

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas

Programa de Pós-Graduação em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia)

**Detecção de esteroides anabólicos androgênicos e seus
produtos de biotransformação em *dried urine spots* por
ionização por *paper spray* acoplada à espectrometria de
massas (PS-MS)**

Ana Luiza Freitas de Assis Linhares

Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Orientador: Prof. Dr. Mauricio Yonamine

São Paulo

2020

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas

Programa de Pós-Graduação em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia)

Detecção de esteroides anabólicos androgênicos e seus produtos de biotransformação em *dried urine spots* por ionização por *paper spray* acoplada à espectrometria de massas (PS-MS)

Ana Luiza Freitas de Assis Linhares

Versão corrigida da Dissertação conforme resolução CoPGr 6018/2011

Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Orientador: Prof. Dr. Mauricio Yonamine

São Paulo

2020

Ana Luiza Freitas de Assis Linhares

Detecção de esteroides anabólicos androgênicos e seus produtos de
biotransformação em *dried urine spots* por ionização por *paper spray*
acoplada à espectrometria de massas (PS-MS)

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Prof. Dr. Mauricio Yonamine
Orientador/Presidente

Prof. Dr. Rodinei Augusti
1o. examinador

Prof. Dr. André Valle de Bairros
2o. examinador

Prof. Dr. Raphael Caio Tamborelli Garcia
3o. examinador

São Paulo, 19 de junho de 2020.

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

L735d Linhares , Ana Luiza Freitas de Assis
Detecção de esteroides anabólicos androgênicos e seus produtos de biotransformação em dried urine spots por ionização por paper spray acoplada à espectrometria de massas (PS-MS) / Ana Luiza Freitas de Assis Linhares . - São Paulo, 2020.
142 p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.
Orientador: Yonamine, Mauricio

1. esteroides anabólicos androgênicos. 2. dried urine spots. 3. paper spray. 4. espectrometria de massas. 5. ionização ambiente. I. T. II. Yonamine, Mauricio, orientador.

Dedicatória

Dedico esse trabalho à
minha mãe, Carmélia, que sempre
me apoiou e incentivou a
realização dos meus sonhos.

Apoio Financeiro

O presente trabalho foi realizado com o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) – Cota Institucional - Processo 130136/2018-2.

Processo CAPES AUXPE 3419/2014, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Agradecimentos

Eu não poderia ter chegado à conclusão do mestrado sozinha, uma jornada que incluiu diversos desafios, incertezas, mudanças, novas amizades, novas experiências, alegrias e algumas tristezas. E, por isso, não posso deixar de agradecer a todos que me acompanharam e me apoiaram durante esses dois anos.

À minha mãe, Carmélia, que nunca duvidou de mim e sempre apoiou meus sonhos, por mais distantes que eles parecessem. Essa é mais uma vitória nossa! Obrigada por ser meu porto seguro e por me incentivar em todos os momentos.

À minha família, especialmente meus tios João, Beth, Fonso e Assunção, que sempre me deram suporte em todas as minhas decisões. Não poderia ter chegado aqui sem a ajuda de vocês.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Mauricio Yonamine, agradeço a orientação, paciência, visão crítica e oportuna, empenho, disponibilidade e apoio. Obrigada por confiar em mim e ter me dado espaço para colocar minhas ideias em prática.

Aos meus amigos que considero família, Paulinha, Maira, Leonardo, Gabi, Luiza, Luisa, Karol, Priscila, Natalia, Mateus e Zé, que mesmo estando longe sempre me apoiaram incondicionalmente. A amizade de vocês é tudo para mim!

À minha família de São Paulo, Luana, Jefferson, Bruno e Bruna, que nunca me abandonaram quando precisei, sempre me ouviram, me apoiaram e são meus irmãos de coração.

Aos meus colegas de laboratório Beatriz, Fabiana, Felipe, Gabs, Gabi, Karina, Katia e Idylla, que estiveram ao meu lado durante esta fase, pelo companheirismo, risadas, dicas, ensinamentos e apoio nos momentos difíceis.

Aos amigos e colegas que fiz no departamento, especialmente Vitor e Lidia, que ajudaram a tornar este trabalho e os eventos em que participamos, uma válida e agradável experiência de aprendizagem.

Aos docentes que tive a honra de conhecer, especialmente Prof. Tania Marcourakis e Prof. Elizabeth Nascimento, que são meus exemplos de mulheres cientistas e as quais sempre me espelho.

A todos da Seção Técnica de Física e Química Legal do Instituto de Criminalística da Polícia Civil de Minas Gerais, especialmente os peritos Yuri Machado, Rogério Lordeiro, José Coelho Neto e Pablo Marinho, que desde o estágio na graduação estiveram

dispostos a me ajudar, não mediram esforços para dividir o equipamento comigo e sempre me apoiaram quando precisei.

À Dra. Maria Janieire de Nazaré Nunes Alves e ao Dr. Francis Ribeiro de Souza do InCor – HCFMUSP, pelo suporte e por me disponibilizarem as amostras utilizadas neste projeto.

À Paula Grossi, Damila Morais e Marcos Pudenzi da Shimadzu, por me cederem o software que foi imprescindível para a realização desta dissertação.

Aos membros da banca que participaram da minha qualificação e foram essenciais para a concretização deste projeto.

Aos funcionários da Faculdade de Farmácia, em especial Edna, Elaine e Samantha, que sempre foram prestativos comigo.

Por fim, quero demonstrar o meu agradecimento, a todos aqueles que, de um modo ou de outro, tornaram possível a finalização do meu mestrado.

Epígrafe

“Porque o medo – é a nossa
exceção. Contudo a coragem, a
aventura e a alegria pelo incerto,
pelo não experimentado – a coragem
me parece a pré-história do
homem.”

NIETZSCHE, F., 2012, p. 298.

Resumo

LINHARES, A. L. F. A. **Detecção de esteroides anabólicos androgênicos e seus produtos de biotransformação em *dried urine spots* por ionização por *paper spray* acoplada à espectrometria de massas (PS-MS)**. 2020. 142f. Dissertação (Mestrado em Farmácia – Fisiopatologia e Toxicologia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Os esteroides anabólicos androgênicos (EAA) são utilizados clinicamente para tratar diferentes doenças, porém propagou-se o uso não terapêutico por atletas de elite e fisiculturistas, com o intuito de aumentar a massa muscular e melhorar o desempenho físico. O uso de substâncias ergogênicas, como fármacos estimulantes e narcóticos analgésicos no esporte, foi proibido em 1967 pelo International Olympic Committee (COI), mas somente em 1976 os EAA entraram para a lista de substâncias proibidas. O uso de EAA está associado a diversos efeitos adversos, principalmente cardiovasculares, neuroendócrinos e distúrbios psiquiátricos, além de dislipidemia, elevação dos marcadores inflamatórios e disfunção endotelial. As análises toxicológicas constam como a maneira mais eficaz de minimizar o *doping* no esporte. O material é fornecido pelo atleta durante as competições ou treinamentos e previne que os competidores alcancem vantagem competitiva devido ao uso de EAA. A utilização de métodos para amostragem alternativos tem ganhado força, devido à necessidade de técnicas mais práticas que utilizam pouco volume de amostra e possuem facilidade de armazenamento. O *dried urine spots* é um método no qual pequenas amostras de urina são aplicadas em papéis de filtro para análises qualitativas ou quantitativas. Ele se caracteriza por ser uma técnica rápida, fácil, simples e barata para a coleta, armazenamento e distribuição, além de minimizar os riscos de infecção, podendo ser utilizado na rotina. A técnica de *paper spray* (PS-MS) foi desenvolvida a partir da relevância de métodos como o *dried blood spots* por proporcionar análises mais rápidas, apresenta alta especificidade, capacidade de analisar diferentes analitos simultaneamente, baixo limite de detecção e dispensa a necessidade de reagentes específicos. Sendo assim, neste trabalho foi desenvolvido e validado o método de *screening* de EAAs em *dried urine spots* por ionização por *paper spray* acoplada à espectrometria de massas. O método apresentou limites de detecção entre 2-15ng/mL e presença de três interferentes endógenos. Os dez analitos de interesse deste estudo são estáveis por 150 dias em temperatura ambiente. Dessa forma, a análise de EAAs em *dried urine spots* por PS-MS demonstra grande potencial para se tornar um método alternativo no monitoramento rápido de drogas de abuso.

Palavras-chave: Esteroides anabólicos androgênicos. Dried urine spots. Paper spray. Espectrometria de massas. Ionização ambiente.

Abstract

LINHARES, A. L. F. A. **Detection of anabolic androgenic steroids and its biotransformation products in dried urine spots by paper spray-mass spectrometry ionization (PS-MS)**. 2020. 142f. Dissertação (Mestrado em Farmácia – Fisiopatologia e Toxicologia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Anabolic androgenic steroids (AAS) are used clinically to treat different diseases, but non-therapeutic use has spread among elite athletes and bodybuilders, with the aim of increase muscle mass and improve physical performance. The International Olympic Committee (IOC) banned the use of ergogenic substances, such as stimulating drugs and analgesic narcotics in sports, in 1967, but only in 1976, AAS were included on the list of prohibited substances. The use of AAS is associated with several adverse effects, mainly cardiovascular, neuroendocrine and psychiatric disorders, in addition to dyslipidemia, elevated inflammatory markers and endothelial dysfunction. Toxicological analyzes are the most effective approach to minimize doping in sport. The material is provided by the athlete during competitions or training and prevents competitors from achieving a competitive advantage due to the use of AAs. The use of alternative sampling methods has gained strength, due to the need for more practical techniques that use low sample volume and can be easily storage. Dried urine spots are a method, which a small amount of urine samples is applied to filter papers for qualitative or quantitative analysis. It is characterized by being a fast, easy, simple and inexpensive technique for collection, storage and distribution, in addition to minimizing the risks of infection, and can be used in the routine. The paper spray technique (PS-MS) was developed based on the relevance of methods such as dried blood spots for providing faster analysis, high specificity, ability to analyze different analytes simultaneously, low detection limit and for eliminating the need for specific reagents. Therefore, this work developed and validated a screening method for AAS in dried urine spots by paper spray-mass spectrometry ionization. The method provided detection limits between 2-15ng/mL and the presence of three endogenous interferents. The ten analytes of interest in this study are stable for 150 days at room temperature. Thus, the analysis of AAS in dried urine spots by PS-MS demonstrates great potential to become an alternative method for the rapid monitoring of drugs of abuse.

Keywords: Anabolic androgenic steroids. Dried urine spots. Mass spectrometry. Ambient ionization.

Lista de Abreviaturas

ADRV	Violação de Regras Anti-Doping, do inglês: <i>Anti-Doping Rule Violations</i>
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
API	Ionização por pressão atmosférica, do inglês: <i>atmospheric pressure ionization</i>
Ar	Área relativa
CE	Energia de colisão, do inglês: <i>collision energy</i>
CI	Ionização química, do inglês: <i>chemical ionization</i>
CID	Dissociação induzida por colisão, do inglês: <i>collision induced dissociation</i>
CQA	Controle de qualidade alto
CQB	Controle de qualidade baixo
CQM	Controle de qualidade médio
CV	Coefficiente de variação
DART	Análise direta em tempo real, do inglês: <i>direct analysis in real time</i>
DBS	<i>Dried blood spots</i>
DLLME	Microextração líquido-líquido dispersiva, do inglês: <i>dispersive liquid-liquid microextraction</i>
DMS	<i>Dried matrix spots</i>
DUS	<i>Dried urine spots</i>
DESI	Ionização de desorção por <i>electrospray</i> , do inglês: <i>dissociation electrospray ionization</i>
DHEA	Deidroepiandrosterona, do inglês: <i>dehydroepiandrosterone</i>
DIP-MS	Sonda de inserção direta acoplada à espectrometria de massas, do inglês: <i>direct insertion probe-mass spectrometry</i>
EAA	Esteroides anabólicos androgênicos
EI	Ionização por elétrons, do inglês: <i>electron ionization</i>
EM	Efeito matriz
ESI	Ionização por <i>electrospray</i> , do inglês: <i>electrospray ionization</i>

F	Fator de ponderação
FDA	<i>U.S. Food and Drug Administration</i>
FSH	Hormônio folículo estimulante, do inglês: <i>follicle-stimulating hormone</i>
GC	Cromatografia em fase gasosa, do inglês: <i>gas chromatography</i>
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, do inglês: <i>gas chromatography-mass spectrometry</i>
GHB	Gama-hidroxitirato
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofina, do inglês: <i>gonadotropin-releasing hormone</i>
HDL	Lipoproteína de alta densidade, do inglês: <i>high density lipoprotein</i>
IAAF	International Athletic Federation
IOC	International Olympic Committee
LC	Cromatografia líquida, do inglês: <i>liquid chromatography</i>
LC-MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas, do inglês: <i>liquid chromatography-mass spectrometry</i>
LDL	Lipoproteína de baixa densidade, do inglês: <i>low density lipoprotein</i>
LH	Hormônio luteinizante, do inglês: <i>luteinizing hormone</i>
LLE	Extração líquido-líquido, do inglês: <i>liquid-liquid extraction</i>
LOD	Limite de detecção, do inglês: <i>limit of detection</i>
LOQ	Limite de quantificação, do inglês: <i>limit of quantification</i>
LPME	Microextração em fase líquida, do inglês: <i>liquid-phase microextraction</i>
m/z	Relação massa sobre carga, do inglês: <i>mass to charge ratio</i>
MALDI	Dessorção/ionização a laser auxiliada por matriz, do inglês: <i>matrix-assisted laser desorption/ionization</i>
MDA	Metilenedioxianfetamina
MDMA	Metilenedioximetanfetamina
MRM	Monitoramento de reações múltiplas
MRPL	Níveis mínimos de desempenho requerido, do inglês: <i>Minimum Required Performance Levels</i>
MS	Espectrometria de massas, do inglês: <i>mass spectrometry</i>
NaOH	Hidróxido de sódio

NH₄OH	Hidróxido de amônio
pH	Potencial hidrogeniônico
PI	Padrão interno
PP	Precipitação de proteínas
PS-MS	Ionização por paper-spray, do inglês: <i>paper spray – mass spectrometry</i>
R²	Coeficiente de determinação
RE	Erro relativo
RUSADA	<i>Russian Anti-Doping Agency</i>
SPE	Extração em fase sólida, do inglês: <i>solid-phase extraction</i>
SPME	Microextração em fase sólida, do inglês: <i>solid-phase microextraction</i>
SWGTOX	<i>Scientific Working Group for Forensic Toxicology</i>
T/E	Relação testosterone/epitestosterona
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
THC	Tetrahydrocannabinol
UNODC	<i>United Nations Office on Drugs and Crime</i>
WADA	<i>World Anti-Doping Agency</i>
WADC	<i>World Anti-Doping Code</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
W_i	Coeficiente de ponderação

Lista de Figuras

FIGURA 1. LINHA DO TEMPO DO ESTABELECIMENTO DO CÓDIGO MUNDIAL ANTI-DOPING.	24
FIGURA 2. ESTRUTURA QUÍMICA DA TESTOSTERONA.	27
FIGURA 3. ESQUELETO DA ESTRUTURA DOS ESTEROIDES ANABÓLICOS ANDROGÊNICOS.	28
FIGURA 4. MODIFICAÇÕES ESTRUTURAIS NA MOLÉCULA DA TESTOSTERONA.	28
FIGURA 5. BIOTRANSFORMAÇÃO DO ESTANOZOLOL E SEUS PRINCIPAIS PRODUTOS DE BIOTRANSFORMAÇÃO.	30
FIGURA 6. GRÁFICO DO TOTAL DE PUBLICAÇÕES SOBRE DRIED URINE SPOTS DE 1987-2020.	39
FIGURA 7. ESQUEMA DE UTILIZAÇÃO DO DRIED URINE SPOTS.	41
FIGURA 8. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE UM ESPECTRÔMETRO DE MASSAS.	43
FIGURA 9. FLUXOGRAMA DE ANÁLISE DE DRIED MATRIX SPOTS POR GC-MS, LC-MS E PS- MS.	48
FIGURA 10. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA IONIZAÇÃO POR PAPER SPRAY EM DRIED URINE SPOTS.	49
FIGURA 11. DISPOSITIVO DE IONIZAÇÃO POR PAPER SPRAY.	58
FIGURA 12. RESULTADOS OBTIDOS POR INJEÇÃO DIRETA DA SUBSTÂNCIA TESTOSTERONA C ¹³	60
FIGURA 13. CRONOGRAMA OBTIDO POR PS-MS.	61
FIGURA 14. ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS ESTEROIDES ANABÓLICOS ANDROGÊNICOS UTILIZADOS NESTE ESTUDO.	62
FIGURA 15. ESPECTROS DE MASSAS NO MODO MRM DAS SUBSTÂNCIAS DESTE ESTUDO EM ANÁLISE POR PS-MS.	63
FIGURA 16. FLUXOGRAMA DO PREPARO DE AMOSTRA EM DRIED URINE SPOTS E ANÁLISE POR PS-MS.	66
FIGURA 17. CRONOGRAMA E ESPECTRO MRM DA ANÁLISE DE EPITESTOSTERONA POR PS- MS NO WHATMAN 903 E NO PAPEL DE FILTRO, RESPECTIVAMENTE.	71
FIGURA 18. CRONOGRAMAS DA OTIMIZAÇÃO DO SOLVENTE DE PULVERIZAÇÃO COM ACETONITRILA E METANOL.	74

FIGURA 19. VOLUMES DE SOLVENTE DE PULVERIZAÇÃO TESTADOS PARA EXTRAÇÃO DE EAAS POR PS-MS.	76
FIGURA 20. TESTE DA IMPREGNAÇÃO DO PI EM URINA E NO PAPEL DE FILTRO.	77
FIGURA 21. INTENSIDADES ABSOLUTAS DOS EAAS NO ESTUDO DE REUSO NO TEMPO ZERO E PÓS 2 HORAS DE SECAGEM, RESPECTIVAMENTE.....	78
FIGURA 22. CURVA DE LINEARIDADE PARA ESTEROIDES ANABÓLICOS ANDROGÊNICOS EM DRIED URINE SPOTS POR PS-MS.	86
FIGURA 23. CURVA DE LINEARIDADE PARA ESTEROIDES ANABÓLICOS ANDROGÊNICOS EM DRIED URINE SPOTS POR PS-MS.	87
FIGURA 24. ESTUDO DA ESTABILIDADE DOS ESTEROIDES ANABÓLICOS ANDROGÊNICOS EM DRIED URINE SPOTS.....	96
FIGURA 25. CRONOGRAMAS OBTIDOS NO ENSAIO DE CARRYOVER.	98

Lista de Quadros

QUADRO 1. ESTEROIDES ANABÓLICOS ANDROGÊNICOS E SEUS PRODUTOS DE BIOTRANSFORMAÇÃO.	31
QUADRO 2. ESTEROIDES ANABÓLICOS ANDROGÊNICOS MAIS UTILIZADOS DE ACORDO COM O PADRÃO DE USO.	34
QUADRO 3. SOLVENTES UTILIZADOS PARA OTIMIZAÇÃO DO SOLVENTE DE PULVERIZAÇÃO.	64
QUADRO 4. POSSÍVEIS INTERFERENTES ENDÓGENOS E EXÓGENOS PARA ANÁLISE DE EAAS POR PS-MS.	80
QUADRO 5. AMOSTRAS POSITIVAS PARA PELO MENOS UM DOS ANALITOS DESTE ESTUDO.	101

Lista de Tabelas

TABELA 1. PADRÕES DE USO MAIS FREQUENTES DE ESTEROIDES ANABÓLICOS ANDROGÊNICOS.	32
TABELA 2. PARÂMETROS DO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS.	58
TABELA 3. OTIMIZAÇÃO DOS COMPOSTOS POR INJEÇÃO DIRETA: ÍON PRECURSOR, ÍON PRODUTO, ENERGIA DE COLISÃO (CE), MODO DE IONIZAÇÃO E DWELL TIME.	59
TABELA 4. FATORES OBSERVADOS NA OTIMIZAÇÃO DO SOLVENTE NO PS-MS.	74
TABELA 5. LIMITES DE DETECÇÃO (LOD) PARA ESTEROIDES ANABOLIZANTES ANDROGÊNICOS EM DRIED URINE SPOTS POR PS-MS.	83
TABELA 6. EQUAÇÕES DA RETA, COEFICIENTES DE DETERMINAÇÃO (R^2) E FATORES DE PONDERAÇÃO PARA ESTEROIDES ANABÓLICOS ANDROGÊNICOS.	85
TABELA 7. DADOS DE EXATIDÃO DE DETECÇÃO DE ESTEROIDES ANABÓLICOS ANDROGÊNICOS EM DRIED URINE SPOTS POR PS-MS.	88
TABELA 8. DADOS DE PRECISÃO INTRADIA E INTERDIA PARA DETECÇÃO DE ESTEROIDES ANABÓLICOS ANDROGÊNICOS EM DRIED URINE SPOTS POR PS-MS.	89
TABELA 9. EFEITO MATRIZ EM AMOSTRAS DE DRIED URINE SPOTS POR PS-MS EM PORCENTAGEM.	92
TABELA 10. CARRYOVER EM AMOSTRAS DE DUS POR PS-MS.	99

Sumário

Dedicatória	5
Apoio Financeiro.....	6
Agradecimentos.....	7
Epígrafe	9
Resumo.....	10
Abstract	11
Lista de Abreviaturas	12
Lista de Figuras	15
Lista de Quadros	17
Lista de Tabelas.....	18
1. Introdução	21
1.1 Doping no esporte	21
1.2. Esteroides anabólicos androgênicos.....	26
1.2.1 Epidemiologia do uso de esteroides anabólicos androgênicos.....	32
1.2.2 Efeitos tóxicos do uso de esteroides anabólicos androgênicos	35
1.3. Análises toxicológicas e matrizes biológicas alternativas.....	37
1.3.1. <i>Dried Urine Spots</i>	38
1.4. Métodos cromatográficos	42
1.5. Espectrometria de massas.....	42
1.6. Técnicas de ionização ambiente.....	44
1.6.1. Ionização por <i>paper spray</i>	45
1.7. Métodos de detecção de esteroides anabólicos androgênicos	50
2. Objetivo	55
3. Materiais e Métodos.....	56
3.1. Materiais.....	56
3.1.2. Coleta de amostras	57
3.2. Métodos.....	57
3.2.1. <i>Condições espectrométricas para a detecção de EAAs por PS-MS</i>	57
3.2.2 <i>Otimização do papel</i>	63
3.2.3. <i>Otimização do solvente de pulverização</i>	64
3.2.4. <i>Otimização da adição do padrão interno no papel e em urina</i>	65
3.2.5. <i>Estudo de reuso</i>	65

3.2.6.	<i>Extração de EAA por PS-MS e hidrólise enzimática</i>	65
3.2.7.	<i>Validação de método analítico para detecção de esteroides anabólicos androgênicos em dried urine spots por ionização por paper spray</i>	66
3.2.7.1.	<i>Seletividade</i>	67
3.2.7.2.	<i>Limite de detecção e limite de quantificação</i>	67
3.2.7.3.	<i>Linearidade</i>	67
3.2.7.4.	<i>Precisão inter e intradia</i>	68
3.2.7.5.	<i>Exatidão</i>	68
3.2.7.6.	<i>Efeito matriz</i>	69
3.2.7.7.	<i>Estabilidade</i>	69
3.2.7.8.	<i>Carryover</i>	69
3.2.8.	<i>Aplicação do método de screening de EAAs em DUS por PS-MS em amostras reais</i>	70
4.	Resultados e discussão	71
4.1.	<i>Otimização do papel</i>	71
4.2.	<i>Otimização do solvente de pulverização</i>	73
4.3.	<i>Otimização da adição do padrão interno no papel e em urina</i>	76
4.4.	<i>Estudo de reuso</i>	78
4.5.	<i>Validação de método analítico para detecção de esteroides anabólicos androgênicos em dried urine spots por ionização por paper spray</i>	79
4.5.1.	<i>Seletividade</i>	79
4.5.2.	<i>Limites de detecção (LOD) e limites de quantificação (LOQ)</i>	82
4.5.3.	<i>Linearidade</i>	84
4.5.4.	<i>Exatidão</i>	88
4.5.5.	<i>Precisão intra e interdia</i>	88
4.5.6.	<i>Efeito matriz</i>	90
4.5.7.	<i>Estabilidade</i>	94
4.5.8.	<i>Carryover</i>	97
4.6.	<i>Aplicação do método de screening de EAAs em DUS por PS-MS em amostras reais</i>	100
5.	Conclusão	104
	Referências bibliográficas:	105
	ANEXO 1 – ESTEROIDES ANABÓLICOS ANDROGÊNICOS PROIBIDOS PELA WADA	117
	ANEXO 2 - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA	125
	ANEXO 2 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE	129
	ANEXO 3 - ASSIST 2.0 ADAPTADO	132
	ANEXO 4 – CURRÍCULO LATTES	136

1. Introdução

O abuso de drogas se caracteriza pelo uso nocivo de substâncias psicoativas, incluindo álcool e drogas ilícitas que podem levar à dependência, e conseqüentemente, ao aumento da morbidade, mortalidade prematura, diminuição da produtividade, problemas sociais, familiares, educacionais e ocupacionais, além de aumentar os custos significativamente para a sociedade (WHO, 2019a). O uso recreativo de medicamentos que necessitam de prescrição médica tem atingido proporções epidêmicas em todo o mundo. Aproximadamente 269 milhões de pessoas entre 15 e 64 anos, cerca de 5,4% da população mundial, utilizaram algum tipo de droga em 2018. Dentre essas, 11,3 milhões utilizaram algum tipo de substância injetável e cerca de 35 milhões de pessoas apresentam algum tipo de transtorno relacionado ao uso de drogas. De acordo com a *United Nations Office on Drugs and Crime* (UNODC), 585 mil pessoas morreram em 2017 em decorrência do uso de substâncias ilícitas, incluindo overdose, HIV (*Human Immunodeficiency Virus*) e hepatite C adquiridas pelo compartilhamento de agulhas (UNODC, 2020; WHO, 2019b).

1.1 Doping no esporte

A utilização de substâncias ergogênicas e estimulantes para aumentar o desempenho de atletas em competições é conhecida desde a antiguidade. O uso de Ma Huang, obtido da planta Ephedra, foi o primeiro indício de doping documentado em uma pintura do imperador chinês Shen-Nung em 2737 A.C (DE ROSE, 2008; MÜLLER, 2010). Na mitologia norueguesa, a bufotenina, extraída da pele de sapo ou de um tipo de cogumelo alucinógeno, era utilizada para aumentar a força dos competidores. Em 300 A.C., os hunos comiam testículos antes de batalhas para aumentar a virilidade e os gregos antigos usavam poções de vinho e conhaque nos treinos. Porém, o uso foi dissipado após a observação do comportamento de animais castrados que podiam ser domesticados após o procedimento cirúrgico. Durante o Império Romano, algumas substâncias eram utilizadas com o objetivo de diminuir a fadiga e traumas. Entretanto, o *doping* era proibido assim como hoje, sendo que penas como morte eram aplicadas para os atletas (DOTSON & BROWN, 2007; HOLT; EROKORITOU-MULLIGAN; SÖNKSEN, 2009; MÜLLER, 2010; VLAD *et al.*, 2018).

A palavra *doping* tem sua origem provavelmente no dialeto sul-africano, na qual o “doop”, uma infusão de ervas, era utilizada em festividades religiosas. Guerreiros Zulu

preparavam o “dope” a partir de resíduos de uvas em lutas e cerimônias religiosas e durante a construção de um canal na Holanda, os construtores utilizavam o termo “doopen” quando queriam aumentar a capacidade de trabalho. Somente em 1889 o termo “doping” foi incluído no dicionário inglês referindo-se às substâncias utilizadas para estimular cavalos (DE ROSE, 2008; MÜLLER, 2010).

Apesar de ter relatos sobre o *doping* e a sua proibição durante a antiguidade, não há muitas informações sobre o seu uso entre as Olimpíadas da Grécia e a Idade Média até o século XIX, coincidindo com o desenvolvimento da medicina e da farmacologia moderna nessa época. Na América Latina, substâncias como a cafeína, cocaína, estricnina, e bebidas como o chá mate, eram utilizados para aumentar o desempenho. Há relatos do uso de chá de coca pelos incas para correr a distância entre Quito e Cusco no Equador (DE ROSE, 2008; HOLT; EROTOKRITOU-MULLIGAN; SÖNKSEN, 2009; MÜLLER, 2010).

Os Jogos Olímpicos modernos foram inaugurados em 1896 em Atenas, na Grécia. No mesmo ano, o fisiologista Oskar Zoth publicou pela primeira vez um artigo propondo o uso de um extrato com hormônios sexuais em atletas, alegando que o mesmo poderia aumentar a força muscular, o desempenho e o aparato neuromuscular. Dez anos antes ocorreu a primeira morte relacionada ao *doping*, na qual um ciclista faleceu após uma overdose de cafeína em uma prova realizada na França (DOTSON & BROWN, 2007; DE ROSE, 2008; MÜLLER, 2010).

Durante os Jogos Olímpicos de Berlim em 1936 e a Segunda Guerra Mundial, existiam rumores de uso de testosterona pelos soviéticos para melhorar o desempenho atlético e dos soldados nazistas, com o objetivo de aumentar a agressividade das tropas, principalmente no *front* oriental. Apesar disso, não há menção na literatura do uso desse hormônio como ergogênico durante as Olimpíadas. Nessa época iniciou-se a comercialização dos Jogos Olímpicos, enaltecendo as vitórias sob a competição (BEAMISH & RITCHIE, 2005; YESALIS & BAHRKE, 2005; DE ROSE, 2008).

Fisiculturistas e atletas da costa leste dos Estados Unidos começaram a utilizar testosterona no final da década de 40 com o objetivo de aumentar a massa muscular e intensificar os protocolos de treinamento, porém somente em 1958 que a metandrostenolona foi aprovada pela *U.S. Food and Drug Administration* (FDA). Atletas olímpicos da União Soviética e da Alemanha Oriental já faziam o uso de esteroides anabólicos androgênicos (EAA) na década de 50. Após a queda do Muro de Berlim, o programa de aumento de desempenho da Alemanha Oriental, marcado pela administração de anabolizantes e estimulantes em jovens atletas, foi descoberto. O uso sistemático de

anabolizantes no esporte é atribuído, principalmente, a administração dessas drogas pelas equipes de levantamento de peso soviéticas durante a década de 50 (YESALIS & BAHRKE, 2005; BARON; MARTIN; MAGD, 2007; DOTSON & BROWN, 2007).

