Desenvolvimento e validação de um método para a quantificação de esteroides endógenos (Androsterona, Etiocolanolona, 5αAdiol, 5βAdiol, Epitestosterona e Testosterona) em urina

Viviana Pedrosa Pereira
Mestrado em Química
Departamento de Química e Bioquímica da FCUP
2014/2015

Orientador
João Ruivo, Coordenador Cientifico, ADoP – LAD

Coorientador
Cosme Moura, Professor Auxiliar, FCUP

U.PORTO
FACULDADE DE CIÊNCIAS
UNIVERSIDADE DO PORTO

Autoridade Antidopagem de Portugal
Laboratório de Análises de Dopagem

Todas as correções determinadas pelo júri, e só essas, foram efetuadas.

O Presidente do Júri,

Porto, _____/_____/_____

Agradecimentos

Gostaria de agradecer em primeiro lugar a quem tornou este estágio possível. Ao professor Cosme Moura, por o ter sugerido, ao Dr. João Ruivo, por me ter autorizado a realização do meu estágio curricular, tal como à comissão de mestrado que deu permissão que o estágio curricular ocorresse, bem como aos meus pais que permitiram que eu fizesse o estágio, apesar da distância.

Também quero agradecer ao pessoal do laboratório que me recebeu de braços abertos, em especial à Beatriz Salema, à Alexandra Gonçalves, à Claudia Antunes, à Sandra Ramos e ao Daniel Luís por me terem ajudado sempre que necessário.

Por último, mas não menos importantes, a todos aqueles que me apoiaram nas minhas escolhas.

Resumo

O projeto enquadra-se na área da química analítica e o seu objetivo principal consiste no desenvolvimento e consequente validação de um novo método de quantificação dos esteroides androgénicos anabolizantes endógenos, nomeadamente a androsterona, a etiocolanolona, o 5αandrostanediol, o 5βandrostanediol, a epitestosterona e a testosterona, em urina por GC-MS. Este novo método surge em consequência das recomendações feitas pela WADA (do inglês World Antidoping Agency), entidade que acredita o laboratório para a análise de amostras no âmbito da dopagem a nível internacional, no seu documento TD2014EAAS (*Technical Document Endogenous Anabolic Androgenic Steroids Measurement and Reporting*).

O desenvolvimento do método consistiu na criação e otimização de um programa de temperatura da separação cromatográfica, testado com uma solução contendo todas as substâncias a quantificar. Os critérios tidos em conta na otimização foram a resolução dos picos cromatográficos e o tempo total da separação cromatográfica.
Uma vez construído e otimizado o método, deu-se início aos diferentes passos conducentes à validação do novo método analítico. Para a validação dos 6 endógenos em questão, obtiveram-se resultados experimentais com vista à avaliação dos seguintes parâmetros de mérito: (i) especificidade/seletividade, (ii) capacidade de identificação, (iii) recuperação da fase de extração, (iv) arrastamento, (v) gama de trabalho, (vi) linearidade, (vii) limites de deteção e quantificação, (viii) robustez, (ix) precisão e (x) exatidão. Também foi construída uma carta de controlo para os seis endógenos em estudo, e foi feita a redação dos documentos técnicos internos no âmbito da qualidade, nomeadamente o relatório de validação, o relatório de cálculo de incertezas e o procedimento técnico de análise.

Palavras-Chave: Esteroides Endógenos; WADA; Dopagem; GC-MS

Abstract

The project consists in the development and validation of a quantification method for endogenous anabolic androgenic steroids such as Androsterone, Etiocholanolone, 5αandrostanediol, 5βandrostanediol, Epitestosterona and Testosterone in urine by GC-MS. This new method was made according to WADA's recommendations on the Technical Document Endogenous Anabolic Measurement and Reporting (TD2014EAAS).

The method's development started with the creation and optimization of the chromatographic separation program for the compounds. Once that process was completed the validation process began. For each of the 6 compounds were studied in order to get data to assess the following parameters: (i) specificity/selectivity, (ii) identification capacity, (iii) recovery of the extraction phase, (iv) carryover, (v) range, (vi) linearity, (vii) limits of detection and quantification, (viii) precision and (ix) accuracy.
Control carts were also built for all six endogenous steroids, as well as the writing of intern technical document such as the method's validation report, the method's measurement uncertainty report and the method's technical procedure.

Key words: Endogenous Steroids; WADA; Doping; GC-MS

Índice

1. Introdução 1
1.1. Objetivo e Programa de Trabalho 1
1.2. Entidade de Acolhimento 1
1.3. Inserção do Tema 2
2. Controlo Analítico de Substâncias Proibidas no Desporto 5
2.1. *Doping* 5
2.1.1. Riscos potenciais 7
2.2. Substâncias e Métodos de Dopagem Proibidos 8
2.2.1. Definições e exemplos 10
2.3. Métodos de Análise Química no controlo Antidopagem 13
2.3.1. Amostragem 15
2.3.2. Tratamento das amostras 16
2.3.3. Receção e armazenamento das amostras 18
3. Métodos de Determinação de Esteroides Endógenos 20
3.1. Esteroides 20
3.1.1. Utilização dos esteroides como *doping* 21
3.1.2. Efeitos dos esteroides 22
3.1.3. Outras utilizações 22
3.1.4. Conclusões 23
3.2. Métodos de determinação 24
4. Validação e Controlo de Qualidade 26
4.1. Validação 26
4.1.1. Seletividade/Especificidade 27
4.1.2. Linearidade 28
4.1.3. Efeito de matriz 29
4.1.4. Recuperação 29
4.1.5. Limites 30
4.1.5.1. Limite de Deteção 30
4.1.5.2. Limite de Quantificação 30
4.1.6. Estabilidade 30
4.1.7. Testes de diluição/Integridade da diluição 31
4.1.8. Precisão 31
4.1.9. Exatidão 32
4.1.10. Robustez 33
4.2. Controlo de Qualidade 33

5. Requisitos do Método a Implementar 35
6. Implementação do método de quantificação dos esteroides endógenos 38
6.1. Material utilizado 38
6.2. Solventes e reagentes 38
6.3. Equipamentos utilizados 39
6.4. Preparação de soluções 39
6.5. Preparação das amostras, soluções de controlo e calibradores 40
6.6. Preparação do branco de urina 42
6.7. Condições operacionais da técnica cromatográfica 43
6.8. Linearidade e gama de trabalho 44
6.9. Avaliação da especificidade e da seletividade 44
6.10. Testes de recuperação 45
6.11. Limite de deteção e quantificação 46
6.12. Teste de diluição 47
6.13. Arrastamento 48
6.14. Precisão e exatidão 49
6.14.1. Avaliação da Repetibilidade, Precisão Intermédia e Exatidão 49
6.14.1.1. Avaliação do erro do limite de quantificação 50
6.14.1.2. Avaliação do erro para o nível de concentração 5 vezes o limite de quantificação 50
6.14.1.3. Avaliação do erro para o nível de concentração intermédia 51
6.14.1.4. Avaliação do erro para o nível de concentração elevada 51
6.14.1.5. Avaliação do erro para o nível de concentração dos limites de decisão para análise de IRMS 52
7. Resultados 53
7.1. Estudo da linearidade e da gama de trabalho 53
7.2. Avaliação da especificidade e da seletividade 66
7.3. Testes de recuperação 72
7.4. Limite de deteção e quantificação 73
7.5. Teste de diluição 79
7.6. Arrastamento 84
7.7. Precisão e exatidão 86
7.8. Cartas de Controlo 103
8. Conclusões 106
9. Referências bibliográficas 108
10. Anexos I

10.1. Cartas de Média (Cartas de controlo) II
10.1.1. Cartas de média para o LQ II
10.1.2. Cartas de média para o 5LQ III
10.1.3. Cartas de média para o Aiva V
10.1.4. Cartas de média para o GA VIII
10.1.5. Cartas de média para o IRMS X

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Critérios para a identificação dos analitos utilizando a abundância relativa atualmente em vigor.[13] 15
Tabela 2 – Identificação dos Iões de diagnóstico dos vários esteroides ensaiados 45
Tabela 3 – Volume usado de solução padrão para a fortificação das urinas sintéticas para o estudo da recuperação 46
Tabela 4 – Concentração das substâncias na 1ª pool preparada para os testes de diluição 47
Tabela 5 – Volumes da pool utilizados na a preparação dos tubos para o teste de diluição 47
Tabela 6 – Volumes da pool utilizados na preparação dos tubos para o segundo teste de diluição 48
Tabela 7 – Concentração das substâncias na 2ª pool preparada para os testes de diluição 48
Tabela 8 – Concentrações dos endógenos nas várias soluções preparadas 49
Tabela 9 – Concentração de cada substância na solução de urina sintética usada nos ensaios avaliação do erro no limite de quantificação 50
Tabela 10 – Concentração de cada substância na solução de urina sintética usada nos ensaios de avaliação do erro para o nível de concentração 5 vezes o limite de quantificação 51
Tabela 11 – Concentração de cada substância na solução de urina sintética usada nos ensaios avaliação do erro para o nível da concentração intermédia 51
Tabela 12 – Concentração de cada substância na solução de urina sintética usada nos ensaios de avaliação do erro para o nível de concentração elevada 51
Tabela 13 – Concentração de Androsterona e Etiocolanolona na pool de urina sintética antes e depois da adição dos últimos 6 mL de urina 52
Tabela 14 – Concentrações de esteroides nos calibradores usados no traçar da curva de calibração 53
Tabela 15 – Equações das retas de calibração para cada um das seis substâncias a validar e o respetivos coeficientes de correlação 54
Tabela 16 – Resultado da regressão aplicada a curva de calibração da Androsterona 56
Tabela 17 – Resultado da regressão aplicada a curva de calibração da Etiocolanolona 56
Tabela 18 – Resultado da regressão aplicada a curva de calibração do 5αAdiol 56
Tabela 19 – Resultado da regressão aplicada a curva de calibração do 5βAdiol 57

Tabela 20 – Resultado da regressão aplicada a curva de calibração da Epitestosterona 57
Tabela 21 – Resultado da regressão aplicada a curva de calibração da Testosterona57
Tabela 22 – Concentrações dos esteroides nos calibradores usadas no traçado das curvas de calibração 60
Tabela 23 – Equações das novas curvas de calibração e respetivos coeficientes de correlação 61
Tabela 24 – Regressão para a curva de calibração da Androsterona com 10 calibradores e um branco de urina 61
Tabela 25 – Regressão para a curva de calibração da Etiocolanolona com 10 calibradores e um branco de urina 62
Tabela 26 – Regressão para a curva de calibração da 5αAdiol com 10 calibradores e um branco de urina 62
Tabela 27 – Regressão para a curva de calibração da 5βAdiol com 10 calibradores e um branco de urina 62
Tabela 28 – Regressão para a curva de calibração da Epitestosterona com 10 calibradores e um branco de urina 63
Tabela 29 – Regressão para a curva de calibração da Testosterona com 10 calibradores e um branco de urina 63
Tabela 30 – Regressão para a curva de calibração da Testosterona com 9 calibradores e um branco de urina 65
Tabela 31 - Tempos de retenção relativos das substâncias a quantificar das 10 amostras iniciais 67
Tabela 32 - Relações iónicas das substâncias das 10 amostras iniciais 67
Tabela 33 – Tempos de retenção relativos das substâncias a quantificar das amostras que foram submetidas a uma primeira extração com éter terc-butilmetílico e uma segunda extração com n-pentano 71
Tabela 34 – Relações iónicas das substâncias das amostras que foram submetidas a uma primeira extração com éter terc-butilmetílico e uma segunda extração com n-pentano 72
Tabela 35 – Médias das recuperações obtidas para cada um das seis substâncias a validar com os dois solventes de extração 73
Tabela 36 – Concentrações das substâncias a que se fez uma gama alargada de concentrações com 10 calibradores e um branco de urina 73
Tabela 37 – Concentrações das substâncias a que se fez uma gama baixa de concentrações com 6 calibradores e um branco de urina 74

Tabela 38 – Concentrações das substâncias a que se fez uma gama alta de concentrações com 6 calibradores..... 74
Tabela 39 – Equações, coeficientes de correlação e desvio padrão residual da curva para todas as curvas de calibração feitas para o estudo do limite de deteção e de quantificação 77
Tabela 40 - Limites de deteção e quantificação obtidos para as várias curvas de calibração 77
Tabela 41 – Concentrações dos esteroides nos calibradores da reta de calibração feita por diluição da solução Aiva 78
Tabela 42 – Limites de deteção e quantificação obtidos pela diluição sucessiva da solução Aiva 78
Tabela 43 – Concentrações das substâncias nos diferentes spikes de Aiva..... 78
Tabela 44 – Limites de deteção e quantificação obtidos por spikes de uma solução Aiva mais diluída 79
Tabela 45 – Áreas dos picos das substâncias nas misturas de derivatização injetadas intercaladas com os calibradores de cama alta..... 85
Tabela 46 – Concentração das substâncias endógenas, nos calibradores usados para a avaliação da precisão e da exatidão 86
Tabela 47 – Concentração das substâncias endógenas, nos calibradores utilizados para a gama baixa da avaliação da precisão e da exatidão 87
Tabela 48 – Concentração das substâncias endógenas, nos calibradores utilizados para a gama baixa da avaliação da precisão e da exatidão 87
Tabela 49 – Resultados obtidos para o estudo da repetibilidade, da precisão intermédia e da exatidão da gama baixa da Androsterona 88
Tabela 50 – Resultados obtidos para o estudo da repetibilidade, da precisão intermédia e da exatidão da gama alta da Androsterona..... 88
Tabela 51 – Valores obtidos no estudo da repetibilidade e da precisão intermédia para a Androsterona 89
Tabela 52 – Resultado obtidos na avaliação da exatidão para a Androsterona 90
Tabela 53 – Resultados obtidos para o estudo da repetibilidade, da precisão intermédia e da exatidão da gama baixa da Etiocolanolona 91
Tabela 54 – Resultados obtidos para o estudo da repetibilidade, da precisão intermédia e da exatidão da gama alta da Etiocolanolona..... 92
Tabela 55 – Valores obtidos no estudo da repetibilidade e da precisão intermédia para a Etiocolanolona 92
Tabela 56 – Resultado obtidos na avaliação da exatidão para a Etiocolanolona 93

Tabela 57 – Resultados obtidos para o estudo da repetibilidade, da precisão intermédia e da exatidão da gama baixa do 5αAndrostandiol 93
Tabela 58 – Resultados obtidos para o estudo da repetibilidade, da precisão intermédia e da exatidão da gama alta do 5αAndrostandiol 94
Tabela 59 – Valores obtidos no estudo da repetibilidade e da precisão intermédia para o 5αAndrostandiol..... 94
Tabela 60 – Resultado obtidos na avaliação da exatidão para o 5αAndrostandiol..... 95
Tabela 61 – Resultados obtidos para o estudo da repetibilidade, da precisão intermédia e da exatidão da gama baixa do 5βAndrostandiol..... 95
Tabela 62 – Resultados obtidos para o estudo da repetibilidade da precisão intermédia e da exatidão da gama alta do 5βAndrostandiol 96
Tabela 63 – Valores obtidos no estudo da repetibilidade e da precisão intermédia para o 5βAndrostandiol 96
Tabela 64 – Resultado obtidos na avaliação da exatidão para o 5βAndrostandiol 97
Tabela 65 – Resultados obtidos para o estudo da repetibilidade da precisão intermédia e da exatidão da gama baixa da Epitestosterona..... 97
Tabela 66 – Resultados obtidos para o estudo da repetibilidade da precisão intermédia e da exatidão da gama alta da Epitestosterona 98
Tabela 67 – Valores obtidos no estudo da repetibilidade e da precisão intermédia para a Epitestosterona..... 98
Tabela 68 – Resultado obtidos na avaliação da exatidão para a Epitestosterona 99
Tabela 69 – Resultados obtidos para o estudo da repetibilidade da precisão intermédia e da exatidão da gama baixa da Testosterona..... 99
Tabela 70 – Resultados obtidos para o estudo da repetibilidade da precisão intermédia e da exatidão da gama alta da Testosterona 100
Tabela 71 – Valores obtidos no estudo da repetibilidade e da precisão intermédia para a Testosterona..... 100
Tabela 72 – Resultado obtidos na avaliação da exatidão para a Testosterona 101
Tabela 73 – Determinação da incerteza combinada e incerteza combinada relativa para os vários controlos 101

Lista de Figuras

Figura 1 – Organograma da ADoP, figura retirada da página ADoP[2] 2
Figura 2 – Esquema em árvore das substâncias e métodos de dopagem proibidos, esquema feito a partir da Lista de Substâncias proibidas da WADA[11] 9
Figura 3 - Esquema em árvore dos grupos e subgrupos para os Agentes Anabolizantes, esquema feito a partir da Lista de Substâncias proibidas da WADA[11] 10
Figura 4 – Esquema em árvore dos grupos relativos às Hormonas Peptídicas, Fatores de Crescimento, Substâncias Relacionadas e Miméticos, esquema feito a partir da Lista de Substâncias proibidas da WADA[11] 11
Figura 5 – Estrutura química comum aos esteroides, imagem adaptada de uma imagem retirada do artigo Anabolic—Androgenic Steroids[6] 20
Figura 6 – Alterações normalmente feitas à testosterona para aumentar a biodisponibilidade no organismo após a toma, imagem retirada do artigo Anabolic—Androgenic Steroids[6] 21
Figura 7 – Espectro de massa com ionização por EI da testosterona (a) e do seu derivativo usado nas análises de doping a testosterona-bis-O-TMS (b), a imagem foi adaptada de[12] 25
Figura 8 – Representação esquemática da hidrólise da testosterona pela enzima β-glucuronidase 41
Figura 9 – Representação esquemática simplificada da derivatização da testosterona 42
Figura 10 – Retas de calibração dos seis esteroides ensaiados 54
Figura 11 – Representação dos residuais da Androsterona 55
Figura 12 - Representação dos residuais da Etiocolanolona 55
Figura 13 – Representação dos residuais do 5αAdiol 55
Figura 14 – Representação dos residuais do 5βAdiol 55
Figura 15 – Representação dos residuais da Epitestosterona 55
Figura 16 – Representação dos residuais da Testosterona 55
Figura 17 – Retas de calibração de Testosterona, Epitestosterona e 5αAdiol obtidas com os novos calibradores 60
Figura 18 – Retas de calibração da Androsterona, Etiocolanolona e 5βAdiol obtidas com os novos calibradores 61
Figura 19 – Representação dos residuais da Androsterona 64
Figura 20 – Representação dos residuais da Etiocolanolona 64
Figura 21 – Representação dos residuais do 5αAdiol 64

Figura 22 – Representação dos residuais do 5βAdiol 64
Figura 23 – Representação dos residuais da Epitestosterona 64
Figura 24 – Representação dos residuais da Testosterona 64
Figura 25 – Reta de calibração para a Testosterona com 9 calibradores e um BU. 65
Figura 26 – Representação dos residuais da Testosterona com uma reta de calibração de 0 a 350 ng mL^{-1} 65
Figura 27 – Cromatograma obtido em SCAN para a amostra BU01 com apenas uma extração com éter terc-butilmetílico 68
Figura 28 – Cromatograma, com os iões principais extraídos, obtido em SIM para a amostra BU01 com apenas uma extração com éter terc-butilmetílico 68
Figura 29 – Cromatograma, em modo SCAN, da fração livre da amostra BU01 obtida na primeira extração 68
Figura 30 – Cromatograma, com os iões principais extraídos, obtido em SIM para a fração livre da amostra BU01 69
Figura 31 – Cromatograma obtido em SCAN para a amostra BU01 com as duas extrações com éter terc-butilmetílico 69
Figura 32 – Cromatograma, com os iões principais extraídos, obtido em SIM para a amostra BU01 com as duas extrações com éter terc-butilmetílico 69
Figura 33 – Cromatograma obtido em SCAN para a amostra BU01 com as duas extrações, a primeira com éter terc-butilmetílico e a segunda com n-pentano 70
Figura 34– Cromatograma, com os iões principais extraídos, obtido em SIM para a amostra BU01 com as extrações, a primeira com éter terc-butilmetílico e a segunda com n-pentano 71
Figura 35 – Representação gráfica das curvas de calibração com uma gama alargada de concentrações em que o solvente de extração foi o éter terc-butilmetílico 74
Figura 36 – Representação gráfica das curvas de calibração com uma gama alargada de concentrações em que o solvente de extração foi o n-pentano 74
Figura 37 – Representação gráfica das curvas de calibração com uma gama baixa de concentrações em que o solvente de extração foi o éter terc-butilmetílico 75
Figura 38 – Representação gráfica das curvas de calibração com uma gama baixa de concentrações em que o solvente de extração foi o n-pentano 75
Figura 39 – Representação gráfica das curvas de calibração com uma gama alta de concentrações em que o solvente de extração foi o éter terc-butilmetílico 75
Figura 40 – Representação gráfica das curvas de calibração com uma gama alta de concentrações em que o solvente de extração foi o n-pentano 76

Figura 41 – Representação das curvas das diluições de Androsterona, Etiocolanolona e 5βAdiol com a extração por éter terc-butilmetílico 80
Figura 42 – Representação das curvas das diluições de 5αAdiol, Epitestosterona e Testosterona com a extração por éter terc-butilmetílico 80
Figura 43 – Representação das curvas das diluições de Androsterona, Etiocolanolona e 5βAdiol com a extração por n-pentano 80
Figura 44 – Representação das curvas das diluições de 5αAdiol, Epitestosterona e Testosterona com a extração por n-pentano 81
Figura 45 – Representação das curvas das diluições de Androsterona, Etiocolanolona e 5βAdiol com a extração por éter terc-butilmetílico 82
Figura 46 – Representação das curvas das diluições de 5αAdiol, Epitestosterona e Testosterona com a extração por éter terc-butilmetílico 82
Figura 47 – Representação das curvas das diluições de Androsterona, Etiocolanolona e 5βAdiol com a extração por n-pentano 82
Figura 48 – Representação das curvas das diluições de 5αAdiol, Epitestosterona e Testosterona com a extração por n-pentano 83
Figura 49 – Representação das novas curvas das diluições de Etiocolanolona com a extração por n-pentano 83
Figura 50 – Representação das novas curvas das diluições de 5βAdiol extraído com éter terc-butilmetílico, Epitestosterona e Testosterona com a extração por n-pentano 84
Figura 51 – Cromatograma da solução GA1 repartido por razão massa/carga, em que no eixo das ordenadas temas a abundância do pico e nas abscissas o tempo de retenção. O pico 1 (androsterona), com o tempo de retenção 7.603, e o pico 2 (etiocolanolona), com o tempo de retenção 7.683, foram “extraídos” utilizando a razão massa/carga 434; o pico 3 (5αadiol), com o tempo de retenção 7.773, e o pico 4 (5βadiol), com o tempo de retenção 7.817, foram “extraídos” usando a razão massa/carga 241; o pico 5 (epitestosterona), com o tempo de retenção 8.260, e o pico 6 (testosterona), com o tempo de retenção 8.464, foram “extraídos” utilizando a razão massa/carga 432 85
Figura 52 - Cromatograma da solução MD1 repartido por razão massa/carga, em que no eixo das ordenadas temas a abundância do pico e nas abscissas o tempo de retenção. No primeiro patamar encontra-se o que foi obtido pela “extração” utilizando a razão massa/carga 434; no segundo patamar encontra-se o que foi obtido pela “extração” usando a razão massa/carga 241; no terceiro patamar encontra-se o que foi obtido pela “extração” utilizando a razão massa/carga 432 86
Figura 53 – Carta de Média para o LQ da Androsterona 104

Figura 54 – Carta de Média para o LQ da Etiocolanolona..... 104
Figura 55 – Exemplo da folha de Excel® onde foi feito o tratamento dos dados para a seletividade..... I
Figura 56 – Carta de Média para o LQ do 5αAndrostanediol II
Figura 57 – Carta de Média para o LQ do 5βAndrostanediol II
Figura 58 – Carta de Média para o LQ do Epitestosterona III
Figura 59 – Carta de Média para o LQ do Testosterona III
Figura 60 – Carta de Média para o controlo 5LQ da Androsterona III
Figura 61 – Carta de Média para o controlo 5LQ da Etiocolanolona IV
Figura 62 – Carta de Média para o controlo 5LQ do 5αAndrostanediol.....IV
Figura 63 – Carta de Média para o controlo 5LQ do 5βAndrostanediol.....IV
Figura 64 – Carta de Média para o controlo 5LQ da Epitestosterona.....V
Figura 65 – Carta de Média para o controlo 5LQ da Testosterona.....V
Figura 66 – Carta de Média para o controlo Aiva da Androsterona.....V
Figura 67 – Carta de Média para o controlo Aiva da Etiocolanolona.....VI
Figura 68 – Carta de Média para o controlo Aiva do 5αAndrostanediol VI
Figura 69 – Carta de Média para o controlo Aiva do 5βAndrostanediol VII
Figura 70 – Carta de Média para o controlo Aiva da Epitestosterona.....VII
Figura 71 – Carta de Média para o controlo Aiva da Testosterona.....VII
Figura 72 – Carta de Média para o controlo GA da Androsterona.....VIII
Figura 73 – Carta de Média para o controlo GA da Etiocolanolona.....VIII
Figura 74 – Carta de Média para o controlo GA do 5αAndrostanediol VIII
Figura 75 – Carta de Média para o controlo GA do 5βAndrostanediol IX
Figura 76 – Carta de Média para o controlo GA da Epitestosterona IX
Figura 77 – Carta de Média para o controlo GA da Testosterona IX
Figura 78 – Carta de Média para o controlo IRMS da Androsterona.....X
Figura 79 – Carta de Média para o controlo IRMS da Etiocolanolona.....X

Lista de Abreviaturas

5α / 5αAdiol – 5αAndrostanediol / 5α-androstane-3α,17β-diol

5β / 5βAdiol – 5βAndrostanediol / 5β-androstane-3α,17β-diol

ADoP – Autoridade Antidopagem de Portugal

AMA / WADA – Agência Mundial Antidopagem, do inglês *Word Anti-Doping Agency*

Andros / A – Androsterona

AUT – Norma Internacional de Autorização para Utilização Terapêutica

BU – Branco de urina

Cal. – Calibradores

CDER – do inglês *Center for Drug Evaluation and Research*

CI – ionização química, do inglês *Chemical Ionization*

CNAD – Conselho Nacional Antidopagem

CV – Coeficiente de variação

CVM – do inglês *Center for Veterinary Medicine*

DHEA – Dehidroepiandrosterona

EAA / AAS – esteroides androgénicos anabolisantes, do inglês *anabolic androgenic steroids*

E / Epi – Epitestosterona

EI – ionização eletrónica do inglês *Electron Ionization*

ELISA – do inglês *enzyme-linked immunosorbent assay*

Etio / Et – Etiocolanolona

FDA – do inglês *US Food and Drug Administration*

GC-MS – Cromatógrafo gasoso com espectrómetro de massa (do inglês *Gas chromatography-mass spectrometry*)

GC/MS^n – cromatográfia gasosa acoplada à espectrometria de massa *tandem*

IRMS – espectroscopia de massa de razões isotópica, do inglês *isotope-ratio mass spectrometry*

IOC / COI – Comité Olímpico Internacional (do inglês *International Olympic Committee*)

IPDJ, I.P. – Instituto Português do Desporto e Juventude

ISO – do inglês *International Organization for Standardizarion*

IUPAC – União Internacional de Química Pura e Aplicada, do inglês *International Union of Pure and Applied Chemistry*

LAD – Laboratório de Análises de Dopagem

LC/MS – cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa

LC/MS^n – cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa *tandem*

LD – Limite de deteção

LQ – Limite de quantificação

MRC – material de referência certificado

MSTFA – n-metil-trimetilsililtrifluoro acetamida

PNA – Programa Nacional Antidopagem

SG – densidade, do inglês *specific gravity*

Sol. – Solução

SPE – extração de fase sólida, do inglês *solid-phase extraction*

T / Testo – Testosterona

T/E – razão entre a testosterona e a epitestosterona

v/m/v – volume/massa/volume

1. Introdução

1.1. Objetivo e Programa de Trabalho

O presente trabalho insere-se no âmbito da unidade curricular de Estágio do curso de Mestrado em Química da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto e é o resultado do desenvolvimento de um projeto enquadrado na área da Química Analítica, tendo por principal objetivo a implementação e a validação de um método quantitativo para a análise de seis esteroides endógenos, nomeadamente a androsterona, a etiocolanolona, o 5αandrostanediol, o 5βandrostanediol, a epitestosterona e a testosterona, em urina por cromatografia gasosa com deteção por espectrometria de massa (GC-MS).

O objetivo proposto foi alcançado através da realização sequencial de um conjunto de ações previamente planeadas no programa de trabalho. Na primeira ação de trabalho procedeu-se a um ajustamento da curva de temperatura do GC-MS para os compostos a analisar, seguido de ensaios para determinar os tempos de retenção, tal como a seletividade e a capacidade de identificação do método aos vários compostos.

Prosseguiu-se com a implementação e validação definindo as gamas de trabalho, tal como a linearidade das mesmas e a obtenção dos dados necessários para os restantes parâmetros de mérito: a recuperação da fase de extração, o arrastamento, os limites de deteção e quantificação, a precisão e a exatidão. Por fim, concluiu-se o programa de trabalho com a criação de cartas de controlo e com a redação de relatórios internos.

1.2. Entidade de Acolhimento

O estágio foi realizado no Laboratório de Análises de Dopagem (LAD) localizado em Lisboa. O LAD é um dos 34 laboratórios acreditados pela *World Anti-Doping Agency* (WADA), ou em português: Agência Mundial Antidopagem (AMA), para a realização de análises a amostras humanas de controlo de *doping*.[(1)]

A Autoridade Antidopagem de Portugal é a organização nacional de antidopagem que tem funções no controlo e na luta contra a dopagem no desporto, sendo a entidade responsável pela adoção de regras com vista a desencadear, implementar ou aplicar qualquer fase do procedimento de controlo de dopagem.[(2)]

O Laboratório está incumbido de realizar análises relativas ao controlo da dopagem, a nível nacional ou internacional, se para tal for solicitado. Também terá de executar análises bioquímicas e afins que têm como objetivo apoiar as ações desenvolvidas pelos organismos e entidades competentes na preparação dos praticantes desportivos,

principalmente os de alto rendimento, tal como colaborar nas ações de recolha necessárias.

O Laboratório também tem que executar, no âmbito das suas competências, os protocolos celebrados entre o Instituto Português do Desporto e Juventude (IPDJ), e outras instituições, colaborar em ações de formação e investigação no âmbito da dopagem e assegurar as restantes funções que lhe sejam dadas.[3]

O LAD abrange o Laboratório de Análises de Dopagem, o Departamento de Análises Clínicas, a Secção Administrativa e a Gestão da Qualidade. Este é dirigido por um Coordenador Científico, e como parte dos recursos humanos tem também um Técnico Assessor, um Responsável pelo Sector de Análises Clínicas, um Técnico Superior e um Adjunto responsáveis pela cadeia de custódia, tal como Técnicos Superiores de Laboratório, Técnicos de Diagnóstico e Terapêutica e um Auxiliar de Laboratório.[3]

O Laboratório também usufrui de autonomia técnica e científica e reporta diretamente ao Presidente da Autoridade Antidopagem de Portugal (ADoP). Na Figura 1 encontra-se o esquema da organização do funcionamento da ADoP dividida em vários sectores, entre eles o LAD.

Figura 1 – Organograma da ADoP, figura retirada da página ADoP[2]

1.3. Inserção do Tema

Foi no final dos anos 60 que o Movimento Desportivo tomou consciência da existência problemática da dopagem no desporto e, em 1968, o Comité Olímpico Internacional (COI) decidiu realizar pela primeira vez controlos de dopagem nos Jogos Olímpicos de Verão que decorreram na cidade do México.[4]

O primeiro controlo de dopagem em Portugal foi, também, feito em 1968, no decurso da Volta a Portugal em bicicleta. As análises foram realizadas num laboratório particular em Lisboa.

Durante os finais dos anos 60 e durante os anos 70 a maioria dos controlos foram feitos para a modalidade de ciclismo, seguindo os regulamentos da *Union Cycliste Internationale*. Inicialmente, as análises foram realizadas na Faculdade de Farmácia de Lisboa, passando mais tarde, entre os anos 1974 e 1981, a ser realizados na Faculdade de Farmácia de Coimbra.

Das análises feitas para o ciclismo entre 69 e 84, cerca de 11% dos resultados foram positivos, sendo mais reduzida relativamente às obtidas noutros países, apesar de ainda ser uma percentagem elevada. Contudo, os procedimentos analíticos da altura eram feitos essencialmente com métodos cromatográficos menos sensíveis que os atuais, não sendo possível detetar alguns compostos, como os esteroides anabolizantes, os quais já se suspeitava da sua utilização naquela altura.

O primeiro diploma legal português que aborda a temática da dopagem, o Decreto-Lei n.º 420/70, foi publicado no ano de 1970. Sete anos mais tarde, as autoridades portuguesas decidem criar a Comissão para Regulamentação do Controlo Antidopagem. Esta passou, mais tarde, a ser a primeira organização nacional antidopagem de Portugal, sendo intitulada de Conselho Nacional Antidopagem (CNAD). A primeira Legislação sobre o Controlo Antidoping, foi publicada em Setembro de 1979.

A instalação do Laboratório de Análises do Doping nas instalações do Centro de Medicina Desportiva de Lisboa iniciou-se no final dos anos 70, Lisboa pelas mãos do Prof. Doutor Lesseps dos Reys. Contudo, o laboratório só viria a ser criado oficialmente em 1985, pelo Dr. Júlio Miranda Calha, o Secretário de Estado do Desporto da altura, através da publicação do Despacho n.º 29/85, de 12 de agosto. O laboratório recebeu, na altura, a denominação de Laboratório de Análises de Doping e Bioquímica, uma vez que possuía um departamento distinto para cada área. Só em 1987, é que o laboratório foi acreditado pelo COI, passando a fazer parte de um grupo muito restrito de laboratórios acreditados a nível mundial. As análises começaram a ser efetuadas no Laboratório de Análises de Doping a partir de 1982, começando, também, a controlar outras modalidades além do ciclismo, com a base na legislação publicada nos finais de 1979. O número de modalidades desportivas controladas em Portugal foi aumentando de forma progressiva, tendo ultrapassado as 10 modalidades em 1988, as 20 modalidades em 1992, as 30 modalidades em 1998, as 40 modalidades em 2000 e as 50 modalidades em 2004.

Apesar do aumento progressivo do número de modalidades controladas, só a partir de 98 é que o Conselho Nacional Antidopagem (CNAD) passou a conceber anualmente um verdadeiro Programa Nacional Antidopagem (PNA) em cooperação estreita com as Federações Desportivas titulares de utilidade pública desportiva.

Em 1994, o IOC, preocupado com a utilização crescente de esteroides anabolizantes e de outras substâncias dopantes com efeitos de longa duração, criou os controlos de dopagem fora de competição. Portugal implementou-os ainda nesse ano e tem vindo a realizar um número crescente ano após ano, reconhecendo o seu papel fundamental na dissuasão do uso de substâncias dopantes.

Portugal foi um dos primeiros países a nível mundial a reconhecer um direito fundamental dos praticantes desportivos: o direito ao tratamento. O CNAD criou, em 1994, um sistema de notificação da utilização de substâncias dopantes para tratamento de situações patológicas, para que o praticante desportivo pudesse exercer esse direito fundamental, que só viria a ser reconhecido a nível internacional em 2003 pela Norma Internacional de Autorização para Utilização Terapêutica (AUT) da WADA.

2. Controlo Analítico de Substâncias Proibidas no Desporto

2.1. *Doping*

Doping é o termo utilizado para o abuso de drogas, em animais ou por atletas, no desporto. Este termo só começou a ser utilizado em 1933, apesar do uso de drogas com o intuito de melhorar o desempenho desportivo não ser algo recente. Há autores gregos, como *Phylostratos* e *Galen*, que comentaram a ética dos competidores nos Jogos Olímpicos que tomavam qualquer tipo de preparações de forma a melhorar o seu desempenho, como exemplos das substâncias ingeridas temos o consumo de cogumelos ou sementes de sésamo. Na altura dos Romanos os gladiadores eram frequentemente drogados ou tomavam estimulantes para tornar as lutas mais sangrentas, e aumentar a sua resistência de modo agradar aos espectadores. Mais recentemente, no início do século XX, o consumo de estimulantes por parte dos atletas tem como objetivo aliviar a fadiga e melhorar a sua concentração.[5-8]

O verdadeiro efeito das drogas no desempenho desportivo é por vezes difícil de determinar, uma vez que dos poucos resultados publicados alguns afirmam haver um aumento na performance do atleta enquanto outros afirmam não haver alteração, não chegando a haver um consenso entre eles. E apesar de ainda não ser possível comprovar todos os efeitos negativos a curto e longo prazo das drogas ingeridas pelos atletas, há provas suficientes dos efeitos negativos de algumas delas para justificar a sua proibição em competições desportivas.[5]

A procura das substâncias proibidas consumidas pode ser feita através da procura da própria substância em urina, no sangue ou por vezes em amostras capilares, ou através de metabolitos, isómeros, ou isómeros de metabolitos da substância a detetar. Encontrar qualquer indicador científico da administração da substância proibida, ou à sua exposição, na urina ou no sangue é equivalente a encontra-la. À exceção das substâncias com valor limite, ou limite de ação, todas as outras substâncias são de tolerância zero, ou seja, caso sejam encontradas nas amostras o atleta será excluído de competição.[5]

Em desportos humanos, a entidade controladora principal foi o Comité Olímpico Internacional, COI. Esta entidade criou a definição de *doping* no desporto, em 1963, após a morte de um ciclista dinamarquês nos jogos Olímpicos de 1960, de um ciclista do Reino Unido durante a volta à França, e à prevalência do uso de drogas potencialmente letais no desporto. Assim, o uso do *doping* foi banido em 1964, contudo

só em 1967 é que foi estabelecido uma comissão médica com a responsabilidade de proibir o *doping*, desenvolver o Código do Movimento Olímpico Anti Dopagem e redigir uma lista de substâncias proibidas.

Apesar destes desenvolvimentos no âmbito da dopagem, uma investigação feita pela revista *Sports Illustrated*, em 1969, concluiu que nenhuma organização desportiva americana teria adotado regulamentos para o seu controlo. Só em 1982 é que a Liga Nacional de Futebol Americano, NFL, começou a fazer testes a drogas aos jogadores, contudo os esteroides anabolizantes só foram introduzidos nos testes em 1987. Contudo até os anos 20 poucos achavam que o *doping* em desportos profissionais seria injusto ou batota, considerando-o um auxiliar de trabalho. Mesmo em 2002, os desportos profissionais nos Estados Unidos da América que eram sujeitos a testes de *doping* tinham critérios menos rigorosos que os do COI. Uma das últimas ligas a implementar os testes anti dopagem foi a Liga de Basebol, nos EUA, que só os implementou em 2004 quando se viu obrigado a fazê-lo na sequência de alguns escândalos públicos que envolviam jogadores de basebol e denúncias anónimas de testes positivos para esteroides anabolizantes e hormona de crescimento de alguns jogadores. Em contraste com os desportos humanos nos quais as maiores organizações desportivas começaram a banir o *doping* nos finais do século XX e a caracterizá-lo como uma forma de batota, o *doping* já o era considerado ilegal em corridas de cavalos desde 1903.[8; 9]

Em 1999 os assuntos relacionados com o *doping* passaram a ser geridos por uma entidade internacional independente criada apenas para essa finalidade. A Agência Mundial Antidopagem, AMA ou WADA, é composta e foi fundada por movimentos desportivos e governos mundiais. Esta tem como função a investigação cientifica, a educação na área do *doping*, bem como, o desenvolvimento de capacidades anti dopagem e a monitorização do Código Mundial Anti Dopagem, o documento que harmoniza as políticas anti dopagem em todos os desportos e países.[5; 6; 9; 10]

Este documento define *doping* como o uso de um expediente, substância ou método, que é potencialmente prejudicial para a saúde do atleta e/ou é capaz de aumentar o seu desempenho. Este pode ser ainda definido como presença, no corpo do atleta, de uma substância proibida ou como a prova do uso de um método ou substância proibida. Um competidor que esteja a efetuar um tratamento médico legítimo não é desclassificado. Contudo, isto levanta um problema em relação a quais dos medicamentos devem ou não ser proibidos, ou se um atleta que está a efetuar determinado tratamento deverá ou não competir.[5]

A WADA publica todos os anos uma lista com as substâncias e métodos proibidos. Este estão divididos em substâncias proibidas em qualquer altura (dentro e fora de

competição), substâncias proibidas somente em competição e substâncias proibidas em alguns desportos em particular.[11]

2.1.1. Riscos potenciais

a) Recurso fraudulento

Desde cedo que foi implementada a ideia de jogo limpo e integridade a todos os membros de uma comunidade desportiva. A ideologia de que apenas as pessoas íntegras devem ter permissão para competir já estava implementada nos jogos Olímpicos antigos, nos quais apenas os atletas que não tinham sido acusados de crimes poderiam participar. Os desportistas também eram obrigados a jurar que tinham treinado nos 10 meses anteriores ao Jogos e tinham que treinar outras 4 semanas no local dos jogos sobre a supervisão dos juízes. O *doping* viola os princípios básicos do jogo limpo e resulta no engado tanto dos outros desportistas como dos espectadores. Os atletas "enganados" podem sofrer de desvantagens financeiras e sociais tal como de desilusão devido à perder de uma competição contra um desportista que melhorou o seu desempenho artificialmente. Consequentemente, o *doping* deve ser visto como batota e os direitos dos atletas dedicados a manter os desportos limpos e justos devem ser protegidos.[12]

b) Impacto na saúde do atleta

A utilização de substâncias dopantes pode comprometer a saúde física e mental do atleta a curto ou longo prazo, assim sendo, a preocupação com a saúde e segurança do desportista tem sido um fator importante na luta contra o *doping*. Foram publicados vários artigos relatando casos acerca de consequências sérias, ou até mesmo fatais devido ao abuso de drogas tanto em desporto amador como profissional. Esses artigos também abordam efeitos colaterais observados que são associados ao *doping*. Alguns deles foram o suposto "incentivo final" para as federações desportivas internacionais estabelecerem a regras anti dopagem para os seus desportistas.[12]

c) Violação da ética desportiva

Segundo o Código Mundial Anti Dopagem e o senso comum relativamente ao valor intrínseco do desporto, o *doping* é uma contradição ao espirito desportivo. Esta problemática foi avaliada eticamente considerando os valores atribuídos ao espírito desportivo. O jogo limpo, a honestidade, o caráter, a educação e a virtude do atleta são partes integrantes da pedagogia e da ética pedagógica. Estas são complementadas por vários aspetos adicionais da ética no desporto relativamente à saúde e ao uso do corpo

humano ou animal, assim como o respeito pelas regras, leis, por outros participantes e pelo atleta em questão. A violação dos princípios éticos no desporto não é aceitável, e o seu incumprimento é visto como uma transgressão.[12]

2.2. Substâncias e Métodos de Dopagem Proibidos

As várias substâncias e métodos de dopagem proibidos encontram-se numa lista criada pela WADA que é constantemente atualizada. A sua versão atual é intitulada de "*The 2015 prohibited list*". Na Figura 2 encontra-se um esquema das várias categorias de compostos e métodos que são proibidos atualmente.

