf>>. Acesso em: 17 de jul. 2015.

DURANTE, GRAZIELLE; GOMES, GEOVANNA; BARCO, JULIANA ALEXANDRA P. DE C. Suplementos alimentares e anabolizantes: risco do uso inadequado. Pontifícia Universidade Católica de Goiás, 2014.

DEA (Drug Enforcement Administration) - Department of Justice. Classification of two steroids, prostanazol and methasterone, as Schedule III anabolic steroids under the Controlled Substance Act. Final rule. 2012. Disponível em: <http://www.deadiversion.usdoj.gov/fed_regs/rules/2012/fr0730.htm>. Acesso em: 23 de set. 2015.

DOMINGUES, M. I. S. Análise de cabelo – procedimentos e aplicações. Universidade Fernando Pessoa Faculdade de Ciências da Saúde. Porto - Portugal, 2015.

DORNE, J.L.C.M., BORDAJANDI, L.R., AMZAL, B., FERRARI, P., VERGER, P. Combining analytical techniques, exposure assessment and biological effects for risk assessment of chemicals in food. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 28, p.695–707, 2009.

FAYH, ANA PAULA TRUSSARDI, et al. Consumo de suplementos nutricionais por frequentadores de academias da cidade de Porto Alegre. *Rev. Bras. Ciênc. Esporte* [online]. 2013, vol.35, n.1, pp. 27-37. ISSN 2179-3255. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0101-32892013000100004&script=sci_arttext>. Acesso em: 28 de ago. 2015.

FDA (Food and Drug Administration). Purity First Health Products, Inc. Issues Nationwide Recall of Specific Lots of Healthy Life Chemistry B-50, Multi-Mineral and Vitamin C Products: Due to a Potential Health Risk, 2013. Disponível em: <<http://www.fda.gov/safety/recalls/archiverecalls/2013/ucm363374.htm>>. Acesso em: 11 de ago. 2015.

FRAGKAKI, A.G. *et al.* Challenges in detecting substances for equine anti-doping. *Drug Testing and Analysis*. 2017. doi: 10.1002/dta.2162.

FRAGKAKI, A. G.; ANGELIS, Y. S.; TSANTILI-KAKOULIDOU, A.; KOUPPARIS, M.; GEORGAKOPOULOS, C. Statistical analysis of fragmentation patterns of electron ionization mass spectra of enolized trimethylsilylated anabolic androgenic steroids. *International Journal of Mass Spectrometry*, v. 285, n. 1-2, p. 58-69. 2009 (b).

GRANJEIRO, P.A, COSTA, C.E.R., BARROS, COSTA, A.R., INÁCIO, R.F. Levantamento do uso de anabolizantes e suplementos nutricionais em academias de musculação. *Movimento e percepção*. v 9 (13), 2008.

GEYER, HANS; MARIA, KRISTINA, PARR; KARSTEN KOEHLER; UTE MARECK; WILHELM SCHANZER AND MARIO THEVIS. Nutritional supplements cross-contaminated and faked with doping substances. *Journal of Mass Spectrometry*, 2008; 43: 892–902.

INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial). Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos DOQ-CGCRE-008, ver. 05. Rio de Janeiro: INMETRO, 2016. 31p.

JUZWIAK, CLAUDIA RIDEL; MIRANDA, ANDRÉA JACUSIEL. Guia de suplementação nutricional no esporte paralímpico. *Comitê Paralímpico Brasileiro e Academia Paralímpica Brasileira*. São Paulo, 2013.

Disponível em:

<<http://www.canoagem.org.br/arquivos/ckfinder/files/Manual%20de%20Suplementacao%20Nutricional%20no%20Esporte%20Paralimpico.pdf>>. Acesso em: 01 de jul. 2015.

KAMBER, MATTHIAS; BAUME, NORBERT; SAUGY, MARTIAL AND RIVIER, LAURENT. Nutritional supplements as a source for positive doping cases? *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism*, 2001, 11, 258-263.

KINTZ, PASCAL; SALOMONE, ALBERTO; VINCENTI, MARCO. *Hair Analysis in Clinical and Forensic Toxicology*. First edition. Academic Press, London, 2015.

LABANCA, BRUNA DE JESUS. *Avaliação da excreção urinária do letrozol e seu efeito no perfil esteroide endógeno*. 2015. Dissertação de mestrado – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química.

LANÇAS, F. M.; *Cromatografia em Fase Gasosa*. Suprema Gráfica e Editora, Edição 1, 1993.

LANÇAS, F. M.; *Cromatografia Líquida moderna: HPLC/CLAE*. Editora Átomo, Edição 1, 2009.

LBCD. *Protocolo de Validação de Métodos de Análise Qualitativa - Laboratório Brasileiro de Controle de Dopagem (LBCD)*, 2011.