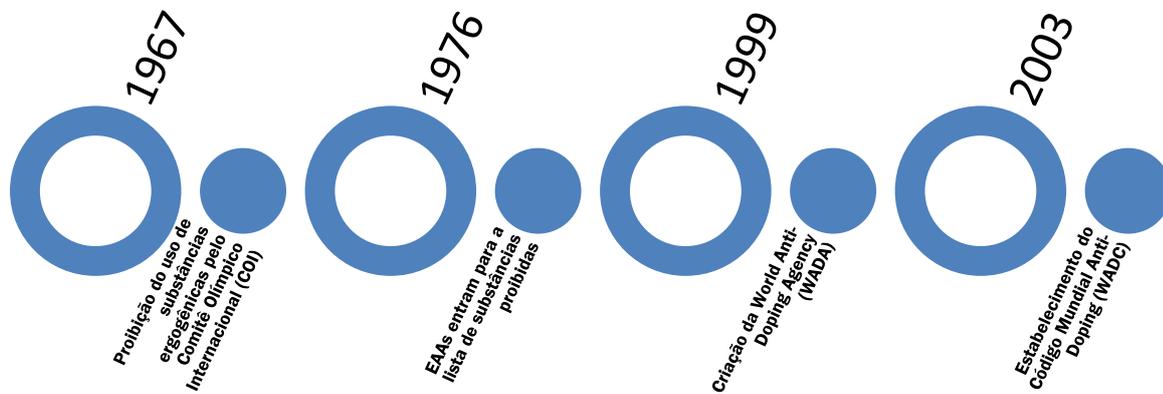
Em 1957, a Associação Médica Americana se posicionou contra o *doping* em resposta à difusão do uso de substâncias ergogênicas e fármacos estimulantes, porém existiam médicos que se demonstravam a favor do uso, visto que no final da década de 60, os EAA já estavam bem difundidos em esportes como futebol americano, levantamento e arremesso de peso (HOBERTMAN, 2002).

A *International Athletic Federation* (IAAF) foi a primeira a proibir o uso de estimulantes em 1928, porém ainda não existiam testes possíveis para verificar o *doping* nos atletas (MÜLLER, 2010). Nas Olimpíadas de Tóquio em 1964 foram testadas amostras de ciclistas em algumas competições, mas devido às limitações, não foi totalmente implementado. Albert Dirix escreveu uma carta para o presidente do *International Olympic Committee* (IOC) exigindo ações contra o *doping* após esse ocorrido (DE ROSE, 2008).

Os primeiros testes de detecção de esteroides anabólicos androgênicos foram realizados em 1974 por Raymond Brooks em Londres. O uso de substâncias ergogênicas, como fármacos estimulantes e narcóticos analgésicos no esporte, foi proibido em 1967 pelo IOC, mas somente em 1976, após o surgimento do radioimunoensaio, os EAA entraram para a lista de substâncias proibidas. O monitoramento fora de competições iniciou-se em 1988 após observar que muitos atletas pararam o uso de EAA 15 dias antes do início das Olimpíadas de Seul (CAMPOS *et al.*, 2005; DE ROSE, 2008; ATHANASIADOU *et al.*, 2012).

A *World Anti-Doping Agency* (WADA) foi criada em 1999 durante a Conferência Mundial do Doping no Esporte após a descoberta de grandes quantidades de drogas ergogênicas pela polícia francesa na Tour de France realizada no ano anterior, com o intuito de monitorar a nível internacional o *doping* no esporte. A WADA teria como missão trabalhar independente do IOC, organizações esportivas e do governo contra o *doping*. Em 2003, foi estabelecido o *World Anti-Doping Code* (WADC) que é constituído por regras que são aceitas por aproximadamente setecentas organizações de esporte no mundo (Figura 1) (BARON; MARTIN; MAGD, 2007; RABIN, 2011).

Figura 1. Linha do tempo do estabelecimento do Código Mundial Anti-Doping.



Fonte: Elaborado pela autora.

Os fatores psicológicos e sociais do abuso de substâncias ergogênicas estão relacionados principalmente com a evolução do esporte moderno e o aumento considerável do capital aplicado ao esporte. A pressão do meio esportivo, patrocinadores, mídia e as questões pessoais levam os atletas a buscarem o *doping* como alternativa, principalmente quando todos os métodos legais já foram utilizados e o mesmo já atingiu o ápice do seu desempenho (GUEZENNEC, 2001; HOLT; EROTKRITOU-MULLIGAN; SÖNKSEN, 2009).

Atualmente o *doping* pode ser definido como a ocorrência de uma ou mais violações das regras *antidoping* dos artigos 2.1 ao 2.10 do *World Anti-Doping Code* como a presença de uma substância proibida ou seus produtos de biotransformação ou marcadores na amostra; tentativa de uso; uso por um atleta de uma substância proibida ou um método proibido; evitar, recusar ou não se submeter a coleta de amostra, falhas de localização, adulteração ou tentativa de adulteração de qualquer parte do controle de dopagem; posse de substância proibida ou método proibido; tráfico ou tentativa de tráfico de qualquer substância proibida ou método proibido; administração ou tentativa de administração a qualquer atleta em competição de qualquer substância proibida ou método proibido, ou administração ou tentativa de administração a qualquer atleta fora de competição de

qualquer substância proibida ou qualquer método proibido que seja proibido fora de competição; cumplicidade e associação proibida (WADA, 2019d).

A lista de substâncias proibidas da WADA compreende os esteroides anabólicos androgênicos, assim como hormônios, agonistas beta-2, agentes com atividade antiestrogênica, diuréticos, estimulantes, narcóticos, canabinoides e glicocorticosteroides (WADA, 2020). Os EAAs exógenos e endógenos e outros agentes anabólicos são proibidos pela WADA dentro e fora das competições (ANEXO 1).

Além dessas substâncias, também são proibidos métodos que aumentam a taxa de oxigênio sanguínea, adulteração e substituição de amostras e dopagem genética (WADA, 2020).

O *doping* se consolidou como uma rede internacional clandestina de distribuição de alternativas para o aumento de desempenho na indústria do esporte. Muitas dessas substâncias são produzidas com indicações específicas pelas indústrias farmacêuticas, mas o meio esportivo acaba aplicando de outras formas, principalmente devido ao capital gerado para aqueles que vencem as competições. Esse mercado clandestino gera mais de 1.4 bilhões de dólares/ano e continua crescendo com o desenvolvimento e venda de novas substâncias, demonstrando um problema grave de saúde pública. Além disso, existe também a falsificação desses medicamentos que muitas vezes não contém a substância indicada, possuem alto grau de impurezas e são potencialmente prejudiciais à saúde (GUEZENNEC, 2001; BARON; MARTIN; MAGD, 2007).

O controle *antidoping* permitiu não somente testar as amostras dos atletas, mas também a natureza e a frequências das substâncias utilizadas (GUEZENNEC, 2001). As análises toxicológicas constam como a maneira mais eficaz de minimizar o *doping* no esporte. O material é fornecido pelo atleta durante as competições ou treinamentos e previne que os competidores alcancem uma vantagem competitiva devido ao uso de EAA (CAMPOS *et al.*, 2005; ANAWALT, 2017). Apesar disso, a prevalência de uso de substâncias ergogênicas por atletas nas competições é desconhecida. Cerca de 1% dos testes realizados em laboratórios acreditados pela WADA são positivos, mas isso se dá devido aos cuidados para evitar resultados falso-positivos (HOLT; EROKROUITOU-MULLIGAN; SÖNKSEN, 2009).

Em 2016, a WADA trouxe à tona o esquema de *doping* utilizado pela federação da Rússia, juntamente com o governo, a agência *antidoping* russa (RUSADA, do inglês *Russian Anti-Doping Agency*) e atletas, principalmente durante as Olimpíadas de Inverno de Sochi. Esse documento, chamado de “The MacLaren Report”, levou ao banimento de

vários atletas das Olimpíadas e Paraolimpíadas de 2016. No ano seguinte, o IOC baniu o país das Olimpíadas de Inverno da Coreia em 2018 e, também, o primeiro ministro e o ex-ministro dos esportes, Vitaly Mutko. Esse sistema impedia que atletas usuários de substâncias proibidas, tivessem suas amostras identificadas como positivas durante os exames *antidoping* (DUVAL, 2017; ALTUKHOV & NAURIGHT, 2018). Em dezembro de 2019, a Rússia foi banida pela WADA por um período de 4 anos dos Jogos Olímpicos da Juventude, dos Jogos Olímpicos e Paraolímpicos, qualquer outro evento organizado por organizações de eventos esportivos e qualquer campeonato mundial organizado ou sancionado (WADA, 2019a).

1.2. Esteroides anabólicos androgênicos

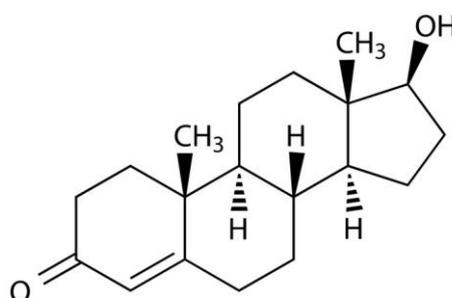
Os esteroides anabólicos androgênicos, popularmente conhecidos como “anabolizantes”, se caracterizam como substâncias naturais, sintéticas ou semissintéticas semelhantes ao hormônio masculino testosterona, que a partir de mudanças em sua estrutura molecular diminuem os efeitos androgênicos e aumentam os efeitos anabólicos (CAMPOS *et al.*, 2005; KICMAN, 2010; BARBALHO & BARREIROS, 2015; ARAZI; MOHAMMADJAFARI; ASADI, 2017). A estrona foi o primeiro hormônio sexual isolado em 1929 pelo químico alemão Adolf Butenandt, a partir da urina de uma mulher grávida. Alguns anos depois, ele isolou androsterona da urina de policiais do sexo masculino, porém a estrutura molecular da testosterona foi elucidada somente em 1935 por Ruzicka e Wettstein (SCHÄNZER, 1996; DOTSON & BROWN, 2007).

O médico austríaco Eugen Steinach desenvolveu uma cirurgia simples na qual ele ligava os canais deferentes na parte mais proximal dos testículos, aumentando assim a produção de testosterona pelas células intersticiais. A cirurgia de Steinach aumentava o crescimento de cabelo e a libido, melhorava as ereções e diminuía a ejaculação precoce. Na década de 20, o médico Sergio Voronoff removia os testículos de animais e os transplantava em homens (DOTSON & BROWN, 2007).

A testosterona (Figura 2) é o principal hormônio esteroide androgênico produzido pelas células de Leydig, localizadas nos testículos. A sua síntese é regulada pelo eixo hipotálamo-hipófise anterior e testículos por feedback negativo, na qual o hipotálamo secreta o hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH), estimulando a hipófise anterior a liberar o hormônio luteinizante (LH) e o hormônio folículo estimulante (FSH). O LH é

responsável pela produção de testosterona por esteroidogênese a partir do estímulo das células de Leydig, enquanto o FSH estimula as células de Sertoli a produzir espermatozoides. Quando há aumento da testosterona circulante, o hipotálamo e a hipófise anterior diminuem a liberação de GnRH. Porém, se a concentração de testosterona estiver muito baixa, há um estímulo para a liberação de GnRH e, conseqüentemente, da produção de testosterona (SMITH *et al.*, 1985; KAM & YARROW, 2005; KICMAN, 2010).

Figura 2. Estrutura química da testosterona.

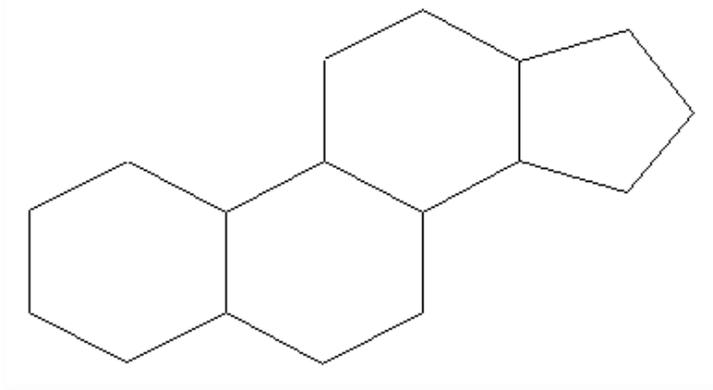


Fonte: Elaborado pela autora.

A produção diária de testosterona em homens varia de 3 a 7 mg/dia. Este hormônio também é sintetizado em pequenas quantidades pelos ovários em mulheres (0,1-0,4 mg/dia) e pelo córtex da suprarrenal em ambos os sexos, sendo derivado do colesterol. É biotransformado em deidroepiandrosterona (DHEA), androstenediona, e posteriormente, em testosterona nos testículos (KICMAN, 2010; LIPPI; FRANCHINI; BANFI, 2011)

A estrutura molecular dos EAA é composta por esteroides C₁₉ e quatro anéis hidratados, denominada de ciclopentano-peridro-fenantreno (Figura 3). Eles são derivados da testosterona e a sua atividade androgênica e anabólica está relacionada com os grupos funcionais presentes na molécula (RUBINOW & SCHMIDT, 1996; KICMAN, 2010).

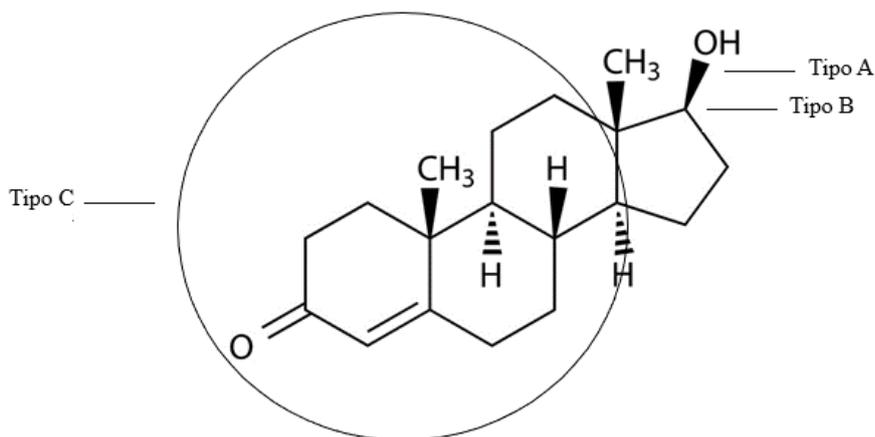
Figura 3. Esqueleto da estrutura dos esteroides anabólicos androgênicos.



Fonte: Elaborado pela autora.

Algumas modificações estruturais foram implementadas na molécula da testosterona com o intuito de maximizar os efeitos anabólicos e diminuir os efeitos androgênicos dos EAAs. Elas podem ser classificadas em três tipos: (A) esterificação do grupo 17β hidroxil; (B) alquilação na posição 17α ; (C) modificação na estrutura do anel (WILSON, 1988; KICMAN, 2008). (Figura 4).

Figura 4. Modificações estruturais na molécula da testosterona.



Fonte: Elaborado pela autora.

Os EAA são utilizados clinicamente para tratar diferentes doenças como terapia de reposição hormonal para estimular o desenvolvimento sexual na puberdade tardia em homens e aumentar a libido em mulheres, anemia, prevenção ao câncer de mama em mulheres na pré-menopausa, osteoporose e estimulação do crescimento em homens

(MOTTRAM, 2011). Principalmente a partir da década de 1960 propagou-se o uso não terapêutico por atletas de elite e fisiculturistas, com o intuito de melhorar o desempenho físico e aumentar a massa muscular. Somente na década de 80 começaram a ser reportados o uso dessas substâncias por jovens atletas fora do circuito das Olimpíadas (BARON; MARTIN; MAGD, 2007; ABRAHIN; SOUSA; SANTOS, 2014; SAGOE *et al.*, 2014).

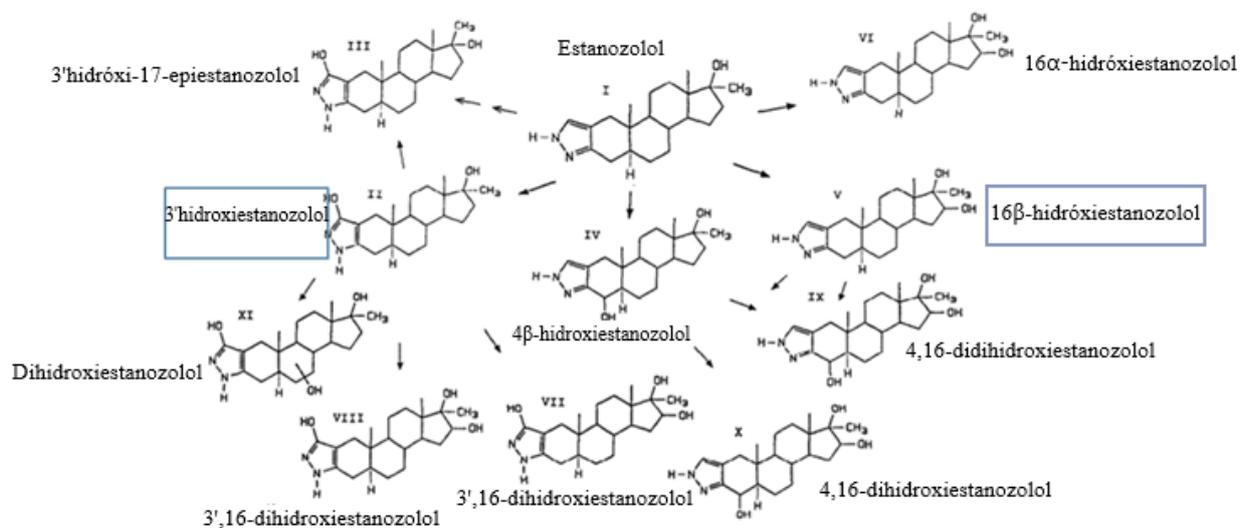
Os efeitos anabólicos são caracterizados pelo crescimento, aumento do tamanho do músculo, metabolismo ósseo e síntese de proteínas e colágeno. Já o androginismo é caracterizado pelo aparecimento das características sexuais masculinas secundárias, como padrão de crescimento do cabelo, maturação dos espermatozoides e libido (EL OSTA *et al.*, 2016).

Os EAA podem ser divididos em dois grupos: andrógenos aromatizantes, que são derivados diretos da testosterona, e não aromatizantes. Devido ao substrato para aromatase (CYP19), um grupo metil dos aromatizantes é removido da molécula. Já os não aromatizantes são modificados para que um dos carbonos não seja reconhecido, evitando a sua aromatização para estrogênio. Estes são preferidos pelos fisiculturistas, pois diminuem os efeitos do estrogênio que podem levar a ginecomastia (KICMAN, 2010; GOLDMAN & BASARIA, 2017).

O mecanismo de ação dos EAA se dá pela modulação da expressão do receptor androgênico, na qual ao se ligar, promove um balanço de nitrogênio positivo, levando ao aumento da síntese proteica. A hipertrofia muscular esquelética pode ocorrer pela ativação de células satélites, aumentando o número de núcleos da fibra muscular, tornando o músculo mais suscetível aos agentes anabólicos (KAM & YARROW, 2005; ROCHA *et al.*, 2007).

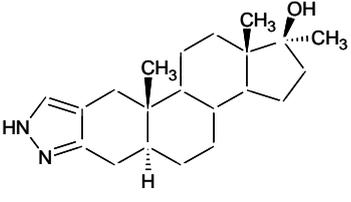
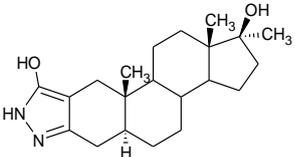
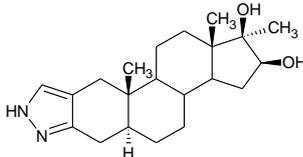
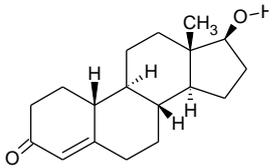
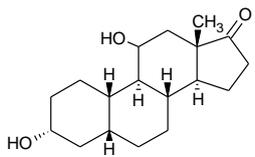
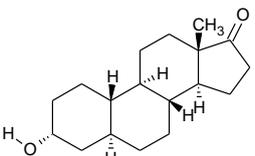
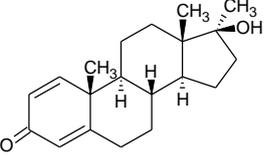
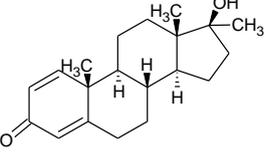
A administração dessas substâncias pode ser por via oral e/ou parenteral, a partir de injeções intramusculares ou transdérmicas, além de algumas formulações em gel, creme ou adesivo (FRATI *et al.*, 2015; NIDA, 2016). Quando administrada oralmente, a testosterona é rapidamente absorvida e biotransformada no fígado em produtos de biotransformação de fase I, devido a oxidação do grupo 17β -hidroxil em androstenediona. Ocorre, também, redução do anel A para produção da 5α -androstanoediona e 5β -androstanoediona e formação dos produtos de biotransformação tetra-hidroxi-17-esteroide, androsterona, eticolanolona e epiandrosterona a partir da ação da 3α e 3β -hidroxiesteroide. A figura abaixo apresenta como exemplo a biotransformação do estanozolol (Figura 5) e no quadro 1 pode-se observar alguns esteroides anabólicos androgênicos e seus produtos de biotransformação.

Figura 5. Biotransformação do estanozolol e seus principais produtos de biotransformação.



Fonte: Adaptado de Schänzer; Opfermann; Donike, 1990.

Quadro 1. Esteroides Anabólicos Androgênicos e seus produtos de biotransformação.

Esteróide Anabólico Androgênico	Produto de biotransformação
 <p data-bbox="446 739 558 772">Estanozolol</p>	 <p data-bbox="1005 560 1165 593">3-hidroxiestanozolol</p>  <p data-bbox="981 840 1189 873">16-beta-hidroxiestanozolol</p>
 <p data-bbox="438 1288 550 1321">Nandrolona</p>	 <p data-bbox="997 1153 1173 1187">19-noreticolanolona</p>  <p data-bbox="1005 1489 1173 1523">19-norandrosterona</p>
 <p data-bbox="414 1747 590 1780">Metandrostenolona</p>	 <p data-bbox="885 1736 1308 1769">17-beta-hidroxi-17-metilandrosta-1,4-dien-3-ona</p>

Fonte: Elaborado pela autora.

As substâncias excretadas na urina estão conjugadas, em sua maioria, com ácido glicurônico a partir de reações de fase II. Algumas substâncias como o DHEA, podem ser

conjugadas com sulfatos no intuito de aumentar a solubilidade em água (KICMAN, 2010; LIPPI; FRANCHINI; BANFI, 2011).

Os padrões de uso mais frequentes dos esteroides anabólicos androgênicos são os ciclos, *stacking* e pirâmide. O ciclo se caracteriza pelo uso intermitente, na qual o usuário consome a droga por 4 a 12 semanas e interrompe o seu uso por 4 a 6 semanas, devido à crença de que as pausas previnem a dessensibilização de grandes doses de EAA. O *stacking* refere-se ao uso simultâneo com aumento progressivo da dose de dois ou mais tipos de EAA orais ou injetáveis em curto prazo, enquanto na pirâmide, o indivíduo aumenta a dose ao longo do ciclo até alcançar doses suprafisiológicas, seguidas por diminuição progressiva (ROCHA; AGUIAR; RAMOS, 2014). A tabela abaixo apresenta os padrões de uso mais frequentes para EAA (Tabela 1).

Tabela 1. Padrões de uso mais frequentes de esteroides anabólicos androgênicos.

Ciclo	Uso intermitente
	4 a 12 semanas
	Interrupção do uso por 4 a 6 semanas
Stacking	Uso simultâneo com aumento progressivo da dose de 2 ou mais EAA
Pirâmide	Aumento até alcançar doses suprafisiológicas
	Diminuição progressiva da dose

Fonte: ROCHA; AGUIAR; RAMOS, 2014.

1.2.1 Epidemiologia do uso de esteroides anabólicos androgênicos

Com a constante busca pelo corpo perfeito, tem-se aumentado o uso indiscriminado dessas drogas por atletas amadores e fisiculturistas para fins estéticos e não com objetivo de melhorar o desempenho físico no esporte (PARKINSON & EVANS, 2006; BARBALHO & BARREIROS, 2015). Um estudo realizado em 2014 demonstrou que a prevalência mundial de uso de EAA para o gênero masculino foi de 6,4% e 1,6% para o gênero feminino (SAGOE *et al.*, 2014).

Estima-se que cerca de 3 milhões de pessoas fazem o uso de EAA nos Estados Unidos e que aproximadamente 3% dos jovens já utilizaram esse tipo de substância alguma vez na vida (PARKINSON & EVANS, 2006). O uso de EAAs em adolescentes tem sido observado para fins estéticos, e também, com o objetivo de obter bolsas de estudo para atletas em universidades (DENHAM, 2006). A competição entre adolescentes para a obtenção dessas bolsas, aumenta a probabilidade de uso de EAAs para aumentar o desempenho no esporte (HUMPHREYS & RUSESKI, 2014). Alunos do 12º ano do ensino médio apresentam prevalência maior de uso de esteroides anabólicos androgênicos do que alunos do 8º e 10º ano no período entre 2007 e 2017 nos Estados Unidos (NIDA, 2020).

O III Levantamento Nacional sobre o Uso de Drogas pela População Brasileira identificou que o uso de esteroides anabolizantes não prescritos por indivíduos entre 12 e 65 anos teve prevalência de 8,4%, sendo que a o uso na vida teve prevalência de 1,1% e nos últimos doze meses de 0,2%. A percepção de risco entre a população estudada, demonstra que a maioria considera como risco grave o uso em forma frequente (uma a duas vezes por semana), porém esse número cai quando associado ao uso eventual dessas substâncias (uma a duas vezes na vida). Homens entre 18 e 34 anos não consideram, com maior frequência, que há risco no uso de EAAs (ICICTC, FIOCRUZ, 2017).

Parkinson *et al.* (2006) relataram em um estudo feito com 500 indivíduos que aproximadamente 60% dos entrevistados faziam uso de doses semanais de 1000mg de testosterona ou equivalente, sendo a maioria (79%) fisiculturistas e atletas amadores.

Em um estudo realizado em Belém, PA, foi analisada a prevalência de uso em professores e estudantes de educação física que atuam em academias de ginástica, demonstrando que 31,6% desses indivíduos faziam a utilização indiscriminada de EAA (ABRAHIN; SOUSA; SANTOS, 2014). Em outro estudo realizado em João Pessoa, PB, a prevalência de uso entre fisiculturistas foi de 20,6%, sendo a maioria homens jovens (NOGUEIRA *et al.*, 2014). O uso de EAAs entre mulheres no Brasil é de 13,3%, sendo que as substâncias mais utilizadas são o estanozolol e a oxandrolona (ABRAHIN *et al.*, 2017).

Um estudo realizado por Wintermantel e colaboradores em 2016, compilou em uma base de dados, informações sobre a Violação de Regras Anti-Doping (ADRV) no período de 2000 a 2013. Foram 1236 ocorrências, sendo que o uso de EAAs foi o mais frequente (38%), seguido por dopagem sanguínea (15,3%) e uso de estimulantes (14,2%), em sua maioria na Rússia, Estados Unidos e Itália.

O relatório de Violação de Regras Anti-Doping de 2017 demonstrou, que das 245.232 amostras analisadas por laboratórios acreditados, 1459 foram categorizadas como achado analítico adverso, que se refere a violação do artigo 2.1 do WADC (presença de substância proibida ou de seus produtos de biotransformação). Dessas amostras, 78% eram de atletas do sexo masculino. Os esportes com maiores números de ADRV foram fisiculturismo, atletismo e ciclismo. Esses atletas são de 111 nacionalidades, em sua maioria da Itália (21%), França (15%), Estados Unidos (12%), Brasil (10%) e Rússia (10%) (WADA, 2019c). Alguns dos EAA mais utilizados por via oral e injetáveis estão listados no quadro abaixo (Quadro 2).

Quadro 2. Esteroides anabólicos androgênicos mais utilizados de acordo com o padrão de uso.

Uso oral	Injetáveis
Estanozolol	Estanozolol
Mesterolona	Decanoato de nandrolona
Metandienona	Propionato de drostanolona
Metenolona	Enantato de metenolona
Metandrostenolona	Fenpropionato de nandrolona
Metiltestosterona	Undecanoato de nandrolona
Acetato de metenolona	Cipionato de testosterona
Oxandrolona	Propionato de testosterona
Oximetolona	Acetato de trembolona

Fonte: SOLIMINI *et al.*, 2017.

Um estudo realizado no Centro de Pesquisa para Abuso de Hormônios na Suécia traçou os principais perfis de usuários de esteroides anabólicos androgênicos. Eles podem ser divididos em três grupos: atletas, jovens que possuem objetivos estéticos e criminosos.

Os atletas fazem uso de EAA com o objetivo de melhorar seu desempenho nas competições ou no fisiculturismo; homens jovens recorrem a essas substâncias para melhorar o aspecto físico e aumentar a massa muscular e os criminosos almejam não só aumentar a massa muscular, mas também a agressividade (EHRNBORG & ROSÉN, 2009).

Indivíduos usuários de EAA frequentemente fazem o uso de outras drogas como estimulantes, opioides e hormônios do crescimento para minimizar os efeitos adversos dos esteroides anabólicos androgênicos e, também, aumentar a sua eficácia. O policonsumo de drogas é comum em cerca de 50% dos usuários (SKARBERG; NYBERG; ENGSTROM, 2009; GRÖNBLADH; NYLANDER; HALLBERG, 2016). Um estudo feito em 2009 demonstrou que as drogas mais utilizadas são maconha, anfetamina e ecstasy, além de estimulantes, sedativos e álcool. Os motivos para a sua utilização são variados, sendo que os hormônios são frequentemente administrados para aumentar a massa muscular e força; estimulantes para queimar gorduras, aumentar a resistência, relaxamento e melhora do sono; sedativos e antidepressivos para distúrbios do sono, depressão e diminuição da dor; e opioides para tratamento da dor (SKARBERG; NYBERG; ENGSTROM, 2009).

No Brasil, a comercialização dos EAAs é regulamentada pela portaria 344, de 12 de maio de 1988, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (ANVISA, 1998). Além disso, segundo o artigo 1º da lei nº 9.965, de 27 de abril de 2000 da Casa Civil, a dispensação ou venda de medicamentos esteroides ou peptídeos anabolizantes para uso humano, só podem ser realizadas em farmácias ou drogarias com apresentação e retenção da cópia carbonada de receita emitida por médico ou dentista (BRASIL, 2000).

1.2.2 Efeitos tóxicos do uso de esteroides anabólicos androgênicos

A administração de doses supra-fisiológicas dos EAA pode ocasionar diversos efeitos tóxicos, principalmente cardiovasculares, neuroendócrinos e distúrbios psiquiátricos, além de estar associado à dislipidemia, elevação dos marcadores inflamatórios e disfunção endotelial (POPE *et al.*, 2014; GOLDMAN & BASARIA, 2017). Efeitos em curto prazo como paranoia, irritabilidade extrema, depressão, delírios e julgamento prejudicado podem se manifestar nos usuários, além de mudanças extremas de humor. Já os efeitos em longo prazo se caracterizam por danos ao fígado, rim e coração. Dentre as doenças cardiovasculares, pode-se citar a cardiomegalia, arritmia, hipertrofia do ventrículo esquerdo, cardiomiopatia, pressão alta, alterações no colesterol, isquemia e

fibrose, que aumentam o risco de derrame e infartos, mesmo em indivíduos jovens (KAM & YARROW, 2005; POPE *et al.*, 2014; NIDA, 2016; GOLDMAN & BASARIA, 2017).

O uso de EAA está associado ao aumento nas concentrações de triglicérides e colesterol LDL (lipoproteína de baixa densidade) e à diminuição de HDL (lipoproteína de alta densidade). Como os esteroides anabólicos androgênicos estimulam a lipase hepática, responsável por catabolizar o HDL, a sua concentração é diminuída, aumentando o LDL. Esse processo pode acelerar a aterosclerose e conseqüentemente ocasionar uma isquemia (KAM & YARROW, 2005; GOLDMAN & BASARIA, 2017).