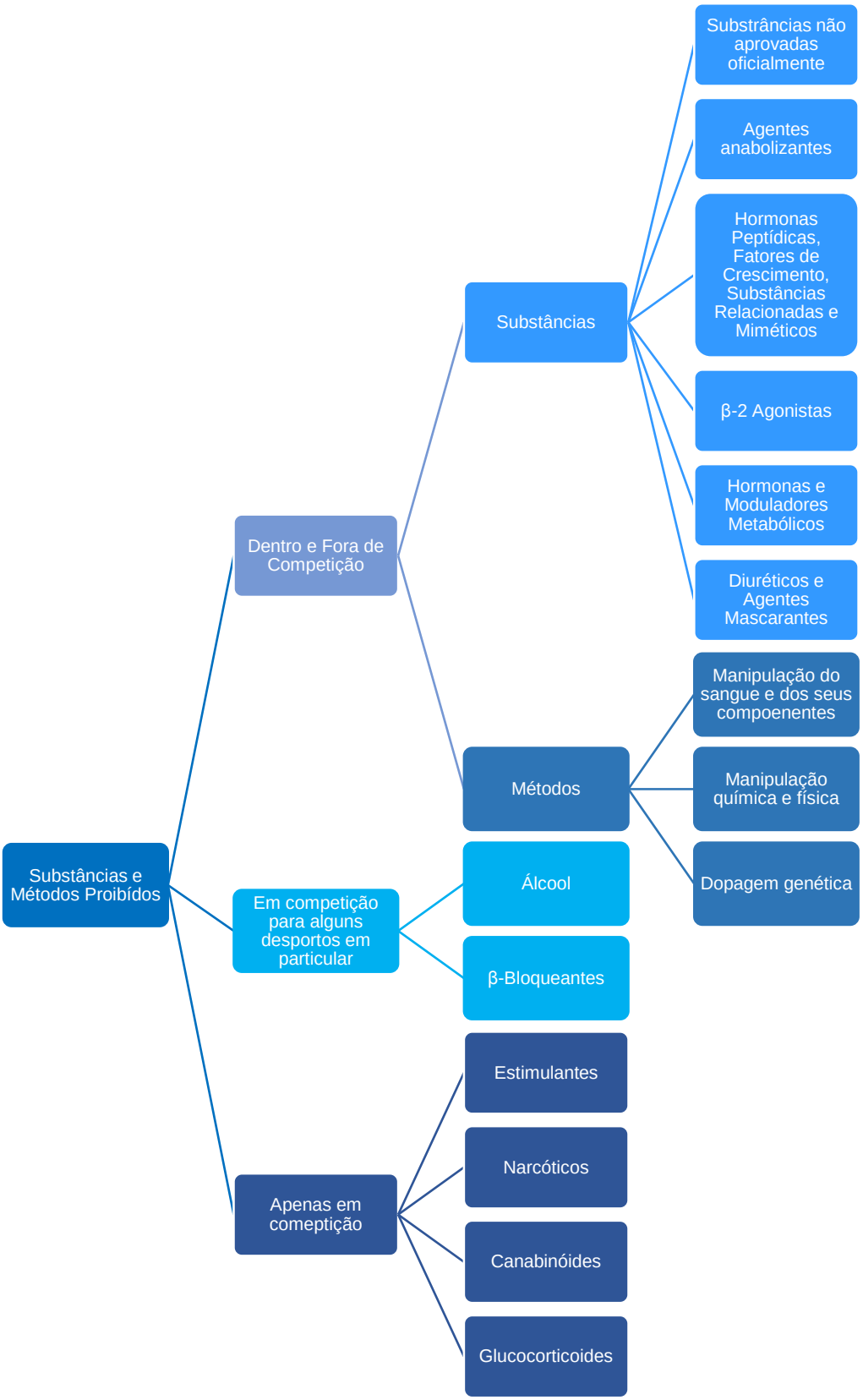


Figura 2 – Esquema em árvore das substâncias e métodos de dopagem proibidos, esquema feito a partir da Lista de Substâncias proibidas da WADA[11]

Algumas das categorias descritas na Figura 2 encontram-se divididas em alguns subgrupos, como no caso dos agentes anabolisantes e das hormonas peptídicas,

fatores de crescimento, substâncias relacionadas e miméticos e das hormonas e moduladores metabólicos.

2.2.1. Definições e exemplos

As substâncias não aprovadas oficialmente são substâncias farmacológicas que não estão referidas em nenhuma das restantes listas e que não foram objeto de aprovação para uso terapêutico em humanos por qualquer autoridade reguladora governamental de saúde pública.

Os agentes anabolizantes estão divididos em 2 grupos e subgrupos, como está descrito na Figura 3. Os exógenos são substâncias que não são normalmente produzidas naturalmente pelo organismo, enquanto os endógenos o são.

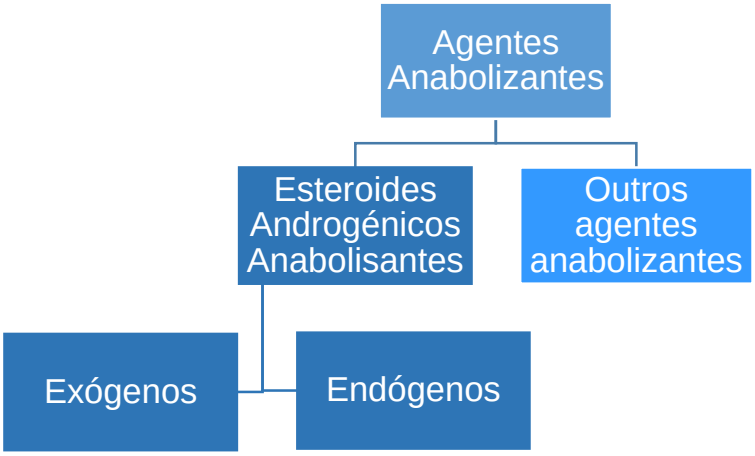


Figura 3 - Esquema em árvore dos grupos e subgrupos para os Agentes Anabolizantes, esquema feito a partir da Lista de Substâncias proibidas da WADA[11]

O grupo das hormonas peptídicas, fatores de crescimento, substâncias relacionadas e miméticos está dividido em 5 subgrupos que estão esquematizados na Figura 4.

Como exemplos de agonistas dos recetores de eritropoietina temos os agentes estimulantes da eritropoiese e os agonistas dos recetores de EPO não eritropoiéticos.

No subgrupo da hormona de crescimento (GH) também se incluem os seus fatores de libertação e outros compostos utilizados com a mesma finalidade, juntamente com outros fatores de crescimento.

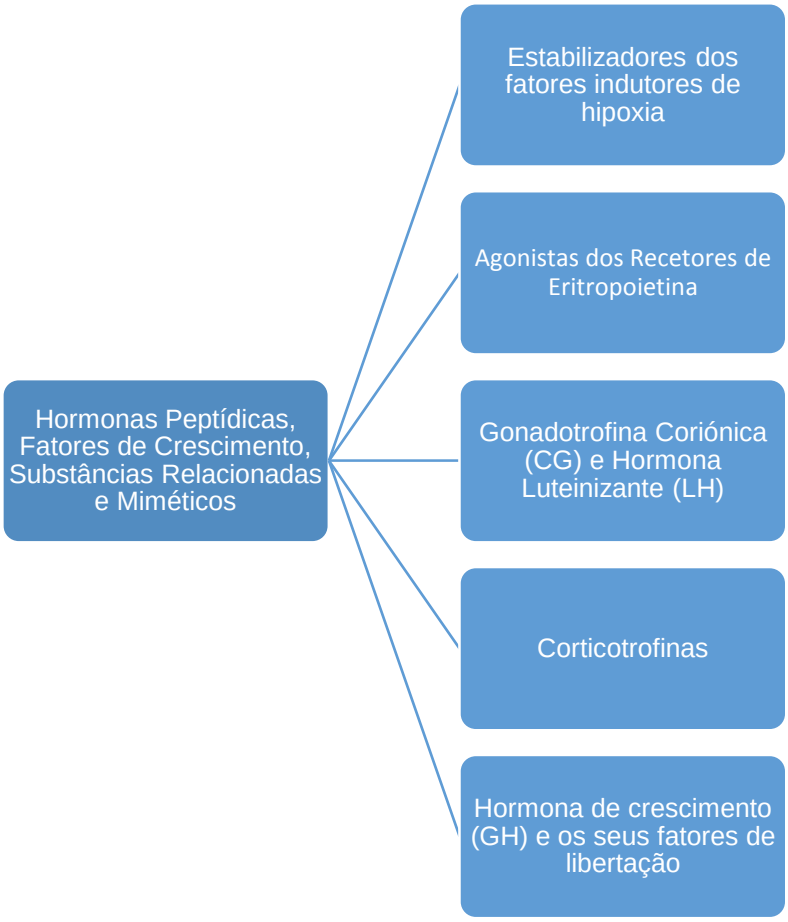


Figura 4 – Esquema em árvore dos grupos relativos às Hormonas Peptídicas, Fatores de Crescimento, Substâncias Relacionadas e Miméticos, esquema feito a partir da Lista de Substâncias proibidas da WADA[11]

Quase todos os β-2 Agonistas, incluindo os seus isómeros óticos são proibidos. As únicas exceções são o salbutamol, o formeterol e o salmeterol, que estão sujeitos a valor limite.

Das hormonas e moduladores são proibidos os inibidores da aromatase, os moduladores seletivos dos recetores dos estrogénios (SERMs), outras substâncias antiestrogénicas, os agentes modificadores da(s) função(ões) da miostatina e os moduladores metabólicos como insulinas, a trimetazidina e agonistas do eixo da proteína quinase dependente do AMP (AMPK) e do recetor ativado δ por proliferadores peroxisomais (PPARδ).

Para os diuréticos e agentes mascarantes todos os restantes diuréticos e agentes mascarantes são proibidos com a exceção da drosperinona, do pamabrom, a aplicação tópica de dorzolamina e de brinzolamida e a administração local de felipressina em anestesia dentária.

Na presença de um diurético ou outro agente mascarante, tanto dentro como fora de competição, qualquer substância sujeita a um valor limite, como o formoterol, pode ser dada como positiva independentemente da concentração ser superior ou inferior ao valor de limite estabelecido.

No caso de os compostos terem que ser administrados para fins medicinais é necessário a obtenção de uma Autorização de Utilização Terapêutica. Esta tem que ser específica para a combinação a ser ingerida, ou seja tem que constar a substância com valor limite, e o diurético ou outro agente mascarante que foi receitado para o tratamento.

A manipulação de sangue e dos seus componentes é proibida. Isto inclui a administração ou reintrodução de qualquer sangue autólogo, alogénico, (homólogo) ou heterólogo, ou de produtos eritrocitários de qualquer origem no sistema circulatório. Também inclui o aumento artificial da captação, transporte ou libertação de oxigénio e qualquer forma de manipulação intravascular do sangue, ou dos seus componentes, por meios físicos ou químicos.

Na manipulação química e física são proibidas a adulteração ou tentativa de adulteração de forma a modificar a integridade e validade das amostras recolhidas nos controlos de dopagem, como por exemplo a substituição e/ou adulteração da urina, tal como as infusões e/ou injeções intravenosas de mais de 50 mL por um período de 6 horas, com a exceção das realizadas legitimamente numa admissão hospitalar, de uma intervenção cirúrgica ou ainda numa investigação clínica.

Na dopagem genética está proibida a transferência de polímeros de ácidos nucleicos ou dos seus análogos, tal como o uso de células normais ou geneticamente modificadas, com o potencial para melhorar o rendimento desportivo.

Os estimulantes, incluindo todos os seus isómeros óticos, estão divididos por estimulantes não específicos e específicos. São todos proibidos, com a exceção dos derivados tópicos/oftalmológicos da imidazole e os estimulantes incluídos no programa de monitorização de 2015, como é o caso da cafeína, da nicotina, do bupropion, entre outros.

Os narcóticos como a buprenorfina, a morfina, a dextromoramida, a diamorfina, ou heroína, o fentanil e os seus derivados são proibidos.

Os canabinóides estão divididos em canabinóides naturais como a canábis, o haxixe e a marijuana, ou Δ9-tetrahidrocanabinol (THC) sintético e em canabimiméticos como o "*Spice"*, o JWH-018, o JWH-073 e o HU-210. Todas estas substâncias são proibidas pela WADA.

Os glucocorticoides são proibidos quando administrados por via oral, retal ou através da injeção intravenosa ou intramuscular.

O álcool, sobre a forma de etanol, é proibido em competição no automobilismo, nos desportos aéreos, no motociclismo, na motonáutica, no tiro e no tiro com arco, sendo que o limite de deteção é o equivalente a uma concentração de 0.10 $g \cdot L^{-1}$ de álcool no sangue. As análises podem ser feitas por via expiratória e/ou pelo sangue.

Os β-bloqueantes são proibidos apenas em competição para a maiorida das modalidades. Contudo em modalidades como o tiro com arco e o tiro a toma destas substâncias também não são permitidas foram de competição.

2.3. Métodos de Análise Química no controlo Antidopagem

O objetivo das análises de controlo de *doping* é determinar a presença do composto proibido com a certeza que o resultado não seja um falso positivo. Para isso foram criadas, pela WADA e pelo COI, recomendações específicas sobre como caracterizar o analito por cromatografia acoplada à espectrométrica de massa, em amostras de controlo. Estas recomendações incluem indicações sobre a separação cromatográfica, como o tempo de retenção, sobre a preparação das amostras e sobre a capacidade de deteção. Este último ponto está relacionado com o número de fragmentos do ião, os desvios permitidos e a abundância relativa dos iões tanto em amostras controlo como em amostras normais.[12; 13]

A preparação da amostra é um passo importante e tem como principal objetivo ajudar na obtenção de um composto relativamente puro, para melhorar a sua capacidade de deteção.[13]

Na cromatografia gasosa os componentes de uma amostra vaporizada são separados devido à sua partição entre a fase móvel gasosa e a fase sólida ou líquida imobilizada numa coluna. O gás da fase móvel, que também é chamado de gás de arrastamento,

tem que ser quimicamente inerte. O gás mais utilizado é o hélio mas o hidrogénio, o azoto ou o árgon também podem ser utilizados.

A amostra, que pode ser líquida ou gasosa à temperatura ambiente, é injetada por uma micro-seringa. A separação dos componentes é feita na coluna cromatográfica e é dependente do fluxo do gás de arrastamento, do programa de temperatura usado, do revestimento do interior da coluna e do seu tamanho.

A cromatografia gasosa pode ter vários detetores diferentes no final da coluna sendo que, os ideais devem ter uma sensibilidade adequada, boa estabilidade e reprodutibilidade, um intervalo de temperatura de 0 a 400 ºC, um tempo de resposta curto e devem ser independentes do fluxo. Entre os vários detetores utilizados pode-se encontrar o de espectrometria de massa, que é um dos detetores mais poderosos para o GC. A espectrometria de massa mede a razão massa carga de iões (m/z) produzidos através da ionização da amostra.[14]

O tempo de retenção do analito numa amostra, para a cromatografia gasosa, não pode diferir mais que 2% ou ± 0.1 minuto do tempo de retenção do mesmo analito numa amostra de urina fortificada, de uma amostra de um estudo de excreção, ou de um material de referência analisado. Para este critério deve-se utilizar o desvio mais pequeno que geralmente é o intervalo de ± 0.1 minutos. No caso da utilização do tempo de retenção relativo para a identificação do composto, este não deve ter uma diferença superior a ± 1 %, para a mesma substância, quando comparando o tempo de retenção relativo de um controlo ou material de referência ou de uma amostra.[13]

Para a detenção em modo SIM, do inglês *selected-ion monitoring*, devem ser detetados 3 iões de diagnóstico para cada composto. Estes iões têm que ter o mesmo tempo de retenção e as abundâncias relativas são obtidas segundo a equação (1), em que A.R. é a abundância relativa, o ião 1 é o ião mais usado na determinação, que é geralmente o mais abundante, e o ião n é um dos restantes iões.

$$A.R. = \frac{ião\ n}{ião\ 1} \times 100 \qquad (1)$$

As abundâncias relativas são obtidas primeiro com um controlo ou um material de referência para depois serem comparadas com as abundâncias relativas dos picos com o mesmo tempo de retenção em amostras reais. A substância na amostra só é considerada igual à substância do controlo se as abundâncias relativas de cada um dos iões da amostra estiverem dentro do intervalo calculado para os mesmos iões no controlo segundo os critérios da Tabela 1, onde Ei-GC/MS corresponde a um cromatógrafo gasoso com ionização eletróncia acoplado à espectrometria de massa,

CI-GC/MS corresponde a um cromatógrafo gasoso com ionização química acoplado à espectrometria de massa, GC/MS^n à cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa *tandem*, LC/MS à cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa, LC/MS^n à cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa *tandem*.

Tabela 1 – Critérios para a identificação dos analitos utilizando a abundância relativa atualmente em vigor.[13]

Abundância Relativa (% do pico base)	**Ei-GC/MS; CI-GC/MS; GC/MS^n; LC/MS; LC/MS^n**
> 50%	± 10 % (absoluto)
25% a 50 %	± 20 % (relativo)
5% a < 25%	± 5 % (absoluto)
< 5 %	±50 % (relativo)

2.3.1. Amostragem

Os processos de amostragem, ou recolha das amostras, devem ter em consideração tanto os aspetos legais como os científicos. Como exemplo temos a salvaguarda da saúde do indivíduo sobre o qual é feita a recolha é necessário evitar a má etiquetagem, as possíveis contaminações e troca de amostras. Os direitos das partes interessadas, que podem ser o dono ou treinador dum animal, no caso dos desportos com animais, ou uma equipa ou um atleta no caso dos desportos humanos, também devem ser salvaguardados contra erros do analista.[5]

A amostra deve ser recolhida dentro de uma cadeia de custódia segura e deve ser dividida numa amostra A e numa amostra B. No caso de se confirmar a presença de alguma substância proibida na amostra A, a amostra B é analisada com o intuito de confirmar da presença da substância, quando solicitada pelo atleta ou treinador. O processo de análise da amostra B é designado por contra-análise.

As amostras recolhidas podem ser urina, sangue, saliva ou até mesmo cabelos.[5; 7; 15]

A urina é o fluido corporal mais utilizado para todas as espécies, uma vez que a recolha é não invasiva, normalmente está disponível em quantidades suficientes para análise e as substâncias ou os seus metabolitos costumam estar presentes em concentrações relativamente altas durante um período de tempo alargado. Uma das desvantagens é que as substâncias podem estar sob a forma dos seus metabolitos, ou numa forma conjugada, e a substância original pode estar presente a uma concentração relativamente baixa. Também há a agravante da relação entre a concentração na urina com a concentração no sangue ser imprecisa, o que pode dificultar a interpretação dos resultados.

A principal vantagem das amostras de sangue é a maior facilidade de salvaguardar a sua integridade, uma vez que é recolhida por um médico, enfermeira, ou veterinário com experiência no procedimento. Adicionalmente, a concentração das substâncias no sangue são mais fáceis de interpretar e é possível detetar substâncias que não são excretadas na urina em concentrações detetáveis.

2.3.2. Tratamento das amostras

Devido à enorme quantidade de compostos a ser pesquisados é impossível analisá-los todos com uma única análise, por esse motivo desenvolveram-se várias abordagens ao longo do tempo. Um dos primeiros métodos a ser utilizado foi a separação dos vários grupos de substâncias por extração líquido-líquido seguida de cromatografia de camada fina, ou TLC, para a sua identificação. Como alternativa as drogas podiam ser extraídas numa resina do copolímero de estireno-divinilbenzeno, ou em XAD-2. Com o desenvolvimento da extração de fase sólida (SPE) em cartuchos esta alternativa passou a ser mais utilizada em vários processos de triagem de drogas.

Os métodos imunoquímicos para a análise de glucocorticoides e EAAs foram primeiro usados nos anos 70 para a análise de *doping* em desportos equinos. No final dos anos 80 o método ELISA, do inglês *enzyme-linked immunosorbent assay*, foi desenvolvido com o mesmo propósito que os imunoquímicos, e são agora utilizados como suporte aos TLC e aos programas de triagem instrumentais. O ELISA é uma técnica bioquímica usada maioritariamente em imunologia para detetar a presença de um anticorpo ou de um antigénio numa amostra.[16] O TLC não foi aplicado nos laboratórios de análises de dopagem humana e estes também não usam o método ELISA extensivamente, contudo usam SPE tanto com XAD-2, como com C_8 e C_{18}. Em termos instrumentais, os métodos mais usados são a cromatografia gasosa acoplada a um detetor de fósforo e azoto, GC-NPD, a cromatografia líquida de alto desempenho com detetor ultra violeta, HPLC-UV, e tanto a cromatografia gasosa como a líquida de alto desempenho acoplada à espectrometria de massa, GC-MS e HPLC-MS. Estes dois últimos métodos passaram a substituir o TLC nos laboratórios de dopagem animal.[5; 17]

Na preparação das amostras, regra geral, é feita uma hidrólise (quando necessária), uma extração líquido-líquido ou extração SPE e uma derivatização.

A extração líquido-líquido é normalmente feita com o intuito de isolar e concentrar os compostos a analisar. O pH da extração é ajustado de modo a garantir que os compostos que se quer extrair não são ionizados e o solvente de extração é escolhido conforme a polaridade dos compostos, tendo em conta os compostos que se quer extrair e os possíveis interferentes.[18]

Na extração de fase sólida, SPE, a inserção da amostra líquida no cartucho de SPE faz com que os compostos de interesse, presentes na matriz, fiquem retidos na fase sólida. Usando solventes ou misturas de solventes com diferentes polaridades é possível separar os interferentes dos analitos de interesse. No caso das cromatografias líquidas se o solvente de extração não for indicado para as análises, procede-se a uma evaporação seguido de uma reconstituição com o solvente pretendido.[18]

A hidrólise é feita antes da extração com o intuito de aumentar a recuperação do analito pretendido quando este está presente nos fluidos biológicos na sua forma conjugada através da quebra da ligação do conjugado. Este passo permite obter uma melhoria na sensibilidade nas análises quantitativas e é essencial na identificação de composto que são expelidos pela urina maioritariamente sobre a forma dos seus metabolitos conjugados. A hidrólise pode ser tanto enzimática como química, dependendo do conjugado e do metabolito.[18]

O uso de uma enzima para quebrar as ligações químicas é o mais específico das duas abordagens e, apesar de implicar um custo e tempo adicional, promove a obtenção de um extrato mais limpo prolongando o tempo de vida útil da coluna cromatográfica.

Há enzimas extraídas de diferentes espécies, sendo que é necessário ter em atenção o pH e temperatura ótima para a enzima a utilizar. Em análises de dopagem as enzimas geralmente utilizadas são a β-Glucuronidase e uma mistura da β-Glucuronidase com a Arylsulfatase.[18]

A hidrólise química é a abordagem mais rápida e mais barata que pode fornecer um extrato para cromatografia para alguns analitos, contudo é necessário mais procedimentos de limpeza da amostra antes da injeção. Normalmente são usados ácidos ou bases inorgânicas fortes com aquecimento, tratamento por micro-ondas ou sob pressão. No final, os extratos têm que ser neutralizados ou a coluna cromatográfica degrada-se rapidamente. Também é necessário garantir a estabilidade do analito nas condições de hidrólise, uma vez que condições não adequadas na hidrólise por vezes resultam em produtos de reação secundários não desejados, ou vários compostos podem ser hidrolisados de modo a formar um só composto influenciando o resultado final da análise.[18]

A derivatização permite a análise de compostos que de outra maneira não seriam facilmente monitorados por GC. A escolha dos reagentes de derivatização é baseada no grupo funcional a ser derivatizado, na presença de outros grupos funcionais no composto e na razão da derivatização. Apesar da alteração nos tempos de retenção dos compostos derivatizados a ordem de eluição será normalmente a mesma que os compostos originais, contudo esta pode ser alterada uma vez que a derivatização

modifica a funcionalidade dos compostos de modo a aumentar, ou diminuir, a volatilidade dos compostos, e assim aumentar, o tempo de retenção da substância ou para acelerar a análise.

Outra razão comum para a derivatização é para aumentar a resolução e diminuir o arrastamento dos compostos polares ou afastar o pico da substância de interesse de interferentes com tempos de retenção próximos. Este processo também facilita a deteção do composto num detetor seletivo, e melhora o padrão de fragmentação do composto no espectrómetro de massa.

A derivatização pode ser feita no resíduo seco após a extração do solvente, ou durante a injeção. A escolha de um reagente de derivatização aceitável é muito importante. Um bom reagente de derivatização produz derivativos estáveis sem a formação de produtos secundários perigosos que possam interagir com a coluna cromatográfica de modo a danificá-la. Reagentes pouco apropriados provocam rearranjos ou alterações estruturais durante a reação, contribuindo para a perda de analito.[18]

2.3.3. Receção e armazenamento das amostras

As amostras são recebidas no laboratório e são entregues ao responsável pela Cadeia de Custódia, ou alguém qualificado para o cargo no caso da ausência do primeiro, que verifica se a informação contida nos documentos associados às amostras estão de acordo com os procedimentos documentados.

No caso de troca de amostras ou identidade do cliente final, ou qualquer outra situação suscetível de influenciar a validade dos resultados o LAD inicia o procedimento de tratamento de não conformidades, que implica a rejeição da amostra conforme os critérios documentados e os procedimentos escritos, em contato direto com o cliente que é informado sobre as ocorrências relacionadas com a receção das amostras.

Todas as amostras conformes são etiquetadas e codificadas de modo a garantir o anonimato. O sistema de identificação também tem como função minimizar o risco de troca de identidade das amostras e assegurar uma ligação clara entre as amostras, o formulário de controlo antidopagem e formulário da cadeia de custódia externa.[19]

As amostras B são guardadas, dentro dos contentores, num congelador com a temperatura a – 20 ºC até a requisição de uma contra-análise, onde o contentor é aberto à frente do atleta, representantes, peritos ou testemunhas, ou até à sua destruição, que implica a destruição física da amostra, ou a eliminação de qualquer forma de identificação que permita o reconhecimento da sua proveniência. O prazo de armazenamento das amostras pode ir de 120 dias a 8 anos após a emissão do relatório de ensaio.[20]

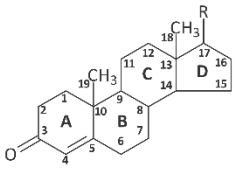
As amostras A são guardadas na camara frigorífica a 4ºC após a receção pelo LAD até o final das triagens e possíveis confirmações. Após a conclusão da fase analítica, ou seja, após a emissão dos resultados as amostras A são conservadas no congelador à temperatura de -20ºC.[20]

3. Métodos de Determinação de Esteroides Endógenos

3.1. Esteroides

Os esteroides androgénicos anabolisantes (EAA) são compostos sintéticos derivados da testosterona, que é a principal hormona sexual masculina. Todos eles são moléculas orgânicas com um sistema de anéis tetracíclicos e derivados do colesterol. A estrutura molecular base dos esteroides pode ser vista na Figura 5.

A representação esquemática das modificações feitas à testosterona para aumentar a biodisponibilidade quando ingerida ou para potenciar os seus efeitos podem ser vistas na Figura 6. Os esteroides são normalmente utilizados para melhorar tanto a aparência como o desempenho atlético, contudo a utilização destas substâncias têm alguns efeitos negativos para a saúde já comprovados, nomeadamente doenças cardiovasculares, acidentes cerebrovasculares, disfunções renais, infertilidade, aumento da agressividade, entre outras.[6; 21]



Substância	R
Testosterona	—OH
Propionato de Testosterona	—O—$OCOCH_2CH_3$
Enantato de Testosterona	—O—$CO(CH_2)_5CH_3$
Cipionato de Testosterona	—O—$COCH_2CH_2$—
Decanoato de Nandrolona	—O—$CO(CH_2)_8CH_3$ *(sem grupo metilo na posição 19)*
Fenilpropionato de Nandrolona	—O—$CO(CH_2)_2$— *(sem grupo metilo na posição 19)*

Figura 5 – Estrutura química comum aos esteroides, imagem adaptada de uma imagem retirada do artigo *Anabolic—Androgenic Steroids*[6]

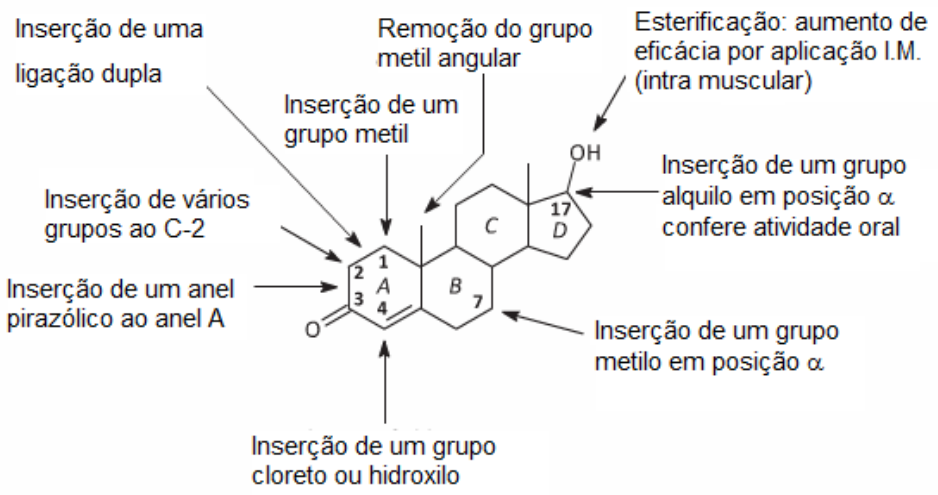


Figura 6 – Alterações normalmente feitas à testosterona para aumentar a biodisponibilidade no organismo após a toma, imagem retirada do artigo *Anabolic—Androgenic Steroids*[6]

3.1.1. Utilização dos esteroides como *doping*

Como exemplo do uso de esteroides como *doping* temos a androstenediona. Esta é um EAA, utilizado com o intuito de aumentar os níveis de testosterona no organismo de modo a aumentar a força, a massa magra corporal e a performance sexual de quem a toma. Contudo não há estudos que comprovem que a androstenediona, ou os compostos relacionados, aumentem significativamente a força ou a massa magra corporal através do aumento dos níveis de testosterona.

Outro exemplo é a dehidroepiandrosterona, DHEA. Esta é um andrógeno fraco também utilizada para elevar os níveis de testosterona. A DHEA está divulgada como um suplemento anti obesidade e anti envelhecimento capaz de aumentar a vitalidade, os níveis de resistência e a libido. Porém há estudos que demonstram que a DHEA não aumenta a concentração de testosterona no sangue, nem a força nos homens, mas está provado que pode aumentar o nível de testosterona nas mulheres, produzindo nelas um efeito de virilização.

Até agora, os únicos casos documentados de que a utilização de esteroides surtiu algum efeito foi em indivíduos que antes da toma já eram praticantes de levantamento de pesos e que continuaram a praticar durante a ingestão dos compostos. Para esses indivíduos observou-se um aumento de força relativamente aos que apenas faziam o treino. Todavia para indivíduos que não tinham experiência ou qualquer treino anterior com pesos não se observou qualquer tipo de aumento na força relativamente aos que faziam treino sem a toma dos esteroides. Mas uma vez que as análises são feitas a desportistas, os esteroides provocam efeitos dopantes nos indivíduos.

3.1.2. Efeitos dos esteroides

Tem havido um aumento no estudo dos efeitos adversos deste tipo de tratamento pois apesar de o uso de EAA ter sido associado com vários efeitos adversos ou até mesmo fatais, poucos têm sido reportados. Os efeitos a longo prazo relacionados com a dosagem, o tipo de esteroide usado, a frequência do consumo e a idade de início de consumo também não estão definidos devido à dificuldade de isolar as causas e efeitos. Esta dificuldade tem como principais fatores a toma de mais de uma substância juntamente com os esteroides, com a utilização de doses elevadas durante grandes períodos de tempo enquanto outros usam a dose terapêutica intermitentemente.[21]

Apesar de muitos dos efeitos dos esteroides em algumas doenças, tanto de animais como de humanos, ainda serem incertas a sua utilização em ensaios clínicos e em estudos laboratoriais estes já foram associados com vários problemas de saúde. Entre eles podemos encontrar mudanças no fator de risco para doenças cardiovasculares como a cardiomiopatia e a doença da artéria coronária. Também se notou o aparecimento de tumores e outras doenças no fígado como a hepatite, o aumento da probabilidade de ocorrência acidentes cerebrovasculares, disfunções renais e infertilidade, tal como alterações na fisiologia de vários órgãos e sistemas do corpo, que sugerem um potencial para problemas de saúde mais tardios. Outras preocupações incluem o comportamento e a mentalidade do indivíduo, uma vez que há uma probabilidade no aumento da agressividade, tal como um aumento em síndromas psicóticos, sintomas de abstinência e dependência psicológica.[7; 17; 21-25]

Alguns dos efeitos negativos provocados pelo consumo dos esteroides são reversíveis como, por exemplo, os danos provocados ao fígado, ou a produção de espermatozoides. Contudo, nem todos os efeitos negativos, principalmente nas mulheres, são reversíveis após a descontinuação do consumo dos esteroides.

Os efeitos negativos nas mulheres incluem anormalidades menstruais, engrossamento da voz, diminuição do peito, calvície e aumento do apetite sexual, de acne, de pilosidades corporais e do tamanho do clitóris. Também há alguns dados da persistência da hipertrofia do ventrículo esquerdo que não é reversível, em ambos os sexos, mesmo após a paragem da toma dos esteroides.[21]

3.1.3. Outras utilizações

Os EAA para além do uso como dopagem no desporto ou para melhoramento de aparências físicas também têm aplicação na medicina e são usados para o tratamento de algumas doenças como o hipogonadismo. O hipogonadismo é uma doença em que

os testículos não produzem quantidade suficiente de testosterona para o desenvolvimento, crescimento e funcionamento sexual normal.

Também há estudos clínicos que sugerem que o uso de EAA melhora a quantidade de massa magra corporal em pacientes com um envelhecimento secundário, que pode ser leve ou moderado, devido a uma doença crónica. Os EAA também são utilizados no tratamento de outras doenças como as anemias, infeções graves, ou alguns distúrbios psicológicos como a depressão, a paranoia, insónias, delírios, ansiedade, entre outros.[6; 17; 22]

3.1.4. Conclusões

Os esteroides foram rapidamente incorporados na lista de substâncias proibidas da WADA. Sempre que há a entrada de um novo esteroide no mercado, este é introduzido na lista, uma vez que tanto as indústrias farmacêuticas como as empresas de suplementos nutricionais tentam desenvolver novos esteroides como precursores de testosterona. Estes precursores são normalmente referidos como prohormonas e as primeiras prohormonas da testosterona introduzidas no mercado foram a DHEA e a androstenediona, já referidas anteriormente.[26]

Os principais metabolitos da testosterona excretados na urina são a androsterona (3α-hidroxi-5α-androstan-17-ona), a etiocolanolona (3α-hidroxi-5β-androstan-17-ona), a epiandrosterona (3β-hidroxi-5α-androstan-17-ona), o 5αandrostanediol (5α-androstane-3α,17β-diol) e o 5βandrostanediol (5β-androstane-3α,17β-diol). Tanto estes metabolitos como a testosterona e a epitestosterona podem aparecer na urina na sua forma livre quando não sofrem alguma alteração até à sua excreção, porém quando isso acontece apresentam concentrações muito baixas. Os compostos são normalmente excretados sobre a forma do conjugado glucuronido, quando nas reações de conjugação de Fase II o composto reage com o ácido glucorónico. Os compostos podem ainda ser excretados sobre a forma do seu conjugado sulfatado, quando nas reações de conjugação de Fase II há interação com grupos sulfato. Estes dois conjugados representam cerca de 90% da dose de testosterona que é excretada na urina.[6]

A ingestão de esteroides, para além de influenciar a concentração final dos endógenos na urina, também pode alterar a razão androsterona/etiocolanolona, a razão androsterona/testosterona, a razão 5αandrostanediol/5βandrostanediol (5αadiol/5βadiol), ou ainda a razão testosterona/epitestosterona (T/E). Todas estas razões, juntamente com a concentração dos compostos podem ser usados como marcadores para a deteção do uso de alguns esteroides, uma vez que estas razões não

são influenciadas pelo exercício, o ciclo menstrual e outros fatores naturais ao corpo humano.[6; 26; 27]

3.2. Métodos de determinação

Os métodos mais usados para a determinação de esteroides são a cromatografia líquida associada à espectrometria de massa, a cromatografia gasosa associada à espectrometria de massa e a cromatografia gasosa associada à espectroscopia de massa de razões isotópicas (IRMS, do inglês *isotope-ratio mass spectrometry*).

Desde a proibição dos esteroides em 1975 a espectrometria de massa permitiu a sua determinação inequívoca. Apesar da determinação da maior parte dos esteroides relevantes para as análises de dopagem por GC-MS poder ser feita sem a derivatização, foram testadas várias modificações químicas para melhorar tanto as propriedades cromatográficas, como as propriedades espectrométricas dos analitos. No final obteve-se os melhores resultados com a trimetilsilanização dos grupos hidroxilo e carbonilo sendo adotada para as análises de dopagem dos esteroides.

Na Figura 7 encontram-se os espectros de massa obtidos com uma ionização EI, para a testosterona (a) e para o seu derivativo após a trimetilsilanização completa (b).[12] Através da comparação dos espectros vemos que o do derivativo encontra-se mais “limpo”, havendo menos fragmentações que no da testosterona sem tratamento.

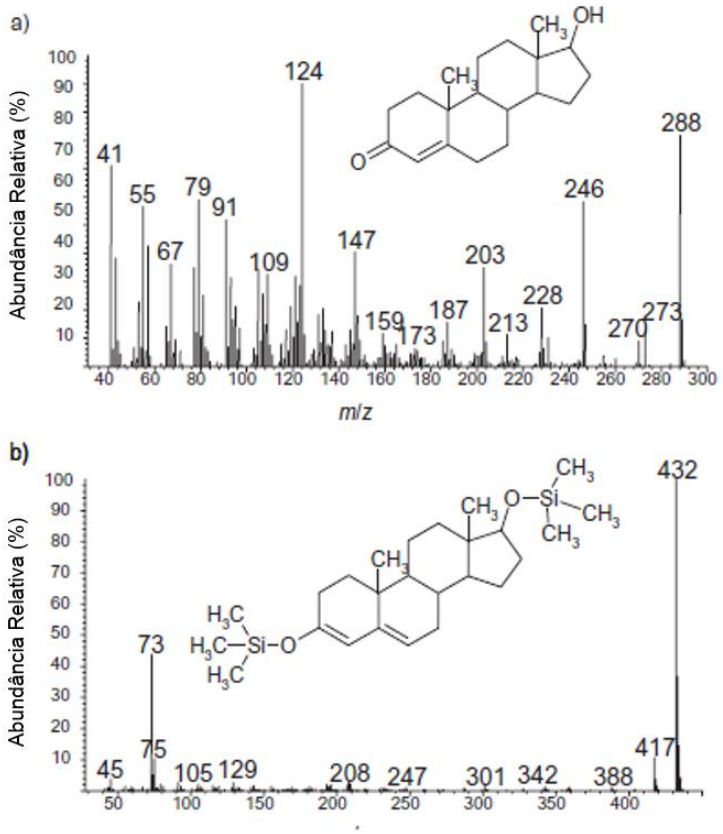


Figura 7 – Espectro de massa com ionização por EI da testosterona (a) e do seu derivativo usado nas análises de *doping* a testosterona-bis-O-TMS (b), a imagem foi adaptada de[12]

A cromatografia líquida também pode ser utilizada para a determinação de esteroides, contudo devido ao poder de resolução da coluna do GC, à robustez da fonte de ionização e a baixa suscetibilidade para o efeito de matriz fazem com que o GC seja mais utilizado que o LC para este tipo de análise.[12]

A técnica de GC-MS permite quantificar os esteroides excretados na urina, mas não nos permite distinguir os esteroides endógenos ingeridos dos naturalmente produzidos, para tentar colmatar esse problema desenvolveu-se o perfil esteroidal. Este é uma estratégia em que através da análise das concentrações dos endógenos e razões entre eles é possível determinar se houve a toma de agentes dopantes.

A análise das amostras por GC-C-IRMS, que determina a assinatura isotópica dos compostos através da medição dos isótopos estáveis do carbono, permite identificar se o esteroide foi sintetizado biologicamente ou se teve origem numa fonte exógena.[12]

4. Validação e Controlo de Qualidade

4.1. Validação

A apresentação de dados analíticos rigorosos é fundamental tanto na investigação de análises forenses e de análises clínicas bioanalíticas como na sua aplicação de rotina, uma vez que a comunidade cientifica internacional precisa que os resultados de pesquisa publicados sejam válidos, reprodutíveis e comparáveis.

O cliente do laboratório requer que o resultado apresentado seja "correto", ou seja, a mesma amostra ao ser analisada por outro laboratório com um método diferente ou semelhante tem que dar o mesmo resultado dentro da incerteza de medição associada. A exatidão dos resultados laboratoriais tem grande peso quando são usados pelas autoridades judiciais na implementação de medidas legais, ou por médicos no diagnóstico de doentes. Consequentemente nas últimas duas décadas a validação e o controlo de qualidade têm sido requisitos de grande importância em vários países e as autoridades judiciais impõem que os laboratórios que efetuam análises de amostras forenses ou clínicas, sejam acreditado segundo a norma ISO e/ou realizem testes de proficiência.[28]

Por este motivo é necessário um consenso internacional em relação à validação e ao controlo de qualidade. Para além de guias específicos nalguns campos de análise como as análises farmacêuticas, existem alguns guias gerais, como os criados pela União Internacional de Química Pura e Aplicada, IUPAC. Contudo estes guias raramente providenciam um exemplo de como a validação deve ocorrer e por vezes os laboratórios têm dificuldades na definição da abordagem experimental, na escolha de critérios de decisão e na estatística apropriada para o método a desenvolver. E apesar da existência de vários guias, poucos fazem referência a drogas e metabolitos em matrizes biológicas. Um dos guias mais utilizados para a validação de métodos forenses é o guia para a validação de métodos na indústria e na bioanalítica publicado pela *Food and Drug Administration* (FDA), o *Center for Drug Evaluation and Research* (CDER) e o *Center for Veterinary Medicine* (CVM). Este guia descreve a validação de métodos bioanalíticos para ensaios químicos, ensaios microbiológicos, tal como avaliação do método em uso de rotina.[28]

É necessário destacar que os guias não são protocolos definitivos, e que a validação ainda é uma disciplina em estudo que precisa de ser atualizada de acordo com a área da aplicação, os requisitos impostos pelo analista em relação ao método. A validação também vai depender da evolução das técnicas analíticas e os critérios de aceitação têm que ser alterados conforme o que melhor se enquadrar ao uso do método.

O principal objetivo dos guias é uniformizar a terminologia da validação para facilitar a comparação dos dados obtidos para métodos diferentes.[28]

Segundo a norma ISO 17025 a validação implica a confirmação por via da investigação resultando na prova objetiva de que determinadas exigências são apropriadas a um uso específico. Isto implica que no início da validação seja necessário definir o uso a dar ao método e os respetivos requisitos de desempenho. Posteriormente será da responsabilidade do analista identificar os parâmetros que devem ser validados para desenvolver o procedimento e para incluir critérios de aceitação apropriados à avaliação do método.