LBCD. *Método de análise de agentes dopantes por CG-QqQ – Laboratório Brasileiro de Controle de Dopagem (LBCD)*, 2017.

LINHARES, T. C.; LIMA, R. M. Prevalência do uso de suplementos alimentares por praticantes de musculação nas academias de Campos dos Goytacazes/RJ, Brasil. Rio de Janeiro, 2006. Disponível em:

<<http://www.essentiaeditora.iff.edu.br/index.php/vertices/article/view/1809-2667.20060008/55>>. Acesso em: 23 de jul.2015.

LOLLO, PABLO CHRISTIANO BARBOZA. *Influência da suplementação de proteínas do soro de leite na composição corporal, desempenho físico e parâmetros bioquímicos de atletas juvenis de futebol*. 2007. 204 f. Dissertação (Mestre) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

MANORE M, THOMPSON J. *Sport nutrition for health and performance*. Champaign: Human Kinetics Publishers, 2000. p. 61-103.

MARCHIORO, ELIS MARINA; BENETTI, FÁBIA. *Consumo de suplementos nutricionais por praticantes de musculação em academias do município de Tenente Portela-RS*. *Revista Brasileira de Nutrição Esportiva*, São Paulo. v. 9. n. 49. p.40-52. Jan./Fev. 2015. ISSN 1981-9927.

NEVES, D. B. DA JUSTA; CALDAS, E. D. Dietary supplements: International legal framework and adulteration profiles, and characteristics of products on the Brazilian clandestine market. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*- 73 (2015) 93-104. 2015.

OLIVEIRA, A. C. ; PADILHA, M. C. ; AQUINO NETO, F. R. . Desenvolvimento de metodologia para análise multi-resíduos de anabolizantes em músculo de frango por CG/EM. In: 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2007, Águas de Lindóia. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2007.

OLIVEIRA, FÁBIO AZAMOR DE. *Otimização e validação de método para a determinação da razão isotópica de $^{13}C/^{12}C$ de esteroides anabolizantes endógenos em urina humana*. 2015. 32, 225 f.: il. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química, Rio de Janeiro.

PADILHA, MONICA COSTA. *Cromatografia gasosa de alta resolução acoplada a espectrometria de massas aplicada ao estudo de agentes anabólicos e candidatos a fármacos moduladores de receptores dopaminérgicos em fluidos biológicos*. 2007. Tese (Doutorado em Ciências) - Centro de Ciências Matemáticas e da Natureza, Instituto de Química, Departamento de Química Orgânica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

PANZA, VILMA *et al.* Consumo alimentar de atletas: Reflexões sobre recomendações nutricionais, hábitos alimentares e métodos para avaliação do gasto e consumo energéticos. *Revista de Nutrição*, Campinas, v.20, n.6, p.681-692, 2007.

PARRA, R. M.T; PALMA, A; PIERUCCI, A. T. R. Contaminação de suplementos dietéticos usados para prática esportiva: uma revisão de literatura. *Rev. Bras. Ciênc. Esporte*, Florianópolis, v. 33, n. 4, p. 1071-1084, out./dez. 2011.

PARR, MK; OPFERMANN, G; SCHÄNZER, W. Detection of new 17-alkylated anabolic steroids on WADA 2006 list. Institute of Biochemistry, German Sport University, Cologne, Germany, 2006.

PARR, M. K.; FUßHÖLLER, G.; SCHLÖRER, N.; OPFERMANN, G.; GEYER, H.; RODCHENKOV, G.; SCHÄNZER, W. (2011) Detection of 6-methyltestosterone in a “dietary supplement” and GC-MS/MS investigations on its urinary metabolism. *Toxicology Letters* 201 (2011) 101–104

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R.; *Introdução à Espectroscopia*. Editora Cengage Learning, Edição 4, 2010.

PEREIRA HMG, MARQUES MAS, CARDOSO JN, AQUINO-NETO FR. Analysis of glucocorticosteroids by GC-MS: a new approach of derivatization step for doping control in sport. *Quimica Nova* 2002; 25: 1096-1102.

PEREIRA, H. M.; PADILHA, M. C.; AQUINO NETO, F.R. A química e o controle de dopagem no esporte. *Coleção Química no cotidiano*. São Paulo: Sociedade Brasileira de Química, v. 3, 2010. 52p.

PRESTES, OSMAR, D. *et al.* QuEChERS – Um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. *Química Nova*, Vol. 32, No. 6, 1620-1634, 2009.

RIBANI, M.; BOTTOLO, C. B.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C.; MELO, L. F. Validação em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos. *Química Nova*, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RINGOLD, H and ROSENKRANZ, G. Steroids. LXXXIII. Synthesis of 2-Methyl and 2,2-Dimethyl Hormones Analogs. *Journal of Organic Chemistry*.21. (1956): 1333.