Os efeitos psicológicos da utilização de EAA podem ser comportamento impulsivo, agressividade, ansiedade, depressão, hipomania e controle inibitório reduzido. Muitos indivíduos podem apresentar dismorfia muscular, onde há excessiva preocupação com os músculos. O suicídio também pode estar relacionado com o uso de EAA (PIACENTINO *et al.*, 2015; GOLDMAN & BASARIA, 2017). De acordo com um estudo realizado em 2000, atletas que fazem uso dessas substâncias apresentam taxa de mortalidade por suicídio 4.6 vezes maior em relação à população (PÄRSSINEN *et al.*, 2000).

Em homens, os principais efeitos são atrofia testicular, redução da produção de espermatozoides, ginecomastia, disfunção erétil, alopecia e aumento do risco para câncer de próstata. Os hormônios andrógenos são extremamente importantes no desenvolvimento e na manutenção da espermatogênese. Sendo assim, a administração de EAA pode suprimir as gonadotropinas, reduzindo a produção de testosterona nos testículos, e levando à supressão da espermatogênese, o que pode ocasionar infertilidade. Já em mulheres, os EAA podem causar crescimento de pelos no rosto, amenorreia, aumento do clitóris, engrossamento da voz e calvície. Adolescentes que fazem uso de EAA podem ter alterações no crescimento (KAM & YARROW, 2005; POPE *et al.*, 2014; EL OSTA *et al.*, 2016; NIDA, 2016; GOLDMAN & BASARIA, 2017).

A acne severa é frequente nos usuários de EAA, aparecendo principalmente no início do uso. A pele apresenta hipertrofia e hiperestimulação das glândulas sebáceas induzindo o aparecimento de comedões, o que pode levar a um quadro de acne *vulgaris* e foliculite. Além disso, há aumento na população de algumas bactérias. Algumas doenças de pele preexistentes como psoríase, acne e rosácea, também podem ser exacerbadas com o uso de EAA (WALKER & ADAMS, 2009; GOLDMAN & BASARIA, 2017).

A aplicação de esteroides anabólicos androgênicos por via parenteral pode levar a quadro de disfunção hepática. Colestase, tumores e hepatite são alguns dos efeitos causados pelos EAA no fígado (SOLIMINI *et al.*, 2017).

Apesar dos EAA não causarem euforia como as outras drogas ilícitas, o uso dessas substâncias continua sendo feito mesmo com os efeitos tóxicos causados, o que indica o seu potencial em causar dependência. Os usuários podem apresentar sintomas de abstinência ao interromper a administração de EAA, como alterações de humor, fadiga, perda de apetite, distúrbios do sono e ansia pela droga. Alguns transtornos de imagem do corpo podem estar envolvidos nos estágios iniciais de dependência, além da vulnerabilidade aos efeitos da abstinência (GRÖNBLADH; NYLANDER; HALLBERG, 2016; NIDA, 2016).

O uso de drogas injetáveis pode aumentar o risco de contaminação por HIV e hepatite C pelo compartilhamento de seringas e agulhas. Cerca de 11 milhões de pessoas no mundo fazem esse tipo de uso, sendo que do total de 1.4 milhões de novas infecções por HIV e 5.6 milhões por HCV em 2017, 23% foram atribuídas ao uso de drogas injetáveis (UNODC, 2020).

1.3. Análises toxicológicas e matrizes biológicas alternativas

A toxicologia analítica é responsável pela identificação, detecção e quantificação de drogas e seus produtos de biotransformação em matrizes biológicas. As análises realizadas apresentam baixas concentrações (picograma ou nanograma) e as quantidades de amostra são normalmente limitadas. O fluxo de trabalho analítico para confirmação de analitos se divide em tratamento da amostra, extração ou *clean-up* dos analitos de interesse e a análise instrumental, portanto as análises toxicológicas apresentam execução mais laboriosa (HE & CONCHEIRO-GUISAN, 2018).

A determinação dos analitos é composta por duas etapas, sendo elas o *screening* e a análise confirmatória. O *screening* pode ser realizado a partir de técnicas como o imunoensaio, cromatografia e espectrometria de massas e se dá pela análise alvo ou não alvo dos analitos de interesse. Estas técnicas devem ser sensíveis, rápidas, específicas e baratas. A etapa confirmatória é feita através da identificação e quantificação das substâncias na matriz biológica a partir da combinação de técnicas de cromatografia e espectrometria de massas (MBUGHUNI, JANNETTO, LANGMAN, 2016; FEDICK *et al.*, 2017; MAURER, 2018; MCKENNA *et al.*, 2018; VANDERGRIFT *et al.*, 2018).

As matrizes biológicas mais utilizadas nas análises toxicológicas são urina e sangue. Porém, com o desenvolvimento de técnicas mais sensíveis, matrizes biológicas

alternativas como *dried matrix spots* (DMS), cabelo, suor, unha, mecônio, cordão umbilical, humor vítreo e fluido oral começaram a ganhar espaço nas análises forenses. Cada matriz possui suas particularidades e fornece diferentes vantagens para uma dada análise (GENTILI *et al.*, 2016; MERCOLINI & PROTTI, 2016; COLBY, 2017; PALMER & KRASOWSKI, 2018)

As matrizes biológicas alternativas têm como vantagens permitir uma coleta menos invasiva e diminuir o risco de adulteração de amostra (DUTKIEWICZ & URBAN, 2016; MERCOLINI & PROTTI, 2016). Além disso, elas representam momentos diferentes do curso da droga no organismo, devendo ser considerados a sua estabilidade e o tempo de preparo da amostra (FREDERICK *et al.*, 2012; DUTKIEWICZ & URBAN, 2016).

Métodos como a extração líquido-líquido (LLE) e extração em fase sólida (SPE) são comumente utilizados na toxicologia forense, porém necessitam de várias etapas, aumentam o risco de erro analítico e podem utilizar grandes quantidades de solvente orgânico (HE & CONCEIRO-GUISAN, 2018; SILVEIRA *et al.*, 2019). A miniaturização de técnicas de preparo de amostras, extrações sem o uso de solventes ou com solventes menos tóxicos e a retirada da derivatização, como na microextração em fase líquida (LPME), microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) e microextração em fase sólida (SPME), constam como formas de minimizar os impactos ocasionados por essas análises (SILVEIRA *et al.*, 2019).

A coleta de urina geralmente requer um volume mínimo de 30 mL que deve ser coletada de forma assistida. Testes como pH, temperatura, dosagem de creatinina e gravidade específica, permitem conferir se a amostra sofreu algum tipo de adulteração como a diluição (RAOUF; BETTINGER; FUDIN, 2018).

1.3.1. *Dried Urine Spots*

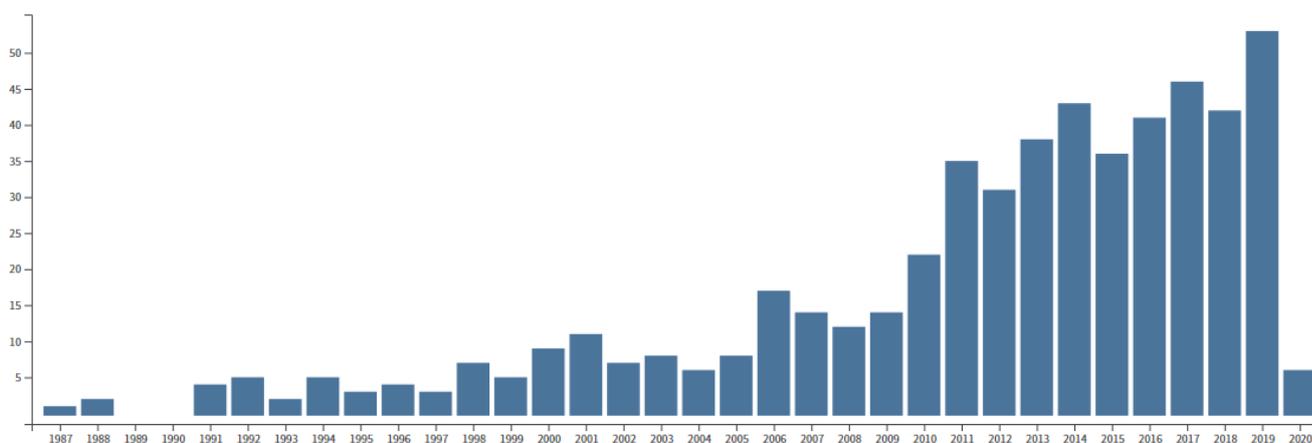
A utilização de métodos para amostragem alternativos tem ganhado força, devido à necessidade de técnicas mais práticas que utilizam pouco volume de amostra e possuem facilidade de armazenamento (SERRA *et al.*, 2013). O *dried blood spots* (DBS), foi desenvolvido por Ivan Bang em 1913 para o monitoramento de glicose em ratos, porém somente em 1963, Guthrie e Susi propagaram o seu uso ao desenvolver um método para triagem de doenças metabólicas em neonatos, como a fenilcetonúria. Apesar de ter sido idealizado para análises com sangue, outras matrizes biológicas como urina, plasma, soro

e fluido oral podem ser utilizadas (GUTHRIE & SUSI, 1963; MEESTERS & HOOFF, 2013; OTERO-FERNÁNDEZ *et al.*, 2013; SADONES *et al.*, 2014; ZAKARIA *et al.*, 2016; CARVALHO *et al.*, 2019; HAUSER *et al.*, 2019). Uma pesquisa realizada no *Web Of Science* demonstrou que a partir de 2010 houve um aumento considerável do número de publicações sobre DUS, evidenciando o potencial de uso dessa técnica (Figura 6).

Figura 6. Gráfico do total de publicações sobre dried urine spots de 1987-2020.

Total de publicações

540



Fonte: Web of Science, 2020.

O DBS é considerado um método de micro-amostragem simples e custo-efetivo que possibilita minimizar os procedimentos de extração, além de permitir uma coleta rápida, fácil e econômica. Na toxicologia forense, permite a realização de análises para detecção e quantificação de diferentes drogas de abuso como canabinoides, cocaína, anfetaminas, opioides, fosfatidil etanol, novas substâncias psicoativas, tabaco benzodiazepínicos e seus produtos de biotransformação além de drogas terapêuticas, contaminantes ambientais, toxinas e elementos traço. A amostragem rápida permitida por esse método é interessante principalmente nas análises de drogas que apresentam tempo de meia-vida curto como a cocaína, heroína e GHB (gama-hidroxitirato), porém o efeito do hematócrito possui grande influência na exatidão e precisão do método, devido a diferença da viscosidade sanguínea entre indivíduos, e por isso, a distribuição da amostra de sangue no papel pode ser alterada (MANICKE *et al.*, 2011; MEESTERS *et al.*, 2012; STOVE *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2012; AMBACH *et al.*, 2013; LEE; LAI; SADRZADEH, 2013; OTERO-FERNANDÉZ *et al.*, 2013; SERRA *et al.*, 2013; KIRBY *et al.*, 2014; SADONES *et al.*,

2014; DÉGLON; LEUTHOLD; THOMAS, 2015; MICHELY; MEYER; MAURER, 2017A; DAOUSANI *et al.*, 2019; FREY, DAMON & BADU-TAWIAH, 2019; LUGINBÜHL *et al.*, 2019).

Em consequência da necessidade de coleta de pouca quantidade de amostra, o DBS minimiza a manipulação de material biológico e permite que a mesma seja enviada por correio em condições de temperatura ambiente, diminuindo o risco de quebra e transmissão de doenças. Dessa forma, ele se caracteriza como uma análise de baixo risco biológico (STOVE *et al.*, 2012; CARVALHO *et al.*, 2019). Além disso, promove conforto ao paciente e reduz significativamente o custo da coleta em relação aos métodos convencionais (DÉGLON; LEUTHOLD; THOMAS, 2015). Algumas substâncias são instáveis em amostras de sangue e plasma e podem sofrer degradação ou produção espontânea de outros compostos. O DBS também apresenta um efeito estabilizante em drogas de abuso, sendo que a hidrólise da cocaína e da 6-monoacetilmorfina são reduzidas em relação ao sangue total (STOVE *et al.*, 2012; WAGNER *et al.*, 2014).

O *dried matrix spots* se caracteriza pela aplicação de uma matriz biológica no papel de filtro com posterior secagem. O volume de amostra aplicado varia entre 5 e 50µL e o spot após a secagem (aproximadamente 90 minutos) é perfurado em discos entre 3-6 mm (SADONES *et al.*, 2014; ZAKARIA *et al.*, 2016).

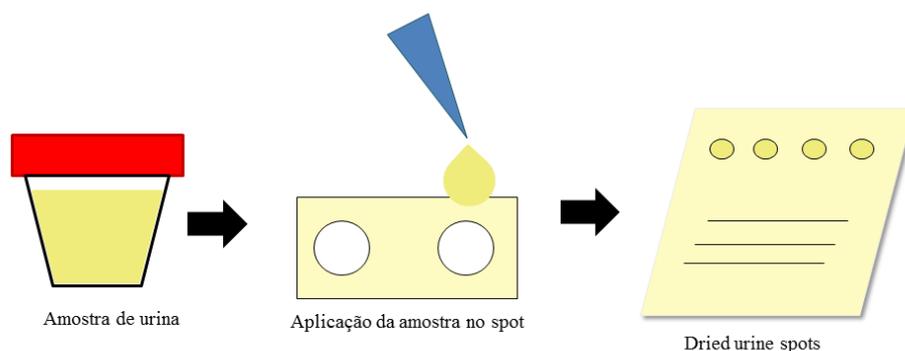
Devido ao pouco volume de amostra, o DMS necessita de técnicas mais sensíveis para identificação e quantificação dos analitos. Técnicas cromatográficas como a cromatografia líquida (LC) e a cromatografia em fase gasosa (GC) são utilizadas, porém a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS) é a mais apropriada para este tipo de análise (SADONES *et al.*, 2014).

Apesar de ser considerado um método simples de amostragem, etapas de preparo, *clean-up*, extração e até mesmo derivatização podem ser necessários (SADONES *et al.*, 2014).

O *dried urine spots* (DUS) é um método similar ao DBS, no qual pequenas amostras de urina são aplicadas em papéis de filtro para análises qualitativas ou quantitativas. Apesar do DUS ser baseado no DBS, poucas publicações sobre a sua utilização em amostras forenses estão disponíveis. Ele se caracteriza por ser uma técnica rápida, fácil, simples e barata para a coleta, armazenamento e distribuição, além de minimizar os riscos de infecção pela desativação dos patógenos em potencial pelo papel, podendo ser utilizado na rotina (CORSO *et al.*, 2010; OTERO-FERNÁNDEZ *et al.*, 2013; SERRA *et al.*, 2013; KIRBY

et al., 2014; MICHELY; MEYER; MAURER, 2017b). Um esquema de uso do *dried urine spots* pode ser observado na Figura 7.

Figura 7. Esquema de utilização do dried urine spots.



Fonte: Elaborado pela autora.

Um estudo realizado por Lee *et al.* (2013) detectou e quantificou 19 drogas de abuso em DUS com alta sensibilidade e especificidade em 15 μ L de amostra. Pablo e colaboradores (2020) validaram um método de screening de 41 substâncias de interesse forense em amostras secas de urina por LC-MS/MS, alcançando precisão maior do que em amostras de urina líquidas. Um método para detecção de opioides, cocaína e seus respectivos produtos de biotransformação em DUS por injeção direta por espectrometria de massas em tandem, foi desenvolvido e aplicado com sucesso em amostras de usuários que fazem policonsumo de drogas (OTERO-FERNANDÉZ *et al.*, 2013). Ambach *et al.* (2013) desenvolveram um método de screening de 64 novas substâncias psicoativas por LC-MS/MS. Apesar disso, são poucos os estudos existentes sobre a utilização de DUS na detecção de analitos de interesse forense, sendo a maior parte das publicações sobre DBS, demonstrando a importância do desenvolvimento dessa técnica para as análises toxicológicas (MICHELY; MEYER; MAURER, 2017b).

A utilização de DUS também se demonstrou factível para a determinação da concentração de creatinina urinária, que é um parâmetro importante para a avaliação de provável adulteração da amostra nas análises *antidoping*, visto que a ingestão excessiva de água ou a adição de substâncias pode diminuir as concentrações dos analitos e dos seus produtos de biotransformação na mesma (BALCÁZAR & MEESTERS, 2014).

1.4. Métodos cromatográficos

As análises forenses são realizadas principalmente por técnicas hífenadas, como a cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) e a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS), devido ao fato de que são métodos confiáveis e reprodutíveis. Contudo, apresentam longo tempo de análise e não permitem que as mesmas sejam realizadas *in situ* (FEDICK *et al.*, 2017).

A técnica de GC-MS é considerada padrão ouro para as análises toxicológicas, pois apresenta separação cromatográfica eficiente e com alta resolução, utiliza fase móvel composta por um gás homogêneo (hélio ou hidrogênio), facilidade de otimização das condições cromatográficas e possibilidade de uso da biblioteca para identificação dos compostos (MBUGHUNI; JANNETTO; LANGMAN, 2016). Entretanto, com o desenvolvimento do LC-MS, a cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas tem sido substituída devido ao fato de que nas análises por LC-MS não é necessário derivatização em sua maioria, simplificando o preparo de amostra, além de permitir a análise de substâncias não voláteis e termicamente instáveis (MBUGHUNI; JANNETTO; LANGMAN, 2016; HE & CONCHEIRO-GUISAN, 2018).

Apesar de ser uma boa alternativa para detecção de drogas, a análise por técnicas hífenadas apresenta alto custo, tempo de preparo de amostras longo e necessita de analistas treinados para realizar a mesma (MANICKE *et al.*, 2011; FERREIRA *et al.*, 2019).

1.5. Espectrometria de massas

A espectrometria de massas (MS) se caracteriza pela transferência de analitos ionizáveis da fase condensada para a fase gasosa e da sua posterior ionização. Ela pode ser utilizada para análise de diversas moléculas como drogas e produtos naturais e permite análises qualitativas e quantitativas, sendo considerada uma técnica muito versátil, sensível e específica, porém pode sofrer efeito de matriz (LIU *et al.*, 2010; OUYANG *et al.*, 2010; ALSAGGAF, 2015; CORREA *et al.*, 2016). A ionização é o primeiro passo da análise por MS, na qual os íons podem ser identificados de acordo com a sua relação massa/carga (BADU-TAWIAH *et al.*, 2013; LUBIN *et al.*, 2017).

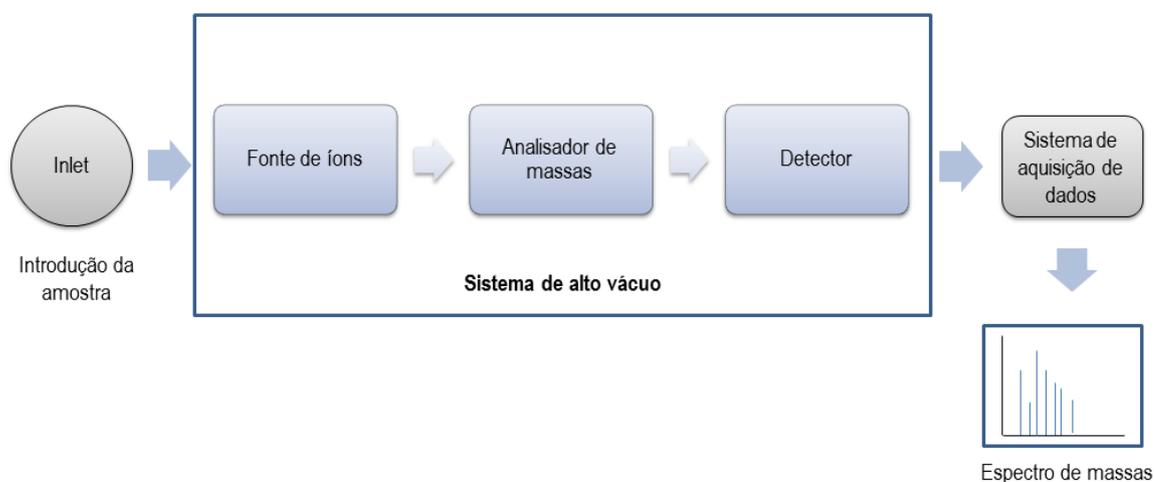
A ionização por *electrospray* (ESI) foi apresentada por John Fenn em 1989 e se tornou um marco para a realização de análises mais simples. Os íons e moléculas formados

por esse tipo de ionização podem ser protonados (M+H), deprotonados (M-H) e permitem a formação de adutos de sódio (M + Na)⁺, potássio (M + K)⁺ ou cloro (M + Cl)⁻ (CORREA *et al.*, 2016).

A ionização por *electrospray* utiliza um tubo capilar que permite o fluxo de solvente a partir de uma voltagem. Esse solvente é então pulverizado em condições de pressão atmosférica como um aerossol. O nitrogênio é utilizado para secar as gotas e liberar os íons que estão em sua forma gasosa para serem detectados (MBUGHUNI; JANNETTO; LANGMAN, 2016).

O ESI é o método de ionização mais utilizado, pois é sensível, robusto e confiável para biomoléculas não-voláteis e termolábeis (BANERJEE & MAZUMDAR, 2012). A sua seletividade é extremamente eficaz, pois não se baseia em tempo de retenção, mas nas diferenças de massa dos íons. Porém os isômeros ainda ficam sobrepostos, demonstrando a necessidade de técnicas mais seletivas para a separação desses últimos (CORREA *et al.*, 2016). A figura abaixo representa o espectrômetro de massas (Figura 8).

Figura 8. Representação esquemática de um espectrômetro de massas.



Fonte: Elaborado pela autora.

O acoplamento da espectrometria de massas com outras técnicas como a cromatografia gasosa e a cromatografia líquida é considerado o padrão ouro para a análise quantitativa de diferentes compostos (PU *et al.*, 2019).

A espectrometria de massas em tandem (MS/MS) permite a detecção de analitos pelos seus íons precursores e produtos, formados a partir da fragmentação pela dissociação

induzida por colisão (CID). O monitoramento de reações múltiplas (MRM) possibilita a conversão de um íon precursor para um íon produto pelo CID, aumentando a sensibilidade baseada no aumento da relação sinal/ruído (MBUGHUNI; JANNETTO; LANGMAN, 2016).

1.6. Técnicas de ionização ambiente

A inserção direta de substâncias no espectrômetro de massas tem sido utilizada desde meados da década de 1980, quando a sonda de inserção direta acoplada à espectrometria de massas (DIP-MS) começou a ser utilizada na análise de fármacos e seus produtos de biotransformação (KREEK *et al.*, 1983; CASTAGNOLI *et al.*, 1986). O procedimento se baseia na injeção direta de amostras na câmara de ionização do espectrômetro de massas, que são vaporizadas e ionizadas, sendo uma alternativa interessante para analitos polares e termolábeis (FLEGO & ZANNONI, 2010).

A ionização de dessorção por *electrospray* (DESI) e a análise direta em tempo real (DART) foram as primeiras técnicas de ionização ambiente desenvolvidas, permitindo analisar substâncias com a formação de íons em ambiente aberto e diminuindo a necessidade do preparo de amostra (TAKÁTS *et al.*, 2004; CODY, LARAMÉE & DURST, 2005; GROSS *et al.*, 2013).

No passado, técnicas compostas apenas por espectrometria de massas eram raras e se limitavam apenas a análises de moléculas voláteis e pequenas. Com o avanço do MS, foi possível aplicar a metodologia para qualquer tipo de matriz, mesmo naquelas com alto grau de complexidade, incluindo tecidos, drogas, proteínas, vírus e bactérias intactas, permitindo que as análises pudessem ser feitas em níveis-traço sem a necessidade de algum tipo de método de extração, pré-concentração ou derivatização. Apesar disso, essas técnicas ainda eram qualitativas ou semi-quantitativas, o que chamou a atenção para o aperfeiçoamento das mesmas para análises quantitativas com a utilização de padrão interno (LIU *et al.*, 2010; CORREA *et al.*, 2016; FEDICK *et al.*, 2017).

As técnicas de ionização ambiente se diferenciam da análise tradicional em vácuo por MS como a ionização por elétrons (EI), ionização química (CI) e dessorção/ionização a laser auxiliada por matriz (MALDI), pois sua ionização ocorre em pressão atmosférica, e também, das análises realizadas em pressão atmosférica, como ESI e APCI por não precisar de preparo de amostra. Isso permite que o processo de análise seja mais rápido

e minimiza a possibilidade de alteração das propriedades químicas do analito de interesse (OUYANG *et al.*, 2010).

O DESI é um método baseado no ESI e tem como benefício a dessorção direta da superfície dos analitos alvo, na qual o *spray* formado pelas gotas carregadas positiva ou negativamente bombardeiam a superfície promovendo a dessorção do analito e a sua posterior ionização. Esta técnica é amplamente utilizada nas análises por espectrometria de massas por imageamento. O DART é uma técnica que não utiliza solvente na qual a ionização ocorre a partir de uma descarga de corona que produz átomos de hélio eletronicamente excitados, produzindo íons por APCI (GROSS *et al.*, 2013; CORREA *et al.*, 2016).

As técnicas de ionização ambiente vêm sendo amplamente utilizadas nas análises de resíduos de disparo e explosivos, documentos, amostras biológicas, drogas de abuso, alimentos, cosméticos, petróleo e biocombustíveis, demonstrando que elas podem se apresentar como ferramentas rápidas, simples e robustas para a análise direta de amostras forenses (CORREA *et al.*, 2016).

1.6.1. Ionização por *paper spray*

Após o desenvolvimento de técnicas diretas como o DESI e o DART, há um interesse crescente na redução da complexidade das análises por espectrometria de massas a partir da diminuição da necessidade do preparo, extração e purificação de amostras e da separação por métodos cromatográficos. O MS além de proporcionar análises mais rápidas apresenta alta especificidade, capacidade de analisar diferentes analitos simultaneamente, baixo limite de detecção, diminuição do risco de contaminação biológica e dispensa a necessidade de reagentes específicos. Sendo assim, a técnica de ionização por *paper spray* (PS-MS) foi desenvolvida a partir da relevância de métodos como o *dried blood spots* (ESPY *et al.*, 2012a; YANG *et al.*, 2012; VEGA *et al.*, 2016; CHIANG; ZHANG; OUYANG, 2018).

Anteriormente foi demonstrado que o papel pode ser utilizado para análises feitas por DESI e tem seu uso bem estabelecido em ensaios químicos por papel cromatográfico, e também, em testes de gravidez em tiras de papel e monitoramento de glicose no sangue para controle da diabetes. Além disso, é de baixo custo, presente em diversos substratos e

facilmente obtido, demonstrando sua relevância para o desenvolvimento de técnicas mais econômicas (LIU *et al.*, 2010).

Paper spray acoplado à espectrometria de massas é um método de ionização ambiente introduzido por Wang *et al.* (2010) que combina o processo de extração de amostra em tempo real e ionização, permitindo a realização de análises qualitativas e quantitativas em misturas complexas de forma direta. A amostra é aplicada em um papel de filtro que após a secagem, é cortado em formato triangular (5mm na base e 10mm de altura) com ângulos específicos (60-90°) e acrescido de uma pequena quantidade de solvente de pulverização. O papel é posicionado horizontalmente em frente à entrada do MS e conectado a um fornecedor de alta tensão de corrente contínua por um grampo de cobre. As microgotas carregadas são formadas a partir da voltagem aplicada (aproximadamente 5kV) na base do papel, promovendo a dessolvatação sem a necessidade de um gás e com temperatura ambiente na entrada do MS (LIU *et al.*, 2010; XU *et al.*, 2010; ZHANG *et al.*, 2012; ESPY *et al.*, 2012b; YANG *et al.*, 2012; TAKYI-WILLIAMS; LIU; TANG, 2015; DE CARVALHO *et al.*, 2016; JETT, 2017; CHIANG; ZHANG; OUYANG, 2018).

Esta técnica utiliza o papel como fonte de ionização (COOKS *et al.*, 2011). O papel é composto de celulose e apresenta uma superfície porosa e hidrofílica que permite a retenção de água entre seus poros. A umidade presente no papel possibilita o transporte do líquido, e conseqüentemente dos analitos dissolvidos no mesmo, pelos microcanais formados pela rede de celulose. O potencial elétrico aplicado induz a formação de um campo elétrico e de uma carga que se acumula na ponta do papel. Desta forma, devido a geometria do papel, a presença do solvente e a alta voltagem, o analito carregado positivo ou negativamente se move por capilaridade pelo papel até o espectrômetro de massas, na qual sua razão massa/carga é determinada.

Como o PS-MS não possui separação cromatográfica, não há formação de cromatogramas, mas sim de um cronograma. Sendo assim, a identificação dos analitos é baseada apenas na medida da relação massa/carga dos analitos ou na espectrometria de massas em tandem (LIU *et al.*, 2010; ZHANG *et al.*, 2012; YANG *et al.*, 2012; JETT *et al.*, 2017b; PAULA *et al.*, 2018).

O mecanismo de formação de íons do PS-MS é similar ao ESI, na qual a repulsão coulombiana promove a expulsão dos íons de dentro das microgotas para a fase gasosa, os quais são atraídos após processos de dessolvatação para o MS, produzindo o cone de Taylor

(LIU *et al.*, 2010; ESPY *et al.*, 2012b; BADU-TAWIAH *et al.*, 2013; DE CARVALHO *et al.*, 2016).

A amostra interage com o papel e é retida no mesmo, diminuindo a necessidade de etapas de pré-tratamento (FERREIRA *et al.*, 2019). O substrato do papel pode remover interferentes da amostra como sais inorgânicos ou excipientes que não são dissolvidos pelo solvente de pulverização. Devido a esse *clean-up* da amostra, o PS-MS é adequado para análise de amostras em *dried matrix spots* (LIU *et al.*, 2016; PU *et al.*, 2019).

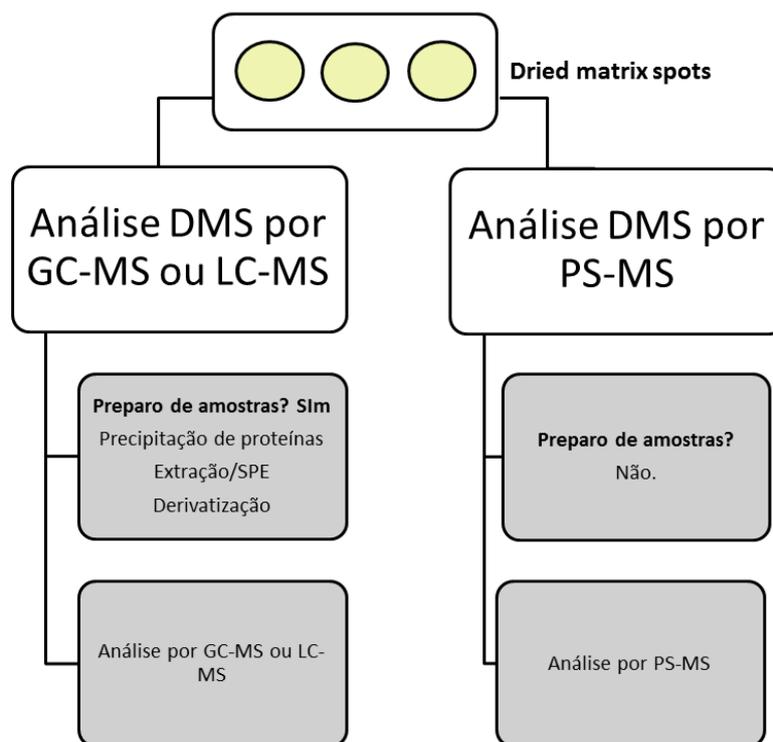
Uma das vantagens da ionização por *paper spray* é a possibilidade de análise imediatamente após a aplicação da amostra no papel. Em amostras com volume maior, o tempo de espera é geralmente de 2 horas. O tempo gasto entre as análises decorre da troca do papel e da limpeza do *inlet* do MS com um *swab* embebido em metanol. Dessa forma, esse tipo de análise é muito mais rápido comparado com outras técnicas que requerem preparo de amostra e separação cromatográfica. O volume de amostra utilizado é baixo (0.5-15 μ L) em relação aos outros métodos que necessitam de volumes acima de 0,5mL. Além disso, a análise pode ser realizada apenas com o papel na qual a amostra foi aplicada, pouco volume de solvente de pulverização (cerca de 30 μ L por amostra) e uma conexão para uma fonte de alta tensão, demonstrando a simplicidade da técnica (MANICKE *et al.*, 2011; ESPY *et al.*, 2012b; CHIANG; ZHANG; OUYANG, 2018; PAULA *et al.*, 2018).