Tanto na literatura como nos vários guias existem descrições dos diferentes parâmetros de validação ou de mérito que devem ser avaliados durante a validação de um método bioanalítico. Os parâmetros de mérito mais consensuais são: a seletividade/especificidade, a linearidade, muitas vezes referida com curva de calibração, a precisão, a exatidão, os limites, o efeito de matriz, a recuperação ou eficiência de extração, a estabilidade das amostras e do método, a integridade da diluição por vezes referida como testes de diluição, e a robustez.[28; 29]

4.1.1. Seletividade/Especificidade

A especificidade ou seletividade é a capacidade de um método discriminar um analito em particular numa mistura complexa, sem interferências significativas dos outros componentes presentes na mistura.[28; 30; 31]

A seletividade e especificidade são termos frequentemente permutáveis entre si. Um método específico é um método que produz uma resposta para um único analito, enquanto que um método seletivo, é um método em que se obtém respostas para um número de entidades químicas e onde é possível diferenciar e identificar as diferentes espécies detetadas durante a medição. Uma vez que há poucos métodos capazes de obter resposta a um único analito o termo seletividade é o mais apropriado.[31]

Na avaliação da seletividade o analista tem que provar que está a conseguir medir o analito ou analitos de interesse e não um composto diferente do pretendido. Por vezes, quando disponível, usam-se como padrões internos isótopos marcados do analito a detetar.[28] Na cromatografia os isótopos deuterados facilitam a identificação do composto pretendido uma vez que apresentam um comportamento semelhante aos seus isótopos não marcados por terem a mesma composição química e só diferirem no peso.

Para a avaliação da especificidade/seletividade o procedimento geral do laboratório aconselha que sejam preparadas “n” amostras brancas representativas do tipo de

amostras analisadas em análises de dopagem. As amostras recolhidas terão que ser divididas em duas alíquotas onde a primeira é analisada diretamente e a segunda é fortificada com o analito de interesse a uma concentração conhecida. Após a análise e a aplicação dos critérios de identificação de substâncias em vigor é necessário determinar a percentagem de falsos negativos e de falsos positivos. Se as percentagens de falsos negativos e de falsos positivos forem de 0% considera-se que não há evidência de interferentes, caso contrário é necessário investigar e registar a interferência. Nos métodos de confirmação a percentagem de falsos positivos deve ser 0% e a percentagem de falsos negativos tem que ser inferior ou igual a 10%.[30]

4.1.2. Linearidade

A linearidade de um método analítico corresponde à sua capacidade de obtenção de resultados diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra dentro de uma dada gama de trabalho. A linearidade deve ser demonstrada diretamente na matriz de teste, por diluição de uma solução *stock* de um padrão, ou através da utilização de misturas sintéticas com diferentes concentrações dos componentes em estudo.[31]

O modelo para a curva de concentração deve ser construído com mais de 5 calibradores.[31] Alguns artigos sugerem que a curva deveria ter um mínimo de 6 calibradores com concentrações de analito conhecidas equidistantes entre elas[28], enquanto outros sugerem que a curva tenha entre 6 a 8 calibradores.[29] As concentrações estabelecidas para a curva devem abranger tanto o limite de quantificação (LQ) como todas as concentrações possíveis de serem encontradas nas amostras.

Os critérios de aceitação para a linearidade são díspares. Há quem considere que o coeficiente de variação (CV) ao valor do LQ deve ser igual ou inferior a 20% e que o CV para as restantes concentrações deve ser igual ou inferior a 15%. Também se considera que o valor do coeficiente de correlação (r) deve ser igual ou superior a 0.98.[29] Contudo há quem defenda que o coeficiente de correlação não deve ser usado para a avaliação da linearidade afirmando que este pode ser incorreto devendo-se, como alternativa, fazer a avaliação da curva através de uma inspeção visual crítica, tento em conta a interseção e a curvatura desta, avaliando também a dispersão da fração residual.[28]

O autor do livro *Validation and Quantification in Analytical Laboratories*, afirma que a equação da regressão linear aplicada aos resultados deve ter uma interseção que não seja significativamente diferente de zero, caso contrário, deve-se demonstrar que a exatidão do método não é influenciada.[31]

No LAD, a avaliação da linearidade de um método consiste na representação dos dados de calibração juntamente com a análise do valor do coeficiente de correlação, da dispersão da fração residual e do intervalo de confiança a 95% da interceção na origem. Uma vez que o coeficiente de correlação é um bom indicador de correlação mas não necessariamente um bom indicador de linearidade, este deve ser complementado com os outros dois parâmetros anteriormente referidos. Considera-se que um método apresenta uma boa linearidade se os valores dos residuais apresentarem uma dispersão aleatória, o coeficiente de correlação apresentar um valor superior a 0.995 e o intervalo de confiança da interceção a 95% incluir o valor 0. O intervalo de linearidade deve compreender, no mínimo, entre 50 e 200 % do valor limite aplicável ao método.[32]

4.1.3. Efeito de matriz

O efeito de matriz ocorre quando há substâncias inerentes à matriz que coeluem com a analito de interesse. Consequentemente a matriz de interesse pode influenciar a sensibilidade do método e a quantificação do analito.[28; 29]

Como o efeito de matriz só é aplicável a métodos de cromatografia líquida este parâmetro não vai ser referido novamente.

4.1.4. Recuperação

A recuperação é um parâmetro que avalia a eficiência do método de tratamento das amostras e é calculada através da comparação da resposta obtida para o analito adicionado na matriz e extraído, com a resposta obtida para amostras sujeitas ao processo extrativo e posteriormente fortificadas, que representam 100%.[29]

É aconselhado a preparação, em triplicado, de amostras a duas concentrações distintas, uma baixa e outra alta, por fortalecimento de um branco de urina, juntamente com a preparação de 3 brancos de urina. Após a extração líquido-líquido das amostras adiciona-se a mesma quantidade de analito usado inicialmente nas amostras de branco de urina que sofreram o mesmo tratamento que as restantes amostras. Antes da evaporação e da derivatização das amostras é-lhes adicionado o padrão interno. A percentagem de recuperação é calculada pela aplicação da fórmula descrita na equação (2), em que $A_{método}$ corresponde à área relativa da amostra em que os padrões foram adicionados no início da preparação (aplicação do método completo), e $A_{s/extração}$ corresponde à área relativa obtida para as amostras em que o padrão foi adicionado antes da evaporação do solvente.[30]

$$\%Recuperação = \frac{A_{método}}{A_{s/extração}} \times 100 \quad (2)$$

4.1.5. Limites

A sensibilidade de um método é muitas vezes associada aos limites de deteção (LD) e quantificação (LQ). Num contexto forense estes limites representam o *cut-off*, valor abaixo do qual não se interpreta o valor obtido, pois deixa de ter significado químico.

Contudo é erróneo descrever estes limites como termos da sensibilidade, uma vez que a sensibilidade é a capacidade de um método de discriminar pequenas diferenças na concentração ou massa do analito em estudo. Assim sendo, a sensibilidade é descrita pelo declive da curva de calibração, enquanto a determinação do LD e do LQ é apenas um modo de estabelecer limites para o método.[28; 31]

4.1.5.1. Limite de Deteção

Segundo *Huber*, o limite de deteção é o ponto ao qual o valor medido é superior ao seu erro associado, sendo a concentração mais baixa do analito numa amostra que pode ser detetada, mas não quantificada.[31]

4.1.5.2. Limite de Quantificação

Huber define o limite de quantificação como a quantidade mínima injetada que produz uma medição quantitativa na matriz usada com uma precisão e exatidão aceitável em cromatografia. Normalmente requer que a altura do pico seja 10 a 20 vezes superior que o ruído de fundo.[29; 31]

4.1.6. Estabilidade

Muitos solutos podem decompor-se antes da análise cromatográfica. A decomposição pode decorrer durante a preparação das amostras, na extração, na limpeza da amostra, na transferência de fase, ou ainda no armazenamento dos *vials* já preparados. Devido a esta possibilidade a estabilidade dos analitos e dos padrões deve ser testada nas condições do método desde a preparação até à injeção, uma vez que o resultado do estudo terá uma grande influência na maneira como as análises de rotina têm que ser conduzidas e na interpretação dos dados.[28; 31]

É necessário testar a estabilidade das soluções padrão, a estabilidade das amostras após ciclos de congelamento e descongelamento, durabilidade das amostras e padrões e a estabilidade das amostras processadas. Todas as condições testadas devem

mimetizar as condições do método, usando os mesmos recipientes, tempo e temperatura de armazenamento, a mesma matriz, etc.[28; 29]

Uma vez que o tratamento, preparação e armazenamento das amostras e soluções padrão seguem o procedimento já pré-estabelecido para a triagem IV, que inclui a verificação da presença dos esteroides endógenos entre outros compostos, a estabilidade não foi testada neste trabalho.

4.1.7. Testes de diluição/Integridade da diluição

No caso de alguma amostra desconhecida ter uma concentração superior ao último calibrador da curva de calibração é necessário proceder a uma diluição para que seja possível quantificar a substância. Para isso é necessário comprovar a integridade da diluição para que a extrapolação dos valores obtidos na diluição para a concentração original do composto não seja afetada. Uma sugestão de avaliação é a criação de uma amostra de controlo, preparada a uma concentração várias vezes superior ao último calibrador da curva, que deve ser diluída em matriz branca e analisadas, pelo menos num dos dias da validação. Os critérios de aceitação para estas amostras diluídas deverão ser os mesmos estabelecidos para os parâmetros de exatidão e precisão do método.[29]

Assim sendo, optou-se por criar uma amostra bastante concentrada através da qual se fez diluições sucessivas para criar uma curva de calibração. A integridade da diluição foi avaliada pela linearidade dessa curva de calibração.

4.1.8. Precisão

A precisão da medição corresponde à proximidade dos valores de concentração obtidos para medições de replicados da mesma solução, ou de soluções semelhantes dentro de condições específicas. A precisão também é considerada o método de medição dos erros aleatórios ou a representação da proximidade dos resultados obtidos a partir de medições independentes de amostragens múltiplas obtidas a partir de uma amostra homogênea.[28; 29]

A precisão pode ser expressa como uma estimativa do desvio padrão, ou do desvio padrão relativo também conhecido como coeficiente de variação (CV) de várias repetições da mesma amostra. Na equação (3) está expressa a equação relativa ao CV, enquanto que na equação (4) encontra-se representado o desvio padrão, em que N corresponde ao número de repetições, $\bar{x}$ é a média dos valores obtidos e x_i é o valor individual de uma das determinações.[29]

$$CV(\%) = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad (3)$$

$$s = \sqrt{\frac{(x_i - \bar{x})^2}{N-1}} \quad (4)$$

A precisão é muitas vezes separada e avaliada de três maneiras, através da repetibilidade, da precisão intermédia e da reprodutibilidade.

A repetibilidade é a proximidade dos valores obtidos para replicados para várias amostras da mesma solução homogénea e com as mesmas condições de análise, ou seja, com o mesmo operador, o mesmo método, o mesmo aparelho, mesmo local, por um curto período de tempo. Esta deve ser calculada sobre os tempos de retenção, as áreas dos picos e, caso possível, a vários pontos da gama de trabalho. [28-30]

A precisão intermédia é semelhante à repetibilidade com a diferença de ser obtida num período de tempo mais extenso e com alteração de algumas variáveis, sempre que possível, como a troca de operador, de soluções, aparelhos, entre outras condições. Por outras palavras, este parâmetro simula a dispersão de valores em condições normais de funcionamento de um laboratório. [28-30]

A reprodutibilidade é o equivalente à precisão interlaboratorial. Os resultados são obtidos usando o mesmo método e a mesma amostra em laboratórios diferentes, o que implica a troca tanto dos analistas como dos equipamentos. A reprodutibilidade nem sempre é necessária, caso haja os dados relativos à precisão intermédia, ou quando o método não será utilizado por diferentes laboratórios.[29]

4.1.9. Exatidão

A exatidão de um método analítico está relacionada com a proximidade dos resultados obtidos pelo método com os valores reais. O método é tanto mais exato quando menor for o erro da medição. A exatidão, que também pode ser vista como a percentagem de recuperação do método, avalia os erros sistemáticos e aleatórios do método. A expressão mais simples do cálculo da exatidão encontra-se na equação (5), em que o x_i é o valor experimental obtido e o x é o valor tido como real para a concentração do analito.[28-31]

$$Exatidão(\%) = \left(\frac{x_i - x}{x}\right) \times 100 \quad (5)$$

A exatidão pode ser avaliada através da análise de um material de referência certificado, MRC, ou pela participação em ensaios interlaboratoriais. No caso da análise de um MRC o valor medido deve estar contido no intervalo de incerteza do método, e no caso da participação interlaboratorial, a exatidão é avaliada através do valor do *Z-score* que é obtido utilizando da equação (6), em que X_{lab} é o valor medido pelo laboratório, o X_0 é o valor aceite como verdadeiro e o s é a unidade de desvio que pode ser o desvio padrão da média dos laboratórios no ensaio interlaboratorial, ou um valor definido pelo organizador.[30]

$$Z = \frac{X_{lab} - X_0}{s} \tag{6}$$

A avaliação do resultado é feita tendo em conta a seguinte escala: se o valor absoluto de Z estiver compreendido entre 0 e 2 o resultado é satisfatório, no caso de o resultado estar compreendido entre 2 e 3 o resultado é questionável e se o valor for superior a 3 é considerado incorreto.[30; 33]

4.1.10. Robustez

A robustez de um método está relacionada com o efeito que os parâmetros operacionais têm no resultado da análise. A robustez mede a capacidade de o método permanecer inalterado após a introdução deliberada de pequenas alterações nos seus parâmetros. Estes testes são importantes uma vez que dão a conhecer os fatores que devem ser estritamente controlados durante a execução de um método para o resultado não sofrer nenhuma alteração. Para tal testa-se as variações de vários parâmetros, como a temperatura da coluna, o volume de injeção, a velocidade do fluxo, ou a razão de split, dentro de intervalos realísticos e determina-se a influência quantitativa das variáveis. No caso de os resultados obtidos estarem dentro dos limites aceitáveis de seletividade, exatidão e precisão então o método pode ser considerado robusto.[29-31]
Contudo este parâmetro não foi estudado durante o trabalho.

4.2. Controlo de Qualidade

Após a validação e implementação do método analítico, muitas vezes recorre-se a métodos de controlo de qualidade para garantir aos clientes do laboratório que os resultados obtidos são de qualidade aceitável e que mostram uma boa consistência. Para isso desenvolveram-se várias técnicas estatísticas para avaliar se os resultados apresentam, além de erros aleatórios, uma tendência dependente do tempo.

A qualidade deve ser avaliada a intervalos regulares analisando um material de referência padrão do analito a ensaiar. Caso não seja possível obter um material de referência padrão, é, também, possível analisar um padrão de controlo de qualidade interno com uma composição conhecida e estabilidade elevada. O material de referência ou o controlo interno são introduzidos aleatoriamente na sequência de materiais a analisar pelo laboratório de maneira a estes serem tratados do mesmo modo que as restantes amostras.

Um dos métodos de análise de controlo de qualidade existentes são as cartas de controlo do valor médio de *Shewhart* ou carta de média.[33]

Para a construção da carta de controlo, onde o eixo das ordenadas representa o valor da média e o das abcissas o tempo, usa-se um valor de média fixo, geralmente o valor teórico, como linha central e adiciona-se tanto acima como abaixo da linha de média uma linha de aviso e uma linha de ação. A posição das linhas de aviso é calculada tendo em conta a equação (7) enquanto que a posição das linhas de ação é calculada tendo em conta a equação (8), onde o $\bar{X}$ corresponde ao valor médio da linha central e o *s* corresponde ao desvio padrão obtido para as várias repetições do padrão utilizado na construção da carta de controlo. As linhas são desenhadas com base na curva de *Gauss*, onde 95% dos valores se encontram entre as linhas de aviso e 99.7% dos valores entre as linhas de ação. Assim, se um ponto estiver fora das linhas de ação, como a probabilidade de isso ocorrer é de 0.3%, o método é parado para ser reavaliado. No caso de apenas um ponto cair entre as linhas de aviso e ação, como a probabilidade de isso acontecer é de 5%, não é necessário parar o método considerando-se que o método se encontra dentro de controlo. Contudo, se dois pontos consecutivos caírem entre as linhas de aviso e ação o método é dado como fora de controlo e é parado. Para além destes critérios de avaliação da carta poderão haver mais alguns que variam de acordo com o local onde o método está implementado e o motivo da análise.[33]

$$L_{Aviso} = \bar{X} \pm 2s \quad (7)$$

$$L_{Acção} = \bar{X} \pm 3s \quad (8)$$

5. Requisitos do Método a Implementar

A WADA requer que o LAD tenha alguns dos métodos acreditados pela entidade de acreditação do país (IPAC) e que obedeçam aos critérios colocados pela WADA. Por vezes é necessário criar alguma alteração a um método ou a alguma condição de análise, quando isso acontece é necessário validar ou revalidar o mesmo após as alterações estarem completas.

Neste trabalho, foi necessário criar um novo método de quantificação para seis dos vários compostos esteroides androgénicos anabolizantes endógenos, nomeadamente a androsterona, a etiocolanolona, o 5αandrostanediol, o 5βandrostanediol, a epitestosterona e a testosterona. Estes compostos, juntamente com a razão Testosterona - Epitestosterona (T/E), são utilizados para a determinação do perfil esteroidal urinário humano por apresentarem vários parâmetros estatisticamente estáveis. Assim sendo, a quantificação destes compostos será utilizada para a avaliação do perfil esteroidal das amostras de urina, para se poder determinar se houve, ou não, a toma de um agente anabolizante.[6; 34]

A administração de um agente anabolizante pode alterar um ou mais marcadores, tal como as razões entre compostos do perfil esteroidal urinário, resultando no aumento ou diminuição das concentrações ou razões de um par específico dos metabolitos esteroidais. Algumas das causas dessas alterações podem ser devidas à toma de uma grande quantidade de álcool; à administração de cetoconazol, à toma de Gonadotrofina Coriónica humana (hCG) ou outros esteroides anabolizantes, à administração de inibidores da 5α-redutase ou ao uso de agentes Mascarantes e diurético, ao crescimento microbial na urina ou outros fatores.[6; 34]

Este método tem que obedecer aos critérios definidos pela WADA no documento técnico TD2014EAAS. Assim sendo o método terá que ter as seguintes características:

- A análise terá que ser feita aos derivativos TMS dos compostos por cromatografia gasosa, acoplada com a espectrometria de massa;
- Os padrões de calibração devem ser analisados periodicamente, e sempre que alguma alteração significativa é feita ao método;
- Uma amostra controlo de qualidade em urina que contenha níveis representativos dos analitos deve ser incluída na sequência de análise;
- A hidrólise enzimática deve ser feita com *β-glucuronidase* purificada proveniente de *E. coli*, uma vez que as mistura com provenientes de *H. pomatia* não são aceitáveis por influenciar nos valores de concentração dos compostos e na razão T/E devido por

apresentar atividade enzimática para os grupos sulfato, para além da atividade enzimática para os grupos glucoronidos;

- A extensão da hidrólise dos esteroides glucuroconjugados deve ser verificada com androsterona-glucuronido isotopicamente marcada, ou uma alternativa equivalente reconhecida cientificamente;
- A extensão da derivatização deve ser verificada através da monitorização da razão dos derivativos mono-O-TMS e di-O-TMS da androsterona;
- Sempre que necessário o volume da alíquota da amostra pode ser ajustado em função da sua densidade e do sexo do atleta; os valores da razão T/E devem ser determinados através da razão das áreas ou alturas dos picos cromatográficos corrigidos;
- A linearidade do método, estabelecida durante a sua validação, deve abranger a amplitude total dos valores normalmente encontrados tanto em homens como em mulheres e o limite de quantificação para T e E não deve ser superior a 2 $ng^{-}mL^{-1}$;
- A incerteza relativa combinada padrão, u_c(%), para a determinação de A, Etio, 5α e 5β, T e E, estimada durante a validação do método não deve ser superior a 30% para a concentração correspondente ao limite de quantificação (LQ);
- O valor de u_c(%) não deve ser superior a 15% para a determinação de A, Etio, 5α e 5β a uma concentração que represente o quíntuplo do respetivo LQ;
- Para a determinação de T, E e razão de T/E, o u_c(%) não deve ser superior a 15% quando as concentrações de T e E são superiores a 5 ng mL^{-1} e para valores concentração de T e E inferiores, o u_c(%) para as determinações T/E não deve exceder os 30%;
- A evidência de degradação microbial e a presença de inibidores da 5α-redutase devem ser monitorizados. [34]

Ainda poderá ser necessário recorrer a uma confirmação por GC-C-IRMS no caso de os valores de epitestosterona e testosterona serem superiores a 200 ng mL^{-1} para homens ou superiores a 50 ng mL^{-1} para as mulheres, ou ainda no caso dos valores de androsterona e etiocolanolona serem superiores a 10000 ng mL^{-1} com uma razão A/Etio inferior a 0.4 para os homens ou superior a 4 para ambos os sexos. Os valores anteriormente referidos são concentrações ajustadas para uma urina com densidade de 1.020, baseado na equação (9), em que o SG corresponde à densidade da urina analisada.

Esta confirmação por GC-C-IRMS é feita para averiguar se o excesso destes compostos é devido à toma indevida das substâncias ou à produção “natural” excessiva do composto pelo indivíduo. Uma vez que os compostos endógenos produzidos pelo

organismo contêm maior quantidade ^{13}C que os que são sintetizados para uso, exógenos e através da avaliação da razão $^{13}C/^{12}C$ por GC-C-IRMS é possível confirmar se as concentrações elevadas são devido à dopagem do atleta, ou não.[6; 34]

$$C_{cor} = C_{medida} \times \frac{(1.020-1)}{(SG-1)} \tag{9}$$

O método desenvolvido e validado terá que obedecer a todos estes critérios para cumprir com os requisitos definidos pela WADA nos Documentos Técnicos.

6. Implementação do método de quantificação dos esteroides endógenos

6.1. Material utilizado

No decorrer do desenvolvimento do trabalho experimental foi utilizado o seguinte material:

- Pipetas volumétricas não calibradas *Fortuna® Germany* 5.00 ±0.03 mL
- Tubos de vidro de 15 mL, *Pyrex®*
- Balões volumétricos calibrados:
    - *Normax* ISO, calibre A, 20.00 ± 0.04 mL
    - *Normax* ISO, calibre A, 10.00 ± 0.025 mL
    - *Fortuna® Poulter & Graf*, AW G, 10.00 ±0.04 mL
    - *Normax* ISO, calibre A, 5.00 ± 0.025 mL
- Micropipetas calibradas, *Eppendorf*
- Micropipetas não calibradas, *Socorex*
- *Eppendorf Multipette® plus*
- Dispensadores automáticos, Brand Dispensette®, calibre B
- Seringa manual, *Agilent Manual Syringe* 10 μL
- Cartuxos Bond Elut-C18, 200 mg, 3 mL, *Agilent Techologies*

6.2. Solventes e reagentes

Na execução do trabalho experimental foram utilizados os seguintes reagentes e solventes:

- Metanol para análise, *Emsure® ACS, ISO*, pureza 99.9%
- Água previamente tratada por um sistema de purificação Millipore. Esta água é designada no texto por água millipore
- Éter *terc*-butilmetílico para análise, *Emsure® ACS Merck*, pureza 99.5%
- n-pentano para análise, *Emsure® Merck*, pureza 99.0%
- N-Metil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamida (MSTFA), para GC, *Machererey Nagel*
- Iodeto de amónio, para análise, *Merck*
- 2-Mercaptoetanol, para síntese, *Merck*
- Urina sintética, *LGC Standards*
- Dihidrogenofosfato de sódio, *ACS, Sigma-Aldrich*, pureza ≥98%
- Carbonato sódio anidro, para análise, *ISO, Merck*
- Hidrogenocarbonato de sódio, para análise, *ISO, Merck*

- β-Glucuronidase extraída da *E. coli* K12, *Roche* (preservada à temperatura de 5 ± 3 ºC)
- Acetona para análise, *Emsure*® ACS, ISO, *Merck*
- Acetado de Etilo, *Emprove*® *exp*, *Merck*, pureza 99.5%
- Testosterona, *LGC Standards*, pureza ≥99%
- d^3-Testosterona, *LGC Standards*, pureza ≥99%
- Epitestosterona, *LGC Standards*, pureza ≥99%
- d^3-Epitestosterona, *LGC Standards*, pureza ≥99%
- 5αandrostanediol, *LGC Standards*, pureza ≥99%
- d^3-5αandrostanediol, *LGC Standards*, pureza ≥99%
- 5βandrostanediol, *LGC Standards*, pureza ≥99%
- d^5-5βandrostanediol, *LGC Standards*, pureza ≥99%
- Androsterona, *LGC Standards*, pureza ≥99%
- d^4-Androsterona, *LGC Standards*, pureza ≥99%
- Etiocolanolona, *LGC Standards*, pureza ≥99%
- d^5-Etiocolanolona, *LGC Standards*, pureza ≥99%
- Metiltestosterona, *LGC Standards*, pureza ≥95%

6.3. Equipamentos utilizados

A execução do presente trabalho foi realizada com recurso à instrumentação seguinte:

- Cromatógrafo gasoso, Agilent 5973, acoplado a um espectrómetro de massa, network Mass Selective Detector, com injetor automático da Agilent 7683 Series.
- Evaporador, Caliper LifeSciences TurboVap® LV
- Agitador, Heidolph promax 2020
- Centrifugadora, rotor de 4 posições; capacidade máxima 4 x 500 mL, velocidade máxima 17000 rpm, Hermle Z 383 k
- Vortex, k MS2 Minishaker IKA®
- Estufa, Memmert
- Bloco de aquecimento, temperatura máxima 200 ºC, Stuart SBH200D
- Camara de vácuo, *Agilent Vac Elut* para 20 cartuxos de SPE

6.4. Preparação de soluções

As soluções padrão dos esteroides endógenos usadas na preparação dos calibradores e das soluções de controlo foram preparadas por diluição de soluções padrão mais concentradas, normalmente de 1000 $\mu g \cdot mL^{-1}$, em metanol.

As soluções dos esteroides endógenos de 1000 $\mu g \cdot mL^{-1}$ foram preparadas por dissolução total de 10 mg de composto fornecido pela *LGC Standards*, em 10 mL de metanol.

Preparou-se igualmente soluções de padrão de esteroides em urina sintética, usando um procedimento semelhante ao da preparação das soluções padrão dos esteroides endógenos e que têm a designação de *pool*.

A solução tampão de dihidrogenofosfato de sódio 0,8 M, pH 7, foi preparada num recipiente de 1000.0 mL. Pesou-se a massa de 55.25 g de dihidrogenofosfato de sódio que foi dissolvido, a quente, em 400 mL de água *millipore*. Após a dissolução completa e a solução ter arrefecido até à temperatura ambiente o volume foi completado com água *millipore*. Após a transferência da solução para garrafas de vidro onde é conservada até à sua utilização, a solução é fervida durante 15 min para prevenir a disseminação bacteriana.

A solução tampão do par conjugado carbonato/hidrogenocarbonato foi preparada por dissolução de 200 g de hidrogenocarbonato de sódio e 200 g de carbonato de sódio em 1 L de água previamente tratada. As massas de cada um dos componentes foram dissolvidas separadamente em balões erlenmeyer de 500 mL com cerca de 400 mL de água millipore. Para assegurar a dissolução completa do carbonato de potássio e do hidrogenocarbonato de potássio, as soluções de cada um dos componentes foram aquecidas e retiradas do calor antes da entrada em ebulição. Quando arrefecidas até à temperatura ambiente, as duas soluções foram transferidas para um balão volumétrico de 1000,0 mL, sendo o volume final ajustado com água millipore. No final confirmou-se se o pH da solução tampão se encontrava entre 9 e 10.

A solução *stock* do reagente de derivatização, MSTFA/NH_4I/Mercaptoetanol (100:2:6, v/m/v) foi preparada por adição de 100 mg de iodeto de amónio e 300 µL de 2-Mercaptoetanol a 5 mL de MSTFA num frasco de 20 mL.

A solução de trabalho do reagente de derivatização MSTFA/NH4I/Mercaptoetanol (100:0.2:0.6 v/m/v) foi preparada por diluição da solução *stock*. O procedimento usado consistiu na adição de 0,5 mL da solução *stock* a 4,5 mL de MSTFA num frasco de 20 mL.

6.5. Preparação das amostras, soluções de controlo e calibradores

a) Preparação de calibradores e controlos

A preparação das amostras foi realizada por uma sequência ordenada de ensaios agrupados em 3 passos. A hidrólise, a extração líquido-líquido e a derivatização.

Os calibradores e os controlos são soluções preparadas a partir de urina sintética com uma concentração conhecida de esteroides e dos respetivos padrões internos. Estas soluções foram preparadas em tubos de vidro de 15 mL, onde se começou por adicionar 2 mL de urina sintética e a quantidade necessária de solução padrão dos esteroides a ensaiar. Adicionou-se ainda 40 µL da mistura dos vários padrões internos, que contem metiltestosterona e os deuterados dos esteroides a quantificar, 750 µL de solução tampão de dihidrogenofosfato de sódio 0,8 *M*, pH 7, e 50 µL de β-glucuronidase, enzima que promove a remoção do grupo glucorónido presente nos compostos excretados na urina que se quer analisar. Na Figura 8 encontra-se a representação esquemática da hidrólise da testosterona.

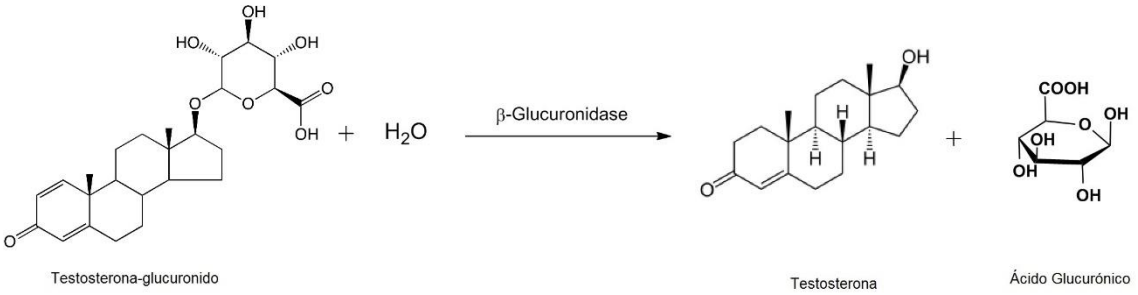


Figura 8 – Representação esquemática da hidrólise da testosterona pela enzima β-glucuronidase

Os calibradores e os controlos foram incubados na estufa a 55 ºC durante 1 hora, depois de terem sido agitados no vortex para lhes conferir homogeneidade.

No fim daquele período, adicionou-se a cada tubo 500 µL de tampão carbonato/hidrogenocarbonato com o pH compreendido entre 9 e 10, de modo a parar a reação de hidrólise, e 5 mL de solvente orgânico extrator, que no início foi o éter de terc-butilmetílico, vindo posteriormente a ser substituído pelo n-pentano.

As misturas heterogéneas foram pré-agitadas no vortex antes de serem vigorosamente agitadas durante 10 min, seguida da centrifugação a 2500 rpm por 5 min. Posteriormente, a fase orgânica foi transferida para um novo tubo e evaporada até à secura, em corrente de azoto, durante 20 minutos a uma temperatura de 45 ºC.

A cada resíduo seco foi adicionado 50 µL de reagente de derivatização, MSTFA/NH_4/Mercaptoetanol (100:0.2:0.6;v/m/v), após o que se procedeu à selagem e agitação dos tubos. A agitação é feita com o cuidado de garantir que todos os compostos que possam ter ficado retidos nas paredes do tubo possam ser removidos e dissolvidos pelo reagente de derivatização. Após a agitação os tubos foram incubados num bloco de aquecimento durante 30 min a uma temperatura de 80 ºC.

Ao fim daquele período de tempo, retiraram-se os tubos com o reagente de derivatização do bloco de aquecimento. Uma vez à temperatura ambiente, as soluções foram transferidas dos tubos para *viais* com *insert* e encapsulados para serem posteriormente ensaiadas por GC-MS.

A derivatização é feita de modo a substituir os grupos cetona e os grupos hidroxilo ativos por grupos trimetilsilil de modo a promover uma maior estabilidade térmica e a ajustar a volatilidade da substância.[35] Na Figura 9 encontra-se a representação esquemática simplificada para a derivatização da testosterona.

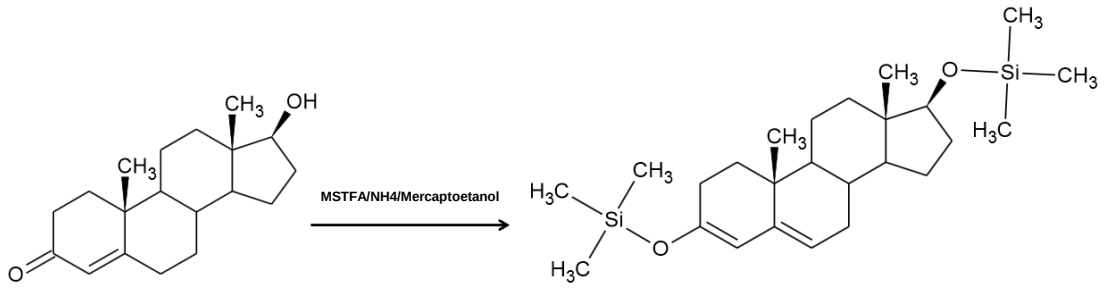


Figura 9 – Representação esquemática simplificada da derivatização da testosterona

b) Preparação da amostra

A preparação das amostras foi realizada por uma sequência ordenada de ensaios agrupados em 4 passos. A hidrólise, duas extrações líquido-líquido e a derivatização.

Começa-se por pipetar 2 mL da amostra para tubos de vidro de 15 mL ao qual se adiciona 500 µL de tampão carbonato/hidrogenocarbonato com o pH compreendido entre 9 e 10 e 5 mL de éter terc-butilmetílico. Esta primeira extração tem como objetivo a remoção de alguns dos interferentes presentes na matriz.

Após a remoção do solvente orgânico adiciona-se à matriz aquosa 40 µL da mistura de padrões internos, que contem metiltestosterona e os deuterados dos compostos a quantificar, 750 µL de tampão fosfato de sódio a pH 7 e 50 µL de β-glucuronidase, enzima. A partir deste ponto o tratamento da amostra é igual ao tratamento dos calibradores e dos controlos.

6.6. Preparação do branco de urina

A urina sintética, que é usada como branco de urina em ensaios de maior rigor analítico, como é o exemplo de contra análises ou outras confirmações de igual exigência analítica, pode ser substituída por urina natural, após a separação da fração orgânica por SPE, em ensaios internos de implementação e desenvolvimento de métodos.

Todavia, este procedimento só é viável desde que a urina extraída não contenha interferentes que venham a inutilizar os ensaios cromatográficos.

Numa parte já mais avançada da execução experimental do presente trabalho foi necessário substituir a urina sintética por um branco de urina natural dada a escassez de urina sintética disponível no laboratório. Na preparação do branco de urina natural usou-se um cartucho C18, de 200 mg e com capacidade para 3 mL, previamente condicionado pela passagem de 2 mL de metanol, seguida de 2 mL de água milipore. Fez-se passar um volume de 10 mL de urina repartido por 4 porções de 2,5 mL.

Concluída a passagem da urina, coloca-se tubos para recolha e adiciona-se aos cartuxos 10 mL de água millipore, repartido por 4 porções de 2,5 mL. O conteúdo dos tubos é guardado em frascos e conservado à temperatura de 5 ºC até à sua utilização.

6.7. Condições operacionais da técnica cromatográfica

Para otimizar o tempo de separação do método e a visualização dos compostos começou-se por injetar um controlo usado nas triagens, usando uma rampa de aquecimento já existente. Após várias injeções obteve-se uma rampa final que foi usada para todos os restantes testes.

A separação por cromatografia gasosa foi executada com uma coluna HP ULTRA 1, ou equivalente, com um comprimentos de 17 m, um diâmetro interno de 0.20 mm e com um filme com uma espessura de 0.11 µm.

Utilizou-se o hélio como fase móvel a um fluxo constante de 0,8 mL/min. O programa de temperatura que condicionou a coluna ao longo da separação cromatográfica foi planeado para uma temperatura inicial e final de 180 ºC e 300 ºC, respetivamente. O incremento da temperatura ocorreu em três etapas distintas. Na primeira, a temperatura inicial aumentou desde 180 ºC até 204 ºC a uma velocidade de 4 $ºC \cdot min^{-1}$, enquanto na segunda, o aumento da temperatura desde 204 ºC até 234 ºC foi suportado por uma velocidade de 20 $ºC \cdot min^{-1}$. Na terceira e última etapa, a temperatura subiu desde 234 ºC até 300 ºC a uma velocidade de 50 $ºC \cdot min^{-1}$, mantendo-se a temperatura final constante durante 3 min.

Foi usado um injetor com divisor (*split*) e com uma razão de *split* de 1:30. A temperatura do injetor foi de 250 ºC, enquanto o volume de injeção foi de 2 µL.

O detetor de espectrometria de massa estava equipado com uma fonte de ionização por impacto eletrónico, encontrando-se a linha de transferência e a fonte de ionização à temperatura de 280 ºC e 230 ºC, respetivamente. O multiplicador de voltagem estava calibrado a +200 eV. A aquisição foi feita maioritariamente em modo SIM.

6.8. Linearidade e gama de trabalho

A linearidade e a gama de trabalho do método analítico foram avaliadas com recurso a ferramentas de análise de dados regressão, em particular dos dados provenientes da fração residual, do coeficiente de correlação e do intervalo de confiança da interceção na origem do eixo das ordenadas.[30; 32] Assim sendo, considerou-se que a curva apresenta uma boa linearidade quando a fração residual é caracterizada por uma dispersão aleatória, o coeficiente de correlação apresenta um valor superior a 0.995 e o intervalo de confiança da interceção na origem inclui o valor 0. [32] A gama de trabalho para cada uma das substâncias ensaiadas foi estabelecida de modo a satisfazer todos os critérios impostos pela WADA para o método de confirmação de endógenos[34] que está a ser desenvolvido neste trabalho.

6.9. Avaliação da especificidade e da seletividade

De acordo com a recomendação feita por Ramos, S., a avaliação da especificidade e da seletividade do presente método analítico deveria ser efetuada a partir de um número diversificado de amostras representativas de vários grupos distintos, como por exemplo, amostras de homens, amostras de mulheres, amostras de atletas nacionais e internacionais, amostras com medicamentos declarados e amostras com interferências detetadas em outros métodos.[30] O cumprimento desta recomendação requer um elevado consumo de tempo e uma grande disponibilidade de amostras, o que leva a que habitualmente não seja totalmente respeitado.

No presente trabalho, a especificidade e a seletividade do método de análise foram avaliadas a partir de amostras reais e de duas soluções: uma mistura dos seis compostos a analisar com uma concentração de 5 $ng \cdot L^{-1}$ e um outro controlo com apenas os esteroides 5α e o 5β com uma concentração de 10 $ng \cdot L^{-1}$

Os parâmetros usados na avaliação foram o tempo de retenção das várias substâncias ensaiadas e as abundâncias relativas dos três iões de diagnóstico de cada uma delas, cujas massas estão identificadas na Tabela 2. É de notar que a quantificação das substâncias é feita apenas a partir da razão massa/carga do ião 1 de cada substância, que geralmente é o mais abundante.

Tabela 2 – Identificação dos Iões de diagnóstico dos vários esteroides ensaiados

Substância	Ião 1 / $m \cdot z^{-1}$	Ião 2 / $m \cdot z^{-1}$	Ião 3 / $m \cdot z^{-1}$
Androsterona	434	419	329
Etiocolanolona	434	419	329
5αAdiol	241	256	436
5βAdiol	241	256	436
Epitestosterona	432	417	327
Testosterona	432	417	327

Depois de selecionados os iões de cada substância, procede-se à comparação da razão iónica proveniente da solução de controlo com a da amostra para cada uma das substâncias.

O tempo de retenção relativo (TRR) também é utilizado como critério de aceitação para a seletividade. É calculado através da equação (10), no qual o $TRR_{suspeito}$ corresponde ao tempo do analito a quantificar na amostra e o $TRR_{controlo}$ corresponde ao tempo de retenção relativo da presumível substância que se encontra presente na solução de controlo. O ΔTRR tem que ser inferior a 1 % para obedecer aos critérios da WADA e através dele estabelece-se o intervalo de variação máxima do tempo de retenção relativo de cada ião para se poder identificar com um dado analito da amostra. O TRR de uma substância é calculado tendo em conta o tempo de retenção da substância a quantificar e o tempo de retenção do padrão interno, que neste caso é a metiltestosterona.

$$\Delta TRR = \frac{TRR_{suspeito} - TRR_{controlo}}{TRR_{controlo}} \quad (10)$$

6.10. Testes de recuperação

O teste de recuperação tem como objetivo determinar a quantidade de amostra realmente obtida após todo o processo extrativo. A execução experimental dos testes de recuperação consistiu na preparação de três tubos, em que o primeiro contem o branco. No segundo foi feita a adição de uma determinada quantidade de composto a 2 mL de urina sintética antes da hidrólise enquanto no terceiro foi adicionada, após a recolha do solvente orgânico, a mesma quantidade de substância que foi adicionada ao segundo tubo. O padrão interno foi sempre adicionado ao solvente orgânico

imediatamente a seguir à extração. Na Tabela 3 estão indicados os volumes de solução padrão usados de fortificação do segundo e terceiro tubo.

Tabela 3 – Volume usado de solução padrão para a fortificação das urinas sintéticas para o estudo da recuperação

Substância	Concentração inicial / $\mu g \cdot mL^{-1}$	$V_{usado\ na\ fortificação}$ / µL	Concentração final / ng mL^{-1}
Androsterona	100	50	2500
Etiocolanolona	100	50	2500
5αAdiol	10	40	200
5βAdiol	10	80	400
Epitestosterona	10	40	200
Testosterona	10	40	200

Os ensaios descritos foram realizados para cada um dos dois solventes orgânicos usados na extração (éter terc-butilmetílico e n-pentano) e os ensaios referentes aos tubos 2 e 3 foram repetidos por 3 vezes, o que resulta num total de 14 ensaios.
Com as áreas relativas das substâncias obtidas para cada ensaio calculou-se a percentagem de recuperação utilizando a equação (2).

6.11. Limite de deteção e quantificação

Os limites de deteção e quantificação de um método analítico são os limites de concentração abaixo dos quais o método não consegue, respetivamente, detetar e quantificar as substâncias para as quais o método foi propositadamente desenvolvido. Inicialmente os limites foram calculados usando as possíveis curvas de calibração para os vários compostos e as equações (11) e (12) para o limite de deteção e quantificação respetivamente. Em que o $s_{y/x}$ corresponde ao desvio padrão residual e o b à interceção da curva de calibração com o eixo das ordenadas.

$$LD = \frac{3.3 \times s_{y/x}}{b} \quad (11)$$

$$LQ = \frac{10 \times s_{y/x}}{b} \quad (12)$$

Para se aceitar os limites obtidos teve-se em conta as características impostas pela WADA [34] nesta matéria, que exige, por exemplo, que o LQ da determinação da testosterona e da epitestosterona seja igual ou inferior a 2 ng mL^{-1}. Os limites foram calculados usando uma solução com uma mistura das substâncias para a construção da curva de calibração correspondente a cada um dos seis esteroides, com um branco e 9 calibradores, que apresentavam concentrações dentro da gama de trabalho.