RINGOLD, H. J. *et al.* *Journal of the American Chemical Society*. Steroids CV. 1 2-Methyl and 2-Hydroxymethylene-androstane Derivatives. 81 (2). (1959): 427-432.

SANTOS, MIGUEL ÂNGELO ALVES DOS; SANTOS, RODRIGO PEREIRA DOS. Uso de suplementos alimentares como forma de melhorar a performance nos programas de atividade física em academia de ginástica. *Revista Paulista de Educação Física*. São Paulo, 16 (2): 174-85, jul/dez. 2002. Disponível em:

<<http://citrus.uspnet.usp.br/eef/uploads/arquivo/v16%20n2%20artigo5.pdf>>. Acesso em: 14 de fev. 2016.

SBD. Sociedade Brasileira de Diabetes. Departamento de Nutrição. Manual oficial de contagem de carboidratos para profissionais de saúde. – Rio de Janeiro, 2009. Disponível em: <<http://www.diabetes.org.br/images/pdf/a-manual-carboidratos.pdf>>. Acesso em: 01 de mai. 2016.

SCHANZER, W. Metabolism of anabolic androgenic steroids. *Clinical Chemistry*, v.42, p.1001-1020, 1996.

SCHRODER, H. *et al.* The type, amount, frequency and timing of dietary supplement use by elite players in the First Spanish Basketball League. *Journal of Sports Science*, England, v. 20, p. 353-358, 2002.

SKOOG, D.A., WEST, D.M., HOLLER, F.J., CROUCH, S.R. A Natureza da química analítica. In. SKOOG *et al.*, *Fundamentos de química analítica*. Trad. da 8ed Norte-Americana. São Paulo: Thomson, 2006, cap.1, p.4.

SILVA, GISELE CHAVES DA. *Desenvolvimento de método para identificação de “off-flavours” em cerveja*. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Instituto Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

SILVA, TANIA DOS SANTOS. *Desenvolvimento de métodos espectrométricos para determinação de contaminantes inorgânicos (arsênio, cádmio, chumbo e mercúrio) em peixe*. Dissertação (Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Instituto Federal de Educação Tecnológica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

SOLOMONS, G.; FRYHLE, C. *Química orgânica*. Tradução Whei Oh Lin– 7ª edição – Rio de Janeiro, RJ: LTC, 2002, cap. 22 e 24.

URTADO, CHRISTIANO BERTOLDO. *Prevalência e perfil da utilização de esteroides anabolizantes por praticantes de treinamento de força com idade entre 14 e 24 anos na*

cidade de Piracicaba, São Paulo, Brasil. 2014. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

VAN DE KERKHOFF, D. H.; Steroid Profiling in Doping Analysis. Proefschrift (Doctorat in de Farmacie), Universiteit Utrecht, Nederlands, Faculteit Farmacie, 2001.

VAN EENOO, P. *et al.* Synthesis and characterization of the N-terminal acetylated 17-23 fragment of thymosin beta 4 identified in TB-500, a product suspected to possess doping potential. *Drug Test. Anal.* 4, 733-738, 2012.

VAN POUCKE, C; DETAVERNIER, C; VAN CAUWENBERGHE, R; VAN PETEGHEM, C. Determination of anabolic steroids in dietary supplements by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 586 (2007) 35-42. 2007.

VEJA. Suplementos: os brasileiros adoram. Revista eletrônica veja.com; 01 de dezembro de 2015. Disponível em: <<http://veja.abril.com.br/saude/suplementos-os-brasileiros-adoram/>>. Acesso em: 01 de mai. 2016.

ZHANG, JIANLI *et al.* New Potential Biomarker for Methasterone Misuse in Human Urine by Liquid Chromatography Quadrupole Time of Flight Mass Spectrometry. *International Journal of Molecular Sciences.* 17, 1628; 2016.