O pouco volume de solvente utilizado categoriza o PS-MS como uma técnica baseada nos princípios da química analítica verde, na qual há uma redução do uso de reagentes e solventes tóxicos, aumento da segurança do analista e diminuição dos impactos ambientais. Além disso, todo o volume de solvente utilizado é consumido na análise. Sendo assim, diminui o resíduo do mesmo para descarte, reduzindo custos com compra de reagentes e descarte de resíduos (JETT, 2017; CHIANG; ZHANG; OUYANG, 2018; SILVEIRA *et al.*, 2019).

A técnica de ionização por *paper spray* vem sendo aplicada com sucesso em análises rápidas em diversas matrizes biológicas como urina, sangue total, saliva, tecidos, *dried blood spots* e *dried urine spots* (MANICKE *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2012; YANG *et al.*, 2012; SU *et al.*, 2013; KLAMPFL & HIMMELSBACH, 2015; VEGA *et al.*, 2016; MICHELY; MEYER; MAURER, 2017c; YANNELL *et al.*, 2017; KEATING *et al.*, 2018; MACIEL *et al.*, 2019). O PS-MS já foi utilizado em análises de fármacos terapêuticos e seus respectivos produtos de biotransformação em DBS, na qual os analitos foram extraídos da matriz pelo solvente de

pulverização (ZHANG *et al.*, 2012; CHIANG; ZHANG; OUYANG, 2018). A figura abaixo apresenta o fluxograma de análise do DMS (Figura 9).

Figura 9. Fluxograma de análise de *dried matrix spots* por GC-MS, LC-MS e PS-MS.

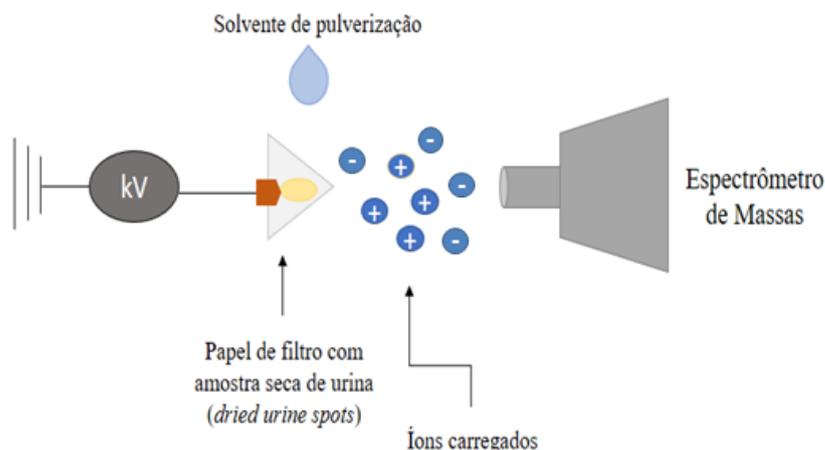


Fonte: Adaptado de CORSO *et al.*, 2010.

Um estudo realizado por Espy *et al.* (2014) para quantificação de oito drogas de abuso em sangue total por PS-MS foi validado de acordo com o guia da *Scientific Working Group for Forensic Toxicology* (SWGTOX) para validação de métodos em toxicologia forense. Em 2018, McKenna *et al.* publicou um método de *screening* semi-quantitativo para análise de 137 drogas de abuso e produtos de biotransformação por PS-MS acoplado à um espectrômetro de massas de alta resolução. Kennedy e colaboradores (2018) validou um método para a quantificação de fentanil e novas substâncias psicoativas por PS-MS. Em 2011, Wang *et al.* demonstrou a possibilidade de análise de hormônios como epinefrina e norepinefrina por PS-MS. Além disso, o seu uso também já foi documentado na química forense para a análise de bebidas e drogas brutas e falsificação de documentos e aplicado para quantificação de efedrina em uma amostra cega para teste de proficiência da WADA em urina (LIN *et al.*, 2014; DE CARVALHO *et al.*, 2016; JEONG *et al.*, 2016; PEREIRA

et al., 2016; AMADOR *et al.*, 2017; TEODORO *et al.*, 2017; CHIANG; ZHANG; OUYANG, 2018; PAULA *et al.*, 2018). Um esquema do PS-MS em *dried urine spots* é demonstrado na Figura 10.

Figura 10. Representação esquemática da ionização por *paper spray* em *dried urine spots*.



Fonte: Elaborado pela autora.

Mesmo apresentando diferentes limites de detecção, a maior parte dos métodos realizados por PS-MS são sensíveis e possibilitam a detecção de baixas concentrações de drogas de abuso. O efeito de matriz é comum nas análises por *paper spray* em amostras secas, principalmente em urina, porém ele apresenta bons limites de detecção. Ele ocorre devido à supressão do analito e a sua baixa recuperação. A sua utilização na quantificação de drogas pode apresentar imprecisão de 10% do valor esperado (LIN *et al.*, 2014; VEGA *et al.*, 2016; CHIANG; ZHANG; OUYANG, 2018). Além disso, pode ser uma ferramenta interessante para a análise qualitativa de drogas, visto que apresenta sensibilidade adequada para a detecção de concentrações baixas e pode eliminar totalmente ou diminuir o preparo de amostras. Dessa forma, a sua utilização como método de *screening* pode minimizar o risco associado a pouca seletividade do PS-MS (JETT *et al.*, 2017b)

Apesar de permitir a quantificação de baixas concentrações dos analitos, este método ainda apresenta alguns desafios na adaptação da aplicação na pesquisa para a rotina. Fatores como o ruído de fundo, tipo de substrato do papel, distância do *inlet* do MS, o corte da ponta do papel e o tipo de matriz influenciam na recuperação e, conseqüentemente, na quantificação dos analitos. Devido ao fato de que é uma técnica sem separação cromatográfica, a sua seletividade é inferior aquelas que utilizam cromatografias, sendo assim a análise deve ser feita por MRM para que fragmentos únicos

sejam escolhidos como transições. Além disso, isóbaros e substâncias com estruturas moleculares diferentes não podem ser diferenciadas apenas por espectrometria de massas. O desenvolvimento de cartuchos de papel e dispositivos automáticos para o PS-MS surgem como opção para melhorar a reprodutibilidade deste método, além da possível compatibilidade com espectrômetros de massas miniaturizados e portáteis (TAKYI-WILLIAMS; LIU; TANG, 2015; ZHANG & MANICKE, 2015; MANICKE; BILLS; ZHANG, 2016; AMADOR *et al.*, 2017; JETT *et al.*, 2017b; TEODORO *et al.*, 2017; YANNELL *et al.*, 2017; CHIANG; ZHANG; OUYANG, 2018; PU *et al.*, 2019).

Os testes toxicológicos realizados em laboratórios normalmente são realizados em duas etapas: *screening* (triagem) e exame confirmatório. Diferentes técnicas como imunoensaio, cromatografia gasosa, GC-MS, HPLC e LC-MS são utilizadas para a análise qualitativa de substâncias de interesse toxicológico, com posterior confirmação por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. Por ser uma técnica simples, rápida e que necessita de pouca quantidade de amostra, o PS-MS é uma boa opção para o *screening* de drogas de abuso (MCKENNA *et al.*, 2018).

1.7. Métodos de detecção de esteroides anabólicos androgênicos

A detecção de esteroides anabólicos androgênicos é de extrema importância para rastrear o uso de drogas proibidas em competições. Os testes se iniciaram em 1976 nos Jogos Olímpicos de Montreal a partir da implementação do radioimunoensaio. Esta técnica logo depois foi substituída por métodos mais sensíveis como o GC-MS e depois pelo LC-MS (ANDERSEN & LINNET, 2014).

A utilização indiscriminada de esteroides anabólicos androgênicos de forma não terapêutica tem crescido rapidamente entre atletas e não atletas. O abuso dessas drogas é considerado um problema de extrema importância, visto que os EAA são a principal droga de escolha para o *doping* (ABUSHAREEDA *et al.*, 2014). Nesse contexto, as análises toxicológicas se apresentam como a principal forma de investigar o uso de EAA no esporte, evitando que os atletas que fazem uso dessa substância, alcancem vantagem competitiva.

Os esteroides anabólicos androgênicos sintéticos são proibidos pela WADA e, por isso, devem ser detectados por um longo período de tempo em baixas concentrações (ABUSHAREEDA *et al.*, 2018). As principais matrizes biológicas utilizadas nas análises toxicológicas são urina e sangue. No entanto, nas análises de *doping* a urina é a amostra de

escolha para os testes sugerida pela WADA, por apresentar uma coleta menos invasiva, maior disponibilidade de volume, larga janela de detecção e por ter maiores concentrações de EAA e seus respectivos produtos de biotransformação (GOSETTI *et al.*, 2013; FABRESSE *et al.*, 2017; MICHELY; MEYER; MAURER, 2017a; PIZZATO *et al.*, 2017). Apesar disso, a urina apresenta como desvantagens a sua facilidade de adulteração para dificultar a detecção de drogas de abuso e as altas concentrações de diferentes sais que podem aumentar o efeito de matriz (OTERO-FERNÁNDEZ *et al.*, 2013; SERRA *et al.*, 2013).

A WADA preconiza a realização de testes antes (*out-of-competition*), que podem ser feitos a qualquer momento durante treinamentos, na casa do atleta ou próximo a um evento e durante (*in-competition*) as competições. Aqueles realizados durante as competições devem ser feitos imediatamente após o evento e engloba todos os métodos e substâncias listados como proibidos durante o período olímpico (DE ROSE, 2008; WADA, 2019d).

A identificação de EAA na urina se baseia na detecção de produtos de biotransformação de fase I e II, no entanto, a maioria dos esteroides anabólicos androgênicos são metabolizados e excretados como produtos de biotransformação de fase II (GEYER; SCHÄNZER; THEVIS, 2014; BALCELLS *et al.*, 2015). As reações de fase I convertem EAA por reações catalisadas enzimaticamente em compostos mais polares, sendo que a droga é inativada e eliminada facilmente. As reações de fase II se caracterizam pela conjugação com ácido glicurônico ou sulfato, aumentando a solubilidade e excreção pelo rim, portanto, poucos EAA são excretados inalterados na urina (GOSETTI *et al.*, 2013).

A hidrólise é necessária para liberar os produtos de biotransformação de fase I e permitir a sua posterior detecção, porém as preparações feitas com enzima β -glicuronidase, demonstram baixa eficácia para clivar a maioria dos sulfatos, além de que cada esteroide apresenta um tempo de hidrólise diferente, impossibilitando a sua análise devido a hidrólise incompleta. Somente os produtos de biotransformação não conjugados e os conjugados hidrolisáveis de ácido glicurônico são detectáveis (BALCELLS *et al.*, 2015).

Os EAA podem ser detectados em matrizes biológicas a partir de diferentes métodos. A espectrometria de massas é o método de escolha para detecção de EAA combinada com a cromatografia gasosa (GC-MS) ou a cromatografia líquida (LC-MS), após a realização da hidrólise enzimática por β -glicuronidase (BALCELLS *et al.*, 2015; ABUSHAREEDA *et al.*, 2017). A WADA preconiza que os laboratórios devem ser

capazes de detectar a presença de analitos na concentração de 2-5 ng/mL, demonstrando a necessidade de métodos confiáveis (POZO *et al.*, 2008; WADA, 2017). Para uma amostra ser considerada positiva para doping, é preciso calcular a relação testosterona/epitestosterona (T/E), visto que a epitestosterona é um produto secundário da biossíntese da testosterona. Dessa forma, quando o indivíduo faz uso de EAAs, não há mudança na produção de epitestosterona, podendo-se observar um aumento na relação T/E (ANDERSEN & LINNET, 2014; ROCHA, AGUIAR, RAMOS, 2014). O threshold preconizado pela WADA é de 4.0, podendo exceder para 6.0 em algumas situações (ANDERSEN & LINNET, 2014).

A WADA segue rigorosos padrões de monitorização e detecção dessas drogas. Esses testes são realizados apenas pelos 31 laboratórios acreditados pela mesma e são caros e tecnicamente desafiadores, devido ao grande número de substâncias testadas. O processo inclui transporte seguro para esses laboratórios e armazenamento das amostras (BARON; MARTIN; MAGD, 2007; DE ROSE, 2008; ANAWALT, 2017; WADA, 2019d). Além disso, de acordo com novas regras implementadas em 2015 pela WADA, as amostras de urina coletadas podem ser armazenadas congeladas por até 10 anos e, se necessário, descongeladas a qualquer momento para reteste. Para isso, as amostras precisam ser armazenadas de forma que mantenha a sua integridade e permita a aplicação de futuros métodos de detecção que ainda não foram desenvolvidos (KUURANNE & SAUGY, 2016). Sendo assim, a utilização de métodos para amostragem alternativos como o *dried urine spots* pode ser interessante para facilitar as análises e o armazenamento dessas amostras.

O LC-MS é uma técnica que não necessita de derivatização e pode detectar níveis baixos de EAA, glicuronídeos e sulfatos, além de poder ser usado de forma qualitativa ou quantitativa (ATHANASIADOU *et al.*, 2012; ALSAGGAF, 2015). Apesar de apresentar uma ionização limitada por ESI ou API, pois substâncias inalteradas ou mesmo alguns produtos de biotransformação de fase II não podem ser detectados devido a ausência de grupos ionizáveis, o ESI se apresenta como a técnica mais recomendada para detecção de EAA. A utilização de adutos em compostos que são pouco ionizáveis aumenta a sensibilidade no LC-MS/MS, favorecendo a sua detecção (ANDERSEN & LINNET, 2014; BALCELLS *et al.*, 2015).

A detecção de EAA é difícil devido às baixas concentrações dos precursores e dos seus produtos de biotransformação e, também, da disponibilidade de esteroides que apresentam uma atividade similar e/ou composição química diferente em relação a outros

esteroides. Os EAA não são facilmente ionizáveis devido a falta de grupos ácidos ou básicos em sua estrutura e apresentam baixa afinidade de prótons nos grupos carbonila e hidroxila. Além disso, é necessária derivatização nas análises por GC-MS, o que limita a detecção de alguns produtos de biotransformação de fase I (ATHANASIADOU *et al.*, 2012; BALCELLS *et al.*, 2015; ABUSHAREEDA *et al.*, 2017).

Alguns EAA endógenos são administrados pelos atletas para melhorar o desempenho. Como não há diferença no espectro de massas dos EAA sintéticos e endógenos, a WADA criou o Passaporte Biológico do Atleta e o perfil esteroidal, na qual consta os resultados da quantificação de EAA endógeno do mesmo (SOTTAS; VERNEC, 2011; ABUSHAREEDA *et al.*, 2018).

O perfil esteroidal urinário determina a presença de testosterona (T), epitestosterona (E), androsterona (A), etiocolanolona (Etio), 5 α -androstan-3 α ,17 β -diol (5 α adiol), 5 β -androstan-3 α ,17 β -diol (5 β adiol), e as relações de 5 α adiol/5 β adiol, 5 α adiol/E, T/E, A/Etio e A/T. Essas relações monitoram a administração de testosterona e DHEA, testosterona em atletas com deleção do polimorfismo UGT2B17 e administração transdérmica de testosterona. Porém, são sensíveis ao stress, consumo de álcool e uso de inibidores da 5 α -redutase. Essas determinações são feitas a partir da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas de razão isotópica do carbono (GC-C-IRMS), que possibilita a diferenciação entre ^{13}C do ^{12}C dos EAAs endógenos e daqueles administrados exogenamente (AYOTTE, 2010; SOTTAS *et al.*, 2011; SAUGY; LUNDY; ROBINSON, 2014; PONZETTO *et al.*, 2019).

A análise instrumental nos exames *anti-doping* para esteroides anabólicos androgênicos se baseia em um processo de duas etapas divididas em: (a) Procedimento Inicial de Teste e (b) Procedimento Confirmatório. O Procedimento Inicial de Teste utiliza de métodos para o *screening* de EAAs para estimar o perfil esteroidal do atleta a partir da técnica de GC-MS. As amostras devem passar uma hidrólise enzimática com β -glucuronidase de *E. coli* e derivatização. Já o Procedimento Confirmatório deve ser realizado em amostras que apresentaram algum achado analítico adverso. As análises quantitativas são feitas por GC-MS ou GC-MS/MS combinadas com a determinação dos analitos do perfil esteroidal por GC-C-IRMS. O procedimento de preparo de amostra se dá por uma extração em fase sólida e hidrólise enzimática (WADA, 2018).

O *screening* não alvo a partir de espectrometria de massas pode ser uma abordagem interessante para a detecção de testosterona e seus análogos em quantidades anômalas. Porém, apesar de permitir uma análise abrangente dos grupos de derivados dos esteroides

por não ser específica para analitos únicos, essa técnica apresenta uma menor sensibilidade e limites de detecção mais altos (GEYER, SCHÄNZER, THEVIS, 2014).

Os produtos de biotransformação presentes na urina possuem uma estabilidade baixa, por isso o DUS pode ser um importante método alternativo para a detecção de EAA, já que não apresenta água como um meio de promover reações químicas de decomposição e pode ser armazenada por meses antes de ser analisada, sem necessidade de condições especiais de armazenamento como o DBS (LIU *et al.*, 2010; SUH *et al.*, 2015).

A utilização de amostras de sangue seca para detecção de substâncias de interesse *antidoping*, foi realizada por Tretzel e colaboradores (2015) com o intuito de identificar o uso de um hormônio adrenocorticotrópico sintético. Em outubro de 2019, a WADA anunciou o desenvolvimento e implementação de testes antidoping em DBS, além de guias para coleta, transporte, análise e armazenamento dos mesmos, segundo a justificativa do método de amostragem ser menos invasivo, ter a possibilidade de simplificar a coleta, necessidade de menor quantidade de amostra, diminuir o custo de coleta e transporte, facilitar o armazenamento e aumentar a estabilidade das amostras, devido a menor degradação da mesma (WADA, 2019b).

A espectrometria de massas, principalmente o PS-MS, é amplamente utilizada para análises em *dried blood spots*, devido às baixas concentrações de analitos presentes que necessitam de ensaios altamente sensíveis e específicos, e por apresentar baixo efeito de matriz (LIN *et al.*, 2014; ZAKARIA *et al.*, 2016). A utilização do *paper spray* para análises em DUS de esteroides anabolizantes androgênicos é interessante, pois o ESI diminui a sensibilidade da detecção devido à interferência de sais inorgânicos e outros químicos. Além disso, é uma técnica simples e rápida que permite a dispensa ou redução de etapas do preparo de amostra, derivatização e insumos para análise. Dessa forma, o PS-MS tem um grande potencial para se tornar um método alternativo no monitoramento rápido de drogas de abuso como os esteroides anabólicos androgênicos (OTERO-FERNÁNDEZ *et al.*, 2013; SU *et al.*, 2013).

2. Objetivo

Este trabalho tem como objetivo o desenvolvimento, validação e aplicação do método de identificação de esteroides anabólicos androgênicos e seus principais produtos de biotransformação em *dried urine spots* por ionização por *paper spray* acoplada à espectrometria de massas (PS-MS).

3. Materiais e Métodos

3.1. Materiais

a) Equipamento:

- Equipamento de cromatografia líquida modelo Shimadzu UFLC CLASS 8030 acoplado à espectrômetro de massas modelo LCMS 8030 triplo quadrupolo com ionização por *electrospray* (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão), disponível na Seção Técnica de Física e Química Legal do Instituto de Criminalística da Polícia Civil do Estado de Minas Gerais (STFQL/IC/PC-MG). O *software* LabSolutions™ versão 5.91 foi utilizado para aquisição e processamento de dados.

b) Reagentes e outros materiais:

- Reagentes: Ácido fórmico foi obtido da Synth (Diadema, Brasil), metanol grau HPLC, acetonitrila grau HPLC, solução de amônia 25% e acetona para análise de resíduos de pesticida foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha) e enzima beta-glicuronidase de *E. coli* K12 da Roche (Mannheim, Alemanha). A água ultrapura foi obtida do Millipore Direct Q3 (Billerica, MA, EUA);
- Papel de filtro Whatman 903 Protein Saver Cards da GE Healthcare (Dassel, Alemanha).
- Papel de filtro qualitativo Unifil (Brasil).

c) Padrões:

- Soluções-padrão de 19-noreticolanolona (produto de biotransformação da nandrolona), 3-hidroxiestanozolol e 16-beta-hidroxiestanozolol (produtos de biotransformação do estanozolol) e epitestosterona foram obtidos do National Measurement Institute (West Lindfield, Austrália), 17-alfa-metil-5-beta-androstano-3-alfa-17-beta-diol e 17-alfa-metil-5-alfa-androstano-3-alfa-17-beta-diol (produtos de transformação da metiltestosterona), trembolona, testosterona, metiltestosterona e dehidroepiandrostenediona foram obtidos da

Cerilliant Corporation (Round Rock, EUA), androstenediona foi obtido da LGC Standards (Teddington, Reino Unido), 19-norandrosterona obtido da Cayman Chemical (Ann Arbor, EUA) e testosterona C¹³ doada pelo Dr. Valdemir Melechco Carvalho do Grupo Fleury.

3.1.2. Coleta de amostras

Amostras de urina de 50 indivíduos do sexo masculino foram coletadas na Unidade de Reabilitação Cardiovascular e Fisiologia do Exercício do InCor-HCFMUSP provenientes de outro estudo. As amostras foram armazenadas em freezer a -10°C. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, sob o parecer de número 00666818.3.0000.0067 (ANEXO 1).

3.2. Métodos

3.2.1. Condições espectrométricas para a detecção de EAAs por PS-MS

A otimização dos padrões analíticos no LC/MS-MS foi realizada por injeção direta, na qual 10µL da solução-padrão na concentração de 1µg/mL de cada analito foi injetada no sistema. 0,1% v/v de NH₄OH e acetonitrila foram utilizadas na fase orgânica e 0,1% v/v de NH₄OH em água ultrapura na fase aquosa. O LC/MS-MS Shimadzu 8030 foi utilizado para identificar os fragmentos dos íons e otimizar os parâmetros instrumentais para os mesmos a partir do *software* LabSolutions™. Os parâmetros para análise foram realizados no modo de monitoramento de reações múltiplas (MRM) nos modos positivo e negativo, sendo que o software otimizou os íons precursores e íons produtos mais intensos e suas respectivas energias de colisão (CE). Também foram selecionados adutos de sódio (Na⁺), potássio (K⁺), acetato (CH₃COO⁻), formiato (HCOO⁻) e amônio (NH₄⁺). A figura 11 apresenta o dispositivo utilizado para a análise em PS-MS.

Figura 11. Dispositivo de ionização por *paper spray*.



Fonte: Arquivo pessoal.

Os parâmetros utilizados para a análise de EAAs por ionização por *paper spray* acoplada à espectrometria de massas se encontram na tabela abaixo (Tabela 2):

Tabela 2. Parâmetros do Espectrômetro de Massas.

Parâmetros do Espectrômetro de Massas no PS-MS	
Modo	ESI
DL Temperature	250° C
Heat Block Temperature	400° C
Voltagem da interface	4,5 kV
Tempo de análise	2,0 min

Fonte: Elaborado pela autora.

O equipamento de cromatografia líquida acoplado ao espectrômetro de massas modelo LCMS 8030 triplo quadrupolo com ionização por *electrospray* foi utilizado para otimizar os analitos e o padrão interno por injeção direta. Os resultados da otimização dos fragmentos e dos parâmetros do espectrômetro de massas estão apresentados na tabela abaixo (Tabela 3):

Tabela 3. Otimização dos compostos por injeção direta: íon precursor, íon produto, energia de colisão (CE), modo de ionização e dwell time.

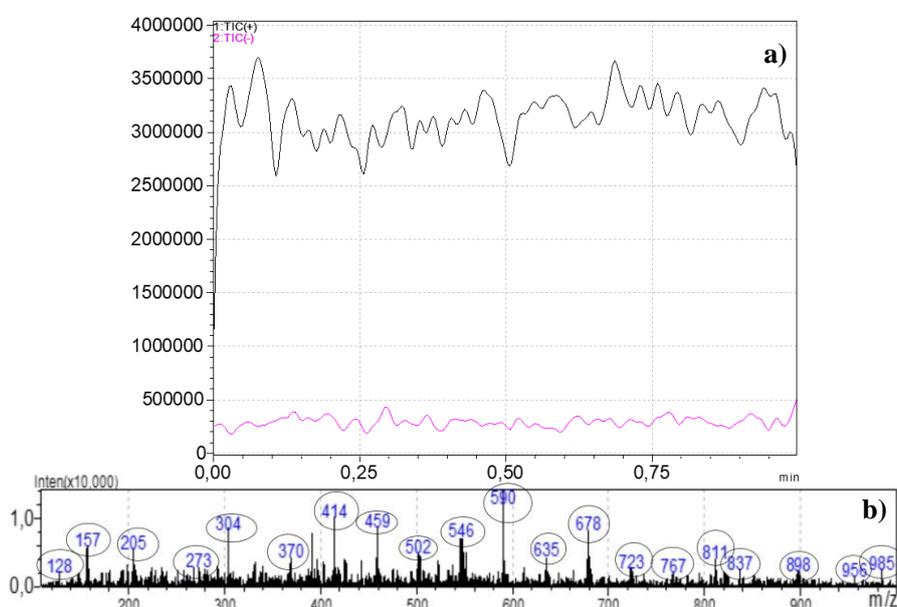
Padrão	Íon Precursor (m/z)	Íon Produto (m/z)	Energia de colisão (CE)	Modo (ESI)	Dwell Time (ms)
3'-Hidroxiandrostanozolol	345,00 (M+H) ⁺	97,00	48,0	Positivo	30,0
		107,00*	40,0		
		111,00	46,0		
16'-β -Hidroxiandrostanozolol	345,00 (M+H) ⁺	95,00*	44,0	Positivo	30,0
		109,00	44,0		
		43,00	53,0		
17α -metiltestosterona (PI)	303,00 (M+H) ⁺	109,00	30,0	Positivo	30,0
		67,00*	48,0		
		123,00	29,0		
17-α-metil-5-α- androstane-3-α-17-β-diol	307,00 (M+H) ⁺	71,00*	15,0	Positivo	30,0
		43,00	38,0		
		219,00	8,0		
17-α-metil-5-β- androstane-3-α-17-β-diol	301,00 (M+H) ⁺	88,00	20,0	Positivo	30,0
		45,00	16,0		
		284,00*	11,0		
19-Norandrosterona	299,00 (M+Na) ⁺	281,00*	12,0	Positivo	30,0
		105,00	18,0		
19-Noreticolanolona	294,05 (M+NH ₄) ⁺	253,05*	7,0	Positivo	30,0
		221,10	15,0		
Androstenediona	287,0 (M+H) ⁺	97,00*	35,0	Positivo	30,0
		109,00	35,0		
Epitestosterona	289,0 (M+H) ⁺	97,00	23,0	Positivo	30,0
		109,00*	25,0		
		81,00	47,0		
Testosterona	289,0 (M+H) ⁺	97,00*	23,0	Positivo	30,0
		109,00	25,0		
		81,00	47,0		
Trembolona	271,0 (M+H) ⁺	199,00	23,0	Positivo	30,0
		253,00	21,0		
		91,00*	49,0		
DHEA	333,0 (M+CH ₃ COO) ⁺	296,80*	21,0	Positivo	30,0
		314,90	10,0		

*Íon quantificador.

Fonte: Elaborado pela autora.

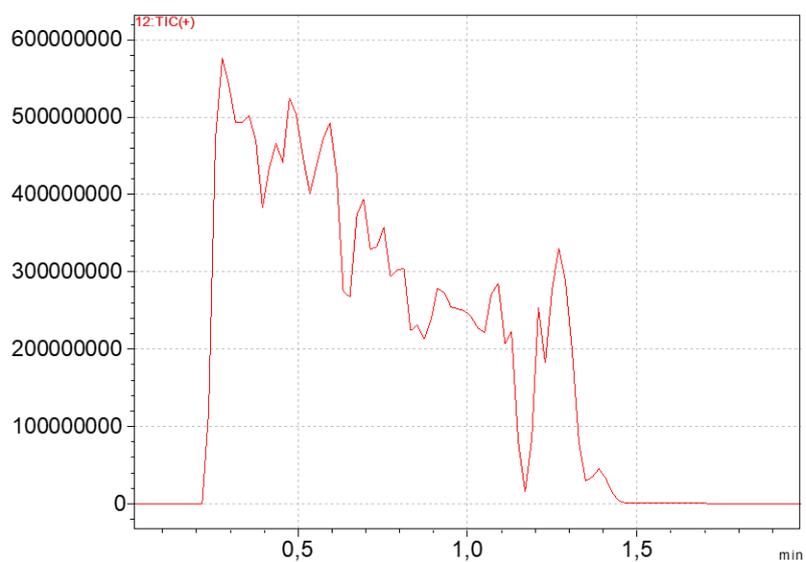
A otimização demonstrou que o modo positivo é o melhor para a análise dos analitos. A molécula protonada foi selecionada como íon precursor na maior parte dos analitos, porém a 19-norandrosterona e a 19-noreticolanolona obtiveram melhor resposta com aduto de sódio e amônio, respectivamente. O software também identificou os três fragmentos mais intensos de cada analito, com exceção da 19-norandrosterona, 19-noreticolanolona e androstenediona que apresentaram somente dois fragmentos. Não foi possível otimizar e identificar a testosterona C¹³ por injeção direta, provavelmente devido a sua baixa concentração (50ng/mL) (Figura 12).

Figura 12. Resultados obtidos por injeção direta da substância testosterona C¹³.