6.12. Teste de diluição

Os testes de diluição foram feitos com o objetivo de se confirmar se é possível realizar uma extrapolação para a concentração inicial a partir do resultado obtido para a amostra diluída.

Preparou-se uma *pool* de 20 mL com as seis substâncias e com as concentrações apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4 – Concentração das substâncias na 1ª *pool* preparada para os testes de diluição

Substância	Concentração / $\mu g \cdot mL^{-1}$
Androsterona	20
Etiocolanolona	20
5αAdiol	0.8
5βAdiol	2.5
Epitestosterona	0.8
Testosterona	0.8

De seguida, prepararam-se 10 tubos, em que no primeiro colocou-se apenas 2.00 mL da pool e nos restantes colocaram-se volumes sucessivamente inferiores a 2.00 mL da pool, cujos valores estão indicados na Tabela 5 , tendo-se completado o volume de 2,00 mL com urina sintética.

Tabela 5 – Volumes da *pool* utilizados na a preparação dos tubos para o teste de diluição

Diluição	$V_{pool\ adicionado}$ / mL	$V_{urina\ sintética\ adicionada}$ / mL	V_{total}/ mL
Sem diluição	2.00	0.00	2.00
1:2	1.00	1.00	2.00
1:3	0.67	1.33	2.00
1:4	0.50	1.50	2.00
1:5	0.40	1.60	2.00
1:6	0.33	1.67	2.00
1:7	0.29	1.71	2.00
1:8	0.52	1.75	2.00
1:9	0.22	1.78	2.00
1:10	0.20	1.80	2.00

As curvas obtidas foram submetidas a testes para comprovar que é possível estimar a concentração dos esteroides na solução inicial por ponderação com o fator de diluição. Contudo, algumas das curvas, como a da testosterona e da epitestosterona não

evidenciaram o comportamento linear esperado, razão pela qual com a mesma *pool* criaram-se diluições intermédias até à diluição de 1:5 para tentar melhorar a linearidade da curva de diluição. Na Tabela 6 encontram-se registados os volumes usados da pool e de urina sintética na preparação das soluções diluídas.

Tabela 6 – Volumes da pool utilizados na preparação dos tubos para o segundo teste de diluição

Diluição	$V_{pool\ adicionado}$ / mL	$V_{urina\ sintética\ adicionada}$ / mL	V_{total}/ mL
Sem diluição	2.00	0.00	2.00
1:1.5	1.33	0.67	2.00
1:2	1.00	1.00	2.00
1:2.5	0.80	1.20	2.00
1:3	0.67	1.33	2.00
1:3.5	0.57	1.43	2.00
1:4	0.50	1.50	2.00
1:4.5	0.44	1.56	2.00
1:5	0.40	1.60	2.00

Apesar desta tentativa, alguns dos compostos continuaram a manifestar curvas de diluição não lineares, o que levou à preparação de uma nova pool, com concentrações das substâncias inferiores às da pool inicial. Esta nova pool foi preparada em 10,00 mL e com as concentrações das substâncias apresentadas na Tabela 7.

Tabela 7 – Concentração das substâncias na 2ª *pool* preparada para os testes de diluição

Substância	Concentração / $\mu g \cdot mL^{-1}$
Etiocolanolona	15
5βAdiol	1.8
Epitestosterona	0.7
Testosterona	0.7

Desta vez, fez-se apenas as diluições até 1:5 sem diluições intermédias, usando os mesmos volumes que nas anteriores.

6.13. Arrastamento

Os ensaios de avaliação do arrastamento permitem confirmar se os compostos de uma solução ensaiada não irão afetar os valores da solução ensaiada imediatamente a seguir por contaminação da injeção.

O procedimento experimental consistiu no ensaio de uma solução concentrada das substâncias seguida de um ensaio do branco, que neste caso se identifica com a solução de derivatização, avaliando-se no fim as quantidades das diferentes substâncias que poderão ser, ou não, registadas no cromatograma do branco.

6.14. Precisão e exatidão

Para os estudos de precisão e exatidão foi necessário preparar soluções de controlo a partir de soluções mais concentradas distintas dos calibradores. Estas soluções de controlo foram preparadas para avaliar:

- O erro ao limite de quantificação;
- O erro a 5 vezes o limite de quantificação, ou no caso da testosterona e epitestosterona a uma concentração superior a 5 ng mL^{-1};
- O erro a uma concentração intermédia;
- O erro a uma gama alta;
- O erro à concentração mais elevada;
- O erro à concentração aos limites de decisão para análise de IRMS.

Uma vez que é necessário criar controlos a várias concentrações das substâncias decidiu-se preparar 3 soluções distintas. As concentrações das diferentes substâncias em cada uma das soluções a ensaiar podem ser visualizadas na Tabela 8.

Tabela 8 – Concentrações dos endógenos nas várias soluções preparadas

Substância	Sol. C / $\mu g \cdot mL^{-1}$	Sol. D / $\mu g \cdot mL^{-1}$	Sol. E / $\mu g \cdot mL^{-1}$
Androsterona	100	80	5
Etiocolanolona	100	80	5
5αAdiol	1	6	0.1
5βAdiol	4	16	0.2
Epitestosterona	2	4	0.1
Testosterona	2	4	0.1

As três soluções a ser utilizadas na preparação das soluções de controlo que foram preparadas e ensaiadas juntamente com as soluções usadas no traçado das curvas de calibração em pelo menos 5 dias distintos.

6.14.1. Avaliação da Repetibilidade, Precisão Intermédia e Exatidão

Estes três parâmetros foram avaliados em conjunto para pelo menos 4 valores de concentração diferentes de cada substância. Depois de obtidas as concentrações

experimentais para cada um dos ensaios estas foram tratadas com o auxílio da ferramenta *Anova* do *Excel*®.

6.14.1.1. Avaliação do erro do limite de quantificação

A avaliação do limite de quantificação consistiu na preparação de 6 tubos, 3 para cada solvente de extração, aos quais se adicionou 2.00 mL de urina sintética e 80 µL de Sol. E. As concentrações das diferentes substâncias na solução resultante encontram-se registadas na Tabela 9.

Esta e as restantes avaliações foram feitas em 8 dias distintos, nos 4 primeiros dias foram feitos calibradores e controlos distintos que foram ensaiados no GC-MS com referência interna EQ.042, e os restantes 4 correspondem à reinjeção das soluções utilizadas nos ensaios anteriores num outro GC-MS com referência interna EQ.009.

Mais tarde, devido a uma falta de urina sintética resolveu-se utilizar apenas o n-pentano como segundo solvente de extração, reduzindo o número de tubos para metade. Também foi necessário recorrer a urina sintética extraída para a conclusão destes testes.

Tabela 9 – Concentração de cada substância na solução de urina sintética usada nos ensaios avaliação do erro no limite de quantificação

Substância	Concentração / ng mL^{-1}
Androsterona	100
Etiocolanolona	100
5αAdiol	2
5βAdiol	4
Epitestosterona	2
Testosterona	2

6.14.1.2. Avaliação do erro para o nível de concentração 5 vezes o limite de quantificação

Nesta avaliação prepararam-se 3 tubos, aos quais se adicionou 2 mL de urina sintética, ou equivalente, e 200 µL de Sol. E. Na Tabela 10 encontram-se os valores da concentração de cada substância na solução resultante.

Tabela 10 – Concentração de cada substância na solução de urina sintética usada nos ensaios de avaliação do erro para o nível de concentração 5 vezes o limite de quantificação

Substância	Concentração / ng mL^{-1}
Androsterona	500
Etiocolanolona	500
5αAdiol	10
5βAdiol	20
Epitestosterona	10
Testosterona	10

6.14.1.3. Avaliação do erro para o nível de concentração intermédia

Prepararam-se 3 tubos com 2.00 mL de urina sintética, ou equivalente, aos quais foram adicionados 40 μL de Sol. C para se obter a solução Aiva. As concentrações das substâncias na solução resultante estão indicadas na Tabela 11.

Tabela 11 – Concentração de cada substância na solução de urina sintética usada nos ensaios avaliação do erro para o nível da concentração intermédia

Substância	Concentração / ng mL^{-1}
Androsterona	2000
Etiocolanolona	2000
5αAdiol	20
5βAdiol	80
Epitestosterona	40
Testosterona	40

6.14.1.4. Avaliação do erro para o nível de concentração elevada

À semelhança dos procedimentos anteriores, prepararam-se 3 tubos com 2.00 mL de urina sintética, ou equivalente, aos quais se adicionou 100 µL de Sol. D. As concentrações das substâncias na solução resultante estão registadas na Tabela 12.

Tabela 12 – Concentração de cada substância na solução de urina sintética usada nos ensaios de avaliação do erro para o nível de concentração elevada

Substância	Concentração / ng mL^{-1}
Androsterona	4000
Etiocolanolona	4000
5αAdiol	300
5βAdiol	800
Epitestosterona	200
Testosterona	200

6.14.1.5. Avaliação do erro para o nível de concentração dos limites de decisão para análise de IRMS

A avaliação do erro para o nível de concentração dos limites de decisão para análise de IRMS só é necessário fazer para a androsterona e a etiocolanolona, uma vez que o limite de decisão para levar a amostra a IRMS, 10000 ng mL^{-1}, é superior à gama de trabalho das suas curvas de calibração cuja concentração mais elevada é 5000 ng mL^{-1}.

A testosterona e a epitestosterona também apresentam limites de decisão para a amostra ser submetida a análises de IRMS, contudo não foram avaliadas uma vez que as concentrações se encontram dentro da curva de calibração e a mais elevada já foi avaliada no ponto 6.14.1.4. As concentrações usadas como limite, para ambos os compostos, em amostras femininas é 50 ng mL^{-1}, e para amostras masculinas de 200 ng mL^{-1}.

A execução experimental consistiu na colocação de 3.00 mL de urina sintética, ou equivalente, num gobelé de 20 mL ao qual se adicionou 300 µL de solução metanólica de androsterona 100 ppm e 300 µL de solução metanólica de etiocolanolona 100 ppm. À *pool* resultante adicionou-se mais 6,00 mL de urina à qual, após a homogeneização, se retirou 2,00 mL para 3 tubos diferentes. Na Tabela 13 encontram-se registadas as concentrações de Androsterona e Etiocolanolona na pool inicial e na pool diluída.

Tabela 13 – Concentração de Androsterona e Etiocolanolona na *pool* de urina sintética antes e depois da adição dos últimos 6 mL de urina

Substância	$IRMS_{3mL}$ / ng mL^{-1}	$IRMS_{9mL}$ / ng mL^{-1}
Androsterona	10000	3333
Etiocolanolona	10000	3333

A *pool* diluída foi preparada de uma maneira diferente devido ao facto de a concentração para o limite de decisão requerido pela WADA para ambos as substâncias não pertencer à curva de calibração. Por esta razão, em primeiro lugar criou-se a pool com a concentração de decisão que foi seguida de uma diluição de modo a simular uma possível diluição que teria que ser feita em amostras reais para garantir que os valores se encontravam dentro da curva de calibração.

7. Resultados

7.1. Estudo da linearidade e da gama de trabalho

A primeira averiguação da linearidade e das possíveis gamas de trabalho foi feita através de uma curva de calibração com 27 calibradores e um branco, as suas concentrações encontram-se na Tabela 14.

Tabela 14 – Concentrações de esteroides nos calibradores usados no traçar da curva de calibração

Calibrador	Concentração / ng mL^{-1}	Calibrador	Concentração / ng mL^{-1}
B1	0	Cal 14	300
Cal 1	10	Cal 15	350
Cal 2	15	Cal 16	400
Cal 3	20	Cal 17	450
Cal 4	30	Cal 18	500
Cal 5	40	Cal 19	550
Cal 6	50	Cal 20	650
Cal 7	75	Cal 21	750
Cal 8	100	Cal 22	900
Cal 9	125	Cal 23	1100
Cal 10	150	Cal 24	1300
Cal 11	175	Cal 25	1500
Cal 12	200	Cal 26	1800
Cal 13	250	Cal 27	2000

Depois do tratamento dos calibradores procedeu-se à extração com o éter *terc*-butilmetílico, à derivatização e ao ensaio cromatográfico para se obtiver as curvas de calibração representadas na Figura 10. As equações das retas e respetivos coeficientes de correlação estão registados na Tabela 15. O padrão interno utilizado nesta experiência foi a metiltestosterona.

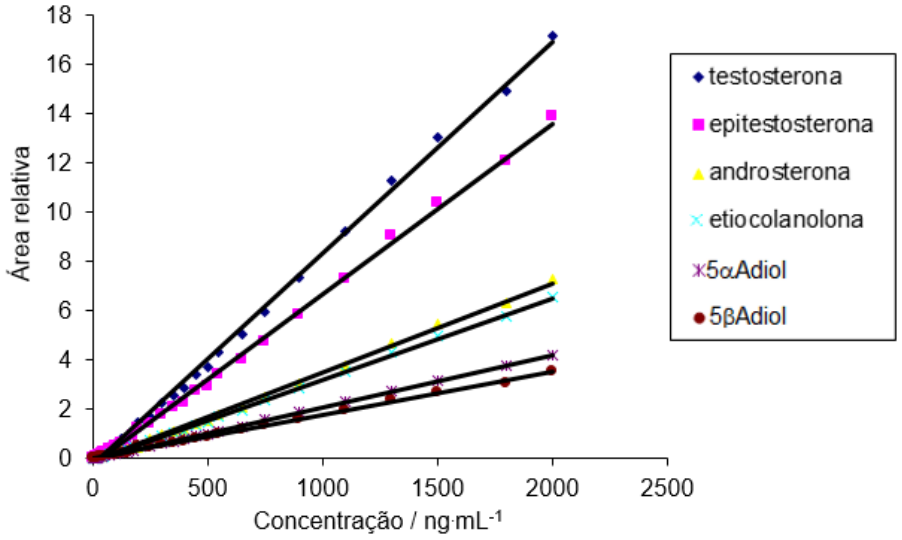


Figura 10 – Retas de calibração dos seis esteroides ensaiados

Tabela 15 – Equações das retas de calibração para cada um das seis substâncias a validar e o respetivos coeficientes de correlação

Substância	Equação da curva	R^2
Androsterona	$y = 0.0036C_A - 0.1291$	0.9975
Etiocolanolona	$y = 0.0033C_{Etio} - 0.086$	0.9987
5αAdiol	$y = 0.0021C_{5\alpha} - 0.0161$	0.9990
5βAdiol	$y = 0.0018C_{5\beta} + 0.0075$	0.9976
Epitestosterona	$y = 0.0069C_E - 0.2191$	0.9979
Testosterona	$y = 0.0086C_T - 0.2572$	0.9981

Aplicando a ferramenta de análise de Regressão do Excel® obteve-se, para cada composto a dispersão da fração residual, que estão representados em função da concentração do respetivo esteroide nas Figura 11 à Figura 16. Da Tabela 16 à Tabela 21 encontram-se as tabelas resultantes da análise da ferramenta regressão do *Excel* aplicada aos valores obtidos para cada um dos compostos que foram utilizadas com o intuito de se perceber há uma interseção em zero, com um nível de confiança de 95%.

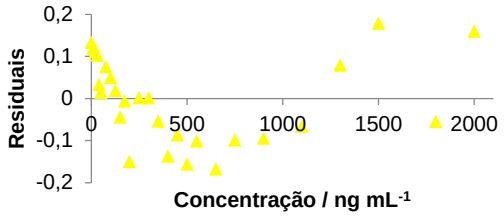


Figura 11 – Representação dos residuais da Androsterona

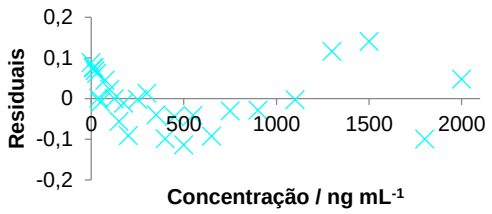


Figura 12 - Representação dos residuais da Etiocolanolona

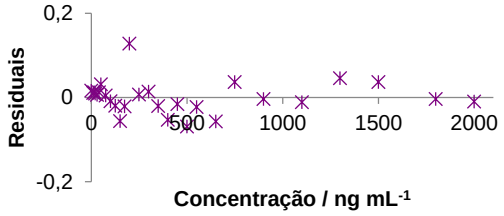


Figura 13 – Representação dos residuais do 5αAdiol

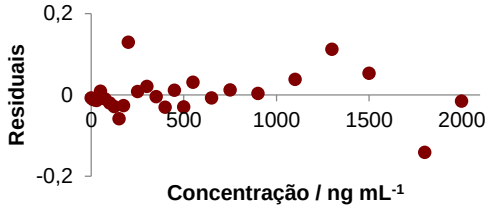


Figura 14 – Representação dos residuais do 5βAdiol

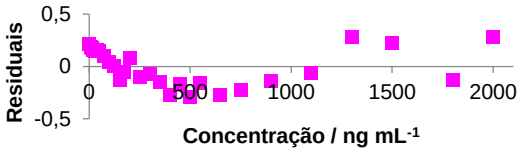


Figura 15 – Representação dos residuais da Epitestosterona

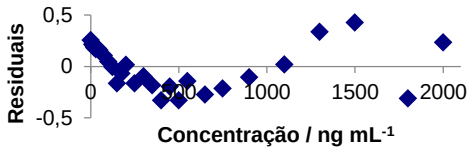


Figura 16 – Representação dos residuais da Testosterona

Através da visualização da Figura 11 à Figura 16 é possível observar que para cada uma delas apresenta um comportamento ondulatório, contudo por não se conseguir detetar o fator responsável resolveu-se prosseguir admitindo que há uma distribuição aleatória dos pontos.

Da Tabela 16 à Tabela 21, constam os resultados obtidos através da aplicação da ferramenta de análise de Regressão do Excel® para cada um das substâncias a validar. Ao analisar as tabelas verifica-se que na linha com o nome “Interceptar” apenas para o 5α e para o 5β é que, nas colunas “95% inferior” o valor obtido é negativo enquanto nas colunas de “95% superior” o valor obtido é positivo, isto significa que para o intervalo de confiança de 95% a curva de calibração passa pela origem, para as restantes curvas de calibração, ambas as colunas apresentam valores negativos para a linha “Interceptar”. Por esse motivo, apenas para o 5α e para o 5β foram considerados lineares em toda a gama, apesar de todas elas obedecerem aos restantes critérios.

Tabela 16 – Resultado da regressão aplicada a curva de calibração da Androsterona

SUMÁRIO DOS RESULTADOS

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,9988
Quadrado de R	0,9975
Quadrado de R ajustado	0,9974
Erro-padrão	0,1047
Observações	28

ANOVA

	gl	*SQ*	*MQ*	*F*	*F de significância*
Regressão	1	114,12	114,1	10407	2,219E-35
Residual	26	0,2851	0,01097		
Total	27	114,40			

	Coeficientes	*Erro-padrão*	*Stat t*	*valor P*	*95% inferior*	*95% superior*	*Inferior 95,0%*	*Superior 95,0%*
Interceptar	-0,1291	0,02640	-4,892	4,469E-05	-0,1834	-0,07487877	-0,1834	-0,07488
Variável X 1	0,003619	3,547E-05	102,0	2,219E-35	0,003546	0,003691876	0,003546	0,003692

Tabela 17 – Resultado da regressão aplicada a curva de calibração da Etiocolanolona

SUMÁRIO DOS RESULTADOS

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,9993
Quadrado de R	0,9987
Quadrado de R ajustado	0,9986
Erro-padrão	0,06965
Observações	28

ANOVA

	gl	*SQ*	*MQ*	*F*	*F de significância*
Regressão	1	95,05	95,05	19594	6,026E-39
Residual	26	0,1261	0,004851		
Total	27	95,17			

	Coeficientes	*Erro-padrão*	*Stat t*	*valor P*	*95% inferior*	*95% superior*	*Inferior 95,0%*	*Superior 95,0%*
Interceptar	-0,08605	0,01756	-4,901	4,364E-05	-0,1221	-0,04996	-0,1221	-0,04996
Variável X 1	0,003303	2,359E-05	140,0	6,026E-39	0,003254	0,003351	0,003254	0,003351

Tabela 18 – Resultado da regressão aplicada a curva de calibração do 5αAdiol

SUMÁRIO DOS RESULTADOS

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,9995
Quadrado de R	0,9990
Quadrado de R ajustado	0,9989
Erro-padrão	0,03895
Observações	28

ANOVA

	gl	*SQ*	*MQ*	*F*	*F de significância*
Regressão	1	38,69	38,69	25504	1,965E-40
Residual	26	0,03944	0,001517		
Total	27	38,73			

	Coeficientes	*Erro-padrão*	*Stat t*	*valor P*	*95% inferior*	*95% superior*	*Inferior 95,0%*	*Superior 95,0%*
Interceptar	-0,01610	0,009818	-1,639	0,1132	-0,036278796	0,004085274	-0,036278796	0,004085274
Variável X 1	0,002107	1,319E-05	159,7	1,965E-40	0,002080	0,002134235	0,002080	0,002134235

Tabela 19 – Resultado da regressão aplicada a curva de calibração do 5βAdiol

SUMÁRIO DOS RESULTADOS

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,9988
Quadrado de R	0,9976
Quadrado de R ajustado	0,9976
Erro-padrão	0,04946
Observações	28

ANOVA

	gl	*SQ*	*MQ*	*F*	*F de significância*
Regressão	1	26,97	26,97	11021	1,055E-35
Residual	26	0,06362	0,002447		
Total	27	27,03			

	Coeficientes	*Erro-padrão*	*Stat t*	*valor P*	*95% inferior*	*95% superior*	*Inferior 95,0%*	*Superior 95,0%*
Interceptar	0,007523	0,01247	0,6033	0,5515	-0,01811	0,03316	-0,018108484	0,03316
Variável X 1	0,001759	1,676E-05	105,0	1,055E-35	0,001724742	0,001793632	0,001724742	0,001793632

Tabela 20 – Resultado da regressão aplicada a curva de calibração da Epitestosterona

SUMÁRIO DOS RESULTADOS

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,9990
Quadrado de R	0,9979
Quadrado de R ajustado	0,9979
Erro-padrão	0,1821
Observações	28

ANOVA

	gl	*SQ*	*MQ*	*F*	*F de significância*
Regressão	1	416,2	416,2	12551	1,954E-36
Residual	26	0,8621	0,03316		
Total	27	417,0			

	Coeficientes	*Erro-padrão*	*Stat t*	*valor P*	*95% inferior*	*95% superior*	*Inferior 95,0%*	*Superior 95,0%*
Interceptar	-0,2191	0,04591	-4,773	6,117E-05	-0,3135	-0,1248	-0,3135	-0,1248
Variável X 1	0,006911	6,169E-05	112,0	1,954E-36	0,006784	0,007038	0,006784	0,007038

Tabela 21 – Resultado da regressão aplicada a curva de calibração da Testosterona

SUMÁRIO DOS RESULTADOS

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,9990
Quadrado de R	0,9981
Quadrado de R ajustado	0,9980
Erro-padrão	0,2187
Observações	28

ANOVA

	gl	*SQ*	*MQ*	*F*	*F de significância*
Regressão	1	645,0	645,0	13489	7,666E-37
Residual	26	1,243	0,04781		
Total	27	646,2			

	Coeficientes	*Erro-padrão*	*Stat t*	*valor P*	*95% inferior*	*95% superior*	*Inferior 95,0%*	*Superior 95,0%*
Interceptar	-0,2572	0,05512	-4,666	8,112E-05	-0,3705	-0,1439	-0,3705	-0,1439
Variável X 1	0,008604	7,408E-05	116,1	7,666E-37	0,008451	0,008756	0,008451	0,008756

Como a maior parte das retas de calibração das substâncias foram consideradas não conforme, resolveu-se reduzir a gama de concentrações com um intuito de encontrar uma gama de concentração que satisfaça os critérios de linearidade.

As gamas lineares obtidas foram as seguintes:

i) Para a Androsterona:

- De 0 a 450 ng mL^{-1};
- De 450 a 750 ng mL^{-1};
- De 550 a 2000 ng mL^{-1};

Apesar das primeiras duas gamas serem seguidas ao tentar abranger todas as concentrações numa só gama não se obtém interseção com o zero com um grau de confiança de 95 %, tal como se pode observar na Tabela 16. O mesmo acontece ao fazer-se a regressão para uma gama de 450 a 2000 ng mL^{-1}.

No final, tendo em conta os valores normalmente esperados em amostras reais, decidiu-se construir uma curva de calibração com uma gama de 0 a 5000 ng mL^{-1} com um menor número de calibradores, obtendo-se assim linearidade em toda a gama. As concentrações dos calibradores utilizados podem ser encontradas na Tabela 22.

ii) Para a Etiocolanolona:

- De 0 a 300 ng mL^{-1};
- De 300 a 650 ng mL^{-1};
- De 900 a 2000 ng mL^{-1};

À semelhança do que acontece com a Androsterona não é possível juntar as gamas de concentração média e pequena, apesar de serem próximas, de modo a obedecer a todos os critérios de linearidade.

E tal como na Androsterona, tentou-se fazer uma nova curva de calibração com as mesmas concentrações, obtendo o mesmo resultado. As concentrações dos calibradores utilizados podem ser encontradas na Tabela 22.

iii) Para o 5αAdiol:

Comparando os valores da Tabela 18, da Tabela 15, da Figura 10 e da Figura 13 pode-se concluir que a curva de calibração obedece a todos os critérios de linearidade para toda a gama. Todavia, escolheu-se trabalhar apenas de 0 a 400 ng mL^{-1}, uma vez que é a gama de concentração mais apropriada para as concentrações de substância normalmente encontradas em amostras reais e com um número inferior de calibradores. As concentrações dos calibradores utilizados podem ser encontrados na Tabela 22.

iv) Para o 5βAdiol:

Tal como o 5αAdiol, o 5βAdiol também apresenta linearidade em toda a gama de concentrações, contudo e atendendo às concentrações normalmente encontradas em amostras reais, escolheu-se utilizar concentrações de 0 a 1000 ng mL^{-1}, retirando-se alguns dos calibradores para se obter uma curva de calibração com 10 calibradores, mais o branco de urina. As concentrações dos calibradores utilizados podem ser encontradas na Tabela 22.

v) Para a Epitestosterona:

- De 0 a 400 ng mL^{-1};
- De 400 a 650 ng mL^{-1};
- De 750 a 2000 ng mL^{-1};

Tal como aconteceu com a androsterona, apesar das primeiras duas gamas serem seguidas, ao tentar-se abranger todas as concentrações numa só gama não se obtém interseção com o zero com um grau de confiança de 95 % nem para uma gama de 0 a 750 ng mL^{-1}. Por ter demasiados calibradores entre os 0 ng mL^{-1} e os 400 ng mL^{-1}, retirou-se alguns deles até só se ter uma curva composta por 10 calibradores diferentes, mais o branco. As concentrações dos calibradores utilizados podem ser encontradas na Tabela 22.

vi) Para a Testosterona:

- De 0 a 300 ng mL^{-1};
- De 300 a 650 ng mL^{-1};
- De 650 a 2000 ng mL^{-1};

Apesar de as gamas serem seguidas, não se obtém interseção com o zero com um grau de confiança de 95 % nem para uma gama de 0 a 650 ng mL^{-1}, nem para uma gama de 300 a 2000 ng mL^{-1}, nem para a gama completa, cujo resultado obtido pela ferramenta de Regressão está na Tabela 21.

Uma outra tentativa foi retirar alguns dos pontos intermédios para a gama mais baixa, obtendo-se assim linearidade de 0 a 400 ng mL^{-1}. As concentrações dos calibradores utilizados podem ser encontradas na Tabela 22.

Tabela 22 – Concentrações dos esteroides nos calibradores usadas no traçado das curvas de calibração

Calibrador	A / ng mL^{-1}	Etio / ng mL^{-1}	5α / ng mL^{-1}	5β / ng mL^{-1}	E / ng mL^{-1}	T / ng mL^{-1}
BU	0	0	0	0	0	0
Cal. 1	100	100	10	10	10	10
Cal. 2	300	300	30	50	30	30
Cal. 3	550	550	50	100	50	50
Cal. 4	900	900	100	200	100	100
Cal. 5	1500	1500	150	300	150	150
Cal. 6	2500	2500	200	400	200	200
Cal.7	3000	3000	250	500	250	250
Cal. 8	4000	4000	300	700	300	300
Cal. 9	4500	4500	350	900	350	350
Cal. 10	5000	5000	400	1000	400	400

Após a preparação dos novos calibradores procedeu-se ao tratamento previsto pelo método antes do ensaio cromatográfico. Obteve-se seis novas curvas de calibração, cujas representações gráficas encontram-se nas Figura 17 e Figura 18, enquanto as equações das retas e coeficientes de correlação estão na Tabela 23.

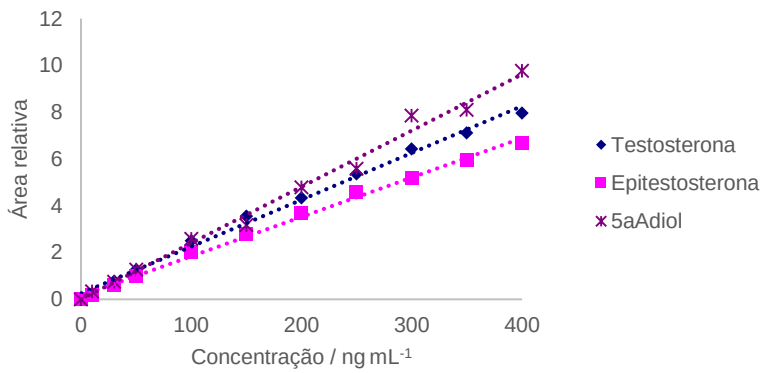


Figura 17 – Retas de calibração de Testosterona, Epitestosterona e 5αAdiol obtidas com os novos calibradores

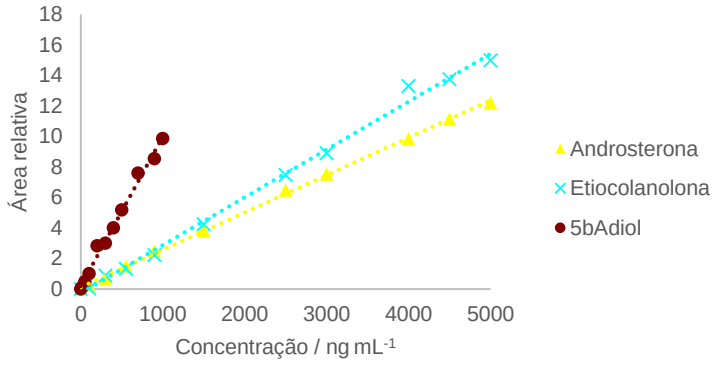


Figura 18 – Retas de calibração da Androsterona, Etiocolanolona e 5βAdiol obtidas com os novos calibradores

Tabela 23 – Equações das novas curvas de calibração e respetivos coeficientes de correlação

Substância	Equação da curva	R^2
Androsterona	$y = 0.0025C_A + 0.1083$	0.9992
Etiocolanolona	$y = 0.0031C_{Etio} – 0.2657$	0.9954
5αAdiol	$y = 0.024C_{5\alpha} + 0.003$	0.9919
5βAdiol	$y = 0.0098C_{5\beta} + 0.1726$	0.9905
Epitestosterona	$y = 0.0168C_E + 0.1586$	0.9964
Testosterona	$y = 0.02C_T + 0.2535$	0.9950

Recorreu-se, mais uma vez, à ferramenta de Regressão do Excel® e obteve-se que, todas elas correspondiam a todos os critérios de linearidade, exceto a Testosterona, para a qual a interseção com o zero com um nível de confiança de 95% não aconteceu, como se pode ver na Tabela 29. Todas as tabelas das regressões podem ser vistas da Tabela 24 à Tabela 29, para as 6 substâncias a validar e da Figura 19 à Figura 24 estão representadas as dispersões dos residuais das curvas.

Tabela 24 – Regressão para a curva de calibração da Androsterona com 10 calibradores e um branco de urina

SUMÁRIO DOS RESULTADOS

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,9996
Quadrado de R	0,9992
Quadrado de R ajustado	0,9991
Erro-padrão	0,1368
Observações	11

ANOVA

	gl	*SQ*	*MQ*	*F*	*F de significância*
Regressão	1	207,7	207,7	1,110E+04	3,175E-15
Residual	9	0,1684	0,01871		
Total	10	207,8			

	Coeficientes	*Erro-padrão*	*Stat t*	*valor P*	*95% inferior*	*95% superior*	*Inferior 95,0%*	*Superior 95,0%*
Interceptar	0,1083	0,06274	1,726	0,1184	-0,03362	0,2502	-0,033622622	0,2502
Variável X 1	0,002452	2,327E-05	105,3	3,175E-15	0,002399	0,002504	0,002399	0,002504

Tabela 25 – Regressão para a curva de calibração da Etiocolanolona com 10 calibradores e um branco de urina

SUMÁRIO DOS RESULTADOS

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,9977
Quadrado de R	0,9954
Quadrado de R ajustado	0,9949
Erro-padrão	0,4187
Observações	11

ANOVA

	gl	*SQ*	*MQ*	*F*	*F de significância*
Regressão	1	339,3	339,3	1935	8,095E-12
Residual	9	1,578	0,1753		
Total	10	340,9			

	Coeficientes	*Erro-padrão*	*Stat t*	*valor P*	*95% inferior*	*95% superior*	*Inferior 95,0%*	*Superior 95,0%*
Interceptar	-0,2657	0,1921	-1,383	0,1999	-0,7001	0,1688	-0,7001	0,1688
Variável X 1	0,003134	7,123E-05	43,99	8,095E-12	0,002973	0,003295	0,002973	0,003295

Tabela 26 – Regressão para a curva de calibração da 5αAdiol com 10 calibradores e um branco de urina

SUMÁRIO DOS RESULTADOS

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,9959
Quadrado de R	0,9919
Quadrado de R ajustado	0,9910
Erro-padrão	0,3271
Observações	11

ANOVA

	gl	*SQ*	*MQ*	*F*	*F de significância*
Regressão	1	117,3	117,3	1096	1,029E-10
Residual	9	0,9628	0,1070		
Total	10	118,3			

	Coeficientes	*Erro-padrão*	*Stat t*	*valor P*	*95% inferior*	*95% superior*	*Inferior 95,0%*
Interceptar	0,003034	0,1564	0,01940	0,9849	-0,3507	0,3568	-0,3507
Variável X 1	0,02402	0,0007255	33,11	1,029E-10	0,02238	0,02567	0,02238

Tabela 27 – Regressão para a curva de calibração da 5βAdiol com 10 calibradores e um branco de urina

SUMÁRIO DOS RESULTADOS

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,9952
Quadrado de R	0,9905
Quadrado de R ajustado	0,9894
Erro-padrão	0,3622
Observações	11

ANOVA

	gl	*SQ*	*MQ*	*F*	*F de significância*
Regressão	1	122,91	122,91	936,72	2,078E-10
Residual	9	1,181	0,1312		
Total	10	124,09			

	Coeficientes	*Erro-padrão*	*Stat t*	*valor P*	*95% inferior*	*95% superior*	*Inferior 95,0%*
Interceptar	0,1726	0,1631	1,058	0,3175	-0,1963	0,5415	-0,1963
Variável X 1	0,009801	0,0003202	30,61	2,078E-10	0,009077	0,01053	0,009077

Tabela 28 – Regressão para a curva de calibração da Epitestosterona com 10 calibradores e um branco de urina

SUMÁRIO DOS RESULTADOS

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,9982
Quadrado de R	0,9964
Quadrado de R ajustado	0,9960
Erro-padrão	0,1512
Observações	11

ANOVA

	gl	*SQ*	*MQ*	*F*	*F de significância*
Regressão	1	57,64	57,64	2523	2,467E-12
Residual	9	0,2056	0,02285		
Total	10	57,85			

	Coeficientes	*Erro-padrão*	*Stat t*	*valor P*	*95% inferior*	*95% superior*	*Inferior 95,0%*	*Superior 95,0%*
Interceptar	0,1586	0,07227	2,195	0,05581	-0,004871	0,3221	-0,004871	0,3221
Variável X 1	0,01684	0,0003353	50,23	2,467E-12	0,01608	0,01760	0,01608	0,01760

Tabela 29 – Regressão para a curva de calibração da Testosterona com 10 calibradores e um branco de urina

SUMÁRIO DOS RESULTADOS

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,9975
Quadrado de R	0,9950
Quadrado de R ajustado	0,9945
Erro-padrão	0,2126
Observações	11

ANOVA

	gl	*SQ*	*MQ*	*F*	*F de significância*
Regressão	1	81,38	81,38	1800	1,119E-11
Residual	9	0,4068	0,04520		
Total	10	81,78			

	Coeficientes	*Erro-padrão*	*Stat t*	*valor P*	*95% inferior*	*95% superior*	*Inferior 95,0%*	*Superior 95,0%*
Interceptar	0,2535	0,1017	2,494	0,03418	0,02360	0,4835	0,02360	0,4835
Variável X 1	0,02001	0,0004716	42,43	1,119E-11	0,01894	0,02108	0,01894	0,02108

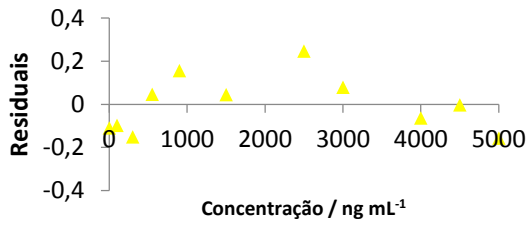


Figura 19 – Representação dos residuais da Androsterona

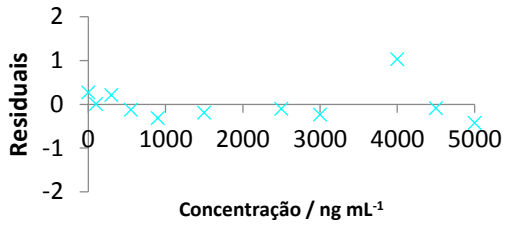


Figura 20 – Representação dos residuais da Etiocolanolona

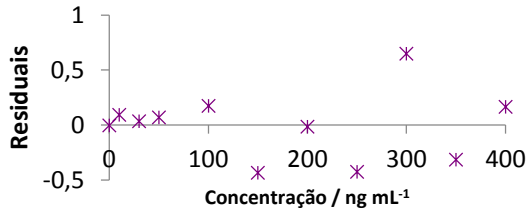


Figura 21 – Representação dos residuais do 5αAdiol

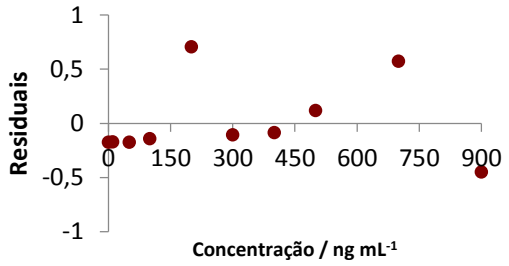


Figura 22 – Representação dos residuais do 5βAdiol

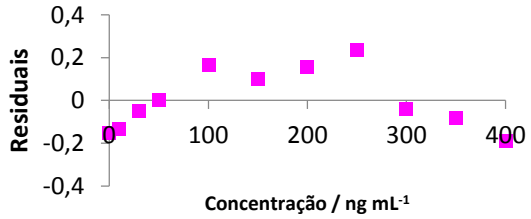


Figura 23 – Representação dos residuais da Epitestosterona

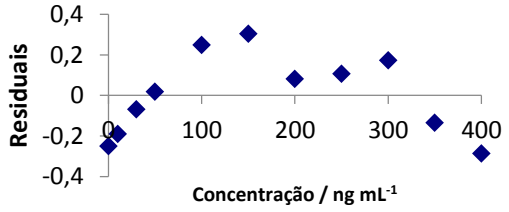


Figura 24 – Representação dos residuais da Testosterona

Através da observação da Figura 19 à Figura 24 vê-se que há uma distribuição não aleatória na dispersão dos pontos das várias curvas, contudo por não se ter conseguido determinar a causa resolveu-se prosseguir admitindo que há uma distribuição aleatória dos pontos.

Como a Testosterona, mais uma vez, não obedeceu a todos os critérios de linearidade resolveu-se retirar os calibradores mais concentrados, um a um, para se perceber até que concentração a curva seria linear segundo todos os critérios. Retirando-se apenas o calibrador mais concentrado, 400 ng mL^{-1}, conseguiu-se obter uma curva visualmente linear e com um coeficiente de correlação aceitável, que podem ser vistos na Figura 25, pelos dados da regressão, presentes na Tabela 30 pode-se ver que na linha "interceptar" na coluna 95% inferior apresenta um valor negativo enquanto na coluna 95% superior apresenta um valor positivo, isso significa que, para o grau de confiança de 95% a interseção passa pela ordenada na origem. Na Figura 26, observa-se a dispersão da fração residual da curva de testosterona com apenas nove calibradores, apesar da distribuição dos pontos não ser aleatória contudo não se detetou o fator que provoca essa não conformidade. Por esse motivo admitiu-se que a dispersão é aleatória e

conclui-se que a curva de calibração com a gama de concentração do 0 aos 350 ng mL^{-1} é linear.

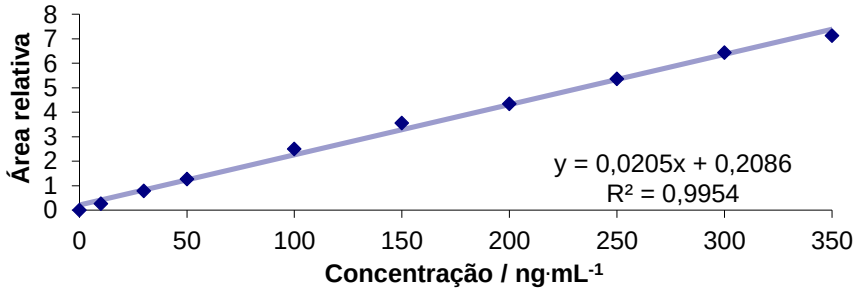


Figura 25 – Reta de calibração para a Testosterona com 9 calibradores e um BU.

Tabela 30 – Regressão para a curva de calibração da Testosterona com 9 calibradores e um branco de urina

SUMÁRIO DOS RESULTADOS

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,9977
Quadrado de R	0,9954
Quadrado de R ajustado	0,9948
Erro-padrão	0,1866
Observações	10

ANOVA

	gl	*SQ*	*MQ*	*F*	*F de significância*
Regressão	1	60,50	60,50	1737	1,210E-10
Residual	8	0,2786	0,03483		
Total	9	60,77			

	Coeficientes	*Erro-padrão*	*Stat t*	*valor P*	*95% inferior*	*95% superior*	*Inferior 95,0%*	*Superior 95,0%*
Interceptar	0,2086	0,09225	2,261	0,05363	-0,004143	0,4213	-0,004143	0,4213
Variável X 1	0,02052	0,0004924	41,68	1,210E-10	0,01939	0,02166	0,01939	0,02166

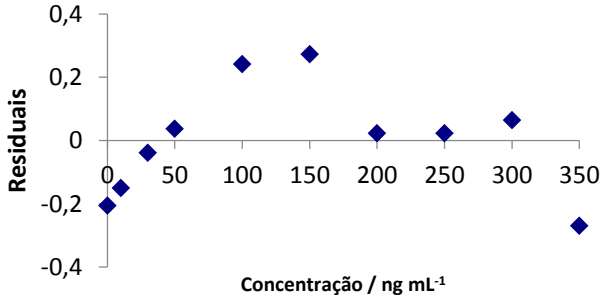


Figura 26 – Representação dos residuais da Testosterona com uma reta de calibração de 0 a 350 ng mL^{-1}

Finalmente, estabeleceu-se as seguintes concentrações para as retas de calibração para este método:

- Androsterona: 0 a 5000 ng mL^{-1};
- Etiocolanolona: 0 a 5000 ng mL^{-1};
- 5αAdiol: 0 a 400 ng mL^{-1};

- 5βAdiol: 0 a 1000 ng mL^{-1};
- Testosterona: 0 a 350 ng mL^{-1};
- Epitestosterona: 0 a 350 ng mL^{-1}.