ANEXO 1
COMPOSIÇÃO DO CQA

Substância	Concentração
FINASTERIDA	100 ng mL ⁻¹
ANDROSTERONA	1550 ng mL ⁻¹
ETIOLANOLONA	1250 ng mL ⁻¹
5ALFA-ANDROSTANO-3ALFA,17BETA-DIOL	135 ng mL ⁻¹
5BETA-ANDROSTANO-3ALFA,17BETA-DIOL	140 ng mL ⁻¹
EPITESTOSTERONA	50 ng mL ⁻¹
TESTOSTERONA	200 ng mL ⁻¹
FORMESTANO	150 ng mL ⁻¹
SALBUTAMOL	20 ng mL ⁻¹
(-)-THC-CARBOXI	75 ng mL ⁻¹
Morfina	30 ng mL ⁻¹
NORANDROSTERONA-19	2 ng mL ⁻¹
NORETIOLANOLONA-19	5 ng mL ⁻¹
NANDROLONA	5 ng mL ⁻¹
NORANDROSTENODIONA-19	5 ng mL ⁻¹
BOLANDIOL	5 ng mL ⁻¹
CARTEOLOL HCL	100 ng mL ⁻¹
FENOTEROL BROMIDRATO	20 ng mL ⁻¹
HIDROXIESTANOZOLOL-16BETA	2 ng mL ⁻¹
HIDROXIESTANOZOLOL-3	2 ng mL ⁻¹
ZILPATEROL	5 ng mL ⁻¹
CLEMBUTEROL	0,2 ng mL ⁻¹
DEHIDROCLOROMETILTESTOSTERONA	2 ng mL ⁻¹
HIDROXITURINABOL-6BETA	2 ng mL ⁻¹
METANDIENONA	2 ng mL ⁻¹
EPIMETENDIOL	2 ng mL ⁻¹
HIDROXIMETANDIENONA-6BETA	2 ng mL ⁻¹
METANDIENONA-M5	2 ng mL ⁻¹
METANDRIOL	5 ng mL ⁻¹
METILTESTOSTERONA-M2	2 ng mL ⁻¹
METILTESTOSTERONA-M1	2 ng mL ⁻¹
HIDROXIFURAZABOL-16BETA	5 ng mL ⁻¹
FLUOXIMESTERONA	5 ng mL ⁻¹
FLUOXIMESTERONA-M2	5 ng mL ⁻¹
FLUOXIMESTERONA-M1	100 ng mL ⁻¹
HIDROXIFLUOXIMESTERONA-6BETA	10 ng mL ⁻¹
ANDROSTENODIOL-1	20 ng mL ⁻¹
ANDROSTENODIONA-1	20 ng mL ⁻¹
TESTOSTERONA-1	20 ng mL ⁻¹

ANEXO 1
COMPOSIÇÃO DO CQA (CONTINUAÇÃO)

Substância	Concentração
5ALFA-ANDROST-1-ENE-3ALFA-OL-17-ONA	5 ng mL ⁻¹
3ALFA-HIDROXI-TIBOLONA	5 ng mL ⁻¹
3BETA-HIDROXI-TIBOLONA	5 ng mL ⁻¹
HIDROXITESTOSTERONA-4	5 ng mL ⁻¹
BOLASTERONA	5 ng mL ⁻¹
BOLASTERONA-M1	5 ng mL ⁻¹
CALUSTERONA	5 ng mL ⁻¹
CALUSTERONA-M1	5 ng mL ⁻¹
BOLDENONA	5 ng mL ⁻¹
BOLDENONA-M1	5 ng mL ⁻¹
BOLDENONA-M2	5 ng mL ⁻¹
BOLDIONA	5 ng mL ⁻¹
CLOSTEBOL-M1	5 ng mL ⁻¹
DANAZOL-M1	10 ng mL ⁻¹
ETISTERONA	5 ng mL ⁻¹
DESOXIMETILTESTOSTERONA	5 ng mL ⁻¹
DROSTANOLONA	5 ng mL ⁻¹
DROSTANOLONA-M1	5 ng mL ⁻¹
EPIOXANDROLONA	10 ng mL ⁻¹
OXANDROLONA	10 ng mL ⁻¹
ESTEMBOLONA	5 ng mL ⁻¹
FORMEBOLONA-M1	100 ng mL ⁻¹
MESTANOLONA	5 ng mL ⁻¹
MESTEROLONA	5 ng mL ⁻¹
MESTEROLONA-M1	5 ng mL ⁻¹
MESTEROLONA-M2	5 ng mL ⁻¹
METASTERONA	5 ng mL ⁻¹
METENOLONA	5 ng mL ⁻¹
METENOLONA-M1	5 ng mL ⁻¹
METIL-1-TESTOSTERONA	5 ng mL ⁻¹
METILDIENOLONA	5 ng mL ⁻¹
METILESTEMBOLONA	5 ng mL ⁻¹
METILNORTESTOSTERONA	5 ng mL ⁻¹
MIBOLERONA	5 ng mL ⁻¹
NORBOLETONA M1	5 ng mL ⁻¹
13BETA,17ALFA-DIETIL-5BETA-GONANO-3ALFA,17BETA-DIO	5 ng mL ⁻¹
NORBOLETONA	5 ng mL ⁻¹
NORCLOSTEBOL	5 ng mL ⁻¹
NORETANDROLONA	5 ng mL ⁻¹