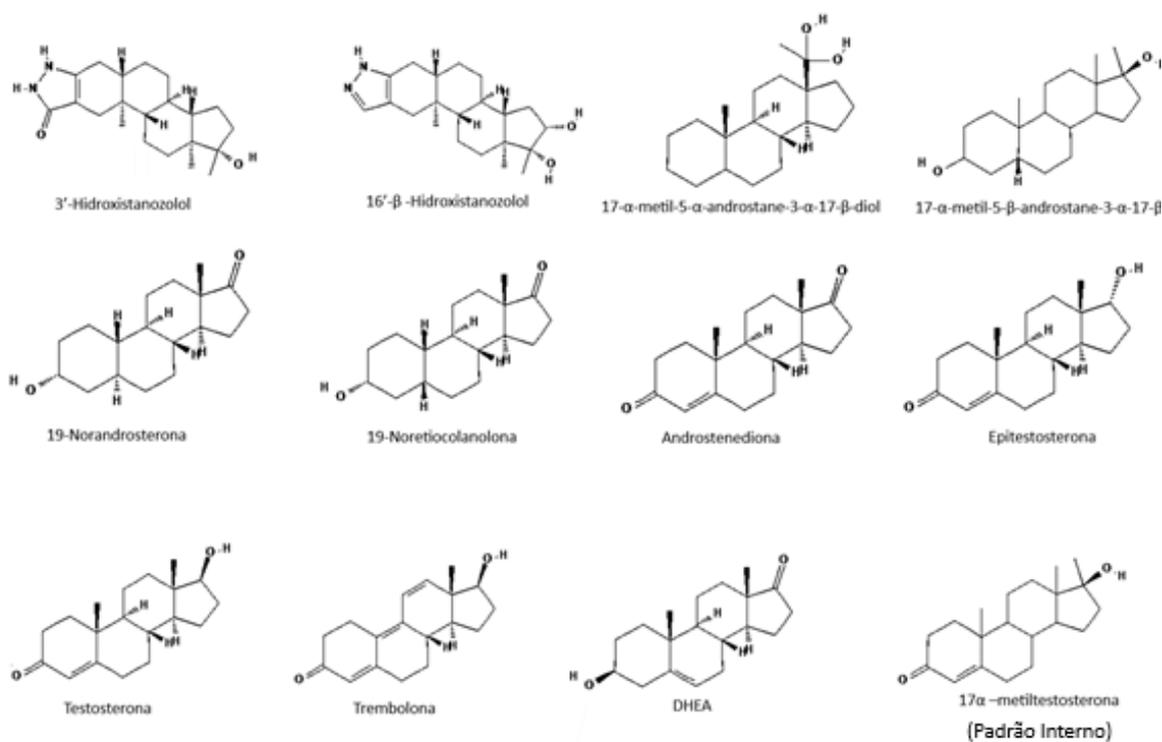
Legenda: (a) cronograma da testosterona C¹³; (b) espectro de massas da testosterona C¹³.

O PS-MS não forma picos gaussianos como nas análises usuais com cromatografia, pois não há separação. Sendo assim, o termo mais apropriado para a medida dos íons pelo tempo, é cronograma. A quantificação pode ser realizada a partir da integração da área abaixo da curva dos íons monitorados, como ocorre em cromatogramas (JETT, 2017; MCKENNA *et al.*, 2018). A figura abaixo apresenta um exemplo de cronograma obtido com a análise por ionização por *paper spray* (Figura 13).

Figura 13. Cronograma obtido por PS-MS.

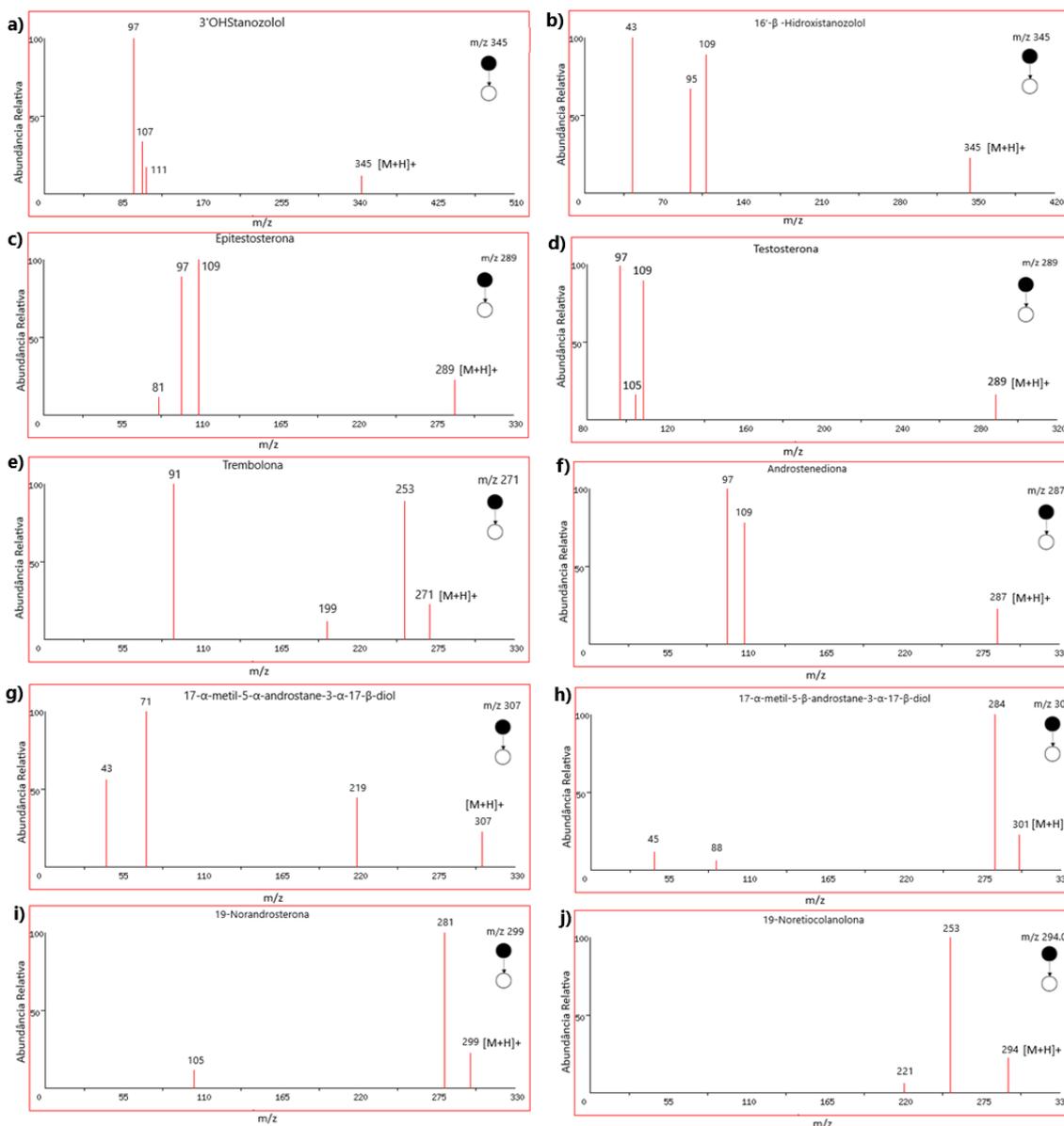
Para a análise dos compostos, observa-se a intensidade dos fragmentos dos íons. A figura abaixo demonstra suas estruturas químicas e seus respectivos espectros de massas no modo MRM encontrados dos analitos deste estudo (Figuras 14 e 15).

Figura 14. Estruturas químicas dos esteroides anabólicos androgênicos utilizados neste estudo.



Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 15. Espectros de massas no modo MRM das substâncias deste estudo em análise por PS-MS.



Legenda: (a) 3'OHStanozolol; (b) 16'-β -HidroxiStanozolol; (c) Epitestosterona; (d) Testosterona; (e) Trembolona; (f) Androstenediona; (g) 17-α-metil-5-α-androstane-3-α-17-β-diol; (h) 17-α-metil-5-β-androstane-3-α-17-β-diol; (i) 19-Norandrosterona; (j) 19-Noreticolanolona.

Fonte: Elaborado pela autora.

3.2.2 Otimização do papel

Para identificar o melhor tipo de papel para a análise de EAA, foram realizados ensaios para a otimização no Whatman 903 Protein Saver Card e no papel de filtro qualitativo. O papel foi cortado em formato triangular em 15x10mm com um ângulo de 30°C com a ajuda de um cortador manual em

formato de triângulo. 10µL do pool de EAA foi adicionado no papel de filtro e a amostra secou por 2h. O papel foi alocado a 5mm do inlet do MS. Uma alíquota de 20µL de metanol foi adicionada ao papel para aquisição de dados. Para a escolha do melhor tipo de papel, foram observadas as intensidades dos íons dos analitos em cada análise, assinalando como ótimo o tipo de papel que promovesse a maximização do mesmo.

3.2.3. Otimização do solvente de pulverização

Foram avaliados 11 solventes para a otimização do solvente de pulverização. Os ensaios foram realizados nas concentrações de 10 ng/mL, 75 ng/mL e 200 ng/mL em pool de EAA na urina. 10 µL do pool de EAA foi adicionado no papel de filtro e a amostra secou por 2h em temperatura ambiente. Para a análise, 20 µL de cada solvente foi adicionado ao papel. Foram observadas a formação de cone, *spray* e descarga elétrica. O solvente que promoveu melhor intensidade dos íons em cada concentração para os analitos de interesse foi escolhido. O quadro abaixo apresenta os solventes utilizados (Quadro 3).

Quadro 3. Solventes utilizados para otimização do solvente de pulverização.

Solvente
Metanol
Metanol:Água 1:1
Metanol:Água 90:10
Metanol:Ácido fórmico 0,1%
Acetona
Acetonitrila
Acetonitrila:NH ₄ OH 0,1%
Acetonitrila:Água 90:10
Acetonitrila:Água 1:1
Isopropanol
Isopropanol:Água 75:25

Fonte: Elaborado pela autora.

Após a escolha do solvente de pulverização, foi realizada a otimização da quantidade de solvente aplicada ao papel para extração dos analitos. Os

testes foram executados em triplicata nas concentrações de 10ng/mL e 50ng/mL. Os volumes de solvente testados foram 20 μ L, 50 μ L, 80 μ L e 100 μ L.

3.2.4. *Otimização da adição do padrão interno no papel e em urina*

Com o objetivo de testar a adição do padrão interno (PI) metiltestosterona para obter melhor intensidade do sinal, foram preparadas amostras em triplicata com adição de 20 μ L do PI em 500 μ L de urina na concentração de 200 ng/mL e adição de 10 μ L de PI em metanol na concentração de 200 ng/mL direto no papel. O papel secou por 20min em temperatura ambiente. O tipo de impregnação do PI escolhido foi a partir da análise da intensidade dos íons da metiltestosterona.

3.2.5. *Estudo de reuso*

Com o intuito de avaliar o potencial de reanálise das amostras de DUS, foi realizado o ensaio de repetibilidade, na qual três concentrações (10ng/mL, 50ng/mL e 100ng/mL), foram analisadas em triplicata. Após a análise, as amostras secaram por 2 horas em temperatura ambiente e foram reanalisadas no PS-MS.

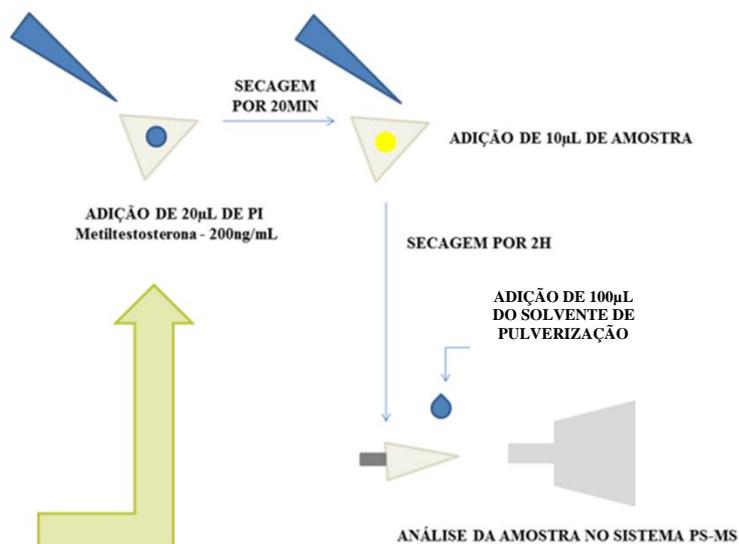
3.2.6. *Extração de EAA por PS-MS e hidrólise enzimática*

As amostras de urina foram preparadas de acordo com o método proposto por Okano *et al.* (2015), na qual adicionou-se 0.75 mL de tampão fosfato pH 6.8 em uma alíquota de 3mL de urina. Adicionou-se 50 μ L da solução de enzima β -glicuronidase de *E. coli* K12 e a amostra foi incubada a 50°C por 60 min. Para elevar o pH para 9,0, adicionou-se 100 μ L de solução de NaOH 0,1M.

Após a otimização do solvente, tipo de papel e impregnação do PI, o seguinte fluxograma (Figura 16) para análise de EAA por PS-MS foi estabelecido:

Figura 16. Fluxograma do preparo de amostra em dried urine spots e análise por PS-MS.

Hidrólise enzimática:



Fonte: Elaborado pela autora.

3.2.7. Validação de método analítico para detecção de esteroides anabólicos androgênicos em dried urine spots por ionização por paper spray

Para a validação do método, estabeleceram-se os parâmetros de seletividade, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), linearidade, precisão, exatidão intra e interdia, efeito matriz, estabilidade e *carryover* dos analitos nas amostras de urina. O método foi validado conforme o *Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology* (SWGTOX, 2013). Também foram utilizados os artigos *Strategies for the Assessment of Matrix Effect in Quantitative Bioanalytical Methods Based on HPLC-MS/MS* (MATUSZEWSKI; CONSTANZER; CHAVEZ-ENG, 2003); *Validation of New Methods* (PETERS; DRUMMER; MUSSHOFF, 2007) e *Limit of Blank, Limit of Detection and Limit of Quantification* (ARMBRUSTER; PRY, 2008).

3.2.7.1. Seletividade

O parâmetro de seletividade foi determinado a partir da análise de 10 amostras de urina de fontes diferentes para avaliar a presença de interferentes endógenos. Os resultados foram comparados com os íons precursores e produtos dos analitos do estudo.

Foram também analisadas 10 amostras adicionadas de 1000 ng/mL de tetrahydrocannabinol (THC), canabidiol, sertralina, alprazolam, clonazepam, oxazepam, diazepam, nordiazepam, metilenedioximetanfetamina (MDMA), metilenedioxianfetamina (MDA), metanfetamina, anfetamina, femproporex, cocaína, benzoilecgonina, cocaetileno, fentanil, oxprenolol, dipirona, propoxifeno, nicotinamida, benzocaína, lidocaína, dicoflenaco, nicotina e sibutramina para avaliar a possível interferência destes analitos na análise.

Foi realizada uma busca nas bases de dados DrugBank e The Human Metabolome Database a partir do número de massa molecular para identificar os possíveis interferentes endógenos e exógenos que possuem a mesma massa molar dos analitos de interesse deste estudo.

3.2.7.2. Limite de detecção e limite de quantificação

Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) foram determinados pelo método empírico proposto por Peters *et al.* (2007) a partir da análise de amostras adicionadas dos analitos em série decrescente de concentração. As análises foram feitas em sextuplicata, nas concentrações de 1ng/mL, 2ng/mL, 5ng/mL, 10ng/mL e 15ng/mL. O coeficiente de variação aceitável entre as replicatas não deveria ser maior que 15% para LOQ e 20 % para LOD.

3.2.7.3. Linearidade

A linearidade foi avaliada a partir da análise em sextuplicata de seis concentrações diferentes dos analitos na faixa que abrange do LOQ a 200ng/mL (LOQ, 50ng/mL, 100ng/mL, 150ng/mL e 200ng/mL).

O cálculo que demonstra a relação matemática entre a concentração do analito e a área relativa foi descrita pela equação da reta:

$$y = ax + b$$

Na qual:

y = área relativa (área absoluta do analito dividida pela área absoluta do PI)

x = concentração

a = inclinação da curva de calibração

b = intersecção com eixo y, quando x = 0.

O estudo de heteroscedasticidade foi realizado a partir da comparação do valor do $F_{\text{experimental}}$ e do F_{tabelado} , a partir da regressão dos mínimos quadrados ponderados, na qual foram avaliados os seguintes coeficientes de ponderação (w_i): $1/x^{1/2}$, $1/x$, $1/x^2$, $1/y^{1/2}$, $1/y$ e $1/y^2$. A escolha de w_i foi feita de acordo com a menor somatória dos erros relativos (%RE) e o valor do coeficiente de determinação (r^2) igual ou superior a 0,99.

3.2.7.4. Precisão inter e intradia

Com o intuito de avaliar a precisão (inter e intradia), foram realizados ensaios em quintuplicata em concentrações que contemplaram o intervalo linear de cada analito do estudo preparados em diferentes controles de qualidade baixo (CQB), médio (CQM) e alto (CQA), no período de cinco dias consecutivos. Os resultados foram dados de acordo com os coeficientes de variação (CV%) das áreas relativas do painel de substâncias e avaliados pela análise de variância (ANOVA), na qual o CV% deveria ser menor que 20% para controles de qualidade baixo, e 15% para controles de qualidade médio e alto, para ser considerado aceitável.

3.2.7.5. Exatidão

A exatidão é dada pela relação entre a concentração teórica e concentração média calculada experimentalmente. Para isso, esse parâmetro foi determinado a partir de ensaios em quintuplicata em três diferentes concentrações de controle de qualidade, baixa, média e alta, após o estabelecimento da linearidade do método.

3.2.7.6. Efeito matriz

Para avaliar o efeito matriz, amostras de 6 indivíduos foram utilizadas. Os ensaios foram feitos em sextuplicata, nas concentrações de 15ng/mL (controle baixo), 80ng/mL (controle médio) e 160ng/mL (controle alto). O padrão interno metiltestosterona também teve seus parâmetros avaliados a partir da sua aplicação direta no papel na concentração de 200ng/mL. As amostras foram divididas em dois grupos: (A) analitos preparados no solvente de pulverização (acetonitrila) e (B) na qual os analitos foram preparados na matriz de escolha.

Para calcular o efeito matriz foram determinadas as áreas relativas (A_r) de cada grupo, de acordo com a equação abaixo:

$$EM (\%) = (A_{r\text{média B}} / A_{r\text{média A}}) * 100$$

Valores acima de 100% demonstram um aumento da ionização e abaixo de 100%, uma supressão iônica.

3.2.7.7. Estabilidade

A estabilidade do DUS foi avaliada pelo período de cinco meses. As amostras nas concentrações de 15ng/mL e 50ng/mL foram armazenadas dentro de um envelope de papel alocado em um armário de madeira fechado a temperatura ambiente. As análises foram realizadas no tempo zero, quatro e cinco meses, em triplicata, de acordo com as intensidades absolutas de cada analito.

3.2.7.8. Carryover

O *carryover* foi avaliado a partir da análise em triplicata de amostras branco após a injeção de amostra adicionada dos analitos do estudo a 1000ng/mL. A metodologia proposta por Takiy-Williams e colaboradores (2019), foi utilizada para avaliar o efeito *carryover* em amostras de urina negativa utilizando o mesmo grampo de metal sem limpeza entre as corridas. Para isso, amostras em concentrações de 1000ng/mL foram analisadas previamente, com consequente análise de amostras em concentrações baixas de 10ng/mL. Posteriormente,

amostras de urina negativa foram testadas. As áreas abaixo da curva dos analitos da amostra branco foram comparadas com as áreas das amostras de concentração de 10ng/mL. A presença de *carryover* seria indicada por coeficiente de variação acima de 20%.

3.2.8. *Aplicação do método de screening de EAAs em DUS por PS-MS em amostras reais*

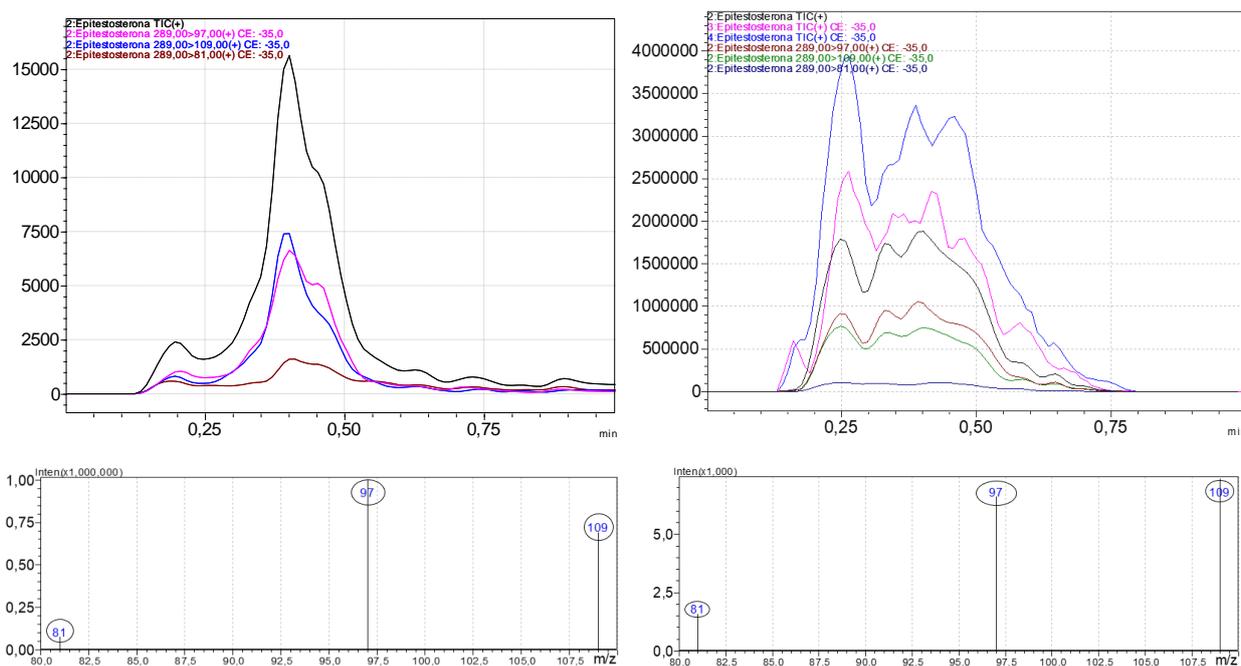
Após a validação do método, 50 amostras de urina de pacientes usuários de EAA foram analisadas qualitativamente em *dried urine spots* pelo método de PS-MS.

4. Resultados e discussão

4.1. Otimização do papel

A escolha do substrato do papel utilizado é extremamente importante para o desempenho geral das análises por ionização por *paper spray* acoplada à espectrometria de massas, pois impacta diretamente na eluição, ionização dos analitos, intensidade e duração do sinal e a sensibilidade do método (REN *et al.*, 2013; HAN *et al.*, 2018). Os ensaios para a otimização do tipo do papel para a análise em PS-MS foram realizados no Whatman 903 *Protein Saver Card* e no papel de filtro qualitativo. A figura abaixo apresenta os cronogramas e espectros da substância epitestosterona dos testes realizados no papel Whatman e no papel de filtro qualitativo (Figura 17).

Figura 17. Cronograma e espectro MRM da análise de epitestosterona por PS-MS no Whatman 903 e no papel de filtro, respectivamente.



A fibra do papel é repleta de grupos hidroxila que favorecem a interação com diferentes analitos, dificultando a eluição e diminuindo a quantidade de íons que são detectados pelo MS (FREY, DAMON & BADU-TAWIAH, 2019). O papel Whatman 903 é descrito na literatura para análises em DUS e DBS, visto que causam menos interferência

química e são compatíveis com amostras de sangue e urina, além de estarem de acordo com os protocolos de armazenamento (MICHELY; MEYER; MAURER, 2017b; HAN *et al.*, 2018). Ele apresenta uma maior gramatura, menor tamanho dos poros e é mais absorvente do que o papel de filtro, por isso necessita de maior quantidade de amostra. Isso garante que o solvente de pulverização passe pela amostra seca com facilidade. Porém, quanto menor o tamanho do poro do papel, menor o fluxo de passagem do solvente durante a análise, diminuindo a sua recuperação. Apesar disso, há um aumento da eficiência da ionização (MANICKE; BILLS; ZHANG, 2016; BILLS *et al.*, 2018).

Os resultados demonstraram que o Whatman 903 apresenta as menores intensidades absolutas, na qual alguns analitos como o DHEA não produzem nenhum espectro de massas. Em comparação, o papel de filtro qualitativo produziu as maiores intensidades dos picos dos analitos estudados. Papéis com gramatura menor necessitam de menor quantidade de amostra e solvente. O *spray* funciona como um filtro, aumentando a interação do solvente com as fibras do papel, e conseqüentemente, do analito e os componentes da matriz com a celulose (MANICKE; BILLS; ZHANG, 2016; BILLS *et al.*, 2018). Como exemplo, a epitestosterona apresenta intensidade absoluta de aproximadamente $1,5 \times 10^4$ no Whatman 903 enquanto no papel de filtro qualitativo foi de 4×10^6 . Esses resultados estão de acordo com o encontrado por Alsagaff (2015). Em seu estudo, ele testou o Whatman Filter Paper Grade 1 que possui retenção de partículas média de $11 \mu\text{m}$, verificando que o mesmo produziu os maiores picos de resposta e recuperação para todos os componentes testados por PS-MS. O Whatman Filter Paper Grade 1 apresenta retenção similar ao do papel utilizado neste estudo, de $4\text{-}12 \mu\text{m}$.

Dessa forma, o papel de filtro qualitativo foi selecionado para as análises deste estudo. Além disso, o seu custo em relação ao Whatman 903 é bem inferior. Após a otimização do tipo de papel, o analito DHEA foi excluído do painel de analitos do método, devido ao fato de que não produz alta intensidade absoluta, não sendo possível detectá-lo em baixas concentrações.

Parâmetros como a distância da ponta do papel para a entrada do MS e o tamanho do mesmo são importantes. Esse intervalo não deve ser menor que 1mm , pois pode provocar a formação de uma descarga elétrica e, conseqüentemente, uma supressão iônica (LIN *et al.*, 2014; ALSAGAFF, 2015; BILLS *et al.*, 2018).

4.2. Otimização do solvente de pulverização

Com o intuito de otimizar o solvente de pulverização, espectros de massa e cronogramas foram obtidos utilizando metanol, metanol:água 1:1, metanol:água 90:10, metanol:ácido fórmico 0,1%, acetona, acetonitrila, acetonitrila: NH₄OH 0,1%, acetonitrila:água 90:10, acetonitrila:água 1:1, isopropanol e isopropanol:água 75:25. Uma pequena quantidade (10µL) de um pool com os analitos do presente estudo foi aplicada no papel de filtro qualitativo com posterior secagem por 2 horas. Após a secagem, as amostras foram analisadas pelo PS-MS com a adição de 20µL de cada solvente ou mistura de solventes.

O solvente ótimo foi analisado para cada analito de acordo com a sua capacidade de eluição a partir da intensidade absoluta dos fragmentos e dos cronogramas formados. É de extrema importância que o solvente utilizado seja capaz de aumentar a sensibilidade e a seletividade do método (JETT, 2017). Na literatura, os principais solventes nas análises por PS-MS são orgânicos, permitindo que moléculas hidrofóbicas pequenas como drogas de abuso, sejam extraídas enquanto os componentes hidrofílicos da matriz biológica continuam retidos. A adição de agentes modificadores como ácido fórmico ou NH₄OH é feita para auxiliar na protonação ou desprotonação de moléculas e aumentar a estabilidade do *spray* (JETT, 2017; MANICKE; BILLS; ZHANG, 2016).

A presença de água diminui a viscosidade do *spray* de pulverização, dificultando a formação do cone de Taylor, não sendo uma boa escolha para essa função. Além disso, ela passa com dificuldade pelo *dried blood spot*, e promove uma má ionização em amostras secas de plasma e urina, devido aos componentes da matriz como sais e proteínas solúveis em água que são coeluídos juntamente com o solvente de pulverização. Por isso, os solventes utilizados contêm cerca de menos de 20% de água em sua composição (ESPY *et al.*, 2012a; MANICKE; BILLS; ZHANG, 2016).

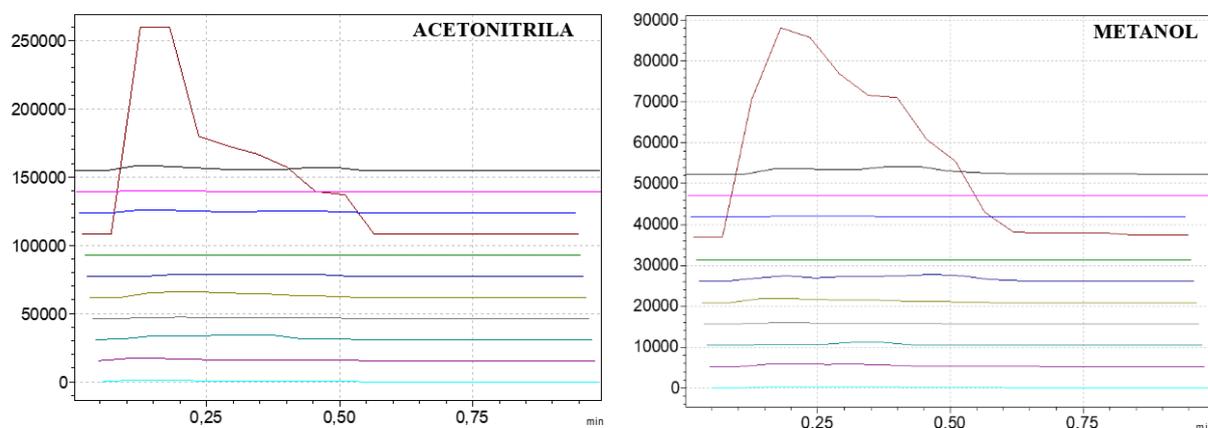
A descarga elétrica produzida por alguns desses solventes foi caracterizada como uma ponta brilhante entre o papel e a entrada do MS e um ruído audível. Esse fato ocorre devido a uma provável mudança na distribuição do solvente no papel. A ocorrência desse fato deve ser evitada, pois pode causar uma supressão iônica (LIN *et al.*, 2014). Sendo assim, os solventes que provocaram descarga elétrica foram excluídos. As observações feitas quanto a formação do cone, *spray* e descarga elétrica estão contidas no quadro abaixo (Tabela 4):

Tabela 4. Fatores observados na otimização do solvente no PS-MS.

Solvente	Fatores observados
Metanol	Formação de cone e spray
Metanol:Água 1:1	Formação de cone e descarga elétrica
Metanol:Água 90:10	Formação de cone, spray e descarga elétrica
Metanol:Ácido fórmico 0,1%	Formação de cone
Acetona	Formação de cone
Acetonitrila	Formação de cone e spray
Acetonitrila:NH ₄ OH 0,1%	Formação de cone
Acetonitrila:Água 90:10	Formação de cone e descarga elétrica
Acetonitrila:Água 1:1	Formação de cone
Isopropanol	Formação de cone e spray
Isopropanol:Água 75:25	Formação de cone e descarga elétrica

Fonte: Elaborado pela autora.

De todos os solventes analisados, a acetonitrila apresentou melhor extração dos analitos e formação do *spray* mais estável. Na literatura, amostras de urina e plasma são bem extraídas com acetonitrila (MANICKE; BILLS; ZHANG, 2016; VEGA *et al.*, 2016; MICHELY; MEYER; MAURER, 2017c). Dessa forma, ela foi o solvente de pulverização de escolha para este método. A figura abaixo apresenta os cronogramas com as intensidades absolutas para os analitos após a extração com dois dos solventes testados (Figura 18).