A gama da Epitestosterona foi reduzida para 350 ng mL^{-1}, apesar de ser linear até 400 ng mL^{-1}. Resolveu-se manter a mesma gama para as duas substâncias, uma vez que o comportamento da testosterona e epitestosterona é semelhante e muitas vezes os resultados serem apresentados em razão T/E

7.2. Avaliação da especificidade e da seletividade

Para a avaliação da especificidade e da seletividade escolheram-se, inicialmente 10 amostras reais, selecionadas aleatoriamente tanto de homens como mulheres, para as quais se preparou alíquotas de 2 mL. O tratamento das amostras, até este ponto foi, feito exatamente como no método para a triagem usada para detetar os endógenos. Juntamente com as amostras reais fez-se uma solução padrão, de modo a funcionar como controlo das substâncias a quantificar. Nestas experiências, considerou-se a metiltestosterona como padrão interno.

Para provar que o método é seletivo, extraiu-se as áreas relativas dos três iões de diagnóstico de cada substância e no fim comparou-se as áreas e tempos de retenção obtidos nas amostras com as da solução padrão. Na Figura 55, presente nos Anexos encontra-se uma representação da folha Excel® usada para o tratamento dos dados, sendo que para cada substância, foi criado um ficheiro, e para cada amostra, uma folha com aquela estrutura. Se as áreas relativas dos três iões de diagnóstico da substância e os tempos de retenção relativos do controlo e da amostra forem conformes, considera-se que o método é seletivo, caso contrário, o método terá que ser alterado.

Depois do tratamento dos dados obtidos, que estão compilados na Tabela 31 e na Tabela 32, observou-se a presença de demasiadas não conformidades em 4 das 6 substâncias, por esse motivo resolveu-se utilizar 13 amostras masculinas. Na Figura 27 e na Figura 28, encontram-se os cromatogramas para a amostra BU01, sendo que a primeira é o cromatograma completo obtido em modo SCAN, enquanto o segundo é o cromatograma com os iões principais extraídos, obtido em SIM. Destas verificou-se não conformidades maioritariamente em dois das substâncias, testosterona e epitestosterona, assim sendo, resolveu-se acrescentar uma extração líquido-líquido com éter *terc*-butilmetílico antes da hidrólise para retirar possíveis interferentes.

A nova extração é acrescentada antes da hidrólise uma vez que não existe o risco de remoção das substâncias a analisar por estes, quando são excretados para a urina,

virem na forma conjugada, assim sendo, têm uma maior afinidade com o solvente aquoso que com o orgânico. Contudo, para confirmar que não haveria substância que pudesse ser perdida com a primeira extração, o solvente orgânico foi guardado, evaporado, derivatizado e analisado juntamente com as amostras, o cromatograma obtido para a fração livre, nome dado aos constituintes que ficam retidos no solvente orgânico na primeira extração, encontra-se na Figura 29 no modo SCAN, ou e na Figura 30 em modo SIM. Na Figura 31 e na Figura 32 constam, respetivamente, os cromatogramas em SCAN e em SIM de apenas os iões principais extraídos, para a amostra BU01 com ambas as extrações.

Tabela 31 - Tempos de retenção relativos das substâncias a quantificar das 10 amostras iniciais

		Controlo		BU01	BU02	BU03	BU04	BU05	BU06	BU07	BU08	BU09	BU10
MT	TR	9.36	–	9.37	9.36	9.36	9.36	9.36	9.36	9.36	9.37	9.36	9.36
A	TR	7.26	–	7.30	7.3	7.28	7.32	7.3	7.32	7.3	7.32	7.29	7.32
	TRR	0.776	0.768 – 0.783	0.776	0.780	0.778	0.782	0.780	0.782	0.780	0.781	0.779	0.782
Etio	TR	7.37	–	7.41	7.39	7.38	7.41	7.39	7.42	7.39	7.42	7.38	7.42
	TRR	0.787	0.780 – 0.795	0.791	0.790	0.788	0.792	0.790	0.793	0.790	0.792	0.788	0.793
5α	TR	7.47	–	7.49	7.48	7.48	7.49	7.48	7.5	7.48	7.5	7.48	7.49
	TRR	0.798	0.790 – 0.806	0.799	0.799	0.799	0.800	0.799	0.801	0.799	9.37	0.799	0.800
5β	TR	7.55	–	7.57	7.56	7.55	7.56	7.57	7.57	7.57	7.57	7.56	7.57
	TRR	0.807	0.799 – 0.815	0.808	0.808	0.807	0.808	0.809	0.809	0.809	0.809	0.808	0.809
Epi	TR	8.26	–	8.25	8	8	8	8	8	7.39	8.01	8.25	8
	TRR	0.882	0.874 – 0.891	0.880	0.855	0.855	0.855	0.855	0.855	0.790	0.855	0.881	0.855
T	TR	8.68	–	8.67	8.78	8.67	8.67	8.66	8.67	8.67	8.66	8.67	8.67
	TRR	0.927	0.918 – 0.937	0.925	0.938	0.926	0.926	0.925	0.926	0.926	0.924	0.926	0.926

Tabela 32 - Relações iónicas das substâncias das 10 amostras iniciais

	Transição	Controlo / %		BU01 / %	BU02 / %	BU03/ %	BU04 / %	BU05 / %	BU06/ %	BU07 / %	BU08 / %	BU09 / %	BU10 / %
A	434 – 419	125.7	115.7 – 135.7	123.6	123.8	123.2	123.9	123.9	124.4	124.1	125.9	123.8	124.9
	434 – 329	41.7	33.3 – 50.0	38.6	38.6	38.4	38.8	38.9	39.1	38.8	39.5	38.7	39.2
Etio	434 – 419	101.1	91.1 – 111.1	100.8	100.9	100.8	101.0	101.1	101.7	100.9	101.9	100.2	101.6
	434 – 329	45.9	36.7 – 55.0	44.6	44.6	44.3	44.7	44.9	45.4	44.6	46.1	44.5	45.4
5α	241 – 256	57.6	47.6 – 67.6	56.4	59.3	56.4	61.7	59.0	59.9	57.8	59.3	59.5	59.8
	241 – 436	28.8	23.0 – 34.6	1128.3	642.0	1021.1	993.7	610.9	1259.4	730.2	473.6	700.2	737.8
5β	241 – 256	117.7	107.7 – 127.7	116.6	114.4	118.4	114.9	115.3	113.6	115.0	121.1	114.9	114.7
	241 – 436	7.2	2.2 – 12.2	286.5	374.0	427.2	417.9	231.0	475.5	276.0	219.3	267.1	445.9
Epi	432 – 417	8.6	3.6 – 13.6	38.4	46.0	67.2	40.6	47.1	71.8	19.6	19.2	72.7	33.6
	432 – 327	4.4	2.2 – 6.6	5.7	23.8	23.8	27.2	26.9	21.4	24.5	16.4	29.1	24.3
T	432 – 417	11.2	6.2 – 16.2	33.4	350.9	554.8	642.1	519.6	447.4	589.5	516.4	401.9	884.4
	432 – 327	27.6	22.1 – 33.1	7.5	138.0	224.5	263.2	210.9	183.0	235.1	212.6	163.0	351.8

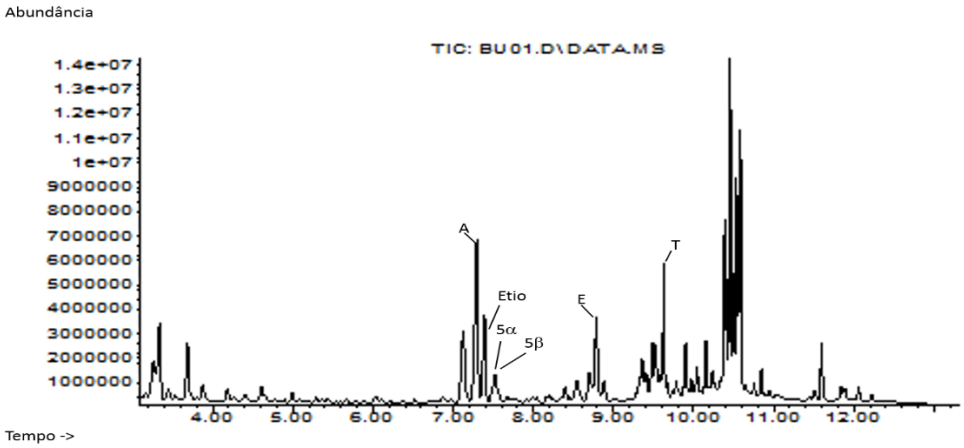


Figura 27 – Cromatograma obtido em SCAN para a amostra BU01 com apenas uma extração com éter *terc*-butilmetílico

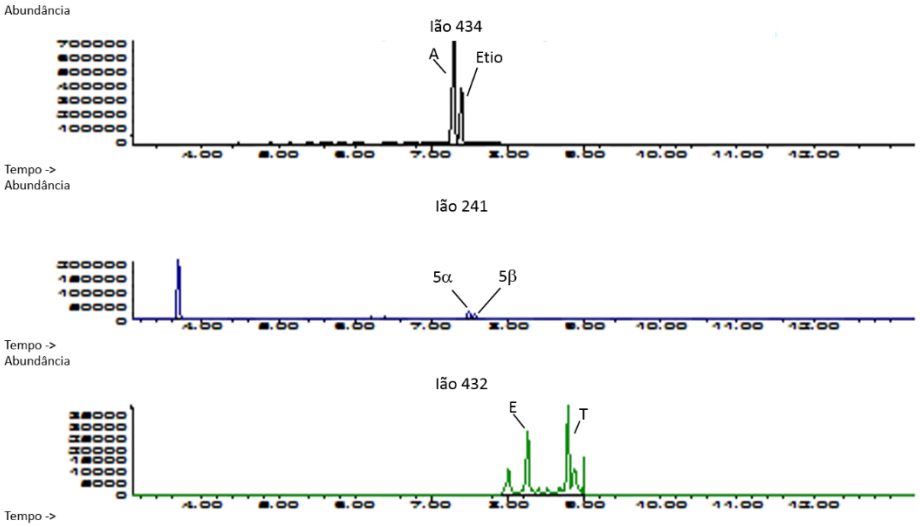


Figura 28 – Cromatograma, com os iões principais extraídos, obtido em SIM para a amostra BU01 com apenas uma extração com éter *terc*-butilmetílico

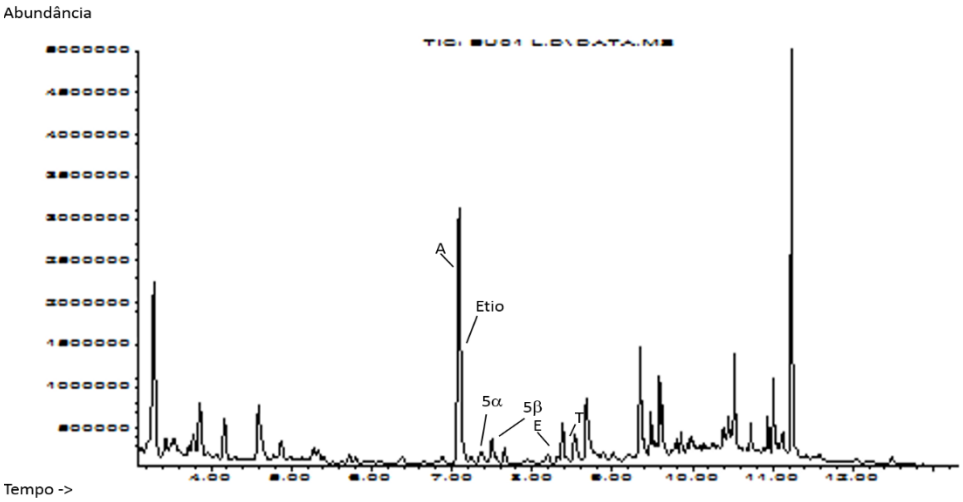


Figura 29 – Cromatograma, em modo SCAN, da fração livre da amostra BU01 obtida na primeira extração

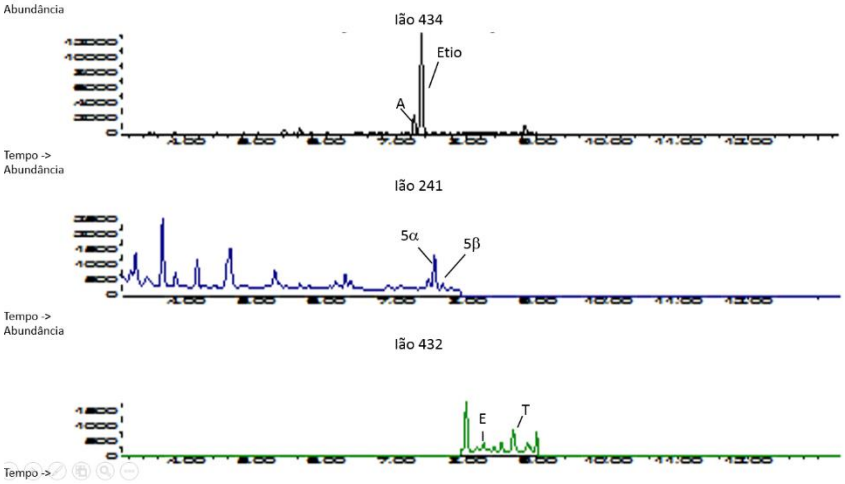


Figura 30 – Cromatograma, com os iões principais extraídos, obtido em SIM para a fração livre da amostra BU01

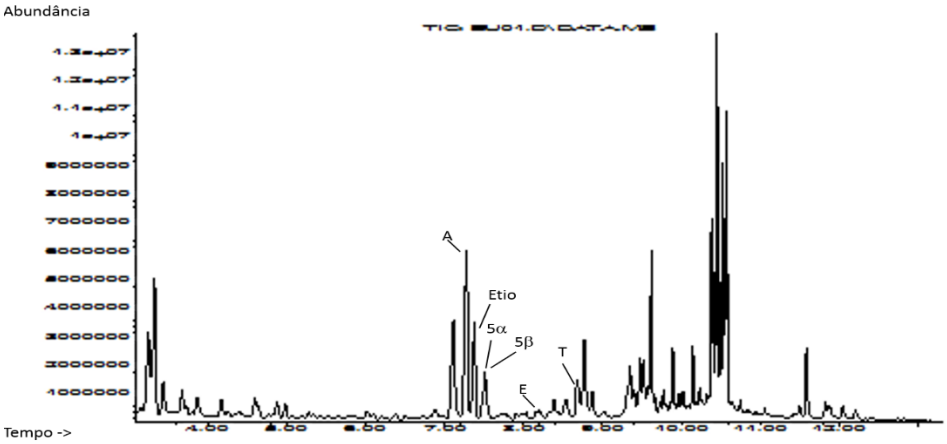


Figura 31 – Cromatograma obtido em SCAN para a amostra BU01 com as duas extrações com éter *terc*-butilmetílico

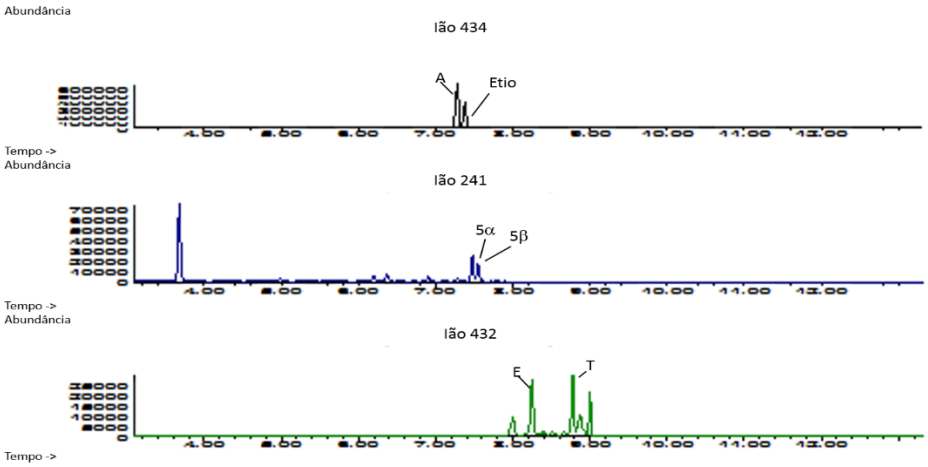


Figura 32 – Cromatograma, com os iões principais extraídos, obtido em SIM para a amostra BU01 com as duas extrações com éter *terc*-butilmetílico

Apesar de se ter detetado a presença de algumas substâncias, como o 5βAdiol, a Etiocolanolona e a Androsterona, na fração livre de algumas amostras como se pode constatar pela observação da Figura 30, a sua área relativa é muito menor que a área relativa das mesmas substâncias nas amostras que sofreram hidrólise. Por vezes, quando a produção de um determinado endógeno é muito elevada há uma porção da substância na forma livre, não conjugada, que é excretada na urina, o que poder-se-á traduzir numa toma de *doping*.

Os resultados obtidos para esta última extração estão sumarizados na Tabela 33 e na Tabela 34.

Avaliando as amostras, houve um pouco de dificuldade em obter conformidade em algumas amostras para a testosterona, por isso resolveu-se repetir o processo com duas extrações, mas em que o segundo solvente usado fosse o n-pentano, por ser um solvente mais seletivo, reduzindo o número de interferentes. Na Figura 33 e na Figura 34 encontram-se respetivamente, os cromatogramas em SCAN e em SIM de apenas os iões principais extraídos, para a amostra BU01 com ambas as extrações, sendo que a segunda foi feita com n-pentano.

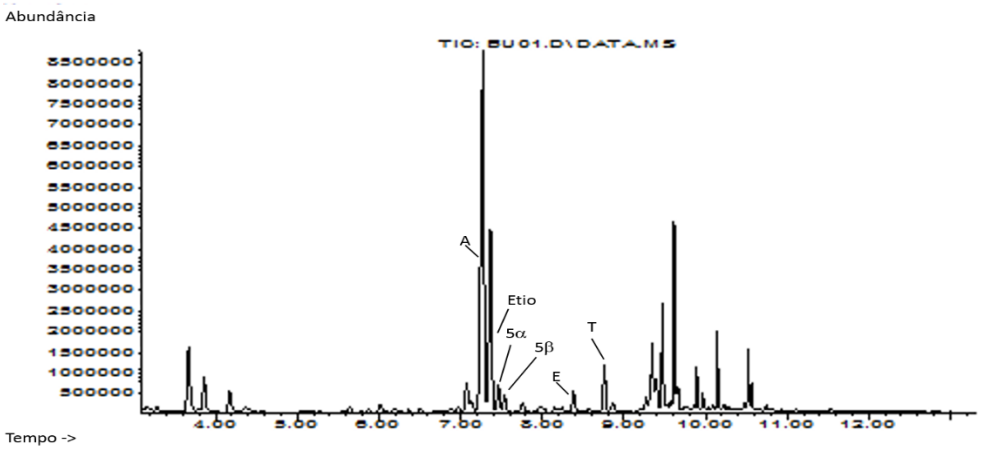


Figura 33 – Cromatograma obtido em SCAN para a amostra BU01 com as duas extrações, a primeira com éter *terc*-butilmetílico e a segunda com n-pentano

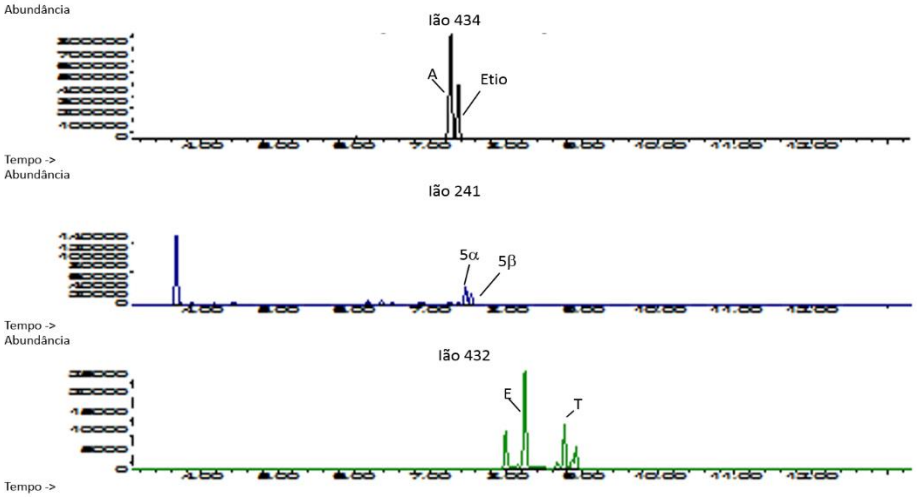


Figura 34– Cromatograma, com os iões principais extraídos, obtido em SIM para a amostra BU01 com as extrações, a primeira com éter *terc*-butilmetílico e a segunda com n-pentano

Tabela 33 – Tempos de retenção relativos das substâncias a quantificar das amostras que foram submetidas a uma primeira extração com éter *terc*-butilmetílico e uma segunda extração com n-pentano

		Controlo		BU01	BU02	BU03	BU04	BU05	BU06	BU07	BU08	BU09	BU10	BU11	BU12	BU13
MT	TR	9.35	-	9.35	9.35	9.35	9.35	9.35	9.35	9.35	9.35	9.35	9.35	9.35	9.35	9.35
A	TR	7.27	-	7.27	7.27	7.27	7.25	7.27	7.30	7.26	7.30	7.25	7.28	7.31	7.26	7.28
	TRR	0.778	0.770 - 0.785	0.778	0.778	0.778	0.775	0.778	0.781	0.776	0.781	0.775	0.779	0.782	0.776	0.779
Etio	TR	7.37	-	7.37	7.362	7.38	7.353	7.362	7.388	7.362	7.389	7.371	7.398	7.433	7.37	7.39
	TRR	0.788	0.780 - 0.796	0.788	0.787	0.789	0.786	0.787	0.790	0.787	0.790	0.788	0.791	0.795	0.788	0.790
5α	TR	7.48	-	7.47	7.46	7.47	7.46	7.46	7.48	7.46	7.47	7.46	7.478	7.496	7.47	7.478
	TRR	0.800	0.792 – 0.808	0.799	0.798	0.799	0.798	0.798	0.800	0.798	0.799	0.798	0.800	0.802	0.799	0.800
5β	TR	7.55	-	7.54	7.541	7.54	7.54	7.541	7.54	7.54	7.549	7.54	7.549	7.558	7.541	7.54
	TRR	0.807	0.799 - 0.816	0.806	0.807	0.806	0.806	0.807	0.806	0.806	0.807	0.806	0.807	0.808	0.807	0.806
Epi	TR	8.268	-	8.25	8.245	8.245	8.252	8.245	8.245	8.245	8.245	8.253	8.245	8.245	8.245	8.245
	TRR	0.884	0.875 - 0.893	0.882	0.882	0.882	0.883	0.882	0.882	0.882	0.882	0.883	0.882	0.882	0.882	0.882
T	TR	8.691	-	8.67	8.66	8.652	8.683	8.66	8.66	8.668	8.66	8.676	8.66	8.652	8.668	8.66
	TRR	0.930	0.920 - 0.939	0.927	0.926	0.925	0.929	0.926	0.926	0.927	0.926	0.928	0.926	0.925	0.927	0.926

Tabela 34 – Relações iónicas das substâncias das amostras que foram submetidas a uma primeira extração com éter *terc*-butilmetílico e uma segunda extração com n-pentano

	Transição	Controlo / %		BU01 / %	BU02 / %	BU03 / %	BU04 / %	BU05 / %	BU06 / %	BU07 / %	BU08 / %	BU09 / %	BU10 / %	BU11 / %	BU12 / %	BU13 / %
A	434 – 419	116,5	106,5 – 126,5	120,5	119,3	120,5	119.8	120,4	121,0	120,3	120,9	120,1	120,5	121,5	120,4	120,7
	434 – 329	39,3	31,5 – 47,2	37,7	38,0	37,4	37.3	37,4	37,4	37,3	37,2	37,4	37,2	37,5	37,4	37,3
Etio	434 – 419	96,0	86,0 – 106,0	98,0	98,0	98,4	98.3	98,2	98,7	98,7	98,5	98,3	98,6	99,2	98,5	98,6
	434 – 329	45,8	36,6 – 55,0	42,9	43,0	43,1	43.0	43,0	43,3	42,8	43,1	42,9	42,9	43,8	42,9	43,0
5α	241 – 256	63,0	53,0 – 73,0	60,8	61,1	60,1	60.1	60,5	59,9	59,0	60,2	54,4	58,9	59,8	60,4	59,5
	241 – 436	25,5	20,4 – 30,6	26,3	26,8	27,9	24.7	28,1	27,5	25,1	27,7	21,3	24,3	27,5	28,3	24,6
5β	241 – 256	117,1	107,1 – 127,1	118,3	117,8	118,0	125.9	117,5	116,7	118,0	117,9	119,8	117,6	125,8	118,0	116,8
	241 – 436	6,8	1,8 – 11,8	6,6	6,7	6,8	4.9	6,9	6,8	7,0	6,8	6,9	6,9	4,4	6,7	6,8
Epi	432 – 417	8,9	3,9 – 13,9	8,0	7,7	8,3	10.7	8,0	7,4	9,1	6,8	6,4	7,1	7,0	7,4	6,0
	432 – 327	2,6	1,3 – 3,9	3,5	3,2	1,5	4.4	3,5	3,8	3,7	3,9	3,4	3,9	3,7	2,4	2,0
T	432 – 417	11,4	6,4 – 16,4	13,9	12,2	11,8	30.2	12,1	11,4	6,7	12,6	15,6	11,9	11,3	11,4	12,2
	432 – 327	2,0	1,0 – 3,1	5,7	1,6	1,4	3.1	2,1	1,5	2,7	2,1	2,4	1,7	1,4	1,5	1,7

Finalmente, decidiu-se que o método de preparação das amostras teria duas extrações, a primeira com éter *terc*-butilmetílico, e a segunda com n-pentano para todos, à exceção dos Diois que, por serem menos polares, seriam extraídos com o éter *terc*-butilmetílico. A escolha das duas frações pode ser facilmente sustentada pela comparação entre a Figura 27, a Figura 31 e a Figura 33, onde se vê que a segunda extração com n-pentano apresenta menos interferentes que as outras duas.

Contudo, continuou-se a ter duas não conformidades com a testosterona e uma com a epitestosterona, sendo que o problema pode ser a nível da produção dos endógenos.

7.3. Testes de recuperação

Os testes de recuperação foram realizados com o intuito de avaliar a quantidade de substância que era possível recuperar com a extração, após a hidrólise. Tendo em conta os dois solventes extratores diferentes, fez-se para cada um deles, uma sequência com:

- 3 tubos com 2 mL de urina sintética, aos quais só foi adicionado padrão interno ao solvente orgânico, após a extração;

- 3 tubos aos quais adicionou-se uma quantidade conhecida das substâncias aos 2 mL de urina sintética, e padrão interno, após a extração;

- 3 tubos com 2 mL de urina sintética, aos quais a mesma quantidade de padrão conhecida que os tubos anteriores e o padrão interno foram adicionados ao solvente orgânico, após a extração.

Na Tabela 35, estão representadas as médias de recuperação obtidas para cada substância com os dois solventes de extração.

Tabela 35 – Médias das recuperações obtidas para cada um das seis substâncias a validar com os dois solventes de extração

Composto	Éter *terc*-butilmetílico / %	n-pentano / %
Androsterona	97.66	96.22
Etiocolanolona	76.60	68.26
5αAdiol	95.88	75.20
5βAdiol	94.46	71.46
Epitestosterona	94.89	71.22
Testosterona	104.79	72.19

Apesar de as recuperações com n-pentano serem inferiores, resolveu-se manter a extração com n-pentano para a androsterona, a etiocolanolona, a epitestosterona e a testosterona, uma vez que, remove uma quantidade substancial de interferentes, facilitando a sua deteção e quantificação.

7.4. Limite de deteção e quantificação

Para proceder a determinação dos limites de deteção e quantificação fez-se, para ambos os solventes de extração, curvas de calibração para as substâncias. Escolheu-se uma gama alargada, com 10 calibradores e um branco para a androsterona, a etiocolanolona e o 5βadiol, cujas concentrações constam da Tabela 36. Para as restantes substâncias, fez-se duas curvas de calibração distintas, uma com uma gama de concentrações baixa, que pode ser contemplada na Tabela 37, e uma com uma gama de concentrações alta, que está representada na Tabela 38.

Tabela 36 – Concentrações das substâncias a que se fez uma gama alargada de concentrações com 10 calibradores e um branco de urina

Calibrador	Androsterona / ng mL^{-1}	Etiocolanolona / ng mL^{-1}	5βAdiol / ng mL^{-1}
0	0	0	0
1	100	100	10
2	300	300	50
3	550	550	100
4	900	900	200
5	1500	1500	300
6	2500	2500	400
7	3000	3000	500
8	4000	4000	700
9	4500	4500	900
10	5000	5000	1000

Tabela 37 – Concentrações das substâncias a que se fez uma gama baixa de concentrações com 6 calibradores e um branco de urina

Calibrador	5αAdiol / ng mL^{-1}	Epitestosterona / ng mL^{-1}	Testosterona / ng mL^{-1}
0	0	0	0
1	10	10	10
2	30	30	30
3	80	80	80
4	150	150	125
5	300	300	230
6	400	400	350

Tabela 38 – Concentrações das substâncias a que se fez uma gama alta de concentrações com 6 calibradores

Calibrador	5αAdiol / ng mL^{-1}	Epitestosterona / ng mL^{-1}	Testosterona / ng mL^{-1}
1	300	400	300
2	350	450	350
3	400	500	400
4	500	570	460
5	700	650	570
6	900	750	650

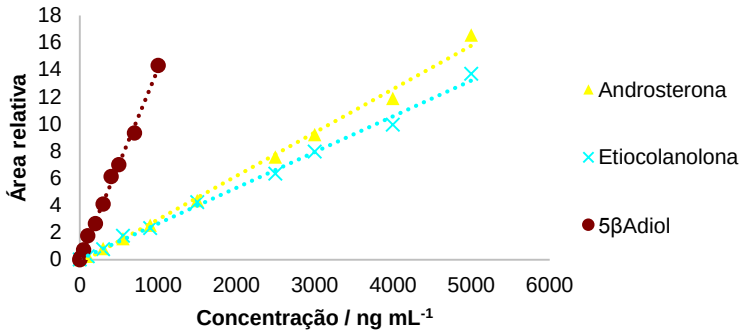


Figura 35 – Representação gráfica das curvas de calibração com uma gama alargada de concentrações em que o solvente de extração foi o éter *terc*-butilmetílico

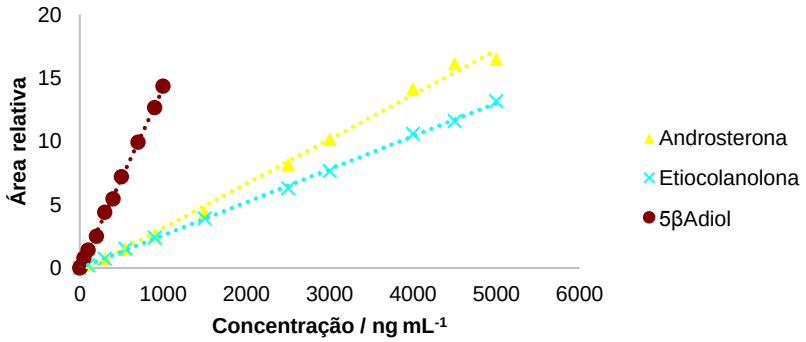


Figura 36 – Representação gráfica das curvas de calibração com uma gama alargada de concentrações em que o solvente de extração foi o n-pentano

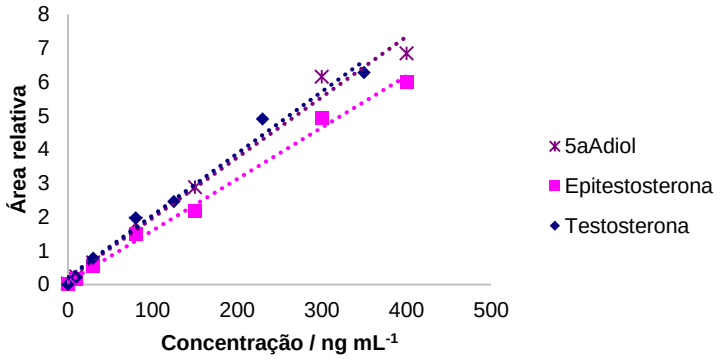


Figura 37 – Representação gráfica das curvas de calibração com uma gama baixa de concentrações em que o solvente de extração foi o éter *terc*-butilmetílico

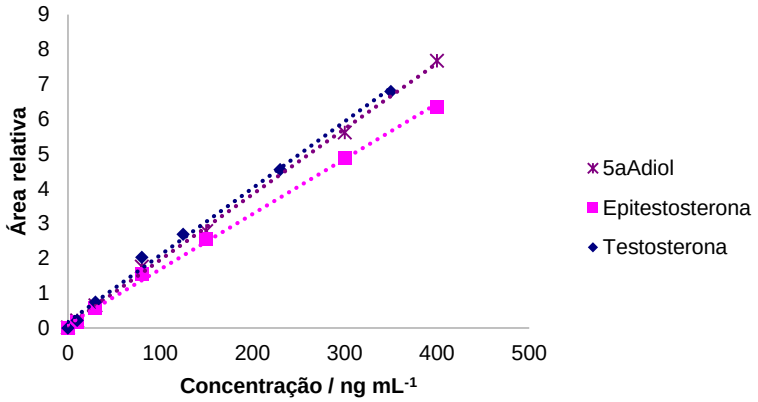


Figura 38 – Representação gráfica das curvas de calibração com uma gama baixa de concentrações em que o solvente de extração foi o n-pentano

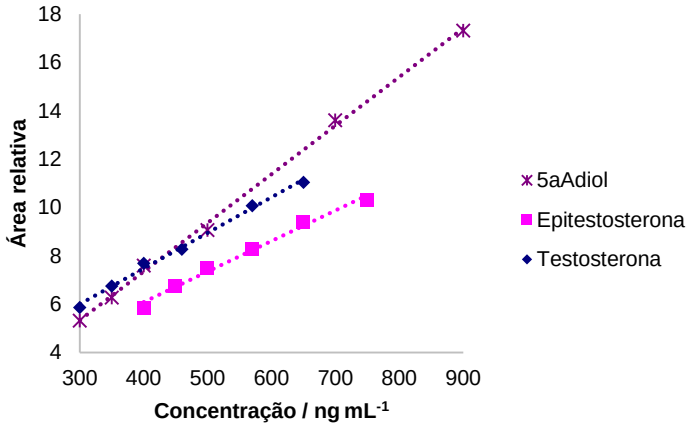


Figura 39 – Representação gráfica das curvas de calibração com uma gama alta de concentrações em que o solvente de extração foi o éter *terc*-butilmetílico

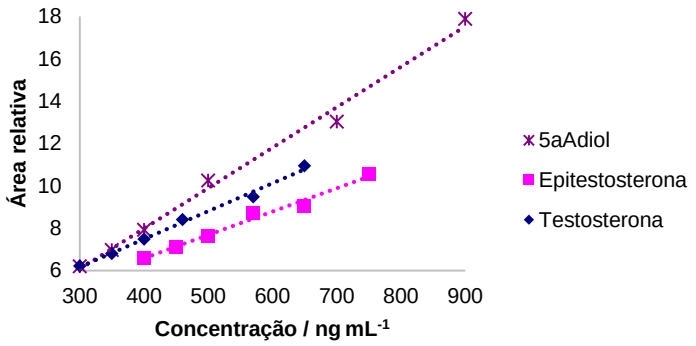


Figura 40 – Representação gráfica das curvas de calibração com uma gama alta de concentrações em que o solvente de extração foi o n-pentano

Na Figura 35 e na Figura 36, estão representadas as curvas de calibração da androsterona, da etiocolanolona e do 5βAdiol com os calibradores cujas concentrações são apresentadas na Tabela 36. Devido a um problema de derivatização, o calibrador 9, da gama alargada extraído com éter de *terc*-butilmetílico, não pode ser incluído.

Na Figura 37 e na Figura 38, pode-se observar as curvas de calibração para a testosterona, epitestosterona e 5αAdiol com os calibradores cujas concentrações constam da Tabela 37.

Na Figura 39 e na Figura 40, encontram-se as curvas de calibração para a testosterona, epitestosterona e 5αAdiol com os calibradores cujas concentrações surgem na Tabela 38.

Na Tabela 39, encontram-se as equações das curvas obtidas, tal como os seus coeficientes de correlação e o desvio padrão residual, aplicando as equações para calcular os limites de deteção e quantificação, (11) e (12) respetivamente, obtiveram-se os limites representados na Tabela 40.

O desvio padrão residual ($s_{y/x}$) foi obtido com base na equação (13), em que n corresponde ao número de calibradores da curva de calibração, y_i ao valor de resposta para o calibrador i e $\bar{y}$ à média das respostas obtidas para os calibradores.

$$s_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}(y_i - \bar{y})^2}{n-2}} \quad (13)$$

Tabela 39 – Equações, coeficientes de correlação e desvio padrão residual da curva para todas as curvas de calibração feitas para o estudo do limite de deteção e de quantificação

Substância	Curva	Equação	R^2	$s_{y/x}$
Androsterona	éter	$y = 0.00320 \cdot C_A - 0.2363$	0.9955	0.4017
	n-pentano	$y = 0.0035 \cdot C_A - 0.3168$	0.9958	0.3596
Etiocolanolona	éter	$y = 0.00263 \cdot C_{Et} + 0.034$	0.9956	0.3269
	n-pentano	$y = 0.0026 \cdot C_{Et} - 0.0116$	0.9993	0.1266
5βAdiol	éter	$y = 0.0140 \cdot C_{5\beta} + 0.0428$	0.9963	0.2993
	n-pentano	$y = 0.0142 \cdot C_{5\beta} - 0.0303$	0.9991	0.1592
5αAdiol	éter - baixa	$y = 0.0179 \cdot C_{5\alpha} + 0.1797$	0.9855	0.3710
	n-pentano - baixa	$y = 0.0188 \cdot C_{5\alpha} + 0.0737$	0.9986	0.1182
	éter -alta	$y = 0.0201 \cdot C_{5\alpha} - 0.7006$	0.9981	0.2271
	n-pentano - alta	$y = 0.0191 \cdot C_{5\alpha} + 0.3642$	0.9924	0.4327
Epitestosterona	éter - baixa	$y = 0.0153 \cdot C_E + 0.0749$	0.9940	0.2025
	n-pentano - baixa	$y = 0.0159 \cdot C_E + 0.1015$	0.9983	0.1109
	éter -alta	$y = 0.0126 \cdot C_E + 1.029$	0.9888	0.1962
	n-pentano - alta	$y = 0.011 \cdot C_E + 2.1804$	0.9842	0.2036
Testosterona	éter - baixa	$y = 0.0183 \cdot C_T + 0.2118$	0.9851	0.3211
	n-pentano - baixa	$y = 0.0192 \cdot C_T + 0.1762$	0.9952	0.1902
	éter -alta	$y = 0.0147 \cdot C_T + 1.5935$	0.9953	0.1505
	n-pentano - alta	$y = 0.0132 \cdot C_T + 2.2259$	0.9930	0.1656

Tabela 40 - Limites de deteção e quantificação obtidos para as várias curvas de calibração

Substância	Curva	LD/ ng mL^{-1}	LQ / ng mL^{-1}
Androsterona	éter	414.6	1256.4
	n-pentano	418.3	1267.6
Etiocolanolona	éter	410.0	1242.4
	n-pentano	168.6	510.9
5βAdiol	éter	70.5	213.6
	n-pentano	36.9	111.8
5αAdiol	éter - baixa	68.4	207.2
	n-pentano - baixa	20.7	62.8
	éter -alta	37.2	112.8
	n-pentano - alta	74.9	226.9
Epitestosterona	éter - baixa	43.8	132.8
	n-pentano - baixa	23.1	70.1
	éter -alta	51.2	155.3
	n-pentano - alta	61.0	185.0
Testosterona	éter - baixa	57.8	175.0
	n-pentano - baixa	32.7	99.2
	éter -alta	33.8	102.3
	n-pentano - alta	41.5	125.6

Comparando os valores presentes na Tabela 40, os valores obtidos para os limites são relativamente elevados, especialmente para a testosterona e epitestosterona, tendo em conta as restrições impostas pela WADA. Por esse motivo, tentou-se obter os limites, por diluições consecutivas da solução *Aiva* usada na triagem IV. As concentrações das curvas obtidas por este método encontram-se na Tabela 41.

Tabela 41 – Concentrações dos esteroides nos calibradores da reta de calibração feita por diluição da solução *Aiva*

Dil	A/ ng mL^{-1}	Etio/ ng mL^{-1}	5α / ng mL^{-1}	5β / ng mL^{-1}	E / ng mL^{-1}	T / ng mL^{-1}
1:1	2000	2000	50	100	40	40
1:2	1000	1000	25	50	20	20
1:4	500	500	12.5	25	10	10
1:8	250	250	6.3	12.5	5.0	5.0
1:16	125	125	3.1	6.3	2.5	2.5
1:32	62.5	62.5	1.6	3.1	1.3	1.3
1:64	31.25	31.25	0.8	1.6	0.6	0.6

Os limites de deteção e quantificação obtidos, com este método, foram os que se encontram na Tabela 42.

Tabela 42 – Limites de deteção e quantificação obtidos pela diluição sucessiva da solução *Aiva*

Limite	Andros	Etio	5α	5β	Epi	Testo
$LD_{éter}$ / ng mL^{-1}	254.(6)	136.(2)	4.4	11.(3)	3.1	3.6
$LQ_{éter}$ / ng mL^{-1}	771.(6)	412.(6)	13.(5)	34.(1)	9.3	10.(9)
$LD_{n\text{-}pent}$ / ng mL^{-1}	29.(9)	71.(7)	1.1	4.4	0.36	1.9
$LQ_{n\text{-}pent}$ / ng mL^{-1}	90.(5)	217.(3)	3.2	13.(3)	1.0(8)	5.7

Contudo, por ter havido problemas de linearidade com a Androsterona extraída com o n-pentano e com os limites obtidos para a testosterona, com ambos os solventes extratores, fez-se uma curva com 9 *spikes* com uma solução de *Aiva* mais diluída. As concentrações da curva estão expostas na Tabela 43.