ANEXO 1
COMPOSIÇÃO DO CQA (CONTINUAÇÃO)

NORETANDROLONA-M1	5 ng mL ⁻¹
NORETANDROLONA-M2	5 ng mL ⁻¹
ETILESTRENOL	5 ng mL ⁻¹
OXABOLONA	5 ng mL ⁻¹
OXIMESTERONA	5 ng mL ⁻¹
ALFA-ZEARALANOL	5 ng mL ⁻¹
BETA-ZEARALANOL	5 ng mL ⁻¹
ALFA-ZEARALENOL	5 ng mL ⁻¹
BETA-ZEARALENOL	5 ng mL ⁻¹
BAMBUTEROL	20 ng mL ⁻¹
BROMBUTEROL HIDROCLORIDRATO	20 ng mL ⁻¹
MABUTEROL HIDROCLORIDRATO	20 ng mL ⁻¹
TERBUTALINA	20 ng mL ⁻¹
4-HIDROXI-CICLOFENIL	20 ng mL ⁻¹
(Z)-4HIDROXI-TAMOXIFENO	20 ng mL ⁻¹
3-HIDROXI-4-METOXI- TAMOXIFENO	20 ng mL ⁻¹
6-METILHIDROXI-ANDROSTA-1,4- DIENO-3,7,11-DIONA	20 ng mL ⁻¹
AMINOGLUTETIMIDA	20 ng mL ⁻¹
LETROZOL-M1	20 ng mL ⁻¹
1,2,4,5- TETRAHIDROTESTOLACTONA	20 ng mL ⁻¹
TRIANTERENO	200 ng mL ⁻¹
PROBENECIDA	200 ng mL ⁻¹
EFAPROXIRAL	50 ng mL ⁻¹
6-HIDROXIBROMANTANO (METABÓLITO DO BROMANTANO)	100 ng mL ⁻¹
CARFEDON	100 ng mL ⁻¹
ETAMIVAN	100 ng mL ⁻¹
CLORIDRATO DE ETILEFRINA	100 ng mL ⁻¹
OXILOFRINA HCL	100 ng mL ⁻¹
NORFENEFRINA HCL	100 ng mL ⁻¹
CODEÍNA	50 ng mL ⁻¹
HIDROMORFONA	50 ng mL ⁻¹
METADONA(+/-) CLORIDRATO	50 ng mL ⁻¹
OXICODONA HCL	50 ng mL ⁻¹
OXIMORFONA	50 ng mL ⁻¹
BUPRENORFINA	5 ng mL ⁻¹
NORBUPRENORFINA	5 ng mL ⁻¹
OCTOPAMINA	1000 ng mL ⁻¹
REPROTEROL	20 ng mL ⁻¹

ANEXO 2

TABELA DOS VALORES CRÍTICOS - TESTE DE GRUBBS

$n \backslash \alpha$	0.10	0.05	0.025	0.01	0.005
3	1.148	1.153	1.155	1.155	1.155
4	1.425	1.463	1.481	1.492	1.496
5	1.602	1.672	1.715	1.749	1.764
6	1.729	1.822	1.887	1.944	1.973
7	1.828	1.938	2.020	2.097	2.139
8	1.909	2.032	2.126	2.221	2.274
9	1.977	2.110	2.215	2.323	2.387
10	2.036	2.176	2.290	2.410	2.482
11	2.088	2.234	2.355	2.485	2.564
12	2.134	2.285	2.412	2.550	2.636
13	2.175	2.331	2.462	2.607	2.699
14	2.213	2.371	2.507	2.659	2.755
15	2.247	2.409	2.549	2.705	2.806
16	2.279	2.443	2.585	2.747	2.852
17	2.309	2.475	2.620	2.785	2.894
18	2.335	2.504	2.651	2.821	2.932
19	2.361	2.532	2.681	2.854	2.968
20	2.385	2.557	2.709	2.884	3.001
21	2.408	2.580	2.733	2.912	3.031
22	2.429	2.603	2.758	2.939	3.060
23	2.448	2.624	2.781	2.963	3.087
24	2.467	2.644	2.802	2.987	3.112
25	2.486	2.663	2.822	3.009	3.135
26	2.502	2.681	2.841	3.029	3.157
27	2.519	2.698	2.859	3.049	3.178
28	2.534	2.714	2.876	3.068	3.199
29	2.549	2.730	2.893	3.085	3.218
30	2.563	2.745	2.908	3.103	3.236
31	2.577	2.759	2.924	3.119	3.253
32	2.591	2.773	2.938	3.135	3.270
33	2.604	2.786	2.952	3.150	3.286
34	2.616	2.799	2.965	3.164	3.301
35	2.628	2.811	2.979	3.178	3.316
36	2.639	2.823	2.991	3.191	3.330
37	2.650	2.835	3.003	3.204	3.343
38	2.661	2.846	3.014	3.216	3.356
39	2.671	2.857	3.025	3.228	3.369
40	2.682	2.866	3.036	3.240	3.381
50	2.768	2.956	3.128	3.336	3.483
60	2.837	3.025	3.199	3.411	3.560
70	2.893	3.082	3.257	3.471	3.622
80	2.940	3.130	3.305	3.521	3.673
90	2.981	3.171	3.347	3.563	3.716
100	3.017	3.207	3.383	3.600	3.754
110	3.049	3.239	3.415	3.632	3.787
120	3.078	3.267	3.444	3.662	3.817
130	3.104	3.294	3.470	3.688	3.843
140	3.129	3.318	3.493	3.712	3.867