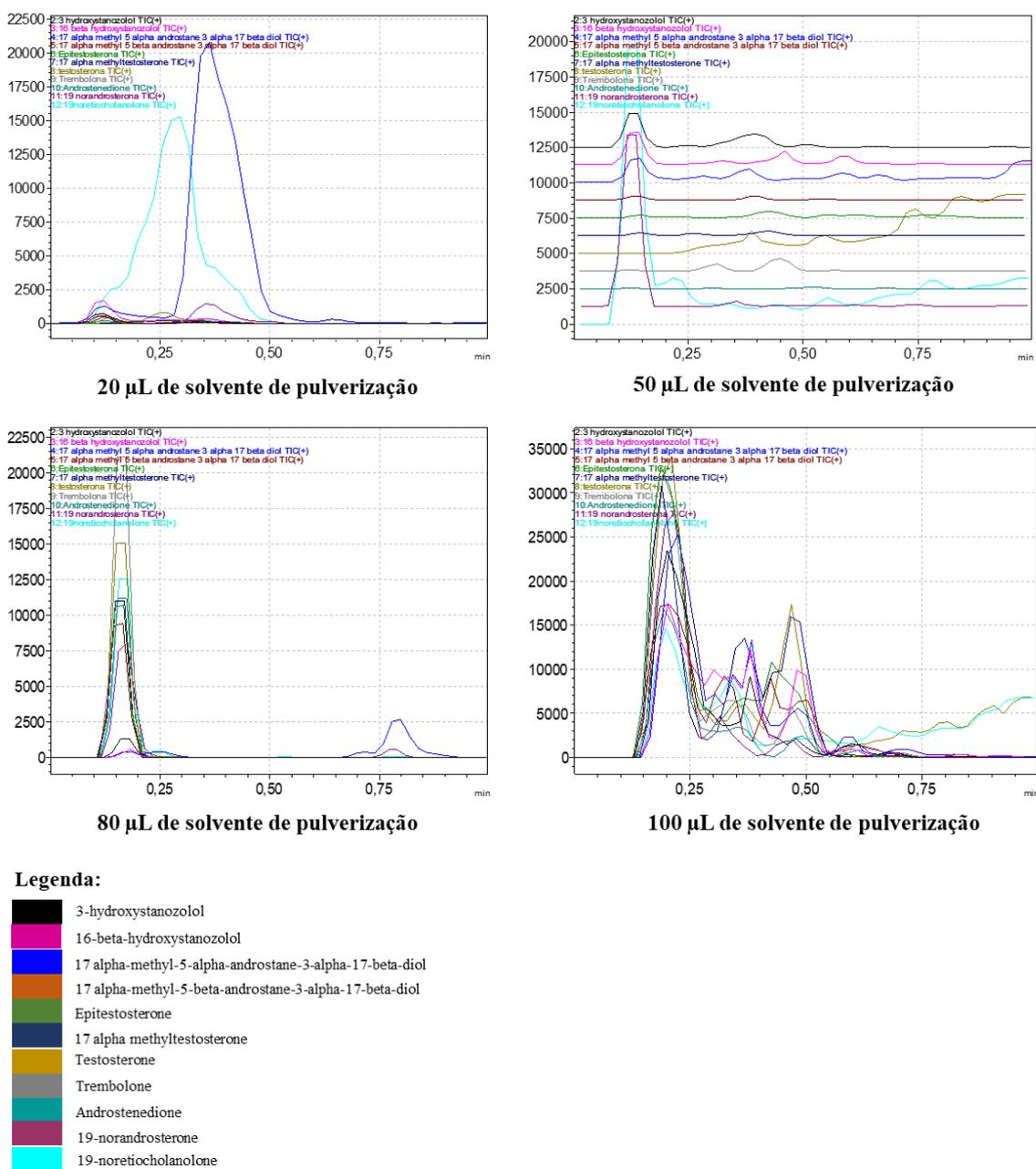
Figura 18. Cronogramas da otimização do solvente de pulverização com acetonitrila e metanol.

Após a escolha do melhor solvente de pulverização, foram testados diferentes volumes (20 μ L, 50 μ L, 80 μ L e 100 μ L) do mesmo para melhorar a extração dos analitos. Em um estudo realizado por Shen e colaboradores (2013), foi demonstrado que a umectância do papel com o solvente é de extrema importância para a eluição dos analitos. A descarga de corona pode ocorrer quando o fluxo do solvente aplicado é baixo, demonstrando que a distribuição do solvente de pulverização no papel não foi uniforme. Sendo assim, a mobilidade do solvente pela superfície, afeta a eficiência da extração da amostra. O fluxo contínuo do mesmo durante a análise faz com que o *spray* formado seja mais estável, assemelhando-se ao ESI (ESPY *et al.*, 2012a; SHEN *et al.*, 2013; ALSAGAFF, 2015).

As amostras analisadas com 100 μ L de acetonitrila apresentaram melhor resultado (Figura 19). Isso se deve ao fato de que a ionização e a extração ocorrem diretamente no papel, visto que ele possui microcanais, na qual a partir da presença do solvente de pulverização e do campo elétrico gerado, possibilita o transporte da amostra por capilaridade e a extração de seus analitos presentes (LIU *et al.*, 2010; LIN *et al.*, 2014; JETT, 2017; MICHELY; MEYER; MAURER, 2017c).

Quando o solvente de pulverização seca por evaporação, não há formação de carga elétrica na ponta do papel, impedindo a extração e, por isso, não é possível continuar a obtenção do espectro de massas, diminuindo a intensidade absoluta das substâncias analisadas (MANICKE *et al.*, 2011; KEATING *et al.*, 2018). Ao aumentar o volume do solvente de pulverização de escolha, a extração dos analitos é prolongada por mais tempo, permitindo uma maior intensidade absoluta e fluxo uniforme dos mesmos enquanto a voltagem for aplicada (LIU *et al.*, 2010; MANICKE *et al.*, 2011; REN *et al.*, 2013; TAKYI-WILLIAMS; LIU; TANG, 2015; JEONG *et al.*, 2016; JETT, 2017; MICHELY; MEYER; MAURER, 2017c).

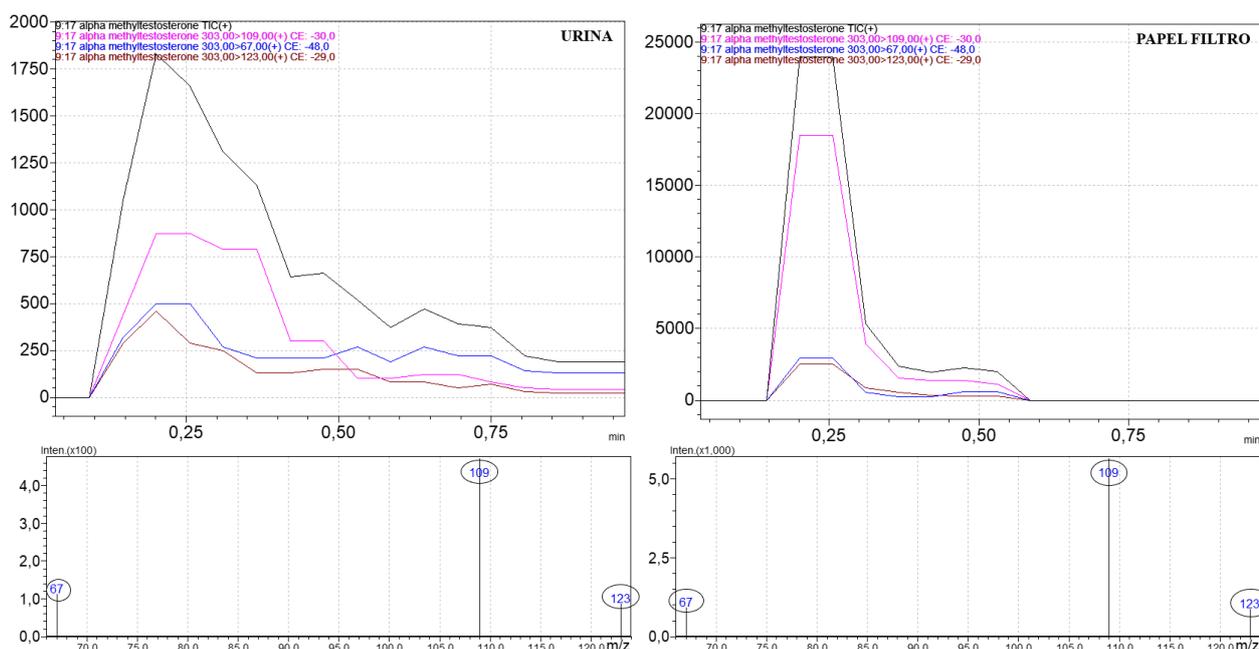
Figura 19. Volumes de solvente de pulverização testados para extração de EAAs por PS-MS.



4.3. Otimização da adição do padrão interno no papel e em urina

A adição do padrão interno (PI) foi testada diretamente no papel de filtro qualitativo e na amostra de urina em triplicata com objetivo de obter melhor intensidade do sinal. Os espectros e cronogramas obtidos estão apresentados abaixo (Figura 20):

Figura 20. Teste da impregnação do PI em urina e no papel de filtro.

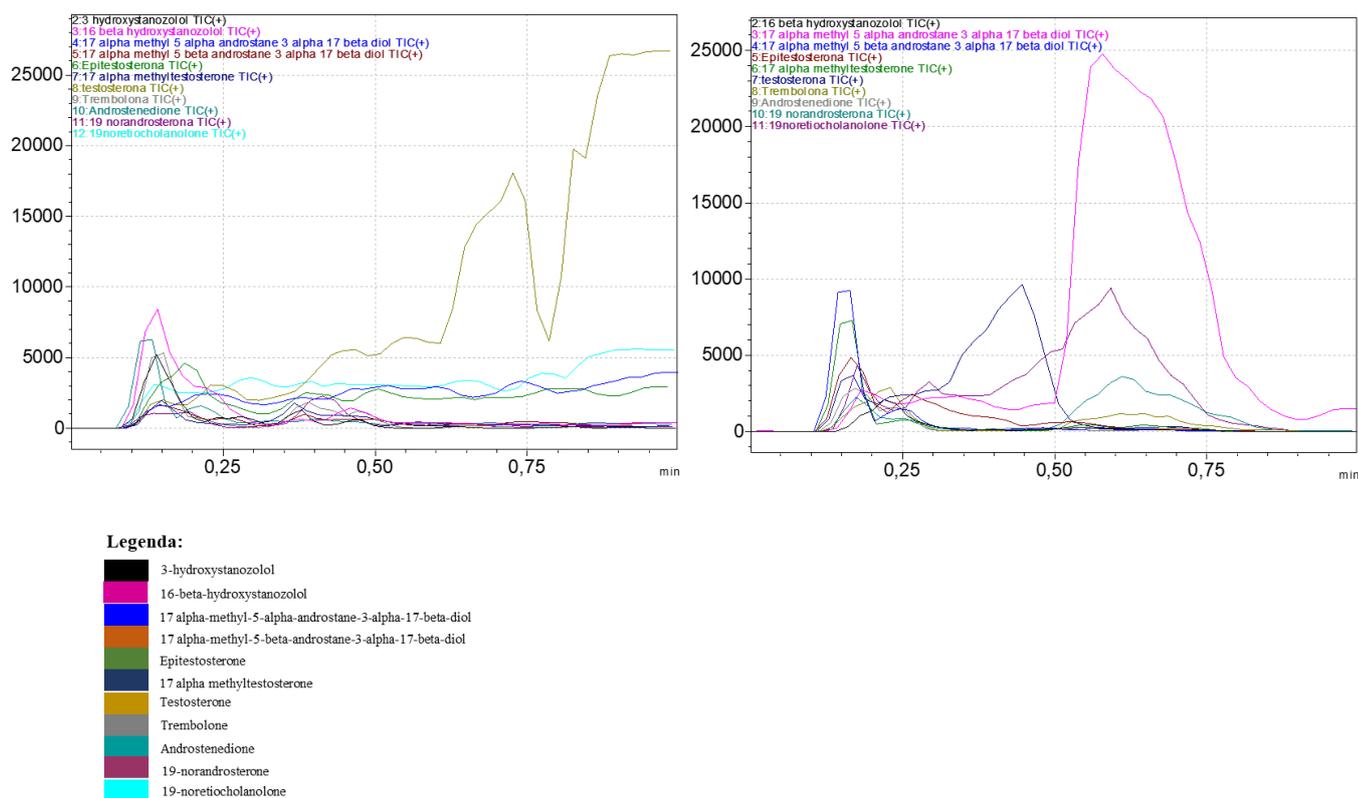


A impregnação do PI no papel de filtro apresentou intensidades absolutas maiores do que a adição do mesmo na amostra de urina, com posterior aplicação no papel. Esse tipo de abordagem é interessante para os casos onde a amostra em DUS é enviada para o laboratório e não é possível adicionar o PI na matriz biológica em fase líquida. Dessa forma, o PI poderia ser adicionado previamente no papel (COOKS *et al.*, 2011; MANICKE *et al.*, 2011). Para este estudo, foi escolhida a impregnação do PI no papel de filtro. O uso do padrão interno com as mesmas características físico-químicas dos analitos é de extrema importância para diminuir erros na análise, aumentar a reprodutibilidade, minimizar o impacto da matriz e de efeitos da ionização, além de garantir a redução da variabilidade da área do pico do analito sob a do PI. A utilização de padrões análogos isotópicos estáveis como deuterado ou C^{13} são ideais para a quantificação, visto que a imprecisão da adição de outros compostos como PI pode aumentar em 10% ou mais, porém apresentam alto custo e difícil acesso (BERGERON, FURTADO & GAROFOLO, 2009; MANICKE; BILLS; ZHANG, 2016; LIU *et al.*, 2018).

4.4. Estudo de reuso

O estudo de reuso foi realizado para avaliar o potencial de reanálise das amostras de DUS, que secaram por 2 horas em temperatura ambiente e tiveram suas intensidades absolutas obtidas novamente no PS-MS (Figura 21).

Figura 21. Intensidades absolutas dos EAAs no estudo de reuso no tempo zero e pós 2 horas de secagem, respectivamente.



Foi possível fazer a reanálise das amostras de DUS, que continuaram apresentando intensidades absolutas ótimas mesmo após a adição do solvente de pulverização e da secagem em temperatura ambiente por 2 horas. Esses resultados estão de acordo com o encontrado por Michely e colaboradores (2017c), na qual algumas substâncias puderam ser reanalisadas por 4 corridas e outras por até 8 corridas. Shi *et al.* (2015), demonstrou que 75% das amostras produziram resultados comparáveis com aqueles antes do reteste. Mesmo assim, a conclusão é de que seriam necessárias análises com cartuchos novos para que todos os analitos fossem detectados.

4.5. Validação de método analítico para detecção de esteroides anabólicos androgênicos em dried urine spots por ionização por paper spray

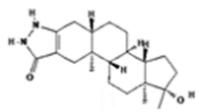
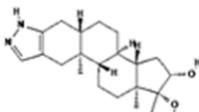
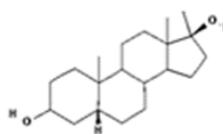
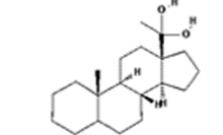
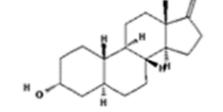
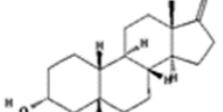
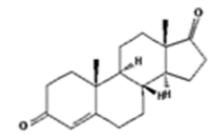
4.5.1. Seletividade

Espectrômetros de massa do tipo triplo quadripolo são específicos, porém possuem baixa resolução. Instrumentos do tipo “*High Resolution Mass Spectrometry*” apresentam alta resolução e podem diferenciar analitos que são coeluídos, a partir da medida de sua massa exata. Como o PS-MS não apresenta boa seletividade, pois não há nenhuma separação cromatográfica, os compostos extraídos pelo solvente de pulverização devem ser diferenciados pelo espectrômetro de massas de acordo com seus fragmentos, sem a interferência do sinal de outros analitos com relação m/z similar (JETT, 2017; MICHELY; MEYER; MAURER, 2017c). A WADA preconiza que a análise deve ser realizada com pelo menos três íons na ausência da cromatografia (WADA, 2015).

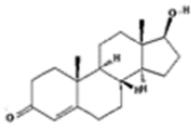
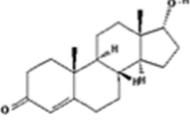
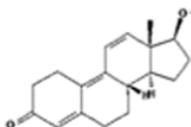
Isômeros endógenos e exógenos podem se fragmentar em íons produtos similares aos do analito de interesse, resultando em resultados falso negativos. A presença de adutos também pode interferir na análise, resultando em m/z similares aos dos compostos analisados (JETT, 2017). Para diferenciar os isômeros das substâncias analisadas pode-se utilizar a razão entre os fragmentos de íons. Algumas dessas substâncias podem fragmentar de forma diferente, apesar de apresentarem a mesma massa molecular. Contudo, resultados falso-positivos podem ocorrer em caso de interferência de compostos que não fazem parte do painel de analitos de interesse e são isômeros dos mesmos (JETT, 2017; MANICKE; BILLS; ZHANG, 2016; MICHELY; MEYER; MAURER, 2017c; MCKENNA *et al.*, 2018). Em um estudo realizado por McKenna e colaboradores (2018), o valor preditivo positivo foi de 99%, enquanto o de preditivo negativo foi de 98%.

Foi realizada uma pesquisa nas bases de dados DrugBank e The Human Metabolome Database (WISHART *et al.*, 2018) com o objetivo de identificar os possíveis interferentes exógenos e endógenos dos analitos de interesse deste trabalho de acordo com sua massa molar. No quadro abaixo encontram-se os principais interferentes para cada analito de acordo com a sua fórmula estrutural e massa molar (Quadro 4).

Quadro 4. Possíveis interferentes endógenos e exógenos para análise de EAAs por PS-MS.

<u>Analito de interesse</u>	<u>Interferente</u>	<u>Fórmula estrutural</u>	<u>Massa nominal</u>
3'OH estanozolol  16'-β-OH estanozolol 	Formoterol	C ₁₉ H ₂₄ N ₂ O ₄	344
	Arformoterol	C ₁₉ H ₂₄ N ₂ O ₄	344
	Formebolona	C ₂₁ H ₂₈ O ₄	344
	Oxifinclimina	C ₂₀ H ₂₈ N ₂ O ₃	344
	Propionato de testosterona	C ₂₂ H ₃₂ O ₃	344
	Medrisona	C ₂₂ H ₃₂ O ₃	344
17-α-metil-5-β-androstane-3-α-17-β-diol  17-α-metil-5-α-androstane-3-α-17-β-diol 	Fluconazol	C ₁₃ H ₁₂ F ₂ N ₆ O	306
	Ruxolitinib	C ₁₇ H ₁₈ N ₆	306
	Oxandrolona	C ₁₉ H ₃₀ O ₃	306
	Butacaína	C ₁₈ H ₃₀ N ₂ O ₂	306
	BA-2664	C ₂₀ H ₃₄ O ₂	306
	17-Alfa-metil-3beta, 17beta-di-hidroxi-5alfa-androstano	C ₂₀ H ₃₄ O ₂	306
	5-Androstenetriol	C ₁₉ H ₃₀ O ₃	306
11-hidroxiandrosterona	C ₁₉ H ₃₀ O ₃	306	
19-Norandrosterona  19-Noreticolanolona 	Etidocaine	C ₁₇ H ₂₈ N ₂ O	276
	Sulfabenzamida	C ₁₃ H ₁₂ N ₂ O ₃ S	276
	Flutamida	C ₁₁ H ₁₁ F ₃ N ₂ O ₃	276
	Salicilato de mentil	C ₁₇ H ₂₄ O ₃	276
	Ciclandelato	C ₁₇ H ₂₄ O ₃	276
	Molindona	C ₁₆ H ₂₄ N ₂ O ₂	276
	19-Nor-5-androstenediol	C ₁₈ H ₂₈ O ₂	276
	Bolandiol	C ₁₈ H ₂₈ O ₂	276
Androstenediona 	Boldenona	C ₁₉ H ₂₆ O ₂	286
	Zolazepam	C ₁₅ H ₁₅ FN ₄ O	286
	Tenalidina	C ₁₇ H ₂₂ N ₂ S	286
	Abacavir	C ₁₄ H ₁₈ N ₆ O	286
	Tonzilamina	C ₁₆ H ₂₂ N ₄ O	286
	1-Androstenediona	C ₁₉ H ₂₆ O ₂	286
	5-Androstenediona	C ₁₉ H ₂₆ O ₂	286
	2-Hidroxiestrona	C ₁₈ H ₂₂ O ₃	286
	N1,N12-Diacetilpermina	C ₁₄ H ₃₀ N ₄ O ₂	286

Quadro 4. Possíveis interferentes endógenos e exógenos para análise de EAAs por PS-MS. (continuação)

<p>Testosterona</p>  <p>Epitestosterona</p> 	Dehidroepiandrosterona	$C_{19}H_{28}O_2$	288	
	Fospropofol	$C_{13}H_{21}O_5P$	288	
	Estriol	$C_{18}H_{24}O_3$	288	
	Androstanediona	$C_{19}H_{28}O_2$	288	
	Prasterona	$C_{19}H_{28}O_2$	288	
	1-Testosterona	$C_{19}H_{28}O_2$	288	
	18-metil-19-nortestosterona	$C_{19}H_{28}O_2$	288	
	Bupivacaína	$C_{18}H_{28}N_2O$	288	
	Levobupivacaína	$C_{18}H_{28}N_2O$	288	
	Etilestrenol	$C_{20}H_{32}O$	288	
	Orotidina	$C_{10}H_{12}N_2O_8$	288	
	2-hidroxiestradiol	$C_{18}H_{24}O_3$	288	
	<p>Trembolone</p> 	Sulfametizol	$C_9H_{10}N_4O_2S_2$	270
		Levulinato de cálcio	$C_{10}H_{14}CaO_6$	270
Leflunomida		$C_{12}H_9F_3N_2O_2$	270	
Teriflunomida		$C_{12}H_9F_3N_2O_2$	270	
Tolbutamida		$C_{12}H_{18}N_2O_3S$	270	
Hexestrol		$C_{18}H_{22}O_2$	270	
Estrona		$C_{18}H_{22}O_2$	270	
Doxilamina		$C_{17}H_{22}N_2O$	270	
Miristato de isopropilo		$C_{17}H_{34}O_2$	270	
Didecildimônio		$C_{18}H_{40}N$	270	
Apigenina		$C_{15}H_{10}O_5$	270	

Fonte: DrugBank e The Human Metabolome Database, 2020.

Foram identificadas 54 substâncias que podem ser consideradas como interferentes nas análises para detecção de EAAs por PS-MS, por apresentarem a mesma massa molar dos analitos desse estudo, demonstrando a importância do monitoramento de reações múltiplas para esse tipo de método. Porém, essas substâncias só podem ser consideradas como interferentes, caso estejam presentes em concentrações detectáveis, sejam ionizadas por protonação e possuam íons produtos idênticos aos dos analitos de interesse do estudo.

O modo MRM aumenta a seletividade do método devido a utilização de seus dois quadrupolos como filtros de massa, na qual íons precursores e produtos podem ser monitorados (JETT, 2017). Entretanto, foi observada a presença de interferentes endógenos com a mesma relação m/z e pelo menos dois íons produtos dos analitos de interesse, visto que algumas das substâncias de interesse deste estudo estão presentes em nível basal.

Os analitos detectados foram a epitestosterona, 19-noreticolanona e testosterona. Para diferenciar os valores de concentração endógena para aqueles de amostras provenientes de usuários de EAA, a quantificação desses analitos deve ser realizada.

Este estudo de seletividade incluiu substâncias comumente utilizadas por usuários de EAA com o objetivo de aumentar o desempenho e minimizar os efeitos adversos.

4.5.2. Limites de detecção (LOD) e limites de quantificação (LOQ)

A WADA preconiza que os esteroides anabólicos androgênicos devem ser detectados na concentração de 2-5 ng/mL (WADA, 2017). Além disso, para garantir que todos os laboratórios acreditados possam relatar os resultados da detecção de substâncias e seus produtos de biotransformação da mesma maneira, a *World Anti-doping Agency* publicou os Níveis Mínimos de Desempenho Requerido (MRPL, do inglês *Minimum Required Performance Levels*) para substâncias que não apresentam um *threshold*. Os MRPL são parâmetros analíticos estabelecidos de acordo com a farmacocinética, farmacodinâmica e estabilidade de cada substância, que foram instituídos visto que alguns laboratórios utilizam métodos que são capazes de detectar analitos em uma faixa maior ou em concentrações menores do que outros. Apesar de ser um valor que representa a concentração de substâncias proibidas, ele não é considerado como um *cut-off* (valor de corte, na qual os resultados acima deste valor numérico são considerados positivos, e abaixo, como negativos) ou um limite de detecção (WADA, 2017).

O LOD não deve ser 50% maior que o MRPL de um determinado analito ou seu produto de biotransformação. Para a detecção de substâncias proibidas utilizando cromatografia e espectrometria de massas, o LOD é baseado na relação sinal/ruído de 3, que é estabelecida de acordo com a comparação de amostras com concentrações conhecidas dos analitos e amostras branco (WADA, 2017). A tabela 5 apresenta os valores alcançados de LOD e LOQ e os MRPL preconizados pela WADA.

Tabela 5. Limites de Detecção (LOD) para esteroides anabolizantes androgênicos em dried urine spots por PS-MS.

Analitos	MRPL WADA (ng/mL)	LOD (ng/mL)	CV (%)
3-OH-estanozolol	2	5	15,5
16 β -OH-estanozolol	2	2	15,0
17 α -metil-5- α -androstane-3- α -17- β -diol	2	15	20,3
17 α -metil-5- β -androstane-3- α -17- β -diol	2	15	15,8
19-Noreticolanolona	2	15	21,1
19-Norandrosterona	2	10	33,6
Androstenediona	-	2	25,6
Epitestosterona	-	5	30,3
Testosterona	-	10	27,6
Trembolona	5	2	21,0

Fonte: Elaborado pela autora.

O coeficiente de variação (CV%) para o LOD e o LOQ não deve ser maior que 20% e 15%, respectivamente de acordo com o guia de validação da SWGTOX. Os valores de LOD do presente estudo apresentaram CV% acima do aceitável para sete das dez substâncias analisadas, porém a literatura demonstra análises realizadas por PS-MS em DBS e sangue total com LODs e LOQs aceitáveis e em concentrações baixas (MANICKE *et al.*, 2011; SU *et al.*, 2013; ESPY *et al.*, 2014; SHI *et al.*, 2015). Apesar disso, é esperado que os LOQs e LODs na técnica de PS-MS sejam maiores do que os alcançados por técnicas hifenadas como a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (KEATING *et al.*, 2018). Apenas o 16'- β -hidroxiestanozolol atingiu o LOQ, enquanto o 3'-hidroxistanozolol e o 17- α -metil-5- β -androstane-3- α -

17- β -diol apresentaram LODs aceitáveis. Estes resultados podem ser devido à dificuldade de ionização dos esteroides anabólicos androgênicos, pois possuem poucos grupos ácido ou básico e apresentam baixa afinidade de prótons nos grupos carbonila e hidroxila. Alguns trabalhos propõem a derivatização dos compostos em análises realizadas por LC-MS, visto que os EAA não apresentam boa ionização no ESI e na técnica de *paper spray*, a ionização ocorre no próprio papel após a adição do solvente de pulverização (COOKS *et al.*, 2011; ATHANASIADOU *et al.*, 2012; BALCELLS *et al.*, 2015; ABUSHAREEDA *et al.*, 2017). Além disso, a técnica utilizada é manual, dificultando o controle de todas as variáveis do método como altura e distância do papel em relação ao inlet do MS, não havendo uma padronização do método (MANICKE; BILLS; ZHANG, 2016).

Nas técnicas convencionais, a fonte de íons está protegida do ambiente externo por um compartimento fechado, enquanto que nas técnicas de ionização ambiente como o PS-MS, estão expostas. Dessa forma, condições do ambiente como corrente de ar, temperatura e umidade podem afetar a estabilidade do *spray*, o que justifica os altos coeficientes de variação de alguns analitos (TAKYI-WILLIAMS; LIU; TANG, 2015). Além disso, o tipo de instrumento do MS na qual a fonte do PS-MS é montada, influencia na sensibilidade do método (ALSAGGAF, 2015).

A presença de efeito matriz também afeta diretamente os limites de detecção do método. A competição da ionização dos analitos de interesse e das substâncias presentes na matriz que são ecoluídas, podem causar uma supressão iônica, diminuindo a quantidade de íons disponíveis que podem ser detectados pelo espectrômetro de massas (JETT, 2017).

Apesar de apresentar CV% acima do aceitável, as análises atingiram critérios de detecção e identificação como formação do pico do cronograma e intensidade absoluta acima do sinal/ruído de até 3.

4.5.3. Linearidade

O método para análise de EAAs por PS-MS não se demonstrou linear para sete dos dez analitos deste estudo, sendo que apenas a epitestosterona, testosterona e trembolona apresentaram coeficiente de determinação (r^2) acima de 0,96, conforme a tabela 6 e as figuras 22 e 23 abaixo. Por esse motivo, não foi realizado o estudo da heteroscedasticidade para nenhuma das substâncias de interesse.