Tabela 43 – Concentrações das substâncias nos diferentes *spikes* de *Aiva*

Spike / μL	A/ ng mL^{-1}	Etio/ ng mL^{-1}	5α / ng mL^{-1}	5β / ng mL^{-1}	E / ng mL^{-1}	T / ng mL^{-1}
100	250	250	6.250	12.5(0)	5.0	5.0
90	225	225	5.625	11.2(5)	4.5	4.5
80	200	200	5.000	10.0(0)	4.0	4.0
70	175	175	4.375	8.75	3.5	3.5
60	150	150	3.750	7.50	3.0	3.0
50	125	125	3.125	6.25	2.5	2.5
40	100	100	2.500	5.00	2.0	2.0
30	75	75	1.875	3.75	1.5	1.5
20	50	50	1.250	2.50	1.0	1.0
0	0	0	0	0	0	0

Mesmo tendo que remover alguns pontos de modo a obter linearidade os limites obtidos cumprem os critérios requeridos pela WADA. Através da observação da Tabela 44, vê-se que, os limites de quantificação, para ambos os solventes extratores, da epitestosterona e da testosterona são inferiores a 2 ng mL^{-1}, sendo que, o que foi feito com n-pentano apresenta um valor inferior ao do éter nas mesmas condições. O mesmo acontece para o 5βAdiol, contudo tanto para a androsterona, como para a etiocolanolona e para o 5αAdiol acontece o oposto Mesmo assim, resolveu-se manter o

n-pentano como solvente extrator para a androsterona e para a etiocolanolona, e o éter *terc*-butilmetílico para os adiois.

Tabela 44 – Limites de deteção e quantificação obtidos por *spikes* de uma solução *Aiva* mais diluída

Limite	Andros	Etio	5α	5β	Epi	Testo
L.D.$_{éter}$ / ng mL^{-1}	22.4	21.4	0.248	1.24	0.465	0.520
L.Q.$_{éter}$ / ng mL^{-1}	67.8	64.9	0.752	3.76	1.41	1.58
L.D.$_{n\text{-}pent}$ / ng mL^{-1}	32.2	24.3	0.683	0.478	0.332	0.164
L.Q.$_{n\text{-}pent}$ / ng mL^{-1}	97.5	73.6	2.07	1.45	1.01	0.497

Por conveniência, na preparação de soluções resolveu-se arredondar os limites de quantificação para a unidade ficando com os seguintes limites:

- Androsterona e etiocolanolona: 100 ng mL^{-1};
- 5αAdiol, epitestosterona e testosterona: 1 ng mL^{-1};
- 5βAdiol: 4 ng mL^{-1}.

7.5. Teste de diluição

Sendo que, para algumas substâncias, o limite de decisão para submeter a amostra a IRMS e para o caso da amostra ser demasiado concentrada para a curva de calibração foram feitos testes de diluição, para se perceber até que nível é possível diluir a amostra. As concentrações da *pool* inicial, que constam da Tabela 4, foram escolhidas por encontrarem-se acima do limite de decisão e a concentrações superiores às encontradas, até agora, em amostras de triagem.

Na primeira tentativa, cujas diluições já foram referidas anteriormente, mais precisamente na Tabela 5, obtiveram-se as curvas de diluição representadas nas Figura 41 e Figura 42, em que a extração foi feita com éter *terc*-butilmetílico e nas Figura 43 e Figura 44, cuja extração foi feita com n-pentano.

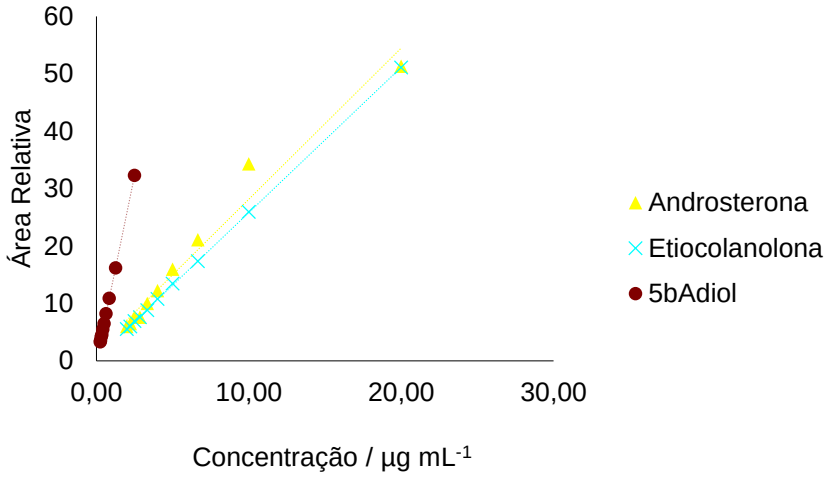


Figura 41 – Representação das curvas das diluições de Androsterona, Etiocolanolona e 5βAdiol com a extração por éter *terc*-butilmetílico

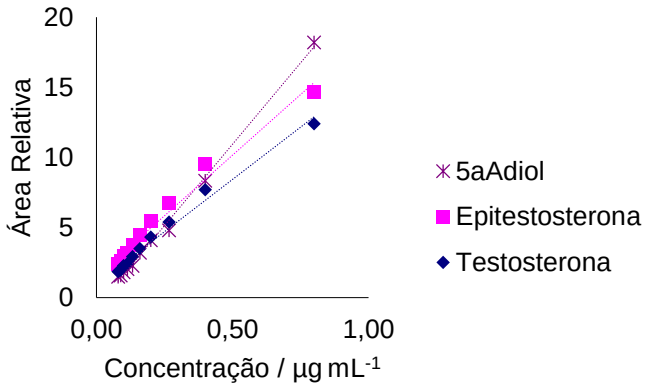


Figura 42 – Representação das curvas das diluições de 5αAdiol, Epitestosterona e Testosterona com a extração por éter *terc*-butilmetílico

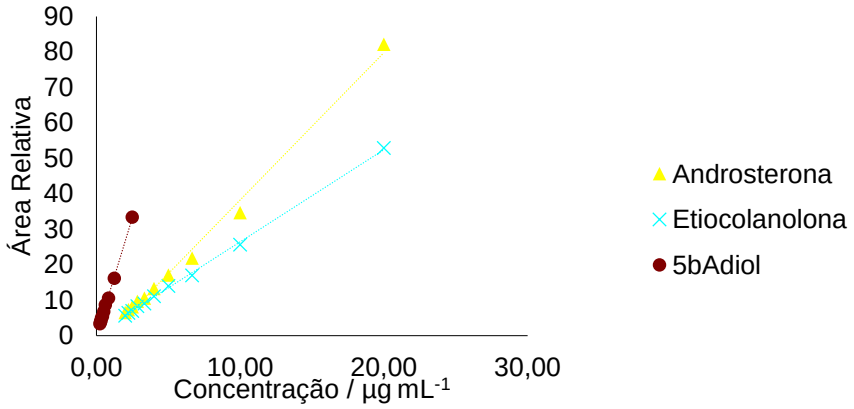


Figura 43 – Representação das curvas das diluições de Androsterona, Etiocolanolona e 5βAdiol com a extração por n-pentano

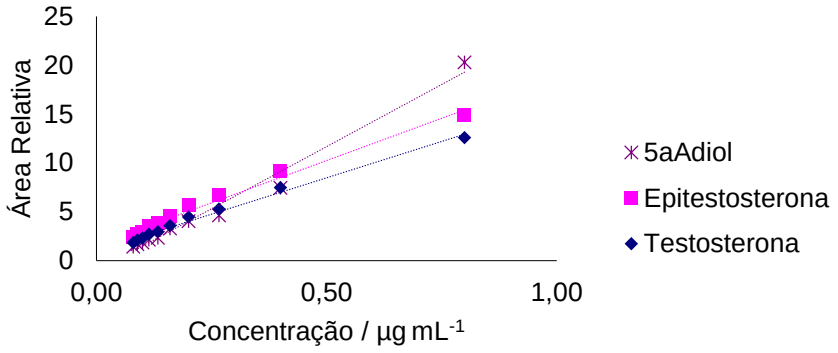


Figura 44 – Representação das curvas das diluições de 5αAdiol, Epitestosterona e Testosterona com a extração por n-pentano

Recorrendo a utilização da ferramenta de Regressão do Excel® para comprovar a linearidade das curvas, verificou-se que, com os dados obtidos, só se obteve linearidade até as seguintes diluições:

- Para o éter *terc*-butilmetílico:
  - Androsterona até 1:10
  - Etiocolanolona até 1:3
  - 5αAdiol até 1:5
  - 5βAdiol até 1:10
  - Epitestosterona até 1:3
  - Testosterona até 1:3
- Para o n-pentano:
  - Androsterona até 1:5
  - Etiocolanolona até 1:10
  - 5αAdiol até 1:7
  - 5βAdiol até 1:10
  - Epitestosterona até 1:3
  - Testosterona até 1:3

Para tentar melhorar as diluições, criou-se pontos intermédios entre o sem diluição e a diluição de 1 para 5, como descrito na Tabela 6. Na Figura 45 e na Figura 46, constam as representações gráficas das curvas de diluição com as amostras preparadas segunda a Tabela 6, em que o solvente de extração foi o éter *terc*-butilmetílico. Na Figura 47 e na Figura 48 exibem-se as representações gráficas para a mesma experiência, mas com a extração feita com o n-pentano.

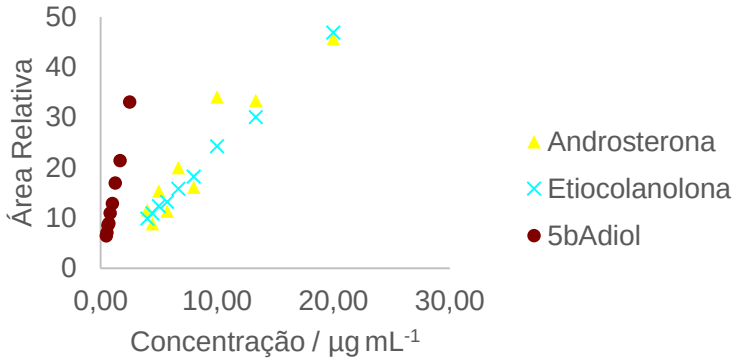


Figura 45 – Representação das curvas das diluições de Androsterona, Etiocolanolona e 5βAdiol com a extração por éter *terc*-butilmetílico

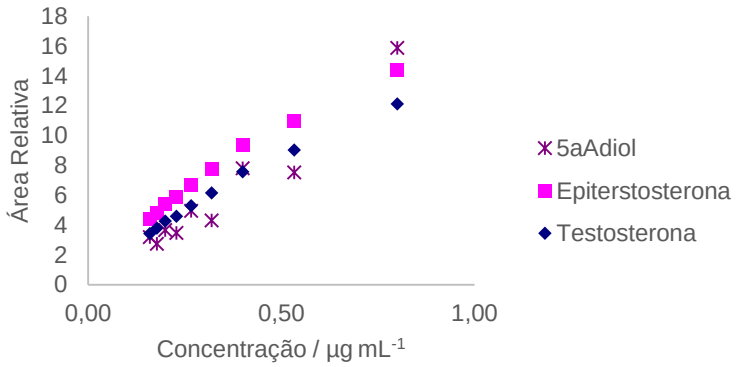


Figura 46 – Representação das curvas das diluições de 5αAdiol, Epitestosterona e Testosterona com a extração por éter *terc*-butilmetílico

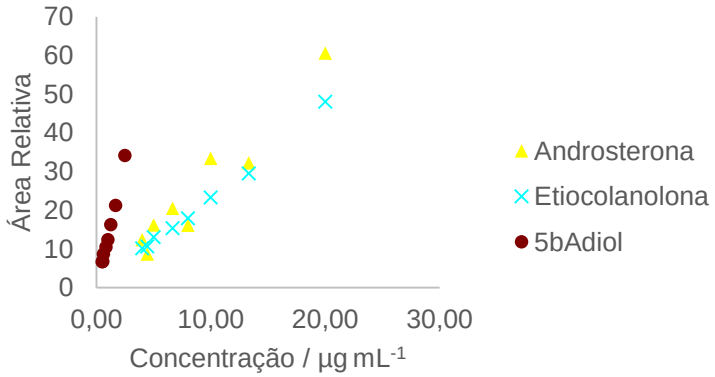


Figura 47 – Representação das curvas das diluições de Androsterona, Etiocolanolona e 5βAdiol com a extração por n-pentano

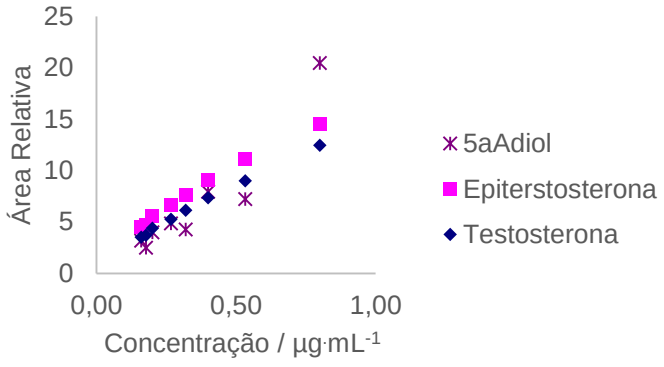


Figura 48 – Representação das curvas das diluições de 5αAdiol, Epitestosterona e Testosterona com a extração por n-pentano

Usando a mesma ferramenta do Excel®, de modo a determinar a linearidade das curvas, obteve-se linearidade para todas as diluições de androsterona, etiocolanolona, 5αAdiol e 5βAdiol em ambos os solventes, contudo, não aconteceu o mesmo para a testosterona e para a epitestosterona. Para estas duas substâncias, só se obteve linearidade da diluição de 1 para 3.5 até à diluição de 1 para 5, para o solvente de extração éter *terc*-butilmetílico, enquanto para o n-pentano obteve-se linearidade da diluição de 1 para 3 até à diluição de 1 para 5.

Finalmente, tentou-se fazer uma outra *pool* com concentrações mais baixas para a etiocolanolona, o 5βAdiol, a epitestosterona e a testosterona. As novas concentrações encontram-se na Tabela 7. Na Figura 49, consta a representação gráfica para a etiocolanolona extraída com n-pentano utilizando a pool descrita na Tabela 7, enquanto na Figura 50, encontram-se as representações gráficas das curvas para a epitestosterona e testosterona extraídas com n-pentano e do 5βAdiol, extraído com éter *terc*-butilmetílico.

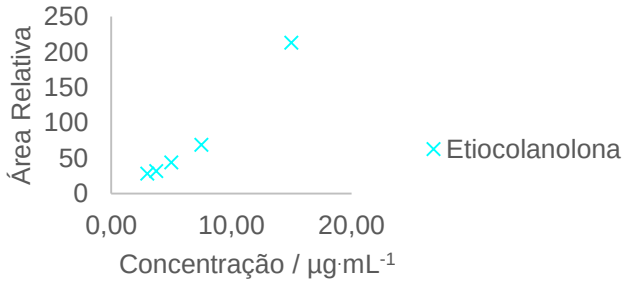


Figura 49 – Representação das novas curvas das diluições de Etiocolanolona com a extração por n-pentano

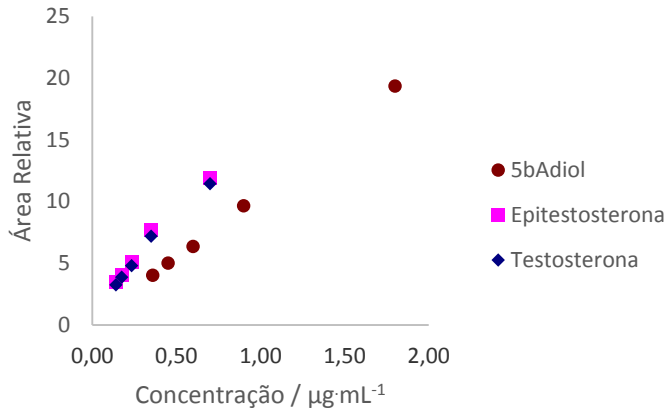


Figura 50 – Representação das novas curvas das diluições de 5βAdiol extraído com éter *terc*-butilmetílico, Epitestosterona e Testosterona com a extração por n-pentano

Depois de aplicada, tal como nos outros casos, a ferramenta de Regressão do Excel®, para os solventes de extração escolhidos para cada uma das substâncias, verificou-se que, para a etiocolanolona e para o 5βAdiol era possível fazer uma diluição até 1:5, enquanto para a testosterona e para a epitestosterona só é possível até uma diluição de 1:4.

Uma vez que, os valores das concentrações das maiores diluições possíveis encontram-se dentro das curvas de calibração das substâncias em estudo, aceitou-se os resultados obtidos para os testes de diluição.

7.6. Arrastamento

A existência, ou não, de arrastamentos das substâncias foi avaliada com a injeção intercalada da mistura de derivatização com uma solução com concentração elevada das várias substâncias. Sendo que a mistura de derivatização usada é sempre a mesma e os calibradores usados são diferentes. No caso de haver uma alteração significativa na área do pico do branco, neste caso, a mistura de derivatização, será indicador de arrastamento. A Tabela 45 fornece os valores das áreas dos picos encontradas nas várias injeções, e através da sua observação pode-se constatar que não há arrastamento. Na Figura 51 e na Figura 52, encontram-se os cromatogramas obtidos para as soluções GA1 e MD1, respetivamente, onde foi feita a extração dos picos cromatográficos pelas razões massa/carga dos vários iões para se obter a área e tempo de retenção de cada pico. Tendo em conta que, na Tabela 45, as soluções aparecem por ordem de injeção, pode-se confirmar que não houve arrastamento das substâncias entre injeções. Esta conclusão pode ser provada também pela observação da Figura

52, onde só se observa a presença de ruido nos tempos de retenção esperados para as substâncias a detetar.

Tabela 45 – Áreas dos picos das substâncias nas misturas de derivatização injetadas intercaladas com os calibradores de cama alta

Substância	*MD* (A_{pico})	*GA1* (A_{pico})	*MD1* (A_{pico})	*GA2* (A_{pico})	*MD2* (A_{pico})	*GA3* (A_{pico})	*MD3* (A_{pico})
A	0	1118388	0	1228144	0	1301245	0
Etio	0	1023263	0	1149129	0	1169850	0
5a	0	55577	0	58829	0	59542	0
5b	0	119155	0	133164	0	132371	0
E	0	76747	0	84194	0	86997	0
T	0	71980	0	77910	0	82768	0

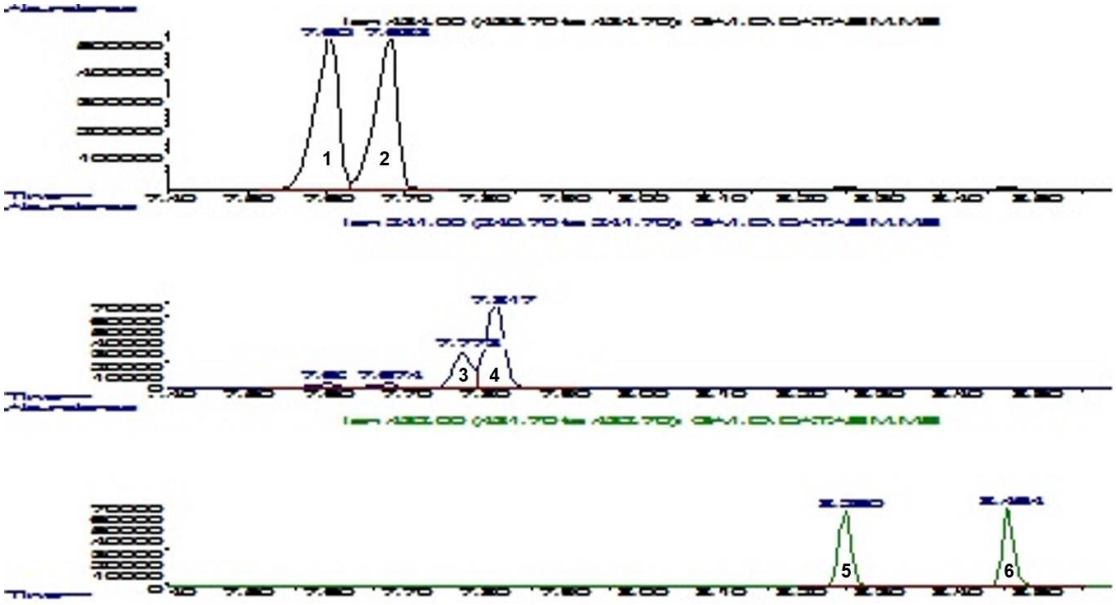


Figura 51 – Cromatograma da solução GA1 repartido por razão massa/carga, em que no eixo das ordenadas temas a abundância do pico e nas abscissas o tempo de retenção. O pico 1 (androsterona), com o tempo de retenção 7.603, e o pico 2 (etiocolanolona), com o tempo de retenção 7.683, foram “extraídos” utilizando a razão massa/carga 434; o pico 3 (5αadiol), com o tempo de retenção 7.773, e o pico 4 (5βadiol), com o tempo de retenção 7.817, foram “extraídos” usando a razão massa/carga 241; o pico 5 (epitestosterona), com o tempo de retenção 8.260, e o pico 6 (testosterona), com o tempo de retenção 8.464, foram “extraídos” utilizando a razão massa/carga 432

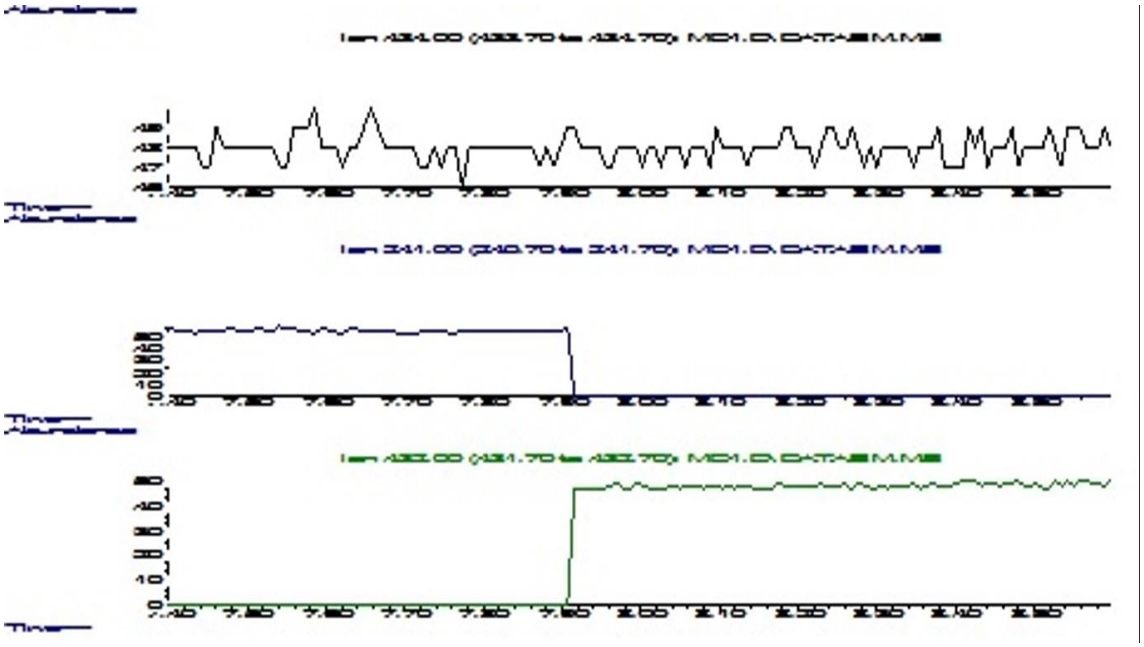


Figura 52 - Cromatograma da solução MD1 repartido por razão massa/carga, em que no eixo das ordenadas temas a abundância do pico e nas abscissas o tempo de retenção. No primeiro patamar encontra-se o que foi obtido pela "extração" utilizando a razão massa/carga 434; no segundo patamar encontra-se o que foi obtido pela "extração" usando a razão massa/carga 241; no terceiro patamar encontra-se o que foi obtido pela "extração" utilizando a razão massa/carga 432

7.7. Precisão e exatidão

Inicialmente, para os ensaios de precisão e de exatidão utilizou-se curvas de calibração com as concentrações referidas na Tabela 46. As concentrações dos vários controlos usados para a obtenção de resultados encontram-se da Tabela 9 à Tabela 13.

Tabela 46 – Concentração das substâncias endógenas, nos calibradores usados para a avaliação da precisão e da exatidão

Calibrador	*A* / ng mL^{-1}	Etio / ng mL^{-1}	5α / ng mL^{-1}	5β / ng mL^{-1}	T / ng mL^{-1}	E / ng mL^{-1}
Bu	0	0	0	0	0	0
Cal 1	300	300	10	50	10	10
Cal 2	550	550	30	100	30	30
Cal 3	900	900	80	200	80	80
Cal 4	1500	1500	150	300	125	125
Cal 5	2500	2500	200	400	180	180
Cal 6	3000	3000	250	500	230	230
Cal 7	4000	4000	300	700	290	290
Cal 8	5000	5000	400	900	350	350

Apesar de se saber que é possível detetar e quantificar a testosterona, a epitestosterona e o 5αadiol com uma concentração de 2 ng mL^{-1}, os valores obtidos com estas curvas de calibração não foram os esperados. Resolveu-se alterar, mais uma vez, as curvas de calibração, desta vez optando-se por duas gamas distintas, uma gama baixa, cujas

concentrações estão expostas na Tabela 47, e uma gama alta em que as concentrações se encontram na Tabela 48.

Tabela 47 – Concentração das substâncias endógenas, nos calibradores utilizados para a gama baixa da avaliação da precisão e da exatidão

Calibrador	*A* / ng mL^{-1}	Etio / ng mL^{-1}	5α / ng mL^{-1}	5β / ng mL^{-1}	T / ng mL^{-1}	E / ng mL^{-1}
Bu	0	0	0	0	0	0
Cal 1	5	5	1	2	1	1
Cal 2	10	10	2	5	2	2
Cal 3	50	50	3	8	3	3
Cal 4	90	90	5	10	5	5
Cal 5	150	150	8	15	8	8
Cal 6	260	260	10	20	10	10
Cal 7	370	370	15	30	15	15
Cal 8	580	580	20	50	20	20
Cal 9	-	650	30	90	30	30
Cal 10	-	780	50	140	40	40

Tabela 48 – Concentração das substâncias endógenas, nos calibradores utilizados para a gama baixa da avaliação da precisão e da exatidão

Calibrador	A / ng mL^{-1}	Etio / ng mL^{-1}	5α / ng mL^{-1}	5β / ng mL^{-1}	T / ng mL^{-1}	E / ng mL^{-1}
Bu	0	0	0	0	0	0
Cal 1	10	5	2	5	2	2
Cal 2	370	260	10	20	10	15
Cal 3	1200	780	50	140	40	80
Cal 4	1700	950	80	190	50	120
Cal 5	2200	1200	120	250	80	140
Cal 6	2800	1700	140	320	120	180
Cal 7	3100	2200	180	430	140	200
Cal 8	3800	2800	200	560	180	250
Cal 9	4500	3100	250	680	200	300
Cal 10	5000	3800	300	790	250	350
Cal 11	-	4500	350	910	300	-
Cal 12	-	5000	400	1000	350	-

Na Tabela 49 e na Tabela 50, encontram-se os valores obtidos para a precisão intermédia para a gama baixa e gama alta da androsterona, respetivamente. Em cada tabela, constam os dados obtidos para as várias repetições de cada um dos controlos, o dia da injeção, a indicação do GC-MS utilizado, o declive e o coeficiente de correlação da curva obtida, tal como a média, o desvio padrão e o coeficiente de variação para cada dia.

Tabela 49 **–** Resultados obtidos para o estudo da repetibilidade, da precisão intermédia e da exatidão da gama baixa da Androsterona

	1ª Curva	2ª Curva	3ª Curva	4ª Curva	5ª Curva	6ª Curva	7ª Curva	8ª Curva
Data	06/03/15	10/03/15	13/03/15	18/03/15	15/04/15	16/04/15	17/04/15	22/04/15
GC-MS	042	042	042	042	009	009	009	009
Declive / mL ng^{-1}	**0,0069**	**0,0069**	**0,0066**	**0,0073**	**0,0071**	**0,0072**	**0,0072**	**0,0074**
r^2	**0,998**	**0,997**	**0,996**	**0,995**	**0,999**	**0,998**	**0,998**	**0,999**
LQ_1 / ng mL^{-1}	82,70	87,30	79,74	-	87,09	90,72	80,45	109,33
LQ_2 / ng mL^{-1}	82,78	72,66	84,33	80,19	88,78	82,61	86,68	85,24
LQ_3 / ng mL^{-1}	85,27	-	87,83	79,11	91,47	75,76	91,64	86,32
Média / ng mL^{-1}	**83,6**	**80,0**	**84,0**	**79,7**	**89,1**	**83,0**	**86,3**	**93,6**
s / ng mL^{-1}	**1,5**	**10,4**	**4,1**	**0,8**	**2,2**	**7,5**	**5,6**	**13,6**
CV / %	**1,7%**	**12,9%**	**4,8%**	**1,0%**	**2,5%**	**9,0%**	**6,5%**	**14,5%**
5LQ_1 / ng mL^{-1}	437,38	441,46	459,02	423,78	435,57	441,46	444,56	423,61
5LQ_2 / ng mL^{-1}	432,62	429,20	451,58	441,77	446,30	435,41	435,81	431,15
5LQ_3 / ng mL^{-1}	442,10	444,56	482,39	-	-	-	475,43	-
Média / ng mL^{-1}	**437,4**	**438,4**	**464,3**	**432,8**	**440,9**	**438,4**	**451,9**	**427,4**
s / ng mL^{-1}	**4,7**	**8,1**	**16,1**	**12,7**	**7,6**	**4,3**	**20,8**	**5,3**
CV / %	**1,1%**	**1,9%**	**3,5%**	**2,9%**	**1,7%**	**1,0%**	**4,6%**	**1,2%**

Tabela 50 – Resultados obtidos para o estudo da repetibilidade, da precisão intermédia e da exatidão da gama alta da Androsterona

	1ª Curva	2ª Curva	3ª Curva	4ª Curva	5ª Curva	6ª Curva	7ª Curva	8ª Curva
Data	06/03/15	10/03/15	13/03/15	18/03/15	15/04/15	16/04/15	17/04/15	22/04/15
Observação	042	042	042	042	009	009	009	009
Declive / mL ng^{-1}	**0,0085**	**0,0087**	**0,0089**	**0,0084**	**0,0065**	**0,0068**	**0,0071**	**0,0070**
r^2	**0,990**	**0,996**	**0,997**	**0,996**	**0,993**	**1,000**	**0,999**	**0,990**
Aiva_1 **/ ng mL^{-1}**	1692,1	1869,7	1621,5	1694,5	1836,14	2008,30	1702,35	1752,95
Aiva_2 **/ ng mL^{-1}**	1852,3	1657,1	1581,4	1496,2	2044,64	1827,10	1704,53	1540,35
Aiva_3 **/ ng mL^{-1}**	2065,9	1731,5	1582,3	3274,8	2263,20	1863,24	1723,38	3503,70
Média / ng mL^{-1}	**1870,1**	**1752,8**	**1595,1**	**2155,2**	**2048,0**	**1899,5**	**1710,1**	**2265,7**
s / ng mL^{-1}	**187,5**	**107,9**	**22,9**	**974,7**	**213,5**	**95,9**	**11,6**	**1077,4**
CV / %	**10,0%**	**6,2%**	**1,4%**	**45,2%**	**10,4%**	**5,0%**	**0,7%**	**47,6%**
G.A._1 **/ ng mL^{-1}**	4024,6	4024,3	3891,6	3699,1	3986,66	3936,44	3827,91	3684,33
G.A._2 **/ ng mL^{-1}**	3944,2	3601,4	3926,3	3595,3	3877,24	3481,13	3843,68	3570,83
G.A._3 **/ ng mL^{-1}**	4074,9	3642,4	3943,9	3879,2	4072,12	3689,04	3829,94	3891,34
Média / ng mL^{-1}	**4014,6**	**3756,0**	**3920,6**	**3724,5**	**3978,7**	**3702,2**	**3833,8**	**3715,5**
s / ng mL^{-1}	**65,9**	**233,2**	**26,6**	**143,6**	**97,7**	**227,9**	**8,6**	**162,5**
CV / %	**1,6%**	**6,2%**	**0,7%**	**3,9%**	**2,5%**	**6,2%**	**0,2%**	**4,4%**
IRMS_1 **/ ng mL^{-1}**	3319,3	3456,6	3087,8	3344,5	3418,95	3359,89	3057,87	3315,14
IRMS_2 **/ ng mL^{-1}**	3274,0	3425,7	3149,5	3249,5	3437,65	3364,52	3192,21	3210,56
IRMS_3 **/ ng mL^{-1}**	3390,8	-	3133,7	3197,1	3488,78	-	3130,17	3186,53
Média / ng mL^{-1}	**3328,0**	**3441,1**	**3123,6**	**3263,7**	**3448,5**	**3362,2**	**3126,7**	**3237,4**
s / ng mL^{-1}	**58,9**	**21,9**	**32,1**	**74,7**	**36,1**	**3,3**	**67,2**	**68,4**
CV / %	**1,8%**	**0,6%**	**1,0%**	**2,3%**	**1,0%**	**0,1%**	**2,2%**	**2,1%**

Verificou-se que, os declives obtidos para ambas as gamas não apresentam uma grande variação e todas apresentam um coeficiente de correlação elevado.

Na Tabela 51, encontram-se os valores obtidos, utilizando a ferramenta *Anova* do *Excel*®, para o estudo da precisão intermédia, para cada uma das soluções de controlo recorrendo aos valores de concentração que constam da Tabela 49 e da Tabela 50. Todos os valores iguais a 0 que aparecem na coluna "*Between-run*" são devidos ao facto do valor obtido através do uso da ferramenta *Anova* para o MQ_d de "Dentro de Grupos" ser superior ao valor obtido para o MQ_e de "Entre os Grupos". O "*Between-run*" corresponde a um cálculo intermédio, usando a expressão (16), que permite o cálculo da precisão intermédia através da *Anova* e da repetibilidade. O desvio padrão de repetibilidade (s_r) é calculado com base na equação (14) enquanto que o da precisão interna é calculado tendo em conta a equação (17). O coeficiente de variação (CV) é calculado tendo em conta a equação (15) onde o s_x corresponde ao desvio padrão de repetibilidade, ou precisão intermédia e o m à média dos valores utilizados para *Anova*.

$$s_r = \sqrt{MQ_d} \tag{14}$$

$$CV = \frac{s_x}{m} \times 100 \tag{15}$$

$$BR = \sqrt{\frac{MQ_e - MQ_d}{3}} \tag{16}$$

$$s_{pi} = \sqrt{s_r^2 + BR^2} \tag{17}$$

Tabela 51 – Valores obtidos no estudo da repetibilidade e da precisão intermédia para a Androsterona

Nível	Média / ng mL^{-1}	Repetibilidade		*Between-run*	Nº de Pontos	Precisão intermédia	
		s / ng mL^{-1}	**CV / %**			s / ng mL^{-1}	**CV / %**
LQ	84,90	7,07	**8,3**	1,61	8	7,25	**8,54**
5LQ	441,45	12,34	**2,8**	8,29	8	14,86	**3,37**
Aiva	1912,06	525,96	**27,5**	0	8	525,96	**27,51**
GA	3830,74	144,94	**3,8**	93,66	8	172,56	**4,50**
IRMS	3291,42	54,54	**1,7**	116,84	8	128,94	**3,92**

Observando a Tabela 51, constata-se que o controlo Aiva tem um coeficiente de variação mais elevado que os restantes controlos.

Na Tabela 52, encontram-se os dados obtidos para a exatidão dos vários controlos da Androsterona, estes foram calculados tendo em conta as expressões das equações (18), (19) e (20).

$$R_i = \frac{C_{obs(i)}}{C_{adicionado}} \quad (18)$$

$$t_{exp} = \frac{\left|1 - \overline{R}\right|}{u_{\%\overline{R}}} \quad (19)$$

$$u_{\overline{R}} = \frac{s_{obs}}{\sqrt{p}} \quad (20)$$

Para a equação (18) o R_i corresponde à recuperação média de n replicados em condições de repetibilidade, o $C_{obs(i)}$ à média das concentrações obtidas para os n replicados do controlo em condições de repetibilidade, o $C_{adicionado}$ à concentração teórica do controlo.

Na equação (19) o $\overline{R}$ corresponde à média total das recuperações e o $u_{\overline{R}}$ à incerteza associada à média da percentagem de recuperação e o t_{exp} corresponde ao valor de t de Student experimental.

Na equação (20) o s_{obs} é o desvio padrão de p valores de R_i em condições de precisão intermédia, e o p corresponde ao número de dias das medições.

Tabela 52 – Resultado obtidos na avaliação da exatidão para a Androsterona

	LQ	5LQ	Aiva	GA	IRMS
Média da % recuperação	84,9%	88,3%	95,2%	95,8%	98,8%
s	0,047	0,023	0,117	0,031	0,038
CV%	5,5%	2,6%	12,3%	3,3%	3,8%
n	8	8	8	8	8
Incerteza de % R	0,0166	0,0082	0,0413	0,0111	0,0134
T_{exp}	9,11	14,28	1,17	3,81	0,93
$T_{crítico}$	2,36	2,36	2,36	2,36	2,36
Incerteza padrão relativa	9,10%	6,70%	4,34%	2,49%	1,36%

Nos casos em que o T_{exp}, valor do teste t de Student obtido para o valor experimental, é superior ao $T_{crítico}$, valor crítico para 95% e com os graus de liberdade específicos para a análise do teste t de Student o valor da incerteza padrão relativa é calculado com base na equação (21), caso contrário a incerteza padrão relativa é calculada com base na equação (22).

Para a androsterona os valores de exatidão obtidos para os vários controlos são inferiores a 10%.

$$u_{\bar{R}} = \frac{\sqrt{\left(u_{\%\bar{R}}\right)^2 + \left(\frac{1-\bar{R}}{k}\right)^2}}{\bar{R}} \quad (21)$$

$$u_{\bar{R}} = \frac{u_{\%\bar{R}}}{\bar{R}} \quad (22)$$

Na equação (21), o k corresponde ao fator de cobertura de 95%, que neste caso corresponde a 2.

Na Tabela 53 e na Tabela 54, estão expostos os dados obtidos para a gama de concentrações baixas e elevadas da etiocolanolona que vão ser utilizados para o cálculo da repetibilidade, da precisão intermédia e da exatidão. Os valores estão dispostos da mesma maneira que foram dispostos para a androsterona, e todos os cálculos são feitos do mesmo modo.

Tabela 53 – Resultados obtidos para o estudo da repetibilidade, da precisão intermédia e da exatidão da gama baixa da Etiocolanolona

	1ª Curva	2ª Curva	3ª Curva	4ª Curva	5ª Curva	6ª Curva	7ª Curva	8ª Curva
Data	06/03/15	10/03/15	13/03/15	18/03/15	15/04/15	16/04/15	17/04/15	22/04/15
Observação	042	042	042	042	009	009	009	009
Declive / mL ng^{-1}	**0,0074**	**0,0072**	**0,0073**	**0,0076**	**0,0071**	**0,0070**	**0,0071**	**0,0071**
r^2	**0,997**	**0,999**	**0,997**	**0,998**	**0,997**	**1,000**	**0,998**	**0,998**
LQ_1 / ng mL^{-1}	77,60	106,10	89,10	123,20	97,83	107,77	89,34	127,72
LQ_2 / ng mL^{-1}	77,70	91,80	92,70	91,20	100,36	91,08	94,74	93,80
LQ_3 / ng mL^{-1}	80,00	85,30	96,80	97,00	100,93	85,38	98,11	97,96
Média / ng mL^{-1}	**78,4**	**94,4**	**92,9**	**103,8**	**99,7**	**94,7**	**94,1**	**106,5**
s / ng mL^{-1}	**1,4**	**10,6**	**3,9**	**17,0**	**1,7**	**11,6**	**4,4**	**18,5**
CV / %	**1,7%**	**11,3%**	**4,1%**	**16,4%**	**1,7%**	**12,3%**	**4,7%**	**17,4%**
5LQ_1 / ng mL^{-1}	461,62	493,28	485,45	492,38	478,31	500,86	488,42	473,89
5LQ_2 / ng mL^{-1}	478,89	488,21	486,81	530,42	490,26	489,25	497,21	493,69
5LQ_3 / ng mL^{-1}	478,35	496,90	505,68	473,41	485,65	504,67	512,52	457,52
Média / ng mL^{-1}	**473,0**	**492,8**	**492,6**	**498,7**	**484,7**	**498,3**	**499,4**	**475,0**
s / ng mL^{-1}	**9,8**	**4,4**	**11,3**	**29,0**	**6,0**	**8,0**	**12,2**	**18,1**
CV / %	**2,1%**	**0,9%**	**2,3%**	**5,8%**	**1,2%**	**1,6%**	**2,4%**	**3,8%**

Tabela 54 – Resultados obtidos para o estudo da repetibilidade, da precisão intermédia e da exatidão da gama alta da Etiocolanolona

	1ª Curva	2ª Curva	3ª Curva	4ª Curva	5ª Curva	6ª Curva	7ª Curva	8ª Curva
Data	06/03/15	10/03/15	13/03/15	18/03/15	15/04/15	16/04/15	17/04/15	22/04/15
Observação	042	042	042	042	009	009	009	009
Declive / mL ng^{-1}	**0,0075**	**0,0077**	**0,0079**	**0,0083**	**0,0068**	**0,0069**	**0,0070**	**0,0074**
r^2	**0,994**	**0,998**	**0,995**	**0,988**	**0,993**	**0,999**	**0,998**	**0,979**
Aiva_1 **/ ng mL^{-1}**	1980,1	2112,1	1785,4	1762,1	1918,52	2083,72	1792,54	1738,10
Aiva_2 **/ ng mL^{-1}**	2166,2	1937,3	1810,3	1576,8	2136,16	1981,48	1838,32	1527,19
Aiva_3 **/ ng mL^{-1}**	2359,3	2020,2	1779,9	3576,8	-	-	1847,78	-
Média / ng mL^{-1}	**2168,5**	**2023,2**	**1791,9**	**2305,2**	**2027,3**	**2032,6**	**1826,2**	**1632,6**
s / ng mL^{-1}	**189,6**	**87,4**	**16,2**	**1105,1**	**153,9**	**72,3**	**29,5**	**149,1**
CV / %	**8,7%**	**4,3%**	**0,9%**	**47,9%**	**7,6%**	**3,6%**	**1,6%**	**9,1%**
G.A._1 **/ ng mL^{-1}**	4031,3	3899,6	3721,1	3377,5	3888,49	3870,35	3825,93	3430,87
G.A._2 **/ ng mL^{-1}**	3910,4	3548,1	3743,1	3330,9	3853,51	3471,24	3888,44	3363,28
G.A._3 **/ ng mL^{-1}**	4003,8	3655,7	3691,9	3566,7	3963,49	3597,38	3933,22	3618,50
Média / ng mL^{-1}	**3981,8**	**3701,1**	**3718,7**	**3425,0**	**3901,8**	**3646,3**	**3882,5**	**3470,9**
s / ng mL^{-1}	**63,4**	**180,1**	**25,7**	**124,8**	**56,2**	**204,0**	**53,9**	**132,2**
CV / %	**1,6%**	**4,9%**	**0,7%**	**3,6%**	**1,4%**	**5,6%**	**1,4%**	**3,8%**
IRMS_1 **/ ng mL^{-1}**	3106,2	3176,5	2633,0	2744,3	3081,97	3076,24	2843,62	2739,42
IRMS_2 **/ ng mL^{-1}**	3113,6	3046,8	2770,6	2721,9	3061,97	3031,28	2912,09	2755,07
IRMS_3 **/ ng mL^{-1}**	3165,2	4094,8	2611,4	-	-	4104,84	-	-
Média / ng mL^{-1}	**3128,3**	**3439,4**	**2671,7**	**2733,1**	**3072,0**	**3404,1**	**2877,9**	**2747,2**
s / ng mL^{-1}	**32,1**	**571,3**	**86,4**	**15,8**	**14,1**	**607,3**	**48,4**	**11,1**
CV / %	**1,0%**	**16,6%**	**3,2%**	**0,6%**	**0,5%**	**17,8%**	**1,7%**	**0,4%**

A Tabela 55, apresenta os valores de repetibilidade e de precisão intermédia obtidos para a etiocolanolona, enquanto a Tabela 56 apresenta os valores da exatidão.