Fonte: http://rigeo.cprm.gov.br/xmlui/bitstream/handle/doc/451/Andriotti_Tecnicas_estatisticas.pdf?sequence=1

ANEXO 3

TABELA DOS VALORES CRÍTICOS – TESTE DE *COCHRAN*

$$\alpha = 0,05$$

Nº grupos	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	15	20	24	30	40	60	120
GL																	
1	9985	9669	9065	8412	7808	7271	6798	6385	6020	5410	4709	3894	3434	2929	2370	1737	0998
2	9750	8709	7679	6838	6161	5612	5157	4775	4450	3924	3346	2705	2354	1980	1567	1131	0632
3	9392	7977	6841	5981	5321	4800	4377	4027	3733	3264	2758	2205	1907	1593	1259	0895	0495
4	9057	7457	6287	5441	4803	4307	3910	3584	3311	2880	2419	1921	1656	1377	1082	0765	0419
5	8772	7071	5895	5065	4447	3974	3595	3286	3029	2624	2195	1735	1493	1237	0968	0682	0371
6	8534	6771	5598	4783	4184	3726	3362	3067	2823	2439	2034	1602	1374	1137	0887	0623	0337
7	8332	6530	5365	4564	3980	3535	3185	2901	2666	2299	1911	1501	1286	1061	0827	0583	0312
8	8159	6333	5175	4387	3817	3384	3043	2768	2541	2187	1815	1422	1216	1002	0780	0552	0292
9	8010	6167	5017	4241	3682	3259	2926	2659	2439	2098	1736	1357	1160	0958	0745	0520	0279
10	7880	6025	4884	4118	3568	3154	2829	2568	2353	2020	1671	1303	1113	0921	0713	0497	0266
16	7341	5466	4366	3645	3135	2756	2462	2226	2032	1737	1429	1108	0942	0771	0595	0411	0218
36	6602	4748	3720	3066	2612	2278	2022	1820	1655	1403	1144	0879	0743	0604	0462	0316	0165
144	5813	4031	3093	2513	2119	1833	1616	1446	1308	1100	0889	0675	0567	0457	0347	0234	0120
∞	5000	3333	2500	2000	1667	1429	1250	1111	1000	0833	0667	0500	0417	0333	0250	0167	0083

Observação: Os valores da tabela devem ser divididos por 10.000

Fonte: http://rigeo.cprm.gov.br/xmlui/bitstream/handle/doc/451/Andriotti_Tecnicas_estatisticas.pdf?sequence=1

ANEXO 4
PLANILHAS DE VALIDAÇÃO

24	CURVA ANALÍTICA 1 (SOLVENTE)													
25	Concentração (ng/mL)	Analito	PI	Analito/PI	Conc. Calculada	Média (Conc. Calculada)	Variância	s: s(médio)	Recuperação	g: Calculado	Resíduos	CÁLCULOS DA CURVA ANALÍTICA		
26	250	1643238	905195	1,8153	302,287	302,959	12,553	-0,672	120,9	0,61	1,21	Coef. Angular	0,023098	
27	250	1433998	815747	1,7579	299,800			-3,159	119,9			1,15	Coef. Linear	-5,166763
28	250	1491616	777148	1,9193	306,790			3,831	122,7			1,31	Correlação r	0,9901
29	500	4894562	790777	6,1896	491,667	476,140	198,047	15,526	98,3	6,38	-0,19	Determinação r ²	0,9802	
30	500	5344956	962066	5,5557	464,224			-11,916	92,8			-0,83	Linearidade	CONFORME
31	500	5372043	934668	5,7475	472,530			-3,610	94,5			-0,63		
32	750	9370017	888705	10,5435	680,167	698,675	352,396	-18,508	90,7	12,16	-1,61			
33	750	10304218	940251	10,9590	698,158			-0,517	93,1			-1,20	Soma das Variâncias	2398,32061
34	750	10411751	912490	11,4104	717,700			19,025	95,7			-0,75	Ceale.	0,4241
35	1000	17442126	1010989	17,2525	970,634	962,393	1017,209	8,241	97,1	17,93	-0,68	Ctab	0,6838	
36	1000	17368894	982125	17,6850	989,358			26,965	98,9			-0,25	Teste Cochran	HOMOCEDASTICO
37	1000	17832053	1097422	16,2490	927,188			-35,205	92,7			-1,68		
38	1250	26791855	1071215	25,0107	1306,520	1309,833	818,115	-3,312	104,5	23,71	1,31			
39	1250	25455425	987303	25,7828	1339,947			30,115	107,2			2,08		
40	1250	26528673	1084212	24,4682	1283,030			-26,802	102,6			0,76		