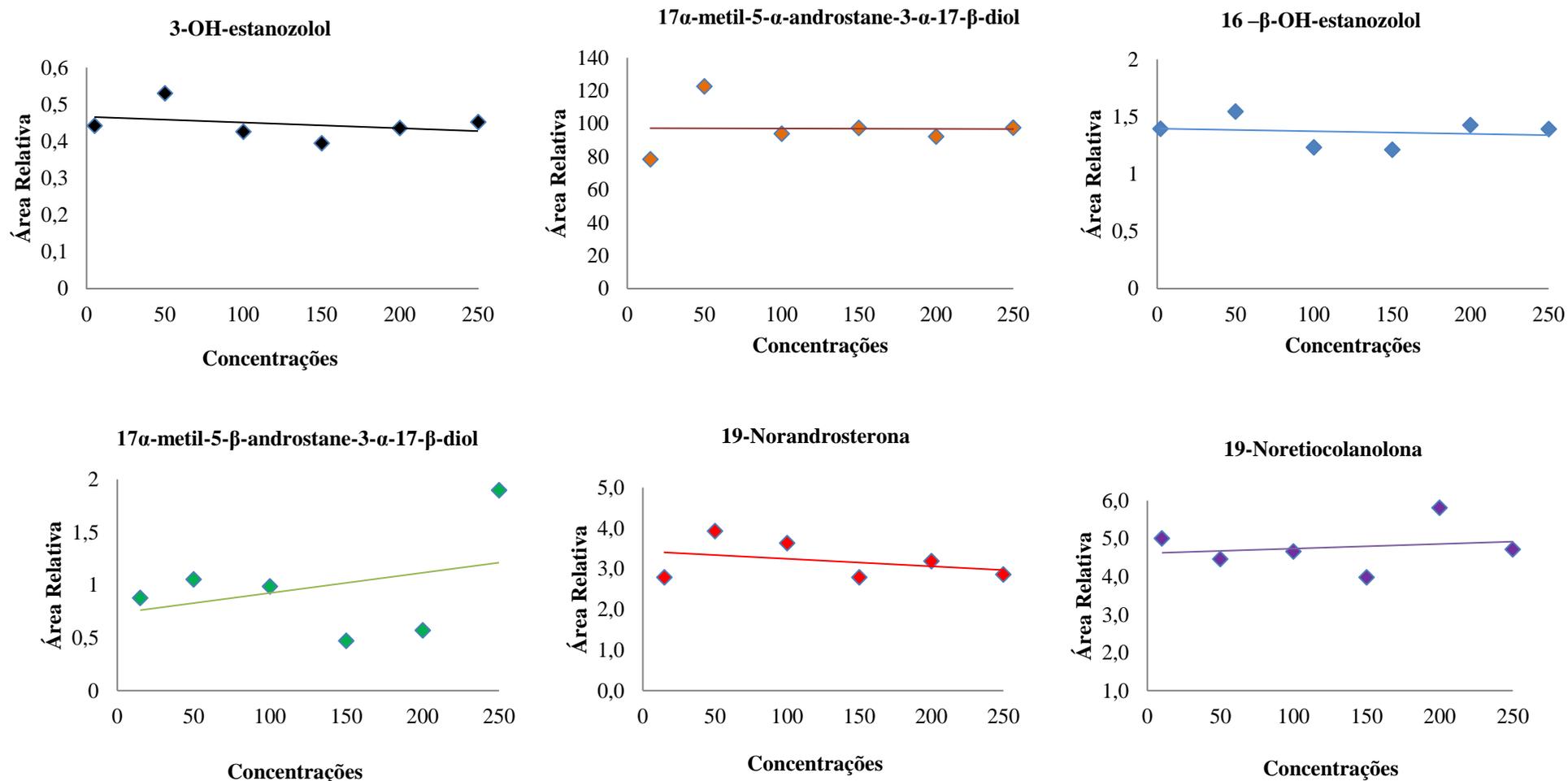
O fato deste método não ser linear nas faixas de trabalho para todos os analitos é corroborada pela dificuldade de ionização dos esteroides anabólicos androgênicos e, também, por esta técnica ser manual, o que aumenta o erro entre as análises, afetando a sua precisão e exatidão (ATHANASIADOU *et al.*, 2012; BALCELLS *et al.*, 2015; MANICKE; BILLS; ZHANG, 2016; ABUSHAREEDA *et al.*, 2017). Além disso, a adição do PI diretamente no papel pode afetar a quantificação, visto que ele já estava diluído previamente, enquanto a amostra pode ser detectada enquanto for aplicado o solvente de pulverização (KLAMPFL & HIMMELSBACH, 2015). Porém, apesar de não ser possível quantificar esses analitos, eles ainda podem ser detectados em baixas concentrações.

Tabela 6. Equações da reta, coeficientes de determinação (r^2) e fatores de ponderação para esteroides anabólicos androgênicos.

Analito	Equação da reta	Coefficiente de determinação (r^2)	Fator de ponderação (F)
3-OH-estanozolol	$y = -0,0002x + 0,4664$	0,1004	-
16 β -OH-estanozolol	$y = -0,0002x + 1,3959$	0,0284	-
17 α -metil-5- α -androstane-3- α -17- β -diol	$y = -0,0022x + 97,315$	0,0002	-
17 α -metil-5- β -androstane-3- α -17- β -diol	$y = 0,0019x + 0,7329$	0,115	-
19-Noreticolanolona	$y = 0,0012x + 4,6157$	0,033	-
19-Norandrosterona	$y = -0,0018x + 3,4313$	0,117	-
Androstenediona	$y = 0,0004x + 0,4457$	0,7151	-
Epitestosterona	$y = 0,0043x + 1,2481$	0,9649	-
Testosterona	$y = 0,0042x + 1,0218$	0,9672	-
Trembolona	$y = 0,0045x + 0,7619$	0,9674	-

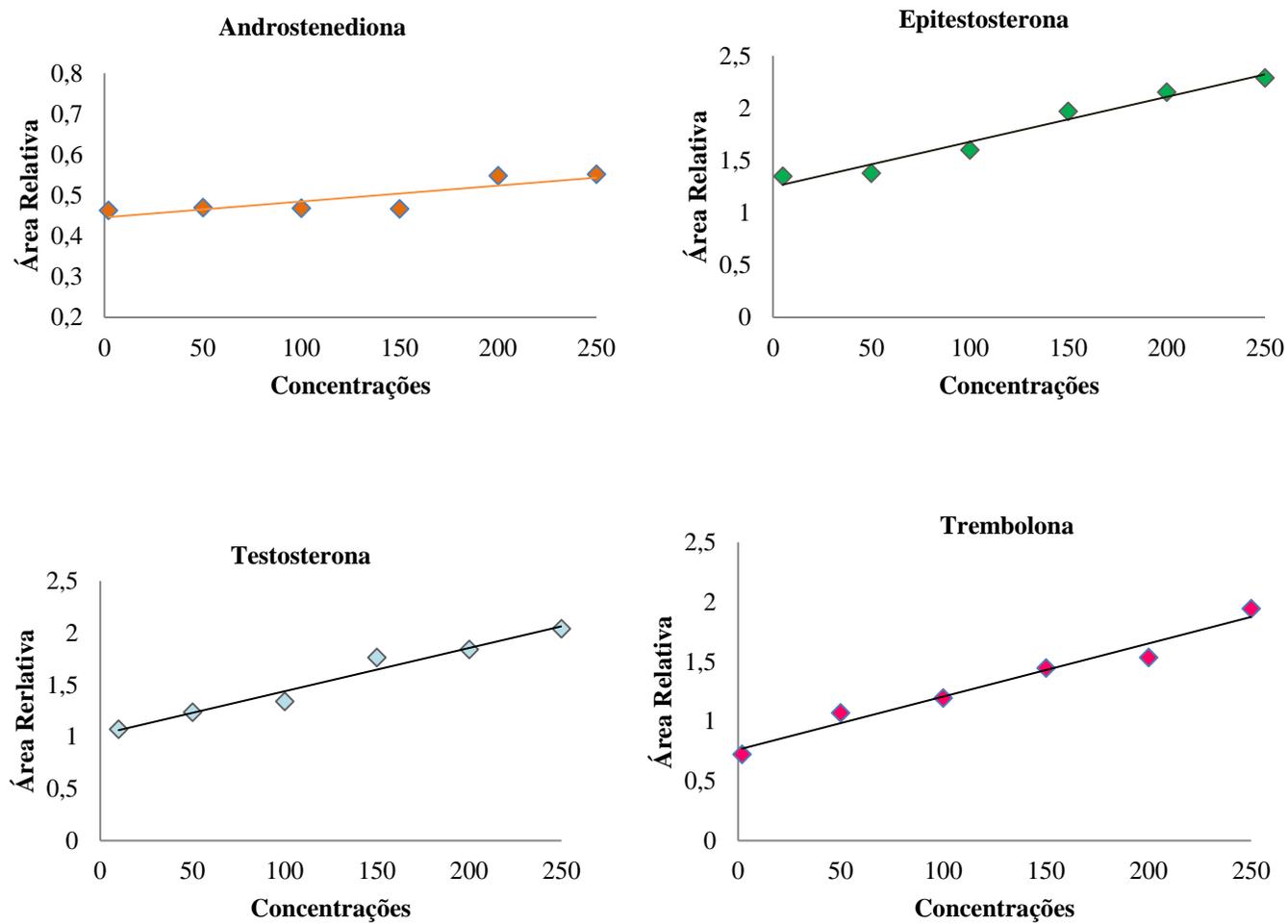
Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 22. Curva de linearidade para esteroides anabólicos androgênicos em dried urine spots por PS-MS.



Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 23. Curva de linearidade para esteroides anabólicos androgênicos em dried urine spots por PS-MS.



Fonte: Elaborado pela autora.

4.5.4. Exatidão

A exatidão se dá pela proximidade da média dos resultados das replicatas e o seu valor real (SWGTOX, 2013). Este parâmetro foi calculado apenas para os analitos que apresentaram linearidade acima de 0,96 para o método proposto. Os ensaios foram realizados em quintuplicata. Os valores encontrados (Tabela 7) não corresponderam aos coeficientes de variação preconizados para controle de qualidade baixo (até 20%) e controles de qualidade médio e alto (até 15%).

Esses resultados estão em conformidade com o parâmetro de linearidade, corroborando que não é possível quantificar os analitos pelo método de PS-MS desenvolvido.

Tabela 7. Dados de exatidão de detecção de esteroides anabólicos androgênicos em dried urine spots por PS-MS.

Analito	Controle de Qualidade	Concentração (ng/mL)	Exatidão (%)
Epitestosterona	CB	15,0	-13,2
	CM	120,0	36,2
	CA	200,0	5,4
Testosterona	CB	30,0	-169,8
	CM	127,5	26,3
	CA	200,0	-4,8
Trembolona	CB	6,0	-287,5
	CM	115,5	53,8
	CA	200,0	3,9

Fonte: Elaborado pela autora.

4.5.5. Precisão intra e interdia

Os resultados de precisão intra e interdia (Tabela 8) apresentaram valores, em sua maioria, acima dos coeficientes de variação aceitáveis, de até 20% para controle baixo e até 15%, para controles médio e alto.

Tabela 8. Dados de precisão intradia e interdia para detecção de esteroides anabólicos androgênicos em dried urine spots por PS-MS.

Analito	Controle de Qualidade	Concentração (ng/mL)	Precisão	
			Intradia (CV%)	Interdia (CV%)
3-OH-estanozolol	CB	15,0	27,8	81,7
	CM	120,0	48,6	123,9
	CA	225,0	<u>14,2</u>	54,1
16 β -OH-estanozolol	CB	6,0	20,8	59,2
	CM	115,5	31,5	92,5
	CA	225,0	<u>12,7</u>	28,2
17 α -metil-5- α -androstane-3- α -17- β -diol	CB	45,0	28,0	376,8
	CM	135,0	34,1	601,7
	CA	225,0	<u>12,7</u>	669,3
17 α -metil-5- β -androstane-3- α -17- β -diol	CB	45,0	38,0	320,9
	CM	135,0	79,3	383,8
	CA	225,0	56,4	388,6
19-Noreticolanona	CB	30,0	38,9	149,1
	CM	127,5	87,1	927,5
	CA	225,0	133,1	1773,1
19-Norandrosterona	CB	45,0	23,9	131,1
	CM	135,0	24,7	177,2
	CA	225,0	29,5	171,7
Androstenediona	CB	6,0	<u>20,1</u>	22,1
	CM	115,5	<u>12,4</u>	56,8
	CA	225,0	18,5	37,5
Epitestosterona	CB	15,0	26,6	57,5
	CM	120,0	35,8	120,9
	CA	200,0	31,1	73,4
Testosterona	CB	30,0	<u>17,8</u>	34,6
	CM	127,5	137,0	677,1
	CA	200,0	31,7	76,1
Trembolona	CB	6,0	<u>17,8</u>	54,1
	CM	115,5	34,4	256,0
	CA	200,0	<u>13,5</u>	71,2

Fonte: Elaborado pela autora.

A precisão se caracteriza como a medida da proximidade de diversos resultados obtidos de diferentes replicatas de uma mesma amostra homogênea, em

condições idênticas, podendo ser avaliada a reprodutibilidade do método (SWGTOX, 2013). Na análise manual em um método *in house* por PS-MS, alguns parâmetros como altura do papel e a distância do mesmo para a entrada do MS, podem sofrer pequenas variações, visto que são ajustados manualmente. Logo, isso pode afetar diretamente a reprodutibilidade do método, aumentando a sua imprecisão. Os métodos de detecção de substâncias por ionização por paper *spray*, apresentam precisão inferior do que os métodos comuns (KLAMPFL & HIMMELSBACH, 2015).

Os valores dos ensaios de precisão interdica estão acima dos limites aceitáveis, visto que a técnica utilizada é manual, não sendo possível controlar todas as variáveis em dias diferentes. Parâmetros oriundos do próprio equipamento e do analista, são extremamente importantes para a avaliação desse parâmetro.

4.5.6. Efeito matriz

O efeito matriz (EM) se caracteriza como a variação da eficácia da ionização do analito de interesse, na qual substâncias endógenas não detectadas presentes na matriz coeluem com os analitos, suprimindo ou aumentando o sinal dos mesmos. Em análises realizadas com amostras oriundas de diferentes fontes, o efeito matriz pode ser pronunciado, impactando no resultado da análise, na sensibilidade, reprodutibilidade, precisão e robustez do método, incluindo os seus limites de detecção. Na técnica de PS-MS, a extração e a ionização ocorrem ao mesmo tempo. Fatores como a superfície de tensão do solvente, pH da amostra e polaridade dos analitos de interesse podem causar uma supressão iônica (MATUSZEWSKI; CONSTANZER; CHAVEZ-ENG, 2003; SHI *et al.*, 2015; BIENVENU *et al.*, 2017; JETT, 2017).

A supressão do sinal ocorre principalmente em técnicas API como o ESI e APCI. Quando há altas concentrações dos analitos, a linearidade do sinal no *electrospray* é perdida devido à uma saturação das gotas produzidas pelo *spray*, dificultando a ejeção dos íons contidos nas mesmas. Uma mudança na viscosidade e na superfície de tensão das gotas, causada pela coeluição de substâncias interferentes, pode diminuir a volatilização do solvente e a capacidade do analito de vaporizar (VAN EECKHAUT *et al.*, 2009). O solvente de pulverização também

pode afetar o EM, devido a solubilidade dos analitos de interesse e das substâncias presentes na matriz que podem coeluir (JETT, 2017).

Neste estudo, o efeito matriz foi determinado de acordo com o protocolo descrito por Matuszewski *et al.* (2003) para cromatografia líquida e ionização do tipo ESI, na qual valores acima de 100% demonstram aumento da ionização, e abaixo de 100%, supressão da ionização. Um valor próximo a 100% indica que o efeito matriz é mínimo. O cálculo é realizado pela média da área absoluta dos analitos de interesse pela área do PI, visto que ele também pode sofrer efeito de matriz. Na tabela 9 encontram-se os valores de EM para EAAs em *dried urine spots*.

Tabela 9. Efeito matriz em amostras de dried urine spots por PS-MS em porcentagem.

Analito	Concentração	EM
	ng/mL	%
3'-Hidroxiandrostanozolol	15	89,5
	80	116,6
	160	93,8
16'- β -Hidroxiandrostanozolol	15	79,9
	80	93,6
	160	99,3
Epitestosterona	15	311,5
	80	357,9
	160	289,0
Testosterona	15	231,0
	80	358,4
	160	328,6
Trembolona	15	105,0
	80	122,6
	160	178,5
17- α -metil-5- α -androstane-3- α - 17- β -diol	15	88,7
	80	72,3
	160	100,3
17- α -metil-5- β -androstane-3- α - 17- β -diol	15	71,5
	80	92,7
	160	57,6
19-Norandrosterona	15	48,2
	80	56,9
	160	58,5
19-Noreticolanona	15	146,4
	80	126,4
	160	89,1
Androstenediona	15	88,3
	80	169,3
	160	165,7
17 α -metiltestosterona	200	100,1

Fonte: Elaborado pela autora.

De acordo com a tabela acima, EAAs como 3'-hidroxiandrostanozolol, 16'- β -hidroxiandrostanozolol e 17- α -metil-5- α -androstane-3- α -17- β -diol apresentam pouca

supressão iônica, enquanto a androstenediona, trembolona e 19-noreticolanolona sofrem um aumento da ionização em concentrações mais altas. Os valores de EM das substâncias 17- α -metil-5- β -androstane-3- α -17- β -diol e 19-norandrosterona indicam uma supressão iônica pronunciada, enquanto os analitos epitestosterona e testosterona apresentam um acentuado aumento da ionização.

A testosterona, epitestosterona, androstenediona e 19-noreticolanolona são substâncias presentes endogenamente em biofluidos. Isso corrobora a presença de valores pronunciados do EM desses analitos.

A urina é uma matriz constituída por proteínas, cristais como ácido úrico, ureia, aminoácidos e células como eritrócitos, leucócitos e células epiteliais (CHIU *et al.*, 2010). Além disso, apresenta variações da sua composição entre indivíduos, de acordo com a dieta e ingestão de líquidos, o que pode dificultar a ionização das substâncias de interesse (VAN EECKHAUT *et al.*, 2009; SCHLITTENBAUER; SEIWERT; REEMTSMA, 2015). O efeito matriz pode ser acima de 100% em amostras que apresentam analitos conjugados com glicuronídeo ou sulfato (MICHELY; MEYER; MAURER, 2017c).

A composição do solvente de pulverização também pode interferir no efeito matriz. Soluções preparadas com acetonitrila demonstram menor supressão da ionização, porém menor recuperação do que àquelas com metanol (VEGA *et al.*, 2016).

O preparo de amostra é importante para minimizar os interferentes que causam o efeito matriz, pois a introdução direta de matrizes biológicas de alta complexidade como a urina no espectrômetro de massas, pode aumentar o EM e diminuir a sensibilidade do método (MARCHI *et al.*, 2010; YANG *et al.*, 2018). Amostras secas de urina tendem a apresentar maior supressão iônica do que amostras secas de sangue (VEGA *et al.*, 2016).

Dessa forma, como o método apresentado não tem nenhum tipo de preparo e as amostras são injetadas diretamente no espectrômetro de massas, o EM pode ser mais pronunciado em alguns analitos, impactando, principalmente, em seus limites de detecção e quantificação. Porém, se os LODs são alcançados, o efeito matriz não deve ser considerado um problema (MICHELY; MEYER; MAURER, 2017c; YANG *et al.*, 2018).

4.5.7. Estabilidade

A estabilidade dos esteroides anabólicos androgênicos em *dried urine spots* foi avaliada pelo período de cinco meses, na qual as amostras nas concentrações de 15ng/mL e 50ng/mL foram armazenadas dentro de um envelope de papel alocado em um armário de madeira fechado a temperatura ambiente. Todas as análises foram realizadas em triplicata no tempo zero, quatro e cinco meses.

Foi possível identificar todos os analitos nas concentrações de 15ng/mL e 50ng/mL durante o período proposto para o estudo de estabilidade (Figura 24). Como não foi possível quantificar essas substâncias, foram avaliadas as intensidades absolutas dos sinais dos analitos e seus respectivos padrões de fragmentação, em relação aos controles preparados no mesmo dia.

Esse resultado é compatível com o proposto por outros estudos, na qual amostras secas de sangue apresentam estabilidade a longo prazo (180 dias) de novas substâncias psicoativas, cocaína e benzodiazepínicos em temperatura ambiente, 4°C e -20°C, quando comparadas às amostras em sangue total. Naquelas armazenadas em freezer e geladeira, não houve degradação dos analitos devido às reações enzimáticas que continuam ocorrendo (ALFAZIL & ANDERSON, 2008; DA CUNHA; EBERLIN; COSTA, 2017; DA CUNHA; EBERLIN; COSTA, 2018). Em estudos de metabolômica, o DUS e DBS armazenados em temperatura ambiente, foram estáveis por 4 semanas, enquanto benzodiazepínicos apresentaram estabilidade de 3 semanas em amostras secas de urina (JAIN *et al.*, 2017; PALMER; COOPER; DUNN, 2019).

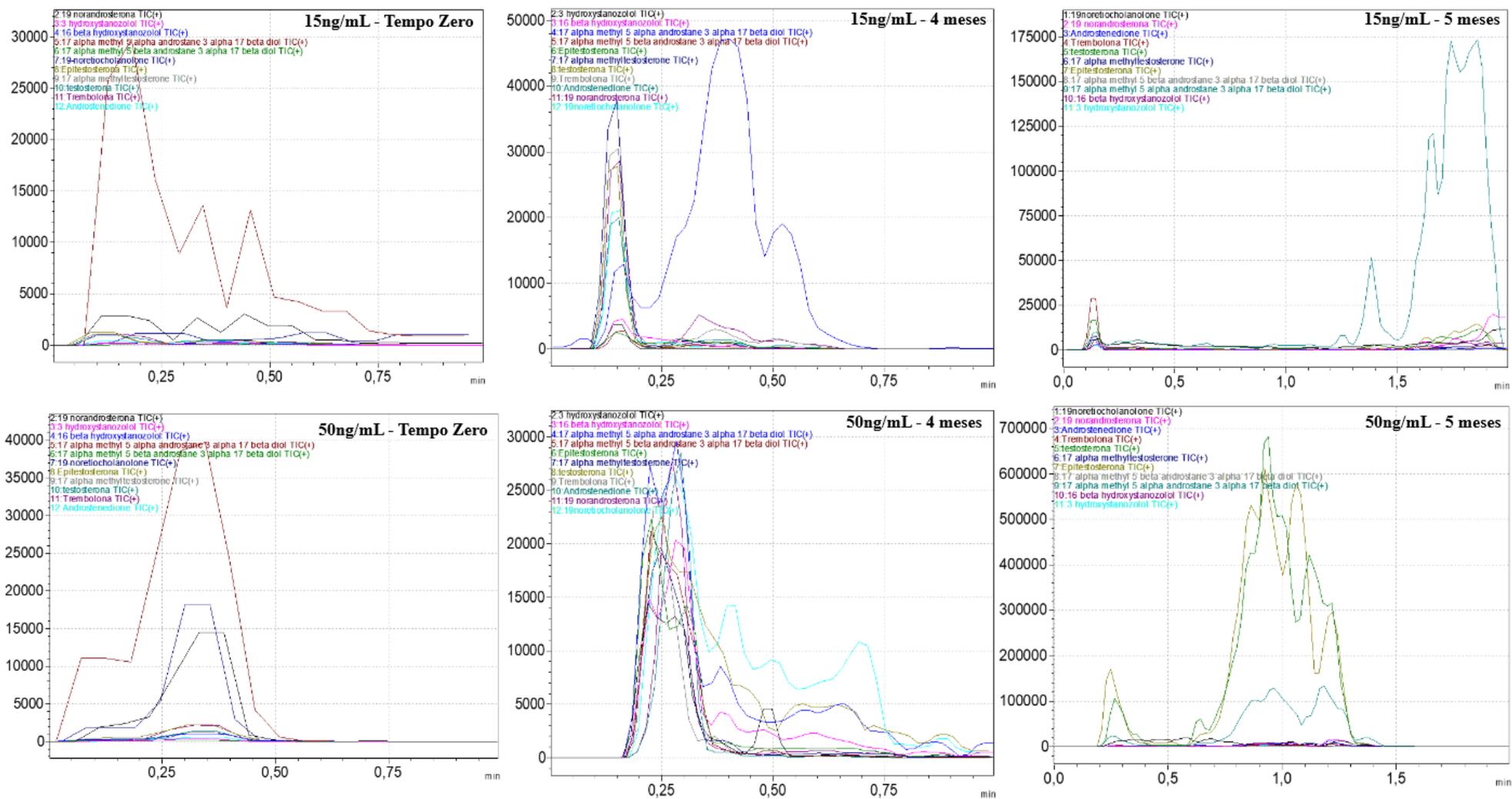
Um projeto está sendo testado na qual as amostras de urina coletadas pela WADA são acondicionadas em frascos que contém substâncias como antibióticos, antimicóticos e inibidores de proteases, com o objetivo de manter a estabilidade das mesmas (ABUSHAREEDA *et al.*, 2014; TSIVOU *et al.*, 2017).

A utilização de amostras em DBS para análises de doping também tem sido discutida, devido a sua capacidade de oferecer estabilidade a longo prazo, facilidade de armazenamento e transporte (ABUSHAREEDA *et al.*, 2014; WADA, 2019b).

Os EAAs deste estudo são estáveis em temperatura ambiente por 150 dias, o que demonstra o potencial do *dried urine spots* para as análises antidoping preconizadas pela WADA, visto que as amostras devem ser armazenadas por um longo período para potenciais retestes, pois a maior parte dos EAAs sintéticos têm

a sua estrutura molecular e produtos de biotransformação desconhecidos quando são introduzidos no mercado. Essas reanálises só podem ser feitas quando há garantia que as amostras de urina não sofreram alterações em sua qualidade, como modificações nas estruturas dos esteroides, devido a reações por microorganismos ou enzimas proteolíticas, principalmente durante o transporte (ABUSHAREEDA *et al.*, 2014; KUURANNE & SAUGY, 2016).

Figura 24. Estudo da estabilidade dos esteroides anabólicos androgênicos em dried urine spots.

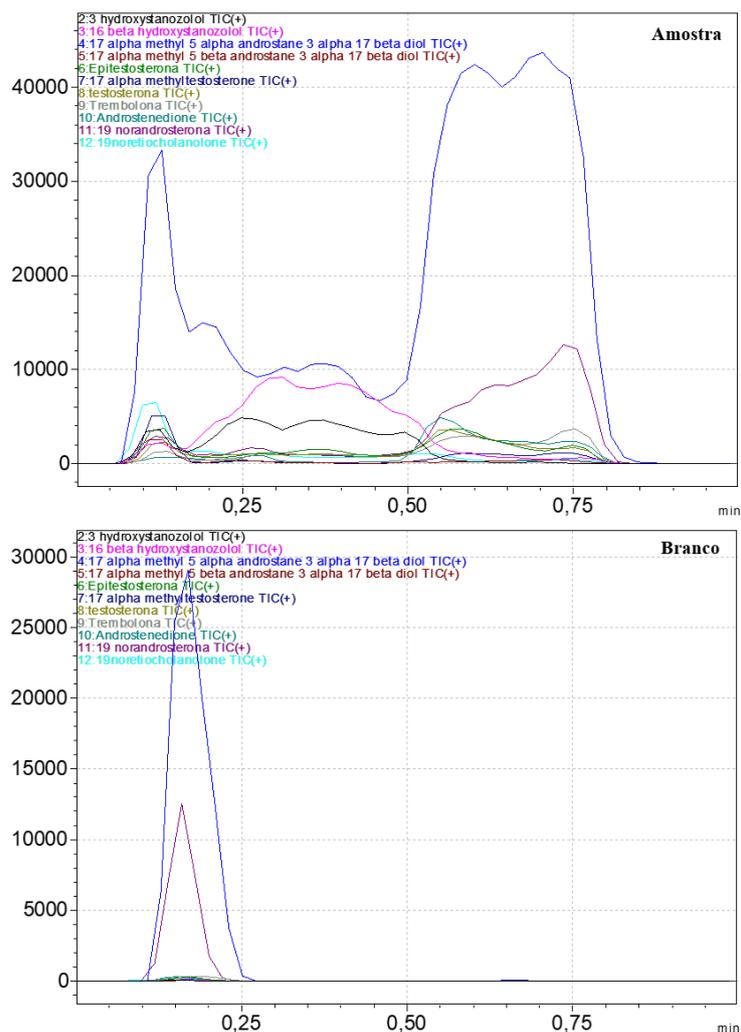


4.5.8. Carryover

A presença de *carryover* é significativa nas análises por *paper spray*. Devido a reutilização do grampo de cobre e das subseqüentes adições de solvente de pulverização, pode ocorrer contaminação cruzada. A limpeza da entrada do MS e do grampo de cobre do dispositivo do PS-MS deve ser realizada para evitar efeito memória e resultados falso-positivos. A contaminação depende do analito e pode ser mínima ou inexistente (PAULA *et al.*, 2018; TAKIY-WILLIAMS *et al.*, 2019).

O ensaio de *carryover* foi realizado de acordo com o preconizado pela SWGTOX, na qual amostras branco em triplicata foram analisadas após a corrida de amostras fortificadas na concentração de 1000ng/mL com limpeza da entrada do MS e do grampo de cobre entre as análises. O método apresentou em suas replicatas *carryover* das substâncias 17- α -metil-5- α -androstane-3- α -17- β -diol e 19-norandrosterona (Figura 25).

Figura 25. Cronogramas obtidos no ensaio de carryover.



Também foi realizada a verificação do carryover a partir da metodologia proposta por Takiy-Williams e colaboradores, na qual amostras em concentrações altas (1000ng/mL) foram testadas após amostras em concentrações baixas (10ng/mL) com posterior análise de amostras de urina negativa utilizando o mesmo grampo de metal sem limpeza entre as corridas. As áreas dos analitos da amostra branco foram comparadas com as áreas das amostras de concentração baixa. Coeficiente de variação acima de 20% seria um indicativo de carryover (TAKIY-WILLIAMS *et al.*, 2019). As análises realizadas para verificar a ocorrência de *carryover* demonstraram que o método apresentou em todas as suas replicatas efeito *carryover* de 6 analitos. A tabela abaixo apresenta os resultados deste ensaio (Tabela 10):

Tabela 10. Carryover em amostras de DUS por PS-MS.

Análitos	CV (%)
3 ^o -Hidroxiandrostanozolol	13,3
16 ^o -β – Hidroxiandrostanozolol	14,9
17-α-metil-5-α- androstano-3-α-17-β- diol	35,7
17-α-metil-5-β- androstano-3-α-17-β- diol	35,8
19-Norandrosterona	12,6
19-Noreticolanolona	23,3
Androstenediona	33,7
Epitesterona	34,0
Testosterona	38,5
Trembolona	30,1

Fonte: Elaborado pela autora.

Foi possível observar a presença de *carryover* das substâncias 17-α-metil-5-α-androstano-3-α-17-β-diol, 17-α-metil-5-β-androstano-3-α-17-β-diol, 19-noreticolanola, androstenediona, epitesterona, testosterona e trembolona, nos ensaios realizados consecutivamente sem limpeza entre as corridas. Sendo assim, a limpeza da entrada do MS e do grampo de cobre do dispositivo do PS-MS é imprescindível para evitar efeito memória das substâncias acima e resultados falso-positivos (PAULA *et al.*, 2018).

4.6. Aplicação do método de *screening* de EAAs em DUS por PS-MS em amostras reais

Em análises toxicológicas, o *screening* e a confirmação são as etapas utilizadas para detecção de drogas de abuso. O *screening* é realizado com o objetivo de identificar uma grande variedade de analitos, podendo ser utilizadas técnicas como o imunoensaio, cromatografia gasosa ou líquida, cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (MCKENNA *et al.*, 2018). Este tipo de análise deve ser sensível, seletivo, de baixo custo e que possa ser utilizado facilmente pelos analistas (VANDERGRIFT *et al.*, 2018). De acordo com a SWGTOX (2013), um método para *screening* deve ter como parâmetros validados: seletividade, limite de detecção e estabilidade.

O método de *screening* validado foi aplicado em 50 amostras de usuários e não-usuários de esteroides anabólicos androgênicos aplicadas em *dried urine spots*. O quadro 5 apresenta os resultados positivos para a presença de EAAs.

Quadro 5. Amostras positivas para pelo menos um dos analitos deste estudo.