Tabela 55 – Valores obtidos no estudo da repetibilidade e da precisão intermédia para a Etiocolanolona

Nível	Média / ng mL^{-1}	Repetibilidade		*Between-run*	Nº de Pontos	Precisão intermédia	
		s / ng mL^{-1}	**CV / %**			s / ng mL^{-1}	**CV / %**
LQ	95,56	10,73	**11,2**	5,87	8	12,23	**12,79**
5LQ	489,32	14,42	**2,9**	6,55	8	15,84	**3,24**
Aiva	1975,95	445,77	**22,6**	0	8	445,77	**22,56**
GA	3716,03	121,37	**3,3**	188,37	8	224,09	**6,03**
IRMS	3009,21	342,81	**11,4**	206,84	8	400,38	**13,31**

Tal como aconteceu com a androsterona, o coeficiente de variação para a repetibilidade e a precisão intermédia do Aiva são os mais elevados dos 5 controlos.

Tabela 56 – Resultado obtidos na avaliação da exatidão para a Etiocolanolona

	LQ	5LQ	Aiva	GA	IRMS
Média da % recuperação	95,6%	97,9%	98,8%	92,9%	90,3%
s	0,085	0,021	0,108	0,050	0,090
CV%	8,9%	2,2%	11,0%	5,4%	10,0%
n	8	8	8	8	8
Incerteza de % R	0,0302	0,0075	0,0383	0,0178	0,0320
T_{exp}	1,47	2,85	0,31	4,00	3,04
$T_{crítico}$	2,36	2,36	2,36	2,36	2,36
Incerteza padrão relativa	3,16%	1,33%	3,87%	4,27%	6,44%

Para a etiocolanolona, os valores de incerteza padrão relativa são todos inferiores a 7 %.

Na Tabela 57 e na Tabela 58, encontram-se, tal como para as outras duas substâncias anteriormente apresentadas, os valores recolhidos para o estudo da precisão e da exatidão do 5αAdiol.

Tabela 57 – Resultados obtidos para o estudo da repetibilidade, da precisão intermédia e da exatidão da gama baixa do 5αAndrostandiol

	1ª Curva	2ª Curva	3ª Curva	4ª Curva	5ª Curva	6ª Curva	7ª Curva	8ª Curva
Data	06/03/15	10/03/15	13/03/15	18/03/15	15/04/15	16/04/15	17/04/15	22/04/15
Observação	042	042	042	042	009	009	009	009
Declive / mL ng^{-1}	**0,024**	**0,025**	**0,021**	**0,025**	**0,028**	**0,027**	**0,023**	**0,030**
r^2	**0,997**	**0,991**	**0,994**	**0,979**	**0,997**	**0,997**	**0,993**	**0,979**
LQ_1 / ng mL^{-1}	-	1,99	2,65	1,67	1,9	2,4	2,8	2,7
LQ_2 / ng mL^{-1}	2,56	-	2,53	1,74	2,3	2,5	2,9	-
LQ_3 / ng mL^{-1}	2,24	1,91	2,58	1,80	2,2	2,4	1,9	2,4
Média / ng mL^{-1}	**2,4**	**1,9**	**2,6**	**1,7**	**2,1**	**2,4**	**2,5**	**2,6**
s / ng mL^{-1}	**0,2**	**0,1**	**0,1**	**0,1**	**0,2**	**0,0**	**0,6**	**0,2**
CV / %	**9,4%**	**2,7%**	**2,4%**	**3,6%**	**8,8%**	**1,7%**	**22,3%**	**7,0%**
5LQ_1 / ng mL^{-1}	10,9	8,7	12,4	10,5	9,49	10,29	10,33	10,38
5LQ_2 / ng mL^{-1}	10,0	12,5	11,5	9,9	9,50	9,21	11,72	9,89
5LQ_3 / ng mL^{-1}	-	11,3	10,8	10,7	-	12,23	12,43	11,03
Média / ng mL^{-1}	**10,4**	**10,9**	**11,6**	**10,3**	**9,5**	**10,6**	**11,5**	**10,4**
s / ng mL^{-1}	**0,7**	**1,9**	**0,8**	**0,4**	**0,005**	**1,5**	**1,1**	**0,6**
CV / %	**6,4%**	**17,9%**	**6,8%**	**4,1%**	**0,1%**	**14,4%**	**9,3%**	**5,5%**

Tabela 58 – Resultados obtidos para o estudo da repetibilidade, da precisão intermédia e da exatidão da gama alta do 5αAndrostandiol

	1ª Curva	2ª Curva	3ª Curva	4ª Curva	5ª Curva	6ª Curva	7ª Curva	8ª Curva
Data	06/03/15	10/03/15	13/03/15	18/03/15	15/04/15	16/04/15	17/04/15	22/04/15
Observação	042	042	042	042	009	009	009	009
Declive / mL ng^{-1}	**0,021**	**0,023**	**0,019**	**0,021**	**0,024**	**0,026**	**0,024**	**0,027**
r^2	**0,987**	**0,992**	**0,992**	**0,976**	**0,998**	**0,991**	**0,990**	**0,974**
Aiva_1 **/ ng mL^{-1}**	16,8	19,7	21,3	19,7	20,56	22,66	20,10	21,02
Aiva_2 **/ ng mL^{-1}**	18,2	21,1	23,9	16,4	22,32	20,98	20,97	18,38
Aiva_3 **/ ng mL^{-1}**	19,6	18,8	24,0	-	22,69	20,58	20,35	-
Média / ng mL^{-1}	**18,2**	**19,9**	**23,1**	**18,0**	**21,9**	**21,4**	**20,5**	**19,7**
s / ng mL^{-1}	**1,4**	**1,1**	**1,5**	**2,3**	**1,1**	**1,1**	**0,4**	**1,9**
CV / %	**7,8%**	**5,7%**	**6,7%**	**13,0%**	**5,2%**	**5,2%**	**2,2%**	**9,5%**
G.A._1 **/ ng mL^{-1}**	291,3	238,6	272,3	237,1	243,79	260,64	271,07	229,10
G.A._2 **/ ng mL^{-1}**	278,3	-	326,6	-	258,45	248,79	272,83	-
G.A._3 **/ ng mL^{-1}**	284,9	222,2	314,0	251,7	275,87	231,75	302,48	260,22
Média / ng mL^{-1}	**284,8**	**230,4**	**304,3**	**244,4**	**259,4**	**247,1**	**282,1**	**244,7**
s / ng mL^{-1}	**6,5**	**11,6**	**28,4**	**10,3**	**16,1**	**14,5**	**17,6**	**22,0**
CV / %	**2,3%**	**5,0%**	**9,3%**	**4,2%**	**6,2%**	**5,9%**	**6,3%**	**9,0%**

Estes dados foram trabalhados do mesmo modo que os anteriores e obteve-se os valores para a repetibilidade e precisão intermédia, exibidos na Tabela 59, e os valores da exatidão apresentados na Tabela 60.

Tabela 59 – Valores obtidos no estudo da repetibilidade e da precisão intermédia para o 5αAndrostandiol

Nível	Média / ng mL^{-1}	Repetibilidade		*Between-run*	Nº de Pontos	Precisão intermédia	
		s / ng mL^{-1}	**CV / %**			s / ng mL^{-1}	**CV / %**
LQ	2,29	0,25	**10,9**	0,26	8	0,36	**15,90**
5LQ	10,66	1,11	**10,4**	0	8	1,11	**10,40**
Aiva	20,33	1,36	**6,7**	1,48	8	2,01	**9,87**
GA	262,15	17,52	**6,7**	21,46	8	27,70	**10,57**

Ao contrário das substâncias anteriores, o coeficiente de variação mais elevado, tanto na repetibilidade, como na precisão intermédia é o LQ.

Tabela 60 – Resultado obtidos na avaliação da exatidão para o 5αAndrostandiol

	LQ	5LQ	Aiva	GA
Média da % recuperação	114,5%	106,6%	101,6%	87,4%
s / %	0,159	0,068	0,088	0,085
CV / %	13,8%	6,4%	8,6%	9,7%
n	8	8	8	8
Incerteza de % R	0,0561	0,0239	0,0310	0,0301
T_{exp}	2,59	2,74	0,53	4,20
$T_{crítico}$	2,36	2,36	2,36	2,36
Incerteza padrão relativa	8,01%	3,81%	3,05%	8,00%

No caso do 5αAdiol, os valores de incerteza padrão relativa são todos inferiores a 9 %.

Na Tabela 61 e na Tabela 62, encontram-se os dados do 5βAdiol utilizados para os cálculos da repetibilidade, precisão intermédia e exatidão para as duas gamas de concentração.

Tabela 61 – Resultados obtidos para o estudo da repetibilidade, da precisão intermédia e da exatidão da gama baixa do 5βAndrostandiol

	1ª Curva	2ª Curva	3ª Curva	4ª Curva	5ª Curva	6ª Curva	7ª Curva	8ª Curva
Data	06/03/15	10/03/15	13/03/15	18/03/15	15/04/15	16/04/15	17/04/15	22/04/15
Observação	042	042	042	042	009	009	009	009
Declive / mL ng^{-1}	**0,010**	**0,011**	**0,011**	**0,014**	**0,011**	**0,011**	**0,011**	**0,015**
r^2	**0,992**	**0,995**	**0,993**	**0,978**	**0,997**	**0,989**	**0,994**	**0,990**
LQ_1 / ng mL^{-1}	4,48	2,36	3,20	-	-	-	3,05	-
LQ_2 / ng mL^{-1}	4,21	6,72	3,63	4,49	3,05	3,72	-	5,39
LQ_3 / ng mL^{-1}	-	4,75	3,74	4,33	2,61	3,35	3,06	4,90
Média / ng mL^{-1}	**4,3**	**4,6**	**3,5**	**4,4**	**2,8**	**3,5**	**3,1**	**5,1**
s / ng mL^{-1}	**0,2**	**2,2**	**0,3**	**0,1**	**0,3**	**0,3**	**0,0**	**0,4**
CV / %	**4,4%**	**47,3%**	**8,2%**	**2,6%**	**11,0%**	**7,4%**	**0,2%**	**6,8%**
5LQ_1 / ng mL^{-1}	18,0	15,20	16,53	17,303	17,2	16,70	17,32	17,579
5LQ_2 / ng mL^{-1}	18,7	18,92	15,92	17,3	17,8	17,75	17,64	17,1
5LQ_3 / ng mL^{-1}	18,2441	18,83	16,26	16,6	16,666	17,69	18,20	-
Média / ng mL^{-1}	**18,3**	**17,7**	**16,2**	**17,1**	**17,2**	**17,4**	**17,7**	**17,3**
s / ng mL^{-1}	**0,4**	**2,1**	**0,3**	**0,4**	**0,6**	**0,6**	**0,4**	**0,3**
CV / %	**2,0%**	**12,0%**	**1,9%**	**2,3%**	**3,3%**	**3,4%**	**2,5%**	**1,9%**

Tabela 62 – Resultados obtidos para o estudo da repetibilidade da precisão intermédia e da exatidão da gama alta do 5βAndrostandiol

	1ª Curva	2ª Curva	3ª Curva	4ª Curva	5ª Curva	6ª Curva	7ª Curva	8ª Curva
Data	06/03/15	10/03/15	13/03/15	18/03/15	15/04/15	16/04/15	17/04/15	22/04/15
Observação	042	042	042	042	009	009	009	009
Declive / mL ng^{-1}	**0,010**	**0,011**	**0,012**	**0,012**	**0,011**	**0,012**	**0,012**	**0,013**
r^2	**0,998**	**0,998**	**0,998**	**0,996**	**0,996**	**0,995**	**0,999**	**0,977**
Aiva_1 **/ ng mL^{-1}**	70,5	78,2	67,1	80,5	66,85	76,62	70,17	55,59
Aiva_2 **/ ng mL^{-1}**	78,2	70,3	95,8	50,8	76,00	67,78	70,20	47,38
Aiva_3 **/ ng mL^{-1}**	83,7	73,6	97,3	109,6	77,98	71,68	-	105,48
Média / ng mL^{-1}	**77,5**	**74,0**	**86,7**	**80,3**	**73,6**	**72,0**	**70,2**	**69,5**
s / ng mL^{-1}	**6,6**	**4,0**	**17,0**	**29,4**	**5,9**	**4,4**	**0,02**	**31,4**
CV / %	**8,5%**	**5,3%**	**19,6%**	**36,6%**	**8,1%**	**6,1%**	**0,0%**	**45,3%**
G.A._1 **/ ng mL^{-1}**	809,5	797,5	767,2	690,9	770,64	747,01	717,32	709,26
G.A._2 **/ ng mL^{-1}**	812,4	728,1	730,1	665,6	779,59	667,16	788,19	678,44
G.A._3 **/ ng mL^{-1}**	845,6	729,5	725,3	725,8	721,38	717,49	721,82	730,46
Média / ng mL^{-1}	**822,5**	**751,7**	**740,9**	**694,1**	**757,2**	**710,6**	**742,4**	**706,1**
s / ng mL^{-1}	**20,0**	**39,7**	**22,9**	**30,2**	**31,3**	**40,4**	**39,7**	**26,2**
CV / %	**2,4%**	**5,3%**	**3,1%**	**4,4%**	**4,1%**	**5,7%**	**5,3%**	**3,7%**

Na Tabela 63 e na Tabela 64, encontram-se os valores obtidos para a precisão e a exatidão, para os vários controlos.

Tabela 63 – Valores obtidos no estudo da repetibilidade e da precisão intermédia para o 5βAndrostandiol

Nível	Média / ng mL^{-1}	Repetibilidade		*Between-run*	Nº de Pontos	Precisão intermédia	
		s / ng mL^{-1}	**CV / %**			s / ng mL^{-1}	**CV / %**
LQ	3,93	1,00	**25,5**	0,37	8	1,07	**27,16**
5LQ	17,37	0,88	**5,1**	0,32	8	0,94	**5,39**
Aiva	75,47	17,35	**23,0**	0	8	17,35	**22,98**
GA	740,68	32,19	**4,3**	35,76	8	48,11	**6,50**

Tal como para o 5βAdiol, os coeficientes de variação obtidos tanto para a repetibilidade como para a precisão intermédia do controlo LQ são os mais elevados.

Tabela 64 – Resultado obtidos na avaliação da exatidão para o 5βAndrostandiol

	LQ	5LQ	Aiva	GA
Média da % recuperação	98,3%	86,9%	94,3%	92,6%
s	0,203	0,030	0,072	0,050
CV%	20,7%	3,5%	7,7%	5,4%
n	8	8	8	8
Incerteza de % R	0,0719	0,0106	0,0256	0,0178
T_{exp}	0,24	12,40	2,21	4,16
$T_{crítico}$	2,36	2,36	2,36	2,36
Incerteza padrão relativa	7,32%	7,67%	2,71%	4,44%

Para o 5βAdiol, os valores de incerteza padrão relativa são todos inferiores a 8 %.

A Tabela 65 e a Tabela 66, referem os dados obtidos para a avaliação da precisão e da exatidão para a gama baixa e alta de concentração da epitestosterona.

Tabela 65 – Resultados obtidos para o estudo da repetibilidade da precisão intermédia e da exatidão da gama baixa da Epitestosterona

	1ª Curva	2ª Curva	3ª Curva	4ª Curva	5ª Curva	6ª Curva	7ª Curva	8ª Curva
Data	06/03/15	10/03/15	13/03/15	18/03/15	15/04/15	16/04/15	17/04/15	22/04/15
Observação	042	042	042	042	009	009	009	009
Declive / mL ng^{-1}	**0,023**	**0,024**	**0,023**	**0,025**	**0,023**	**0,023**	**0,023**	**0,024**
r^2	**0,998**	**0,996**	**0,997**	**0,998**	**0,999**	**0,997**	**0,998**	**0,999**
LQ_1 / ng mL^{-1}	2,18	-	2,03	-	2,2	2,4	1,8	2,8
LQ_2 / ng mL^{-1}	2,26	2,34	2,17	2,01	2,3	2,0	1,9	1,9
LQ_3 / ng mL^{-1}	2,36	2,13	2,22	2,17	2,3	1,9	1,6	2,1
Média / ng mL^{-1}	**2,3**	**2,2**	**2,1**	**2,1**	**2,3**	**2,1**	**1,8**	**2,3**
s / ng mL^{-1}	**0,1**	**0,2**	**0,1**	**0,1**	**0,1**	**0,3**	**0,1**	**0,5**
CV / %	**4,1%**	**6,8%**	**4,7%**	**5,2%**	**2,9%**	**12,2%**	**8,0%**	**21,1%**
5LQ_1 / ng mL^{-1}	11,1	11,5	11,1	10,6	11,40	11,10	11,40	10,20
5LQ_2 / ng mL^{-1}	11,4	11,1	11,4	11,0	11,60	11,10	11,40	11,00
5LQ_3 / ng mL^{-1}	11,3	11,6	11,7	10,4	10,50	11,50	-	10,40
Média / ng mL^{-1}	**11,3**	**11,4**	**11,4**	**10,7**	**11,2**	**11,2**	**11,4**	**10,5**
s / ng mL^{-1}	**0,2**	**0,3**	**0,3**	**0,3**	**0,6**	**0,2**	**0,0**	**0,4**
CV / %	**1,4%**	**2,5%**	**2,9%**	**2,8%**	**5,2%**	**2,1%**	**0,0%**	**4,0%**

Tabela 66 – Resultados obtidos para o estudo da repetibilidade da precisão intermédia e da exatidão da gama alta da Epitestosterona

	1ª Curva	2ª Curva	3ª Curva	4ª Curva	5ª Curva	6ª Curva	7ª Curva	8ª Curva
Data	06/03/15	10/03/15	13/03/15	18/03/15	15/04/15	16/04/15	17/04/15	22/04/15
Observação	042	042	042	042	009	009	009	009
Declive / mL ng^{-1}	**0,020**	**0,018**	**0,018**	**0,018**	**0,019**	**0,018**	**0,018**	**0,018**
r^2	**0,994**	**0,980**	**0,970**	**0,966**	**0,995**	**0,981**	**0,974**	**0,961**
Aiva_1 **/ ng mL^{-1}**	41,5	46,3	37,1	39,0	42,51	47,97	39,08	34,52
Aiva_2 **/ ng mL^{-1}**	46,8	40,7	38,0	31,0	47,62	41,13	40,51	27,86
Aiva_3 **/ ng mL^{-1}**	-	42,4	-	-	-	-	40,02	-
Média / ng mL^{-1}	**44,2**	**43,1**	**37,5**	**35,0**	**45,1**	**44,6**	**39,9**	**31,2**
s / ng mL^{-1}	**3,8**	**2,9**	**0,6**	**5,7**	**3,6**	**4,8**	**0,7**	**4,7**
CV / %	**8,5%**	**6,7%**	**1,6%**	**16,1%**	**8,0%**	**10,8%**	**1,8%**	**15,1%**
G.A._1 **/ ng mL^{-1}**	232,2	-	241,8	208,7	200,23	251,82	249,90	226,65
G.A._2 **/ ng mL^{-1}**	220,6	224,5	245,4	201,5	196,51	224,71	249,99	218,70
G.A._3 **/ ng mL^{-1}**	234,5	232,0	238,5	218,5	203,95	233,41	243,83	241,81
Média / ng mL^{-1}	**229,1**	**228,3**	**241,9**	**209,6**	**200,2**	**236,6**	**247,9**	**229,1**
s / ng mL^{-1}	**7,4**	**5,3**	**3,4**	**8,6**	**3,7**	**13,8**	**3,5**	**11,7**
CV / %	**3,3%**	**2,3%**	**1,4%**	**4,1%**	**1,9%**	**5,8%**	**1,4%**	**5,1%**

Na Tabela 67 e na Tabela 68, constam os resultados obtidos para os cálculos da precisão e exatidão, respetivamente, para a epitestosterona.

Tabela 67 – Valores obtidos no estudo da repetibilidade e da precisão intermédia para a Epitestosterona

Nível	Média / ng mL^{-1}	Repetibilidade		*Between-run*	Nº de Pontos	Precisão intermédia	
		s / ng mL^{-1}	**CV / %**			s / ng mL^{-1}	**CV / %**
LQ	2,14	0,22	**10,5**	0,09	8	0,24	**11,35**
5LQ	11,13	0,34	**3,1**	0,27	8	0,44	**3,93**
Aiva	40,07	3,51	**8,7**	3,69	8	5,09	**12,71**
GA	227,83	8,25	**3,6**	15,20	8	17,30	**7,59**

Ao contrário dos restantes, os coeficientes de variação de repetibilidade e da precisão intermédia mais elevados não pertencem ao mesmo controlo. Neste caso, o controlo com o CV mais elevado para a repetibilidade é o LQ, enquanto que o controlo com CV mais elevado para a precisão interna é o Aiva.

Tabela 68 – Resultado obtidos na avaliação da exatidão para a Epitestosterona

	LQ	5LQ	Aiva	GA
Média da % recuperação	107,1%	111,3%	100,2%	113,9%
s	0,081	0,034	0,127	0,080
CV%	7,5%	3,1%	12,7%	7,0%
n	8	8	8	8
Incerteza de % R	0,0285	0,0121	0,0450	0,0282
T_{exp}	2,50	9,34	0,04	4,94
$T_{crítico}$	2,36	2,36	2,36	2,36
Incerteza padrão relativa	4,26%	5,20%	4,50%	6,59%

Para a epitestosterona, os valores de incerteza padrão relativa são todos inferiores a 7 %.

Na Tabela 69 e na Tabela 70, encontram-se os dados utilizados para os cálculos de precisão e exatidão para os vários controlos da testosterona.

Tabela 69 – Resultados obtidos para o estudo da repetibilidade da precisão intermédia e da exatidão da gama baixa da Testosterona

	1ª Curva	2ª Curva	3ª Curva	4ª Curva	5ª Curva	6ª Curva	7ª Curva	8ª Curva
Data	06/03/15	10/03/15	13/03/15	18/03/15	15/04/15	16/04/15	17/04/15	22/04/15
Observação	042	042	042	042	009	009	009	009
Declive / mL ng^{-1}	**0,028**	**0,029**	**0,028**	**0,030**	**0,028**	**0,028**	**0,028**	**0,028**
r^2	**0,997**	**0,999**	**0,998**	**0,999**	**0,997**	**0,999**	**0,999**	**0,998**
LQ_1 / ng mL^{-1}	1,77	1,95	1,49	2,06	1,9	1,8	-	2,0
LQ_2 / ng mL^{-1}	1,76	1,56	1,64	1,53	1,9	1,6	1,4	1,4
LQ_3 / ng mL^{-1}	1,72	1,54	1,56	1,60	1,9	1,5	1,4	1,5
Média / ng mL^{-1}	**1,8**	**1,7**	**1,6**	**1,7**	**1,9**	**1,6**	**1,4**	**1,6**
s / ng mL^{-1}	**0,03**	**0,2**	**0,1**	**0,3**	**0,0**	**0,2**	**0,0**	**0,3**
CV / %	**1,7%**	**13,6%**	**5,0%**	**16,6%**	**1,1%**	**11,2%**	**0,4%**	**21,5%**
5LQ_1 / ng mL^{-1}	8,6	8,4	8,5	8,8	8,5	8,6	8,4	8,7
5LQ_2 / ng mL^{-1}	8,7	8,5	8,4	8,8	8,7	8,4	8,6	8,5
5LQ_3 / ng mL^{-1}	8,5	8,7	8,9	7,9	8,7	8,6	8,9	-
Média / ng mL^{-1}	**8,6**	**8,5**	**8,6**	**8,5**	**8,6**	**8,5**	**8,6**	**8,6**
s / ng mL^{-1}	**0,1**	**0,1**	**0,3**	**0,5**	**0,2**	**0,1**	**0,2**	**0,2**
CV / %	**1,1%**	**1,6%**	**2,9%**	**6,0%**	**1,8%**	**1,3%**	**2,6%**	**1,8%**

Tabela 70 – Resultados obtidos para o estudo da repetibilidade da precisão intermédia e da exatidão da gama alta da Testosterona

	1ª Curva	2ª Curva	3ª Curva	4ª Curva	5ª Curva	6ª Curva	7ª Curva	8ª Curva
Data	06/03/15	10/03/15	13/03/15	18/03/15	15/04/15	16/04/15	17/04/15	22/04/15
Observação	042	042	042	042	009	009	009	009
Declive / mL ng^{-1}	**0,022**	**0,023**	**0,023**	**0,024**	**0,022**	**0,023**	**0,022**	**0,022**
r^2	**0,995**	**0,995**	**0,991**	**0,991**	**0,995**	**0,997**	**0,993**	**0,997**
Aiva_1 **/ ng mL^{-1}**	32,3	36,7	26,8	31,6	33,10	37,84	28,62	32,67
Aiva_2 **/ ng mL^{-1}**	37,3	32,4	28,7	26,3	37,72	33,99	29,38	28,21
Aiva_3 **/ ng mL^{-1}**	40,9	33,6	-	70,5	41,53	35,16	29,42	72,05
Média / ng mL^{-1}	**36,9**	**34,2**	**27,7**	**42,8**	**37,4**	**35,7**	**29,1**	**44,3**
s / ng mL^{-1}	**4,3**	**2,2**	**1,3**	**24,2**	**4,2**	**2,0**	**0,5**	**24,1**
CV / %	**11,7%**	**6,5%**	**4,6%**	**56,5%**	**11,3%**	**5,5%**	**1,6%**	**54,5%**
G.A._1 **/ ng mL^{-1}**	186,4	182,1	176,7	170,9	183,92	180,53	177,98	172,12
G.A._2 **/ ng mL^{-1}**	179,9	165,4	180,0	165,3	180,96	162,85	180,56	168,54
G.A._3 **/ ng mL^{-1}**	188,7	173,0	175,4	179,0	189,05	169,34	176,38	181,09
Média / ng mL^{-1}	**185,0**	**173,5**	**177,4**	**171,7**	**184,6**	**170,9**	**178,3**	**173,9**
s / ng mL^{-1}	**4,5**	**8,4**	**2,4**	**6,9**	**4,1**	**8,9**	**2,1**	**6,5**
CV / %	**2,5%**	**4,8%**	**1,3%**	**4,0%**	**2,2%**	**5,2%**	**1,2%**	**3,7%**

Na Tabela 71 e na Tabela 72, encontram-se os resultados obtidos para a precisão e a exatidão dos vários controlos da testosterona.

Tabela 71 – Valores obtidos no estudo da repetibilidade e da precisão intermédia para a Testosterona

Nível	Média / ng mL^{-1}	Repetibilidade		*Between-run*	Nº de Pontos	Precisão intermédia	
		s / ng mL^{-1}	**CV / %**			s / ng mL^{-1}	**CV / %**
LQ	1,66	0,20	**12,0**	0,07	8	0,21	**12,73**
5LQ	8,58	0,24	**2,9**	0	8	0,24	**2,85**
Aiva	36,02	12,72	**35,3**	0,00	8	12,72	**35,31**
GA	176,92	5,99	**3,4**	4,26	8	7,35	**4,16**

Para a testosterona o controlo com maior CV, tanto na repetibilidade como na precisão intermédia é o Aiva, devido à oscilação dos valores de concentração entre os triplicados em alguns dos dias.

Tabela 72 – Resultado obtidos na avaliação da exatidão para a Testosterona

	LQ	5LQ	Aiva	GA
Média da % recuperação	83,2%	85,8%	90,1%	88,5%
s	0,074	0,006	0,145	0,027
CV%	8,9%	0,7%	16,1%	3,1%
n	8	8	8	8
Incerteza de % R	0,0261	0,0021	0,0514	0,0097
T_{exp}	6,45	67,93	1,94	11,89
$T_{crítico}$	2,36	2,36	2,36	2,36
Incerteza padrão relativa	10,60%	8,27%	5,71%	6,61%

Os valores de incerteza padrão relativa obtidos para os vários controlos da testosterona são todos inferiores a 11 %.

Na Tabela 73, encontram-se os dados utilizados para o cálculo da incerteza combinada e para a incerteza combinada relativa, tal como os resultados obtidos para todos os controlos e substâncias. Os valores foram obtidos tendo em conta as equações (20), (23), (24) e (25). Onde o u_p corresponde à incerteza do padrão interno, m à média de todas as concentrações utilizadas para o cálculo da precisão intermédia, o u_c à incerteza combinada enquanto o $u_{c\%}$ corresponde à incerteza combinada relativa.

$$u_p = \frac{s_{pi}}{m} \tag{23}$$

$$u_c = \sqrt{u_p^2 + u_{\bar{R}}^2} \tag{24}$$

$$u_{c\%} = u_c \times 100 \tag{25}$$

Tabela 73 – Determinação da incerteza combinada e incerteza combinada relativa para os vários controlos

Androsterona					
Fonte de incerteza	**Incerteza padrão relativa do LQ**	**Incerteza padrão relativa do 5LQ**	**Incerteza padrão relativa do Aiva**	**Incerteza padrão relativa do GA**	**Incerteza padrão relativa do IRMS**
Precisão intermédia (u_P)	0.085	0.0340	0.2751	0.0450	0.0392
Incerteza de exatidão ($u_{\bar{R}}$)	0.091	0.0670	0.0426	0.0249	0.0136
Incerteza combinada	0.125	0.08	0.28	0.05	0.04
Incerteza combinada relativa	**12.45% Cumpre (< 30%)**	**7.51% Cumpre (< 15%)**	**27.84%**	**5.15%**	**4.15%**

Etiocolanolona					
Fonte de incerteza	**Incerteza padrão relativa do LQ**	**Incerteza padrão relativa do 5LQ**	**Incerteza padrão relativa do Aiva**	**Incerteza padrão relativa do GA**	**Incerteza padrão relativa do IRMS**
Precisão intermédia (u_P)	0.128	0.0320	0.2256	0.0603	0.1331
Incerteza de exatidão ($u_{\bar{R}}$)	0.032	0.0130	0.0387	0.0427	0.0644
Incerteza combinada	0.132	0.03	0.23	0.07	0.15
Incerteza combinada relativa (%)	**13.19% Cumpre (< 30%)**	**3.45% Cumpre (< 15%)**	**22.89%**	**7.39%**	**14.78%**
5α-Androstanediol					
Fonte de incerteza	**Incerteza padrão relativa do LQ**	**Incerteza padrão relativa do 5LQ**	**Incerteza padrão relativa do Aiva**	**Incerteza padrão relativa do GA**	**Incerteza padrão relativa do IRMS**
Precisão intermédia (u_P)	0.159	0.1040	0.0987	0.1057	-
Incerteza de exatidão ($u_{\bar{R}}$)	0.080	0.0380	0.0305	0.0800	-
Incerteza combinada	0.178	0.11	0.10	0.13	-
Incerteza combinada relativa (%)	**17.80% Cumpre (< 30%)**	**11.07% Cumpre (< 15%)**	**10.33%**	**13.25%**	-
5β-Androstanediol					
Fonte de incerteza	**Incerteza padrão relativa do LQ**	**Incerteza padrão relativa do 5LQ**	**Incerteza padrão relativa do Aiva**	**Incerteza padrão relativa do GA**	**Incerteza padrão relativa do IRMS**
Precisão intermédia (u_P)	0.272	0.0540	0.2298	0.0650	-
Incerteza de exatidão ($u_{\bar{R}}$)	0.073	0.0770	0.0271	0.0444	-
Incerteza combinada	0.282	0.09	0.23	0.08	-
Incerteza combinada relativa (%)	**28.16% Cumpre (< 30%)**	**9.40% Cumpre (< 15%)**	**23.14%**	**7.87%**	-
Epitestosterona					
Fonte de incerteza	**Incerteza padrão relativa do LQ**	**Incerteza padrão relativa do 5LQ**	**Incerteza padrão relativa do Aiva**	**Incerteza padrão relativa do GA**	**Incerteza padrão relativa do IRMS**
Precisão intermédia (u_P)	0.114	0.0390	0.1271	0.0759	-
Incerteza de exatidão ($u_{\bar{R}}$)	0.043	0.0520	0.0450	0.0659	-
Incerteza combinada	0.122	0.07	0.13	0.10	-
Incerteza combinada relativa (%)	**12.18% Cumpre (< 30%)**	**6.50% Cumpre (< 15%)**	**13.48%**	**10.05%**	-

Testosterona					
Fonte de incerteza	**Incerteza padrão relativa do LQ**	**Incerteza padrão relativa do 5LQ**	**Incerteza padrão relativa do Aiva**	**Incerteza padrão relativa do GA**	**Incerteza padrão relativa do IRMS**
Precisão intermédia (u_P)	0.127	0.0290	0.3531	0.0416	-
Incerteza de exatidão ($u_{\bar{R}}$)	0.106	0.0830	0.0571	0.0661	-
Incerteza combinada	0.165	0.09	0.36	0.08	-
Incerteza combinada relativa (%)	**16.54% Cumpre (< 30%)**	**8.79% Cumpre (< 15%)**	**35.76%**	**7.81%**	-

Observando a Tabela 73, pode-se constatar que tanto para o valor do LQ, como para o valor do 5LQ a incerteza combinada relativa encontra-se dentro dos valores previstos para todos as substâncias, contudo, a incerteza combinada relativa para o controlo Aiva é elevada, principalmente para a testosterona e a androsterona devido à falta de precisão obtida para o controlo. Futuramente, seria preciso repetir estes ensaios com uma nova solução de modo a perceber-se o que terá ocorrido.

7.8. Cartas de Controlo

Iniciou-se o processo de construção de cartas de controlo de médias para as várias substâncias. As cartas ainda estão em construção apresentado apenas 8 pontos cada, para a sua conclusão será necessário acrescentar pelo menos mais dois, antes de fixar a média dos valores e o seu desvio padrão para que as cartas possam ser utilizadas no controlo do método. As cartas abaixo representadas, da Figura 53 à Figura 59, são cartas de média feitas para o controlo ao limite de quantificação para cada uma das substâncias. Todas as cartas de média foram feitas tendo em conta a média e o desvio padrão obtido com valores experimentais que estão referidos nas tabelas de precisão no tópico 7.7. Para as cartas da androsterona os valores utilizados foram os presentes na Tabela 49 e na Tabela 50, para a etiocolanolona foram usados os valores da Tabela 53 e da Tabela 54, para o 5αandrostanediol usaram-se os dados da Tabela 57 e da Tabela 58, para o 5βandrostanediol os da Tabela 61 e da Tabela 62, para a epitestosterona os da Tabela 65 e da Tabela 66, enquanto que, para a testosterona foram utilizados os dados da Tabela 69 e da Tabela 70.

As linhas de aviso são calculadas tendo em conta da equação (7) e as linhas de ação são calculadas através da aplicação da equação (8).

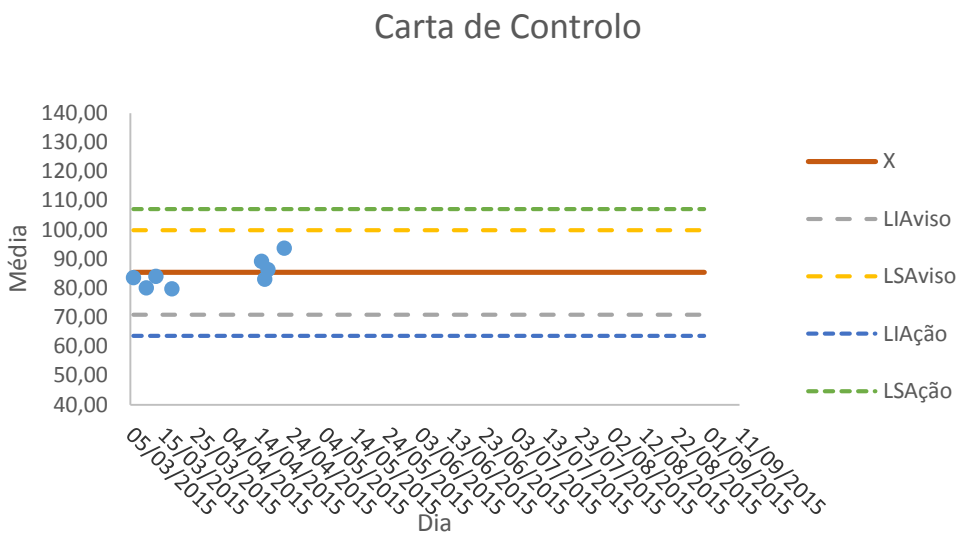


Figura 53 – Carta de Média para o LQ da Androsterona

Através da observação da carta de média para o limite de quantificação da Androsterona, Figura 53, vê-se que, apesar de o valor de X estar deslocado do valor real, 100 ng mL^{-1}, os pontos encontram-se dentro das linhas de aviso, perto da linha de média e dispostos de ambos os lados desta, contudo há uma maior prevalência para os pontos do lado inferior da linha. Pode-se afirmar que os pontos encontram-se dentro de controlo, contudo a carta deve ser vigiada e talvez comprovada com uma nova solução.

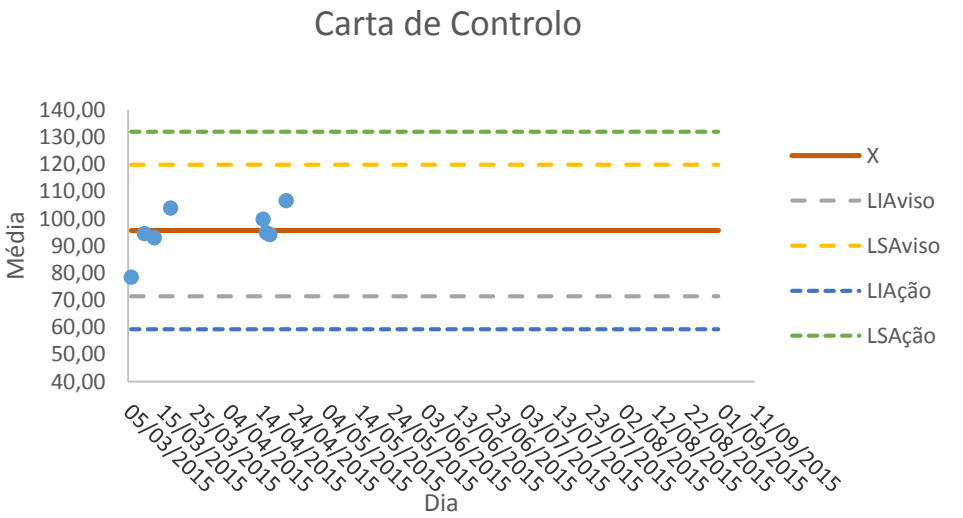


Figura 54 – Carta de Média para o LQ da Etiocolanolona

Através da observação da carta de média para o limite de quantificação da etiocolanolona, Figura 54, vê-se que, o valor de X está próximo do valor real, 100 ng

mL^{-1}. Os pontos encontram-se dentro das linhas de aviso e distribuídos de ambos os lados da linha média, pode-se afirmar que estes encontram-se dentro de controlo.

As restantes cartas de controlo encontram-se em anexo. As cartas relativas ao limite de deteção das restantes substâncias podem ser consultadas no ponto 10.1.1. As cartas de média para o 5LQ encontram-se no ponto 10.1.2, as cartas para o controlo Aiva no ponto 10.1.3, as cartas relativas ao controlo GA no ponto 10.1.4 e as cartas para o controlo IRMS no ponto 10.1.5.

8. Conclusões

No decorrer do trabalho foi possível desenvolver e implementar um método para a determinação e quantificação dos esteroides endógenos e do perfil esteroidal.

Começou-se por testar a linearidade para determinar as curvas de calibração que, à medida que o trabalho ia desenvolvendo, iam sendo adaptadas, sendo que no final optou-se por utilizar duas gamas de concentrações, que se encontram descritas na Tabela 47 e na Tabela 48.

A seletividade foi avaliada através de um conjunto de amostras reais, amostras de excreção, que permitiu averiguar falhas na deteção de algumas substâncias na fase inicial, permitindo, assim, adaptar o tratamento das amostras, acrescentando uma extração com éter *terc*-butilmetílico antes da realização da hidrólise enzimática e alterando o solvente orgânico para a extração líquido-líquido inicial de éter *terc*-butilmetílico para n-pentano, que possibilitou a obtenção de amostras com um menor número de interferentes.

Ao realizar testes de recuperação para ambos os solventes observou-se que o éter *terc*-butilmetílico tem uma maior capacidade de recuperação que o n-pentano, contudo este último evita a passagem de um maior número de impurezas para a matriz final, sendo o escolhido para a segunda extração líquido-líquido. Inicialmente, pensou-se realizar a extração do 5αandrostanediol e do 5βandrostanediol com o éter *terc*-butilmetílico devido à quantidade, por vezes, reduzida das substâncias na urina, porém resolveu-se usar o mesmo solvente para todas as extrações para evitar um grande gasto de reagentes.

Os limites de quantificação pretendidos foram obtidos a partir da diluição de um controlo, sendo que para o n-pentano se obteve um limite de quantificação de 97.8 ng mL^{-1} para a Androsterona, de 73.6 ng mL^{-1} para a Etiocolanolona, de 2.07 ng mL^{-1} para o 5αandrostanediol, de 1.45 ng mL^{-1}para o 5βandrostanediol, de 1.01 ng mL^{-1} para a Epitestosterona e um LQ de 0.497 ng mL^{-1} para a Testosterona. Para facilitar nas análises de rotina resolveu-se utilizar um limite de quantificação de 100 ng mL^{-1} para a androsterona e para a etiocolanolona, um LQ de 4 ng mL^{-1} para o 5βandrostanediol, e um de 2 ng mL^{-1} para os restantes.

Uma vez que algumas das curvas de calibração não abrangem todas as concentrações que são observadas para algumas das substâncias a quantificar, testou-se a diluição das amostras e, apesar de, não se obter linearidade até a diluição de 1:10 usando o n-pentano como solvente de extração, com a exceção do 5βandrostanediol, os valores obtidos para as substâncias são aceitáveis, sendo que as diluições conseguidas permitem que as concentrações das substâncias caiam dentro da curva de calibração.

Também se testou a possibilidade de haver contaminação na coluna após a injeção de uma solução concentrada. O teste consistiu em injetar amostras concentradas seguidas de uma solução que continha apenas reagente de derivatização e concluiu-se que não havia contaminação, por parte da solução concentrada, na mistura de derivatização.