ANEXO 4
PLANILHAS DE VALIDAÇÃO (CONTINUAÇÃO)

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M		
1	CURVA ANALÍTICA 2 (BRANCO DE AMOSTRA)														
2	Concentração (ng/mL)	Analito	PI	Analito/PI	Conc. Calculada	Média (Conc. Calculada)	Variância	$\bar{x} - x(\text{médio})$	Recuperação	g; Calculado	Resíduos	CÁLCULOS DA CURVA ANALÍTICA			
3	250	582582	767681	0,7589	275,458	277,683	3,812	-2,226	110,2	0,57	0,19	Coef. Angular	0,007417		
4	250	805134	1024408	0,7860	279,107				1,423		111,6		0,22	Coef. Linear	-1,284119
5	250	787584	1007984	0,7813	278,486				0,802		111,4		0,21	Correlação r	0,9929
6	500	1964505	793201	2,4767	507,067	508,075	1570,506	-1,008	101,4	2,42	0,05	Determinação r²	0,9859		
7	500	1941179	884750	2,1940	468,959				-39,116		93,8		-0,23	Linearidade	CONFORME
8	500	1865147	670495	2,7817	548,199				40,124		109,6		0,36		
9	750	3685781	956199	3,8546	692,854	706,561	364,253	-13,708	92,4	4,28	-0,42	Soma das Variâncias	16582,7223		
10	750	3702852	950356	3,8963	698,471				-8,090		93,1		-0,38	Ccalc.	0,4332
11	750	3650233	886419	4,1180	728,359				21,798		97,1		-0,16	Ctab	0,6161
12	1000	5734923	923395	6,2107	1010,523	989,085	850,791	21,439	101,1	6,13	0,08	Teste de Cochran	HOMOCEDESTICO		
13	1000	5629086	969640	5,8053	955,869				-33,216		95,6		-0,33		
14	1000	5538751	902218	6,1390	1000,861				11,777		100,1		0,01		
15	1250	8117554	984132	8,2484	1285,271	1231,429	6609,218	53,842	102,8	7,99	0,26				
16	1250	8128222	1136939	7,1655	1137,912				-93,517		91,0		-0,83		
17	1250	8129499	998299	8,1434	1271,103				39,674		101,7		0,16		
18	1500	10001765	939251	10,6487	1608,892	1537,167	7184,143	71,725	107,3	9,84	0,81				
19	1500	9134471	969382	9,4230	1443,635				-93,532		96,2		-0,42		
20	1500	9167717	891938	10,2784	1558,973				21,807		103,9		0,44		

ANEXO 4
PLANILHAS DE VALIDAÇÃO (CONTINUAÇÃO)

	A	B	C	D	E	F	G	H
1	CURVA ANALÍTICA 3 (BRANCO DE AMOSTRA) - 2º ANALISTA							
2	Concentração (ng/mL)	Analito	PI	Analito/PI	Conc. Calculada	Recuperação	y_i Calculado	Resíduos
3	250	5271402	6754287	0,7805	289,27	86,4	0,55	0,23
4	500	14095279	7102854	1,9845	491,89	101,6	2,03	-0,05
5	750	21867432	6440724	3,3952	729,29	102,8	3,52	-0,12
6	1000	32643422	6880719	4,7442	956,31	104,6	5,00	-0,26
7	1250	44795055	6995151	6,4037	1235,59	101,2	6,49	-0,09
8	1500	56743052	6871299	8,2580	1547,64	96,9	7,97	0,28

CÁLCULOS DA CURVA ANALÍTICA	
Coef. Angular	0,005942
Coef. Linear	-0,938450
Correlação r	0,9971
Determinação r ²	0,9942
Linearidade	CONFORME

ANEXO 4
PLANILHAS DE VALIDAÇÃO (CONTINUAÇÃO)