Relativamente à precisão e exatidão obteve-se para a maioria das substâncias nos vários calibradores um pequeno desvio do valor teórico mas que satisfaz os critérios estabelecidos pela WADA. Contudo, nota-se uma maior imprecisão e exatidão com algumas substâncias no controlo Aiva, sendo aconselhável no futuro a testar esse controlo com uma nova solução para tentar determinar o problema observado.

As cartas de controlo, devido ao reduzido número de pontos, apenas confirmam as conclusões obtidas para a precisão e para a exatidão. Posteriormente, quando as cartas estiverem completamente estabelecidas e em uso, servirão como controlo do método analítico de modo a detetar desvios no seu comportamento.

Para dar continuidade ao trabalho realizado, será necessário aplicar o método desenvolvido a amostras reais e submete-lo a acreditação para poder ser utilizado pelo laboratório para a determinação do perfil esteroidal.

9. Referências bibliográficas

1. *WADA - Accredited Approved Laboratories*. www.wada-ama.org/en/who-we-are/anti-doping-community/accredited-approved-laboratories

2. *Autoridade Antidopagem de Portugal (ADoP) - A Instituição*. www.adop.pt/adop/instituicao.aspx

3. *Laboratório de Análises de Dopagem (LAD)*. www.adop.pt/lad/lad.aspx

4. 2013. *História da Luta Contra a Dopagem*. http://www.adop.pt/adop/historia.aspx

5. Cowan D, Houghton E. 2004. Drug Abuse in Sport. In *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons*, 1:134-47. UK: Pharmaceutical Press.

6. Barceloux D, R. P. 2013. Anabolic—Androgenic Steroids. *Disease-a-Month* 59:226–48

7. Gaillard Y, al e. 1999. Gas chromatographic–tandem mass spectrometric determination of anabolic steroids and their esters in hair Application in doping control and meat quality control. *Journal of Chromatography B* 735:189–205

8. Yesalis C, Bahrke M. 2002. History of Doping in Sport. *International Sports Studies* 24:42-76

9. Gleaves J. 2013. Exploring New Avenues to the Doping Debate in Sports: A Test-Relevant Approach. In *Fair Play. Revista de Filosofía, Ética y Derecho del Deporte*, pp. 39-63

10. *WADA - Who we are*. www.wada-ama.org/en/who-we-are

11. WADA. 2014. The 2015 Prohibited List, WADA

12. Thevis M. 2010. Mass Spectrometry in Sports Drug Testing. In *Characterization of Prohibited Substances and Doping Control Analytical Assays*. New Jersey: Wiley

13. Commitee WL. 2010. WADA Technical Document - TD2010DCR: Identification Criteria for Qualitative Assays

14. Skoog D, West D, Holler F, Crouch S. 2004. Fundamentals of Analytical Chemistry. In *Fundamentals of Analytical Chemistry*:947-72. Belmont, California: Thomson Brooks/Cole.

15. Gambelunghe C, Sommavilla M, al e. 2007. Analysis of anabolic steroids in hair by GC/MS/MS. *Biomedical Chromatography* 21:369-75

16. *What is ELISA? Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)*. www.elisa-antibody.com/ELISA-Introduction

17. Guo F, al e. 2014. Automated and sensitive determination of four anabolic androgenic steroids in urine by online turbulent flow solid-phase extraction coupled with

liquid chromatography–tandem mass spectrometry: A novel approach for clinical monitoring and doping control. *Talanta* 125:432–8

18. Dawling S. 2004. Gas Chromatography. In *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons*, 1:421-99. UK: Pharmaceutical Press.

19. Ramos S, Ruivo J. 2014. Processos de realização. In *Manual da Qualidade*:1-9. Lisboa.

20. Heitor M, Ruivo J. 2014. Instrução Técnica - IT-LADB-019: Armazenamento de destruição de amostras*. Instrução Técnica*, LAD, Lisboa

21. Bahrke M, Yesalis C. 2004. Abuse of anabolic androgenic steroids and related substances in sport and exercise. *Current Opinion in Pharmacology* 4:614–20

22. Robles-Diaz M, et al. 2015. Distinct phenotype of hepatotoxicity associated with illicit use of anabolic androgenic steroids. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 41:116–25

23. Leme de Souza G, Hallak J. 2011. Anabolic steroids and male infertility: a comprehensive review. *BJU INTERNATIONAL* 108:1860-5

24. Morrison T, Ricci L, Melloni Jr. R. 2015. Anabolic/androgenic steroid administration during adolescence and adulthood differentiallymodulates aggression and anxiety. *Hormones and Behavior* 69:132–8

25. Pope HJ, Kanayama G, Hudson J. 2012. Risk Factors for Illicit Anabolic-Androgenic Steroid Use in Male Weightlifters: A Cross-Sectional Cohort Study. *Biol Psychiatry* 71:254–61

26. Eenoo P, Delbeke F. 2006. Metabolism and excretion of anabolic steroids in doping control—New steroids and new insights. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 101:161–78

27. Mareck U, Geyer H, al e. 2008. Factors influencing the steroid profile in doping control analysis. *Journal of Mass Spectrometry* 43:877–91

28. Wille S, Peters F, Fazio V, Samyn N. 2011. Practical aspects concerning validation and quality control for forensic and clinical bioanalytical quantitative methods. *Accreditation and Quality Assurance* 16:279-92

29. Cassiano N, al e. 2009. Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. *Química Nova* 32:1021-30

30. Ramos S, Aguilera R. 2013. Procedimento Geral - PGER-LADB-015: Selecção e validação de métodos de ensaio, LAD - ADoP, Lisboa

31. Huber L. 2007. Validation of Analytical Methods. In *Validation and Qualification in Analytical Laboratories*:125-54. New York: informa healthcare.

32. Ramos S, Sekera M. 2011. Procedimento Técnico - PTEC-LADB-051: Teste de linearidade e gama de trabalho, LAD - ADoP, Lisboa

33. Miller JN, Miller JC. 2005. The quality of analytical measurements. In *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*:74-106: Pearson Prentice Hall.

34. Group WLE. 2014. WADA Technical Document - TD2014EAAS: Endogenous Anabolic Androgenic Steroids: Measurement and Reporting

35. Patnaik P. 2004. Chromatographic Methods. In *Dean's Analytical Chemistry Handbook*. New York: McGraw-Hill.

10. Anexos

	REGISTO	MOD-LADB-110 REV:05
	CRITÉRIOS DE IDENTIFICAÇÃO ISL	Equipa II
		Pág. 1 de 1

Substância	Testosterona	Data:	21/11/2014
Derivado/metabolito	Testosterona TMS	Operador:	
Dados da amostra:			
		Relatório:	Tecnologia
		Nº Externo	
		Nº Interno	GC/MS
		Tipo de Exp.	Confirmação

				Critério de conformidade	
CONTROLO	ID	Abundância	Abund. relativa	Lim. inferior	Lim. superior
Pico base	432	7889	100,0%	N/A	
Ião Diagnóstico 1	417	881	11,2%	6,2%	16,2%
Ião Diagnóstico 2	327	2178	27,6%	22,1%	33,1%
Ião Diagnóstico 3					
Ião Diagnóstico 4					
Ião Diagnóstico 5					
Ião Diagnóstico 6					
TR	Testosterona TMS		8,68	8,58	8,78
	PI		9,36	ou	
TRR			0,927	0,918	0,937
AMOSTRA	ID	Abundância	Abund. relativa	Conformidade	
Pico base	432	70683	100,0%	N/A	
Ião Diagnóstico 1	417	23597	33,4%	Não Conforme	
Ião Diagnóstico 2	327	5310	7,5%	Não Conforme	
Ião Diagnóstico 3				-----	
Ião Diagnóstico 4				-----	
Ião Diagnóstico 5				-----	
Ião Diagnóstico 6				-----	
TR	Testosterona TMS		8,67	Conforme	
	PI		9,37		Cumpre TR
TRR			0,925		Cumpre TRR

Última alteração : 20 de Setembro de 2010		Validade:	31/12/14
Nome do ficheiro:	MOD-LADB-110 Critérios de ID ...MS		
Localização:	\\Lad-san\qualidade\Folhas de cálculo\Outros		

Observações:	Elaborado por:

Propriedade LAD-ADoP

Figura 55 – Exemplo da folha de Excel® onde foi feito o tratamento dos dados para a seletividade

10.1. Cartas de Média (Cartas de controlo)

10.1.1. Cartas de média para o LQ

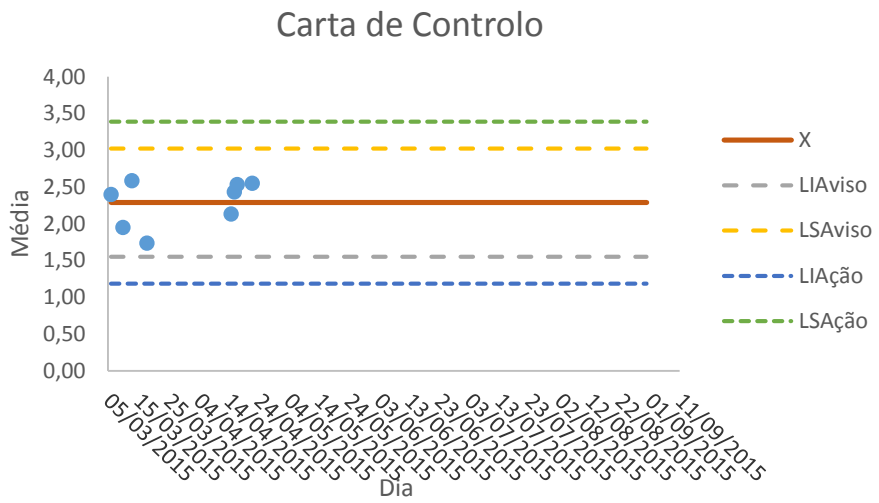


Figura 56 – Carta de Média para o LQ do 5αAndrostanediol

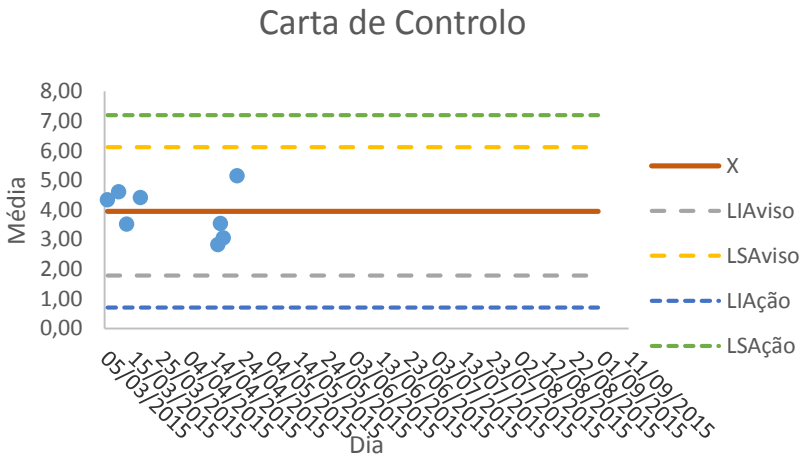


Figura 57 – Carta de Média para o LQ do 5βAndrostanediol

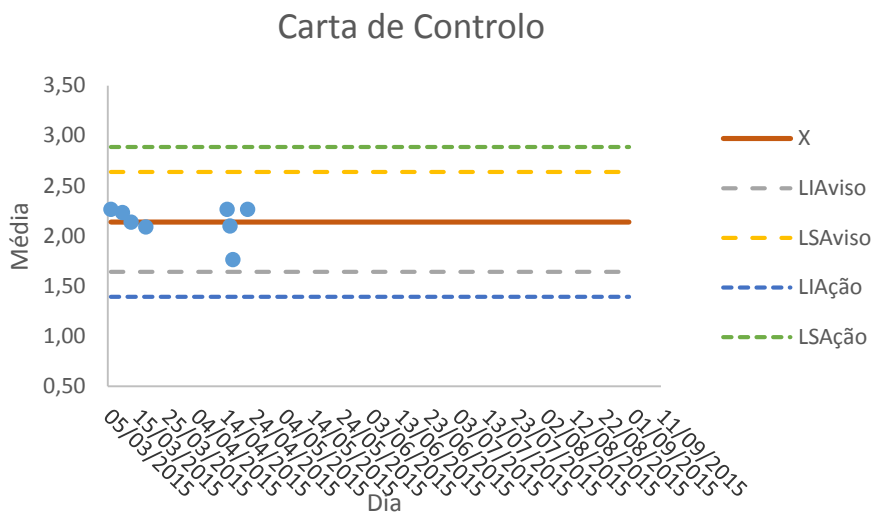


Figura 58 – Carta de Média para o LQ do Epitestosterona

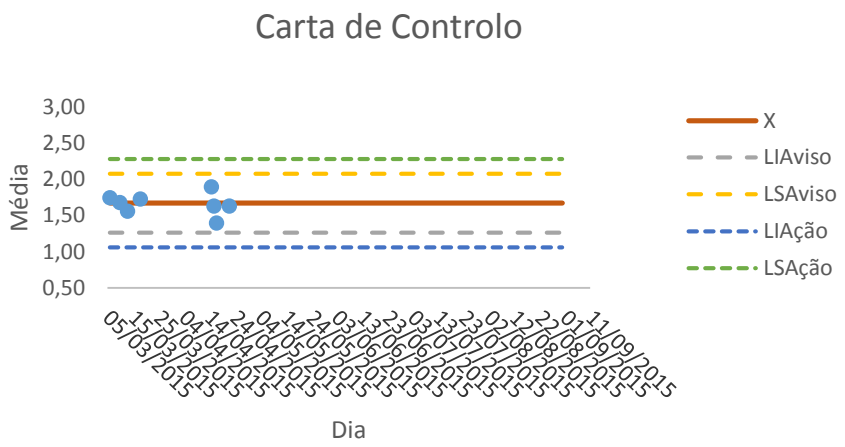


Figura 59 – Carta de Média para o LQ do Testosterona

10.1.2. Cartas de média para o 5LQ

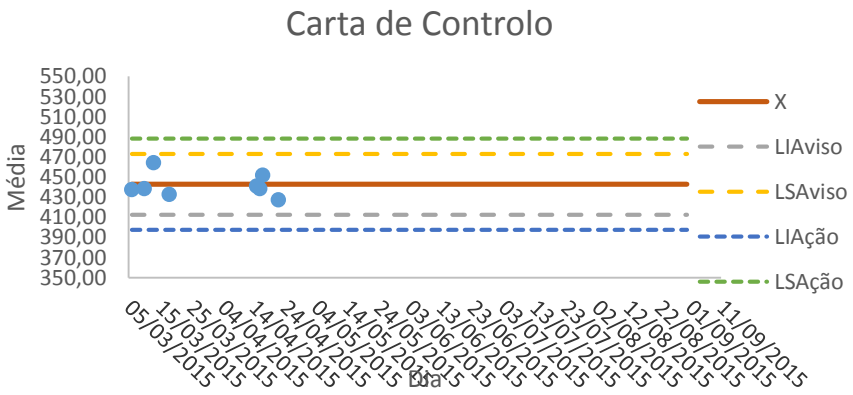


Figura 60 – Carta de Média para o controlo 5LQ da Androsterona

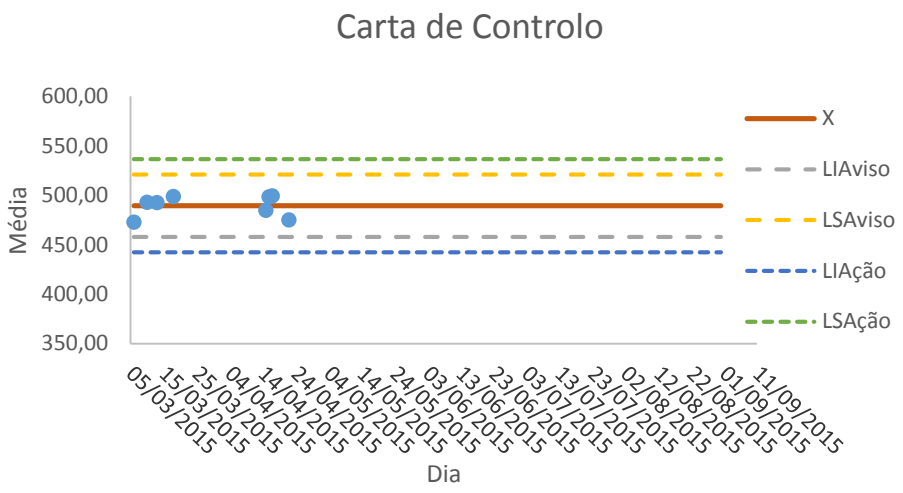


Figura 61 – Carta de Média para o controlo 5LQ da Etiocolanolona

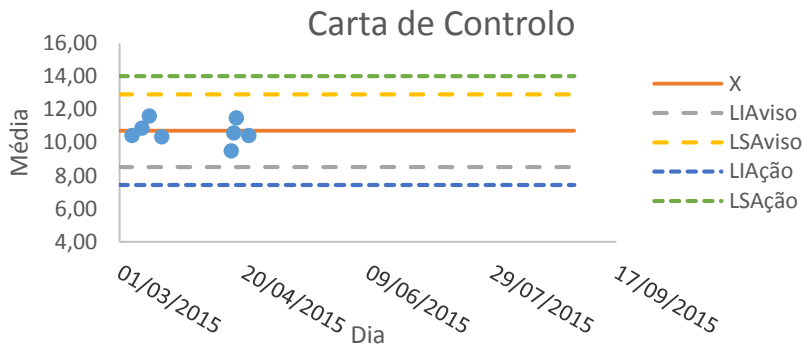


Figura 62 – Carta de Média para o controlo 5LQ do 5αAndrostanediol

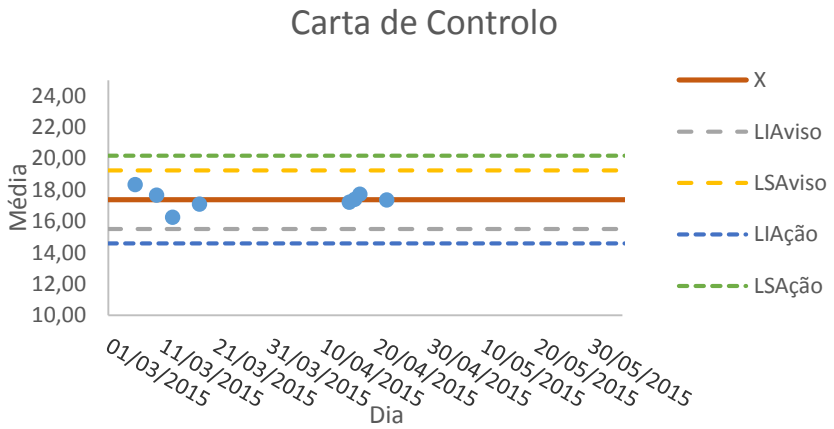


Figura 63 – Carta de Média para o controlo 5LQ do 5βAndrostanediol

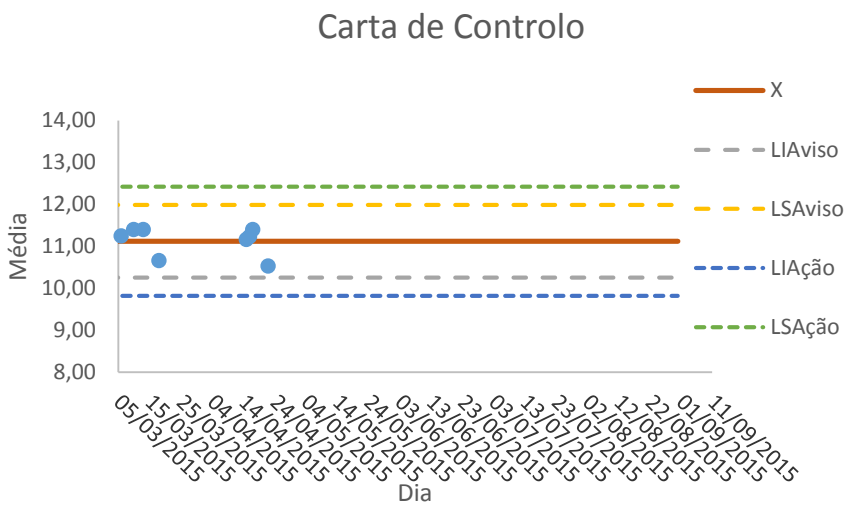


Figura 64 – Carta de Média para o controlo 5LQ da Epitestosterona

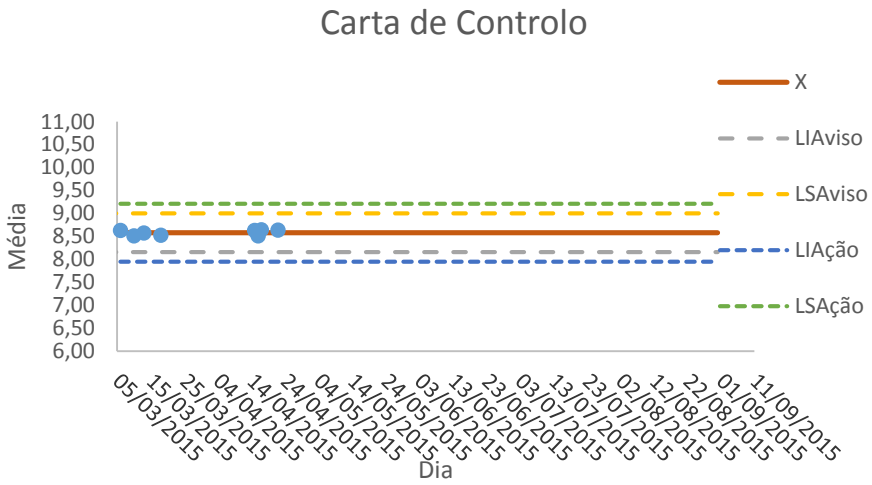


Figura 65 – Carta de Média para o controlo 5LQ da Testosterona

10.1.3. Cartas de média para o Aiva

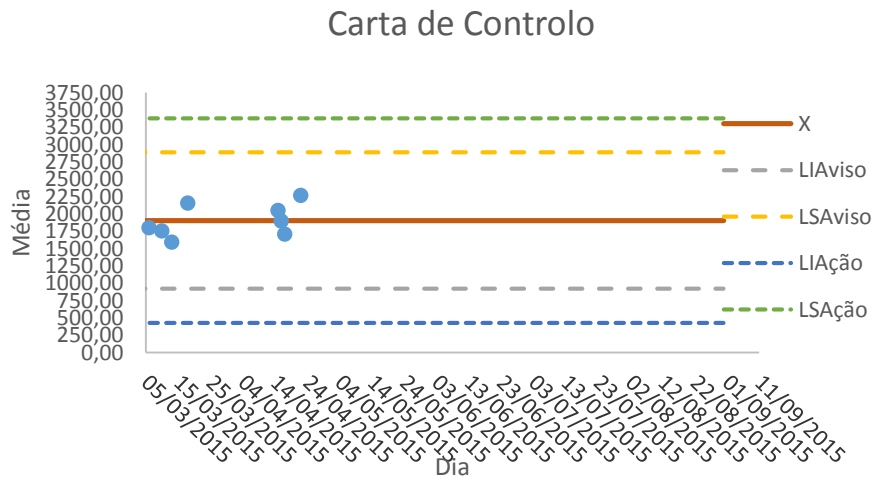


Figura 66 – Carta de Média para o controlo Aiva da Androsterona

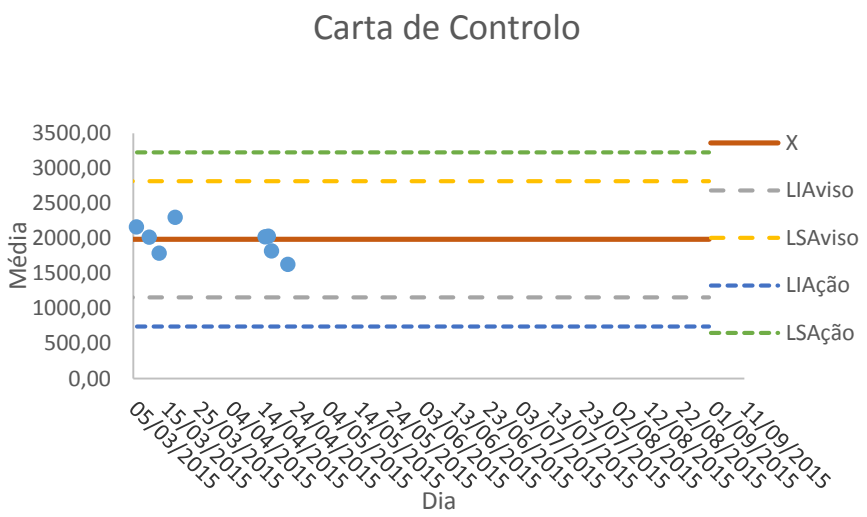


Figura 67 – Carta de Média para o controlo Aiva da Etiocolanolona

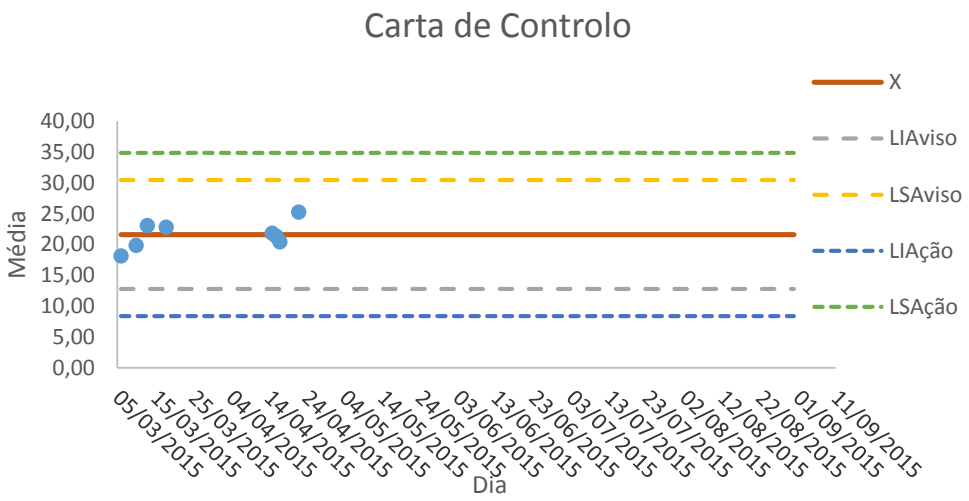


Figura 68 – Carta de Média para o controlo Aiva do 5αAndrostanediol

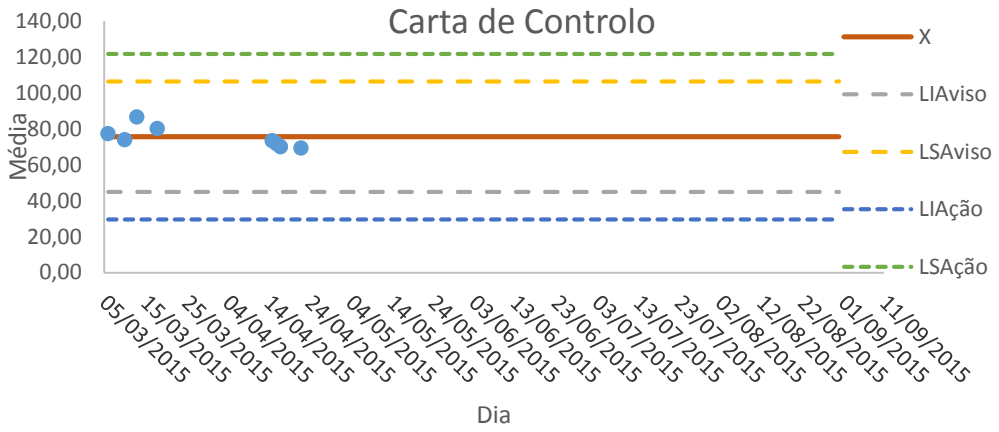


Figura 69 – Carta de Média para o controlo Aiva do 5βAndrostanediol

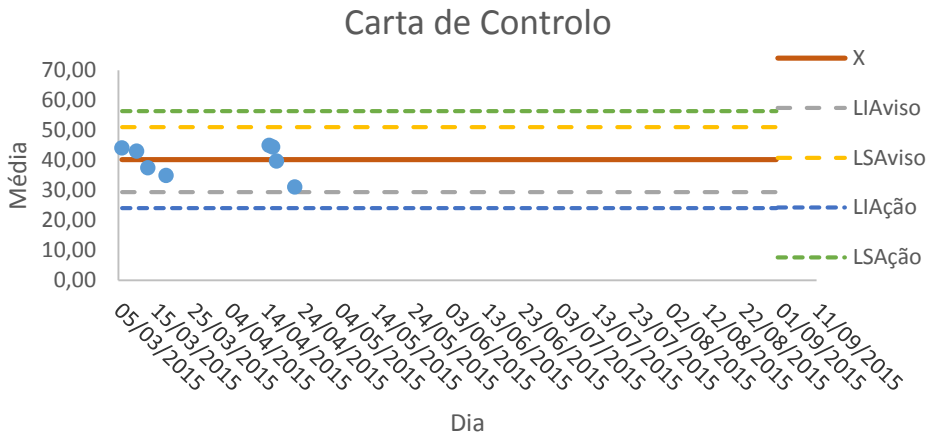


Figura 70 – Carta de Média para o controlo Aiva da Epitestosterona

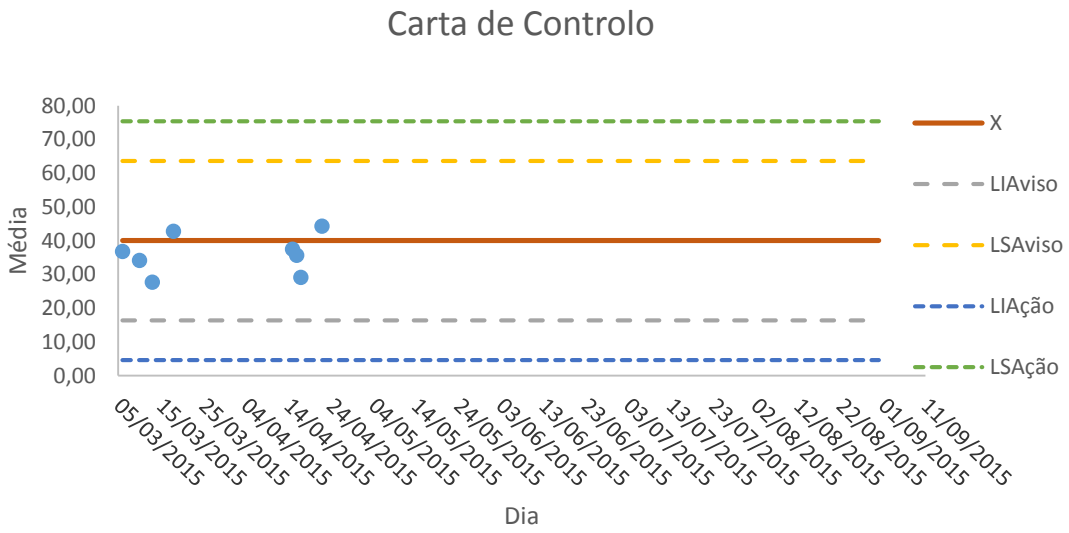


Figura 71 – Carta de Média para o controlo Aiva da Testosterona

10.1.4. Cartas de média para o GA

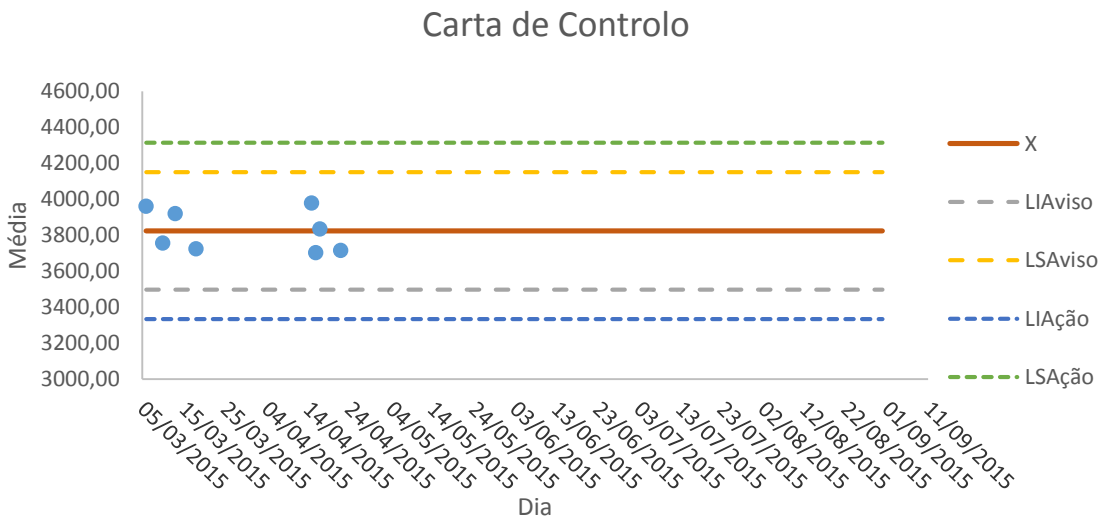


Figura 72 – Carta de Média para o controlo GA da Androsterona

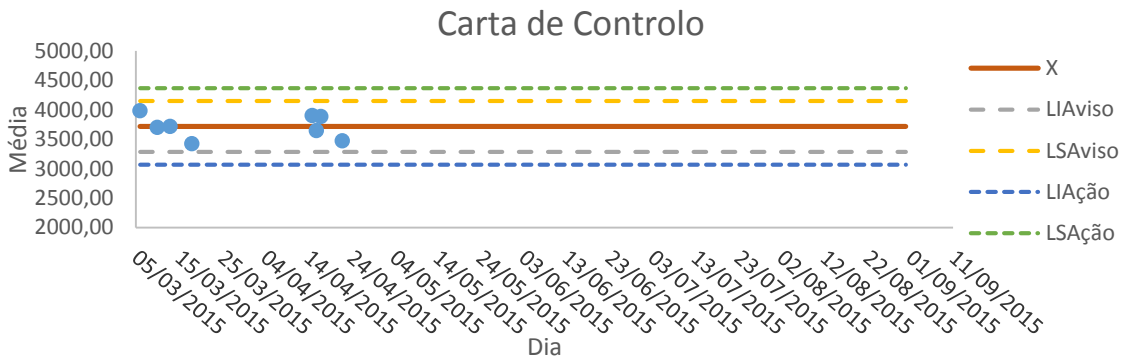


Figura 73 – Carta de Média para o controlo GA da Etiocolanolona

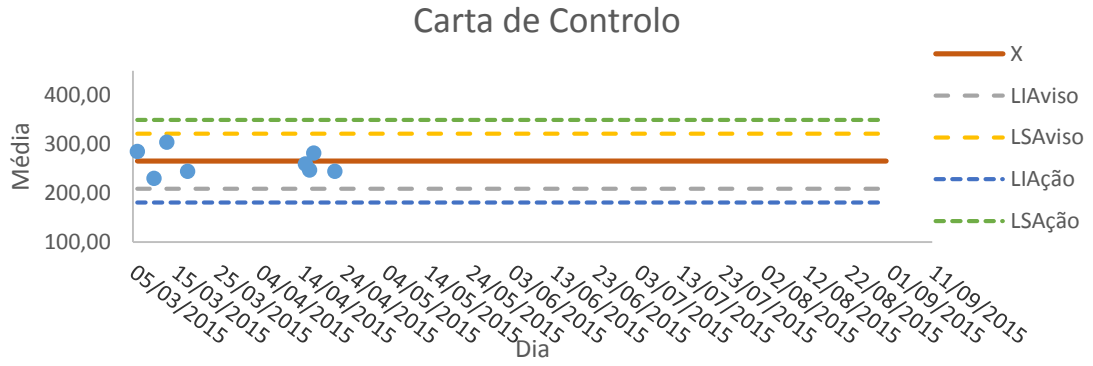


Figura 74 – Carta de Média para o controlo GA do 5αAndrostanediol

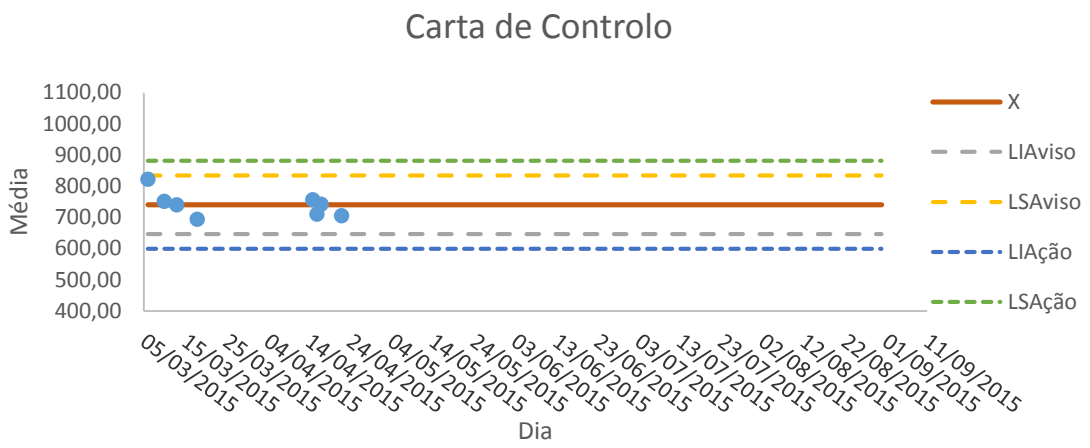


Figura 75 – Carta de Média para o controlo GA do 5βAndrostanediol

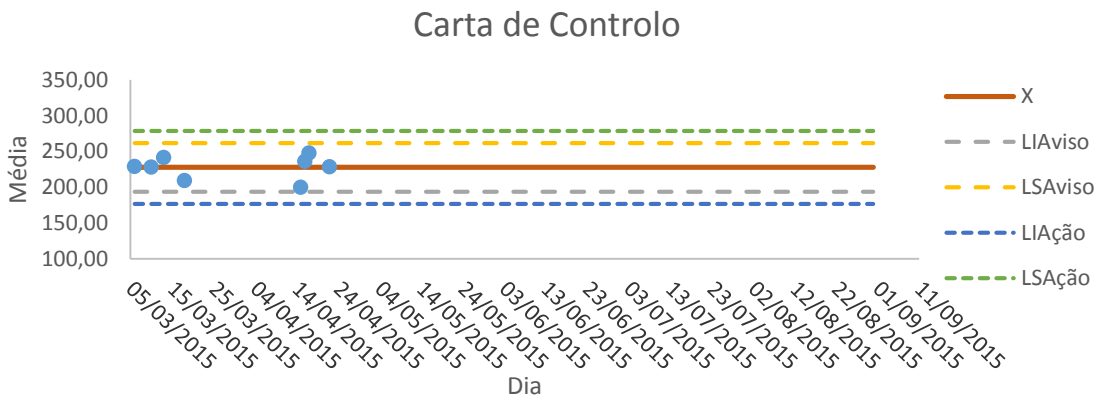


Figura 76 – Carta de Média para o controlo GA da Epitestosterona

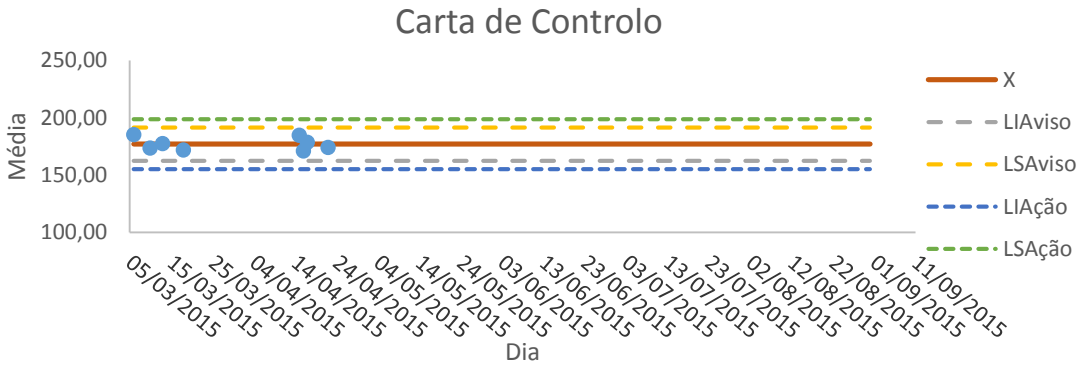


Figura 77 – Carta de Média para o controlo GA da Testosterona

10.1.5. Cartas de média para o IRMS

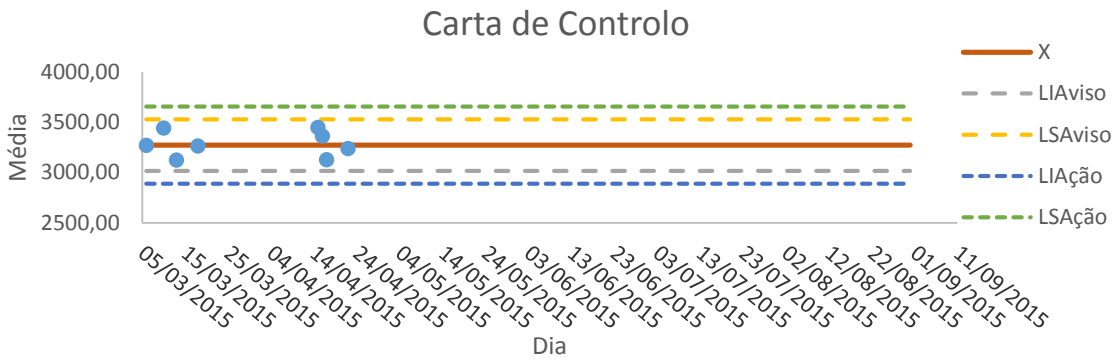


Figura 78 – Carta de Média para o controlo IRMS da Androsterona

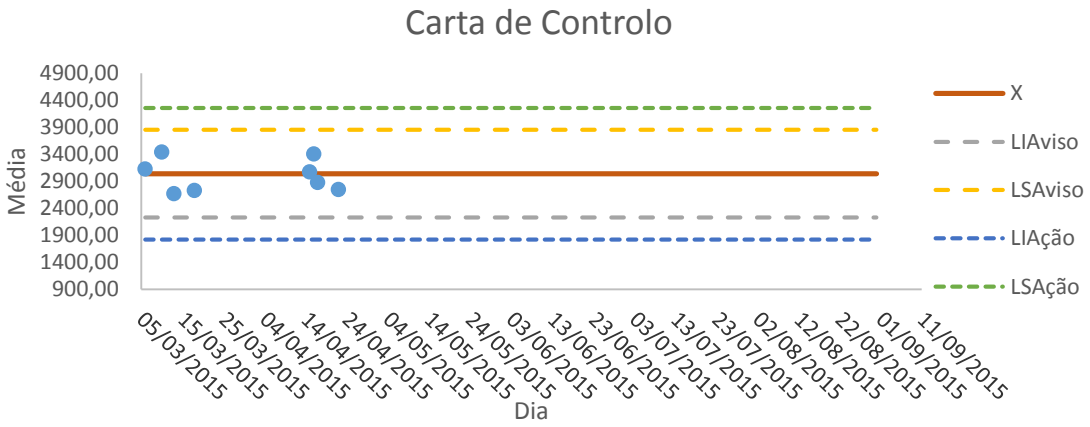


Figura 79 – Carta de Média para o controlo IRMS da Etiocolanolona