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M
1	CURVA ANALÍTICA 4 (BRANCO DE AMOSTRA)												
2	Concentração (ng/mL)	Analito	PI	Analito/PI	Conc. Calculada	Média (Conc. Calculada)	Variância	xi-x(médio)	Recuperação	yi Calculado	Resíduos	CÁLCULOS DA CURVA ANALÍTICA	
3	250	2328220	2526731	0,9214	292,30	300,22	50,47	-7,919987025	116,92	0,49284063	0,428595322	Coef. Angular	0,010131897
4	250	2927616	2861660	1,0230	302,33			2,108952195	120,93		0,530207506	Coef. Linear	-2,040133721
5	250	2703408	2549045	1,0606	306,03			5,81103483	122,41		0,567716627	Correlação r	0,9933
6	500	7065238	2526253	2,7967	477,39	488,47	181,81	-11,08348241	95,48	3,025814981	-0,229089041	Determinação r²	0,9866
7	500	8979285	2933335	3,0611	503,48			15,01154598	100,70		0,035303109	Linearidade	CONFORME
8	500	7525674	2622895	2,8692	484,54			-3,92806358	96,91		-0,156591072		
9	750	12492918	2426644	5,1482	709,48	711,33	358,25	-1,850446491	94,60	5,558789333	-0,4105604	Soma das Variâncias	10105,27746
10	750	12900843	2403540	5,3674	731,11			19,78466577	97,48		-0,191355662	Ccalc.	0,4703
11	750	12245714	2456379	4,9853	693,39			-17,93421928	92,45		-0,573519535	Ctab	0,6161
12	1000	17773176	2124888	8,3643	1026,90	955,55	4752,99	71,34739217	102,69	8,091763684	0,272524574	Teste de Cochran	HOMOCEDEÁSTICO
13	1000	20252034	2905548	6,9701	889,30			-66,25402013	88,93		-1,121638818		
14	1000	19135530	2521217	7,5898	950,46			-5,093372046	95,05		-0,501965407		
15	1250	28175326	2532727	11,1245	1299,33	1249,91	2129,35	49,41213617	103,95	10,62473804	0,499764304		
16	1250	27905983	2736260	10,1986	1207,94			-41,97406985	96,64		-0,42615136		
17	1250	29351529	2782531	10,5485	1242,48			-7,438066322	99,40		-0,076236115		
18	1500	35026426	2468943	14,1868	1601,57	1544,51	2632,40	57,05756154	106,77	13,15771239	1,029100015		
19	1500	40214357	3051227	13,1797	1502,17			-42,33923362	100,14		0,022021884		
20	1500	37081947	2755058	13,4596	1529,79			-14,71832791	101,99		0,301874067		

ANEXO 4
PLANILHAS DE VALIDAÇÃO (CONTINUAÇÃO)

	A	B	C	D	E
1	COMPARAÇÃO DOS COEFICIENTES ANGULARES				
2	Curva (ng/mL)	Curva 2 - BA (A/PI)	Curva 1 - Solvente (A/PI)	(Xi-Xmédio)²	(Xi-Xmédio)²
3	250	0,758885672	1,815341571	19,77283839	106,9381887
4	250	0,785950542	1,757895802	19,53287403	108,1295927
5	250	0,78134581	1,919344554	19,57359738	104,7979964
6	500	2,476680514	6,189557228	7,44673772	35,60361613
7	500	2,194042273	5,555704527	9,069188776	43,56962706
8	500	2,78174673	5,747541108	5,87483033	41,07390565
9	750	3,854614927	10,54345361	1,82503005	2,60170512
10	750	3,896278648	10,95900695	1,714195815	1,433831075
11	750	4,11795252	11,41039222	1,182871885	0,556578049
12	1000	6,210695513	17,25254445	1,010314169	25,97034365
13	1000	5,805338461	17,68501729	0,35974421	30,56523534
14	1000	6,139036767	16,24904078	0,871394449	16,74943185
15	1250	8,24843794	25,01071375	9,259156927	165,2325127
16	1250	7,155509119	25,78279952	3,802334098	185,6778424
17	1250	8,143355195	24,46815377	8,630689623	151,5784483
18	1500	10,64865712		29,62739702	
19	1500	9,422981837		17,78671732	
20	1500	10,27842026		25,73399584	
21	Xmedio=	5,205551658	12,15643381	183,073908	1020,478855
22	Se =	0,401367537	1,245556481		
23	Se ²=	0,1610959	1,551410948		
24	n=	18	15		
25	gl=	16	13		
26	b =	0,007416766	0,023097596		
27	Fcal =	9,630356501			
28	Ftab=	2,514919726			
29	Vâriâncias =>	Diferentes			
30	S²b1=	0,00087995	0,001520277		
31	t' =	2,145534332			
32	t calc=	0,320068432			
33	Os Coeficientes são:	Diferentes			
34	Conclusão	Há efeito de matriz			