AMOSTRA	3' Hidroxiandrostanozolol 5ng/mL	16-β Hidroxiandrostanozolol 2ng/mL	17-α-metil-5-α- androstane-3-α- 17-β-diol 15ng/mL	17-α-metil-5-β- androstane-3-α- 17-β-diol 15ng/mL	19- norandrosterona 15ng/mL	19- noretiocolanona 10ng/mL	Androstenediona 2ng/mL	Trembolona 2ng/mL	Relação T/E
P20587	ND	+	+	ND	+	+	ND	+	<1,0
P20588	ND	+	+	+	+	+	ND	+	<1,0
P20589	+	+	+	+	+	+	+	+	1,0
P20590	ND	+	+	+	+	+	ND	+	<1,0
P20591	ND	+	ND	ND	+	+	ND	ND	1,5
P20592	ND	+	+	+	+	+	ND	+	<1,0
P20593	+	+	+	+	+	+	+	+	5,0
P20594	ND	ND	ND	ND	ND	+	ND	ND	1,0
P20597	ND	ND	+	+	+	+	ND	ND	<1,0
P20598	ND	+	+	+	+	+	ND	+	<1,0
P20600	+	+	+	+	+	+	ND	+	<1,0
P20601	ND	+	+	+	+	+	ND	ND	<1,0
P20602	ND	+	+	+	+	+	ND	+	2,0
P20603	ND	+	ND	ND	+	+	ND	ND	3,7
P20604	ND	ND	ND	ND	+	+	ND	+	<1,0
P20605	ND	ND	ND	ND	+	+	ND	ND	<1,0
P20607	ND	ND	ND	ND	ND	+	ND	ND	3,7
P20608	+	+	+	+	+	+	ND	ND	<1,0
P20610	ND	+	+	+	+	+	ND	ND	<1,0
P20611	ND	ND	ND	ND	+	+	ND	ND	<1,0

*ND: não detectado; (+): presença da substância; (-): ausência da substância.

Quadro 5. Amostras positivas para pelo menos um dos analitos deste estudo.

(continuação)

AMOSTRA	3'-OH-Stanozolol 5ng/mL	16-β OH-Stanozolol 2ng/mL	17-α-metil-5-α-androstane-3-α-17-β-diol 15ng/mL	17-α-metil-5-β-androstane-3-α-17-β-diol 15ng/mL	19-norandrosterona 15ng/mL	19-noreticolanona 10ng/mL	Androstenediona 2ng/mL	Trembolona 2ng/mL	Relação T/E
P20615	ND	+	ND	ND	+	+	ND	ND	<1,0
P20616	+	+	+	+	+	+	ND	+	<1,0
P20618	+	ND	+	+	+	+	ND	ND	<1,0
P20620	+	+	ND	ND	ND	+	ND	ND	<1,0
P20621	ND	+	+	+	+	+	+	+	<1,0
P20622	ND	ND	ND	ND	ND	+	ND	ND	2,0
P20623	ND	ND	+	ND	ND	+	ND	ND	<1,0
P20624	ND	ND	+	ND	+	ND	ND	ND	<1,0
P20626	ND	ND	+	ND	ND	+	ND	+	<1,0
P20627	ND	ND	+	ND	ND	ND	ND	ND	1,6
P20628	ND	+	+	ND	+	+	ND	ND	2,4
P20629	ND	ND	+	ND	+	+	+	+	<1,0
P20630	ND	+	+	+	+	+	ND	ND	<1,0
P20632	ND	ND	+	ND	+	+	ND	ND	<1,0
P20633	ND	+	+	+	+	+	ND	+	<1,0
P20634	ND	ND	ND	ND	ND	+	ND	ND	1,4
P20635	ND	+	+	ND	+	+	ND	ND	<1,0
P20636	ND	ND	+	ND	+	+	ND	ND	1,2
P20637	ND	+	+	ND	+	+	ND	ND	<1,0

Das 50 amostras testadas, 39 foram positivas para pelo menos um dos analitos testados, sendo que apenas 6 apresentaram relação T/E acima de 1,0 a partir do cálculo da área abaixo da curva dos analitos. Para ser considerado doping pela WADA, este valor deve estar acima de 4,0 (ANDERSEN & LINNET, 2014). Somente a amostra P20593 apresentou relação T/E de 5,0.

A maior parte das amostras foram positivas para a utilização de estanozolol, nandrolona, metandienona e trembolona. Esses resultados estão de acordo com o publicado por DE SOUZA *et al.* (2019), na qual as amostras deste estudo foram testadas quantitativamente em colaboração com o nosso laboratório por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas (UPLC-MS/MS). As amostras de usuários de esteroides anabólicos androgênicos, foram positivas para decanoato de nandrolona, boldenona, testosterona e estanozolol.

O método se demonstrou eficaz para o *screening* de esteroides anabólicos androgênicos em *dried urine spots*, podendo ser utilizado na primeira etapa para a análise anti-doping. Porém, outros métodos como a cromatografia gasosa ou líquida acoplada à espectrometria de massas, são necessários para confirmar, quantificar e diferenciar as substâncias produzidas endogenamente das utilizadas exogenamente com o objetivo de doping.

Estes resultados também demonstram que a utilização do *dried urine spots* pode ser considerada como forma de amostragem para a detecção de EAAs.

5. Conclusão

Este trabalho propõe uma nova técnica multianalito para o *screening* de dez esteroides anabólicos androgênicos em *dried urine spots* por ionização por *paper spray* acoplado à espectrometria de massas.

Esta técnica de ionização ambiente é interessante para a análise de EAA, pois reduz custos com armazenamento e insumos; o tempo de aquisição de dados para o painel de substâncias de interesse é de 2 minutos; diminui o descarte de solventes, visto que quase todo o volume é consumido durante a análise, fazendo com que este seja um método que se enquadra nos princípios da química analítica verde; e minimiza o preparo de amostras e o risco biológico para o analista, visto que uma pequena quantidade de urina é necessária. Além disso, permite a realização de um *screening* abrangente de diferentes analitos análogos da testosterona que são utilizados no doping esportivo, sendo uma opção mais barata, sustentável e rápida em detrimento da utilização da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas.

O método apresentou *cut-offs* entre 2 e 15 ng/mL e estabilidade de 150 dias em temperatura ambiente. Porém, é preciso se atentar para a presença de *carryover* de alguns analitos, sendo imprescindível a limpeza do MS e do PS-MS entre as corridas. Por ser uma técnica que utiliza apenas da espectrometria de massas e não há nenhum tipo de separação cromatográfica, a seletividade é uma das suas principais limitações em relação àqueles desenvolvidos com o uso de cromatografia. Deve-se utilizar do maior número de íons produtos e da razão de íons de cada substância, com o intuito de evitar resultados falso-positivos ou falso-negativos pela presença de interferentes endógenos e exógenos.

A técnica desenvolvida ainda necessita de ajustes em sua execução, porém apresenta potencial para automação, o que minimizaria os erros na precisão e exatidão do método. Em conclusão, este estudo apresenta resultados promissores que demonstram a possibilidade da análise rápida e simples de esteroides anabólicos androgênicos em *dried urine spots* por ionização por *paper spray* acoplada à espectrometria de massas para exames *antidoping*.

Referências bibliográficas:

- ABRAHIN, O. S. C.; SOUSA, E. C.; SANTOS, A. M. Prevalence of the use of anabolic-androgenic steroids in Brazil: a systematic review. *Substance Use & Misuse*, v. 49, p. 1156–1162, 2014.
- ABRAHIN, O.; SOUZA, N. S. F.; DE SOUSA, E. C.; SANTOS, A. M.; BAHRKE, S. M. Anabolic–androgenic steroid use among Brazilian women: an exploratory investigation, *Journal of Substance Use*, v. 22, n. 3, p. 246-252, 2017.
- ABUSHAREEDAA, W. FRAGKAKI, A.; ARIADNI VONAPARTI, A.; ANGELIS, Y.; TSIVOU, M.; SAAD, K.; KRAIEM, S.; LYRIS, E.; ALSAYRAFI, M.; GEORGAKOPOULOS, C. Advances in the detection of designer steroids in anti-doping. *Bioanalysis*, v. 6, n. 6, p. 881–896, 2014.
- ABUSHAREEDAA, W.; LYRIS, E.; KRAIEMA, S.; WAHAIBIA, A. A.; ALYAZIDIA, S.; DBESA, N.; LOMMENC, A.; NIELENC, M.; HORVATOVICH, P. L.; ALSAYRAFI, M.; GEORGAKOPOULOS, C. Gas chromatographic quadrupole time-of-flight full scan high resolution mass spectrometric screening of human urine in antidoping analysis. *Journal of Chromatography B*, v. 1063, p. 74–83, 2017.
- ABUSHAREEDA, W.; TIENSTRA, M.; LOMMEN, A.; BLOKLAND, M.; STERK, S.; KRAIEM, S.; HORVATOVICH, P.; NIELEN, M.; AL-MAADHEED, M.; GEORGAKOPOULOS, C. Comparison of Gas Chromatography Quadrupole Time-Of-Flight and Quadrupole Orbitrap Mass Spectrometry in Anti-doping Analysis: I. Detection of Anabolic-androgenic Steroids. *Rapid communications in mass spectrometry*, v. 32, n. 23, p. 2055-2064, 2018.
- ALFAZIL, A. A.; ANDERSON, R. A. Stability of Benzodiazepines and Cocaine in Blood Spots Stored on Filter Paper. *Journal of Analytical Toxicology*, v. 32, n. 7, p. 511–515, 2008. ALSAGGAF, W. T. Characterization and applications of paper spray ionization mass spectrometry. *The University of British Columbia*, 2015.
- ALTUKHOV, S.; NAURIGHT, J. The new sporting Cold War: implications of the Russian doping allegations for international relations and sport. *Sport in Society*, v.21, n. 8, p. 1120-1136, 2018.
- AMADOR, V. S.; PEREIRA, H. V.; SENA, M. M.; AUGUSTI, R.; PICCIN, E. Paper Spray Mass Spectrometry for the Forensic Analysis of Black Ballpoint Pen Inks. *Journal of the American Society For Mass Spectrometry*, v. 28, p. 1965-1976, 2017.
- ANAWALT, B. D. Detection of anabolic androgenic steroid use by elite athletes and by members of the general public. *Molecular and Cellular Endocrinology*, n. 15, v. 464, p. 21-27, 2017.
- AMBACH, L.; REDONDO, A. H.; KÖNIG, S.; WEINMANN, W. Rapid and simple LC-MS/MS screening of 64 novel psychoactive substances using dried blood spots. *Drug Testing and Analysis*, v. 6, n. 4, p. 367–375, 2013.
- ANDERSEN, D. W.; LINNET, K. Screening for Anabolic Steroids in Urine of Forensic Cases Using Fully Automated Solid Phase Extraction and LC–MS-MS. *Journal of Analytical Toxicology*, v. 38, p. 637–644, 2014.
- ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. *Portaria nº344*, de 12 de maio de 1988. Aprova o regulamento técnico sobre substâncias e medicamentos sujeitos a controle especial. 1988. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/svs/1998/prt0344_12_05_1998_rep.html>. Acesso em: 07 fev. 2020.
- ARAZI, H.; MOHAMMADJAFARI, H.; ASADI, A. Use of anabolic androgenic steroids produces greater oxidative stress responses to resistance exercise in strength-trained men. *Toxicology Reports*, v. 4, p. 282–286, 2017.

ARMBRUSTER, D. A.; PRY, T. Limit of blank, limit of detection and limit of quantitation. *The Clinical biochemist. Reviews / Australian Association of Clinical Biochemists*, v. 29, Suppl 1, n. August, p. S49-52, 2008.

ATHANASIADOU, I.; ANGELIS, Y. S.; LYRIS, E.; VONAPARTI, A.; THOMAIDIS, N. S.; KOUPPARIS, M. A.; GEORGAKOPOULOS, C. Two-step derivatization procedures for the ionization enhancement of anabolic steroids in LC-ESI-MS for doping control analysis. *Bioanalysis*, v. 4, n. 2, p. 167-175, 2012.

AYOTTE, C. Detecting the Administration of Endogenous Anabolic Androgenic Steroids. *Doping in Sports in: Handbook of Experimental Pharmacology*, v. 195, 2010.

BADU-TAWIAH, K. A.; EBERLIN, L. S.; OUYANG, Z.; COOKS, R. G. Chemical Aspects of the Extractive Methods of Ambient Ionization Mass Spectrometry. *Annual Review of Physical Chemistry*. v. 64, p. 481-505, 2013.

BALCÁZAR, J. S. C.; MEESTERS, R. J. W. Bioanalytical comparison between dried urine spots and liquid urine bioassays used for the quantitative analysis of urinary creatinine concentrations. *Bioanalysis*, v. 6, n. 21, p. 2803-2814, 2014.

BALCELLS, G.; POZO, O. J.; ESQUIVEL, A.; KOTRONOULAS, A.; JOGLAR, J.; SEGURA, J.; VENTURA, R. Screening for anabolic steroids in sports: Analytical strategy based on the detection of phase I and phase II intact urinary metabolites by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1389, p. 65-75, 2015.

BANERJEE, S.; MAZUMDAR, S. Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A technique to access the information beyond the molecular weight of the analyte. *International Journal of Analytical Chemistry*, vol. 2012.

BARBALHO, M. S. M.; BARREIROS, F. P. The use and effect of anabolic androgenic steroids in sports. *International Journal of Sports Science*, v. 5, n. 5, p. 171-179, 2015.

BARON, D. A.; MARTIN, D. M.; MAGD, S. A. Doping in sports and its spread to at-risk populations: an international review. *World Psychiatry*, v. 6, p. 118-123, 2007.

BEAMISH, R.; RITCHIE, I. The spectre of steroids: nazi propaganda, cold war anxiety and patriarchal paternalism. *The International Journal of the History of Sport*. v. 22, n. 5, p. 777-795, 2005.

BERGERON, A.; FURTADO, M.; GAROFOLO, F. Importance of using highly pure internal standards for successful liquid chromatography/tandem mass-spectrometric bioanalytical assays. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, v. 23, n. 9, 1287-1297, 2009

BIENVENU, J. F.; PROVENCHER, G.; BÉLANGER, P.; BÉRUBÉ, R.; DUMAS, P.; GAGNÉ, S.; FLEURY, N. Standardized Procedure for the Simultaneous Determination of the Matrix Effect, Recovery, Process Efficiency, and Internal Standard Association. *Analytical Chemistry*, v. 89, n. 14, 7560-7568, 2017.

BILLS, B. J.; KINKADE, J.; REN, G.; MANICKE, N. E. The Impacts of Paper Properties on Matrix Effects During Paper Spray Mass Spectrometry Analysis of Prescription Drugs, Fentanyl and Synthetic Canabinoids. *Forensic Chemistry*, v.11, p. 15-22, 2018.

BRASIL. Lei Nº 9.965, de 27 de abril de 2000. Restringe a venda de esteróides ou peptídeos anabolizantes e dá outras providências. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/19965.htm>. Acesso em: 07 fev. 2020.

CAMPOS, D. R.; YONAMINE, M.; ALVES, M. J. N. N.; MOREAU, R. L. M. Determinação de esteróides androgênicos anabólicos em urina por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*; vol. 41, n. 4, 2005.

CARVALHO, J.; ROSADO, T.; BARROSO, M.; GALLARDO, E. Determination of Antiepileptic Drugs Using Dried Saliva Spots. *Journal of Analytical Toxicology*, v. 43, cp. 1-11, 2019.

CASTAGNOLI, K. P.; SHINOHARA, Y.; FURUTA, T.; NGUYEN, T. L. Quantitative Estimation of Quaternary Ammonium Neuromuscular Blocking Agents in Serum by Direct Insertion Probe Chemical Ionization Mass Spectrometry. *Biomedical And Environmental Mass Spectrometry*, v. 13, p. 327-332, 1986.

CHIANG, S.; ZHANG, W.; OUYANG, Z. Paper spray ionization mass spectrometry: recent advances and clinical applications. *Expert Review of Proteomics*, 2018.

CODY, R. B.; LARAMÉE, J. A.; DURST, H. D. Versatile New Ion Source for the Analysis of Materials in Open Air under Ambient Conditions. *Analytical Chemistry*, v. 77, p. 2297-2302, 2005.

COLBY, J. M. Comparison of umbilical cord tissue and meconium for the confirmation of in utero drug exposure. *Clinical Biochemistry*, v. 50, p. 784-790, 2017.

COOKS, R. G.; MANICKE, N. A.; DILL, A. L.; IFA, D. R.; EBERLIN, L. S.; COSTA, A. B.; WANG, HE; HUANGA, G. AND OUYANG, Z. New ionization methods and miniature mass spectrometers for biomedicine: DESI imaging for cancer diagnostics and paper spray ionization for therapeutic drug monitoring. *Faraday Discussions*, v. 149, 247–267, 2011.

CORREA, D. N.; SANTOS, J. M.; EBERLIN, L. S.; EBERLIN, M. N.; TEUNISSEN, S. F. Forensic Chemistry and Ambient Mass Spectrometry: A Perfect Couple Destined for a Happy Marriage? *Analytical Chemistry*. v. 88, p. 2515–2526, 2016.

CORSO, G.; D'APOLITO, O.; GELZO, M.; PAGLIA, P. G.; RUSSO, A. D. A powerful couple in the future of clinical biochemistry: in situ analysis of dried blood spots by ambient mass spectrometry. *Bioanalysis*. v. 2, n. 11, p. 1883–1891, 2010.

DA CUNHA, K. F.; EBERLIN, M. N.; COSTA, J. L. Development and validation of a sensitive LC–MS/MS method to analyze NBOMes in dried blood spots: evaluation of long-term stability. *Forensic Toxicology*. v. 36, n. 1, p. 113–121, 2017.

DA CUNHA, K. F.; EBERLIN, M. N.; COSTA, J. L. Long-term stability of synthetic cathinones in dried blood spots and whole blood samples: a comparative study. *Forensic Toxicology*, v. 36, n. 2, p. 424–434, 2018.

DAOUSANI, C.; KARALIS, V.; MALENOVIĆ, A.; DOTSIKAS, Y. Hematocrit effect on dried blood spots in adults: a computational study and theoretical considerations. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, v. 79, p. 325-333, 2019.

DE CARVALHO, T. C.; TOSATO, F.; SOUZA, L. M.; SANTOS, H.; MERLO, B. B.; ORTIZ, R. S.; RODRIGUES, R. R. T.; FILGUEIRAS, P. R.; FRANÇA, H. S.; AUGUSTI, R.; ROMÃO, W.; VAZ, B. G. Thin layer chromatography coupled to paper spray ionization mass spectrometry for cocaine and its adulterants analysis. *Forensic Science International*, v. 262, p. 56–65, 2016.

DÉGLON, LEUTHOLD & THOMA, A. Potential missing steps for a wide use of dried matrix spots in biomedical analysis. *Bioanalysis*, v. 7, n. 18, p. 2375–2385, 2015.

DENHAM, B. E. Effects of Mass Communication on Attitudes toward Anabolic Steroids: An Analysis of High School Seniors. *Journal of Drug Issues*, v. 36, n. 4, p. 809–829, 2006.

DE ROSE, E. H. Doping in Athletes – An Update. *Clinics in Sports Medicine*, v. 27, p. 107–130, 2008.

DE SOUZA, F. R.; SALES, A. R. K.; DOS SANTOS, M. R.; PORELLO, R. A.; DA FONSECA, G. W. P.; SAYEGH, A. L. C.; FILHO, A. C. B.; PEREIRA, R. M. R.; TAKAYAMA, L.; DE OLIVEIRA, T. F.; YONAMINE, M.; NEGRÃO, C. E.; DE NAZARÉ NUNES ALVES, M. J. Retrograde and oscillatory shear rate in young anabolic androgenic steroid users. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*, v. 29, p. 422-429, 2019.

DOTSON, J. L.; BROWN, R. T. The history of the development of anabolic-androgenic steroids. *Pediatric Clinics of North America*, v. 54, p.761–769, 2007.

DRUGBANK. Molecular Weight Search. 2020. Disponível em:
<https://www.drugbank.ca/structures/search/small_molecule_drugs/mass>. Acesso em 05 fev. 2020.

DUTKIEWICZ, E. P.; URBAN, P.L. Quantitative mass spectrometry of unconventional human biological matrices. *Philosophical Transactions of the Royal Society A*, v. 374, 2016.

EHRNBORG, C.; ROSÉN, T. The psychology behind doping in sport. *Growth Hormone & IGF Research*, v. 19, p. 285–287, 2009.

EL OSTA, R.; ALMONT, T.; DILIGENT, C.; HUBERT, N.; ESCHWÈGE, P.; HUBERT, J. Anabolic steroids abuse and male infertility. *Basic and Clinical Andrology*, v. 26, n. 2, 2016.

ESPY, R. D.; MANICKE, N. E.; OUYANG, Z.; COOKS, R. G. Rapid analysis of whole blood by paper spray mass spectrometry for point-of-care therapeutic drug monitoring. *Analyst*, v. 137, p. 2344–2349, 2012a.

ESPY, R. D.; MULIADIB, A. R.; OUYANG, Z.; COOKS, R. G. Spray mechanism in paper spray ionization. *International Journal of Mass Spectrometry*. p. 325–327, 2012b.

ESPY, R. D.; TEUNISSEN, S. F.; MANICKE, N. E.; REN, Y.; OUYANG, Z.; VAN ASTEN, A.; COOKS, R. G. Paper spray and extraction spray mass spectrometry for the direct and simultaneous quantification of eight drugs of abuse in whole blood. *Analytical Chemistry*. v. 86, p. 7712–7718, 2014.

FABRESSE, N.; GRASSIN-DELYLE, S.; ETTING, I.; ALVAREZ, J.C. Detection and quantification of 12 anabolic steroids and analogs in human whole blood and 20 in hair using LC-HRMS/MS: application to real cases. *International Journal of Legal Medicine*, v. 131, n. 989–999, 2017.

FEDICK, P. W.; BILLS, B. J.; MANICKE, N. E.; COOKS, R. C. Forensic Sampling and Analysis from a Single Substrate: Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Followed by Paper Spray Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*. v. 89, p. 10973-10979, 2017.

FERREIRA, C. R.; YANNELL, K. E.; JARMUSCH, A. K.; PIRRO, V.; OUYANG, Z.; COOKS, R. G. Ambient Ionization Mass Spectrometry for Point-of-Care Diagnostics and Other Clinical Measurements. *Clinical Chemistry*. v. 62, n. 1, p. 99–110, 2016.

FERREIRA, C. R.; YANNELL, K. E.; JARMUSCH, A. K.; PIRRO, V.; OUYANG, Z.; COOKS, R. G. Ambient Ionization Mass Spectrometry for Point-of-Care Diagnostics and Other Clinical Measurements. *Clinical Chemistry*, v. 62, n. 1, p. 99–110, 2019.

FLEGO, C.; ZANNONI, C. Direct Insertion Probe-Mass Spectrometry: A Useful Tool for Characterization of Asphaltenes. *Energy Fuels*, v. 24, p. 6041–6053, 2010.

FRATI, P.; BUSARDÒ, F. P.; CIPOLLONI, L.; DOMINICIS, E.; FINESCHI, V. Anabolic androgenic steroid (AAS) related deaths: autoptic, histopathological and toxicological findings. *Current Neuropharmacology*, v. 13, p. 146-159, 2015.

FREDERICK, D. L. Toxicology Testing in Alternative Specimen Matrices. *Clinics in Laboratory Medicine*. v. 32, p. 467-492, 2012.

FREY, B. S.; DAMON, D. E.; BADU-TAWIAH, A. K. Emerging Trends In Paper Spray Mass Spectrometry: Microsampling, Storage, Direct Analysis, And Applications. *Mass Spectrometry Reviews*, p. 1-35, 2019.

GENTILI, S.; MORTALI, C.; MASTROBATTISTA, L.; BERRETTA, P.; ZAAMI, S. Determination of different recreational drugs in sweat by headspace solid-phase microextraction gas chromatography mass spectrometry (HS-SPME GC/MS): Application to drugged drivers. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 129, p. 282–287, 2016.

- GEYER, H.; SCHÄNZER, W.; THEVIS, M. Anabolic agents: recent strategies for their detection and protection from inadvertent doping. *British Journal of Sports Medicine*, v. 0, p. 1–8, 2014.
- GOLDMAN, A.; BASARIA, S. Adverse health effects of androgen use. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 464, p. 46-55, 2017.
- GOSETTI, F.; MAZZUCCO, E.; GENNARO, M. C.; MARENGO, E. Ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry determination and profiling of prohibited steroids in human biological matrices. A review. *Journal of Chromatography B*, v. 927, p. 22-36, 2013.
- GRÖNBLADH, A.; NYLANDER, E.; HALLBERG, M. The neurobiology and addiction potential of anabolic androgenic steroids and the effects of growth hormone. *Brain Research Bulletin*, v. 126, p. 127–137, 2016.
- GROSS, J. H. Direct analysis in real time - a critical review on DART-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 406, p. 63–80, 2014.
- GUEZENNEC, C. Y. Le dopage: efficacité, conséquences, prévention. *Annales D'Endocrinologie*, v. 62, n. 1, p. 33-41, 2001.
- GUTHRIE, R.; SUSI, A. A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants. *Pediatrics*, v. 32, p. 338–343. 1963.
- HAN, W.; ZHENG, Y.; MUYIZERE, T.; ZHANG, Z. Development of paper substrate for paper spray MS in high-sensitivity analysis of biological samples. *Bioanalysis*, v. 10, n. 24, 2018.
- HAUSER, A., HEIDEN, M., MEIXENBERGER, K., HAN, O., FIEDLER, S., HANKE, K., KOPPE, U., HOFMANN, A., BREMER, V., BARTMEYER, B., KUECHERER, C., BANNERT, N. Evaluation of a BioRad Avidity assay for identification of recent HIV-1 infections using dried serum or plasma spots. *Journal of Virological Methods*, v. 266, p. 114-120, 2019.
- HE, Y.; CONCHEIRO-GUISAN, M. Microextraction sample preparation techniques in forensic analytical toxicology. *Biomedical Chromatography*, v. 33, e4444, 2019.
- HENRIQUE, I. F. S.; MICHELI, D.; LACERDA, R. B.; LACERDA, L. A.; FORMIGONI, M. L.O. S. Validação da versão brasileira do teste de triagem do envolvimento com álcool, cigarro e outras substâncias (ASSIST). *Revista da Associação Médica Brasileira*, v. 50, n. 2, p. 199-206, 2004.
- HOBERMAN, J. Sports physicians and the doping crisis in elite sport. *Clinical Journal of Sport Medicine*, v. 12, p. 203–208, 2002.
- HOLT, R. I. G.; EROKORITOU-MULLIGAN, I.; SÖNKSEN, P. H. The history of doping and growth hormone abuse in sport. *Growth Hormone & IGF Research*, v. 19, p. 320–326, 2009.
- HUMPHREYS, B.; RUSESKI, J. Adolescent Steroid Use and Intercollegiate Athletic Incentives, No 14-25, *Working Papers*, Department of Economics, West Virginia University. 2014.
- ICICT/FIOCRUZ. Instituto de Comunicação e Informação Científica e Tecnológica em Saúde/Fundação Oswaldo Cruz. III Levantamento Nacional sobre o uso de drogas pela população brasileira. Rio de Janeiro: FIOCRUZ/ICICT, 2017. 528 p.
- JAIN, R.; QURAIISHI, R.; AMBEKAR, A.; VERMA, A.; GUPTA, P. Dried urine spots for detection of benzodiazepines. *Indian Journal of Pharmacology*, v. 49, p. 465-469, 2017.
- JEONG, E. S.; KIMA, K. H.; CHAA, E.; KWONA, O.; CHAB, S.; LEEA, J. Direct and rapid quantitation of ephedrines in human urine by paper spray ionization/high resolution mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, v. 1028, p. 237–241, 2016.
- JETT, R. Paper spray mass spectrometry for rapid drug screening. *Purdue University*, 2017.

JETT, R.; SKAGGS, C.; MANICKE, N. E. Drug screening method development for paper spray coupled to a triple quadrupole mass spectrometer. *Analytical Methods*, v. 9, p. 5037-5043, 2017.

KAM, P. C. A.; YARROW, M. Anabolic steroid abuse: physiological and anaesthetic Considerations. *Anaesthesia*, v. 60, p. 685–692, 2005.

KEATING, J. E.; MINGES, J. T.; RANDELL, S. H.; GLISH, G. L. Paper spray mass-spectrometry for high-throughput quantification of nicotine and cotinine. *Analytical Methods*, v. 10, n. 1, v. 46–50, 2018.

KENNEDY, J. H.; PALATY, J.; GILL, C. G.; WISEMAN, J. M. Rapid analysis of fentanyl and other novel psychoactive substances in substance use disorder patient urine using paper spray mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, v. 32, n. 15, p. 1280–1286, 2018.

KICMAN, A. T. Pharmacology of anabolic steroids. *British Journal of Pharmacology*, v. 154, p. 502–521, 2008.

KICMAN, A. T. Biochemical and physiological aspects of endogenous androgens. *Doping in Sports in Handbook of Experimental Pharmacology*, 2010.

KIRBY, A. E.; LAFRENIÈRE, N. M.; SEALE, B.; HENDRICKS, P. I.; COOKS, R. G.; WHEELER, A. R. Analysis on the go: Quantitation of drugs of abuse in dried urine with digital microfluidics and miniature mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, v. 86, p. 6121–6129, 2014.

KLAMPFL, C. W.; HIMMELSBACH, M. Direct ionization methods in mass spectrometry: An overview. *Analytica Chimica Acta*, v. 890, p. 44-59, 2015.

KREEK, M. J.; BENCSATH, F. A.; FANIZZA, A.; FIELD, F. H. Effects of liver disease on fecal excretion of methadone and its unconjugated metabolites in maintenance patients. Quantitation by direct probe chemical ionization mass spectrometry. *Biological Mass Spectrometry*, v. 10, n. 10, p. 544–549, 1983.

KUURANNE, T.; SAUGY, M. Retesting the anti-doping samples: best tool for deterrence? *Swiss Sports & Exercise Medicine*, v. 64, n. 3, p. 19–22, 2016

LEE, Y.; LAI, K. K. Y.; SADRZADEH, S. M. H. Simultaneous detection of 19 drugs of abuse on dried urine spot by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Clinical Biochemistry*, v. 46, p. 1118–1124, 2013.

LIN, C.; LIAO, W.; CHEN, H.; KUO, T. Paper spray-MS for bioanalysis. *Bioanalysis*, v. 6, n. 2, p. 1–10, 2014.

LIPPI, G.; FRANCHINI, M.; BANFI, G. Biochemistry and Physiology of Anabolic Androgenic Steroids Doping. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, v. 11, p. 362-373, 2011.

LIU, J.; WANG, H.; MANICKE, N. E.; LIN, J.; COOKS, R. G.; OUYANG, Z. Development, characterization, and application of paper spray ionization. *Analytical Chemistry*, v. 82, p. 2463–2471, 2010.

LUBIN, A.; BAJIC, S.; CABOOTER, D.; AUGUSTIJNS, P.; CUYCKENS, F. Atmospheric Pressure Ionization Using a High Voltage Target Compared to Electrospray Ionization. *Journal of the American Society of Mass Spectrometry*, v. 28, p. 286-293, 2017.

LUGINBÜHL, M.; WEINMANN, W.; BUTZKE, I.; PFEIFER, P. Monitoring of direct alcohol markers in alcohol use disorder patients during withdrawal treatment and successive rehabilitation. *Drug Testing and Analysis*, v. 11, p. 859–869, 2019.

MACIEL, L.; CARVALHO, T.; PEREIRA, I.; VAZ, B. Determinação De Designer Drugs Em Saliva Por Paper Spray Mass Spectrometry. *Química Nova*, v. 42, n. 6, p. 676-682, 2019.

MANICKE, N. E.; ABU-RABIE, P.; SPOONER, N.; OUYANG, Z.; COOKS, R. C. Quantitative Analysis of Therapeutic Drugs in Dried Blood Spot Samples by Paper Spray Mass Spectrometry: An Avenue to Therapeutic Drug Monitoring. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, v. 22, p. 1501-1507, 2011.

MANICKE, N. E.; BILLS, B. J.; ZHANG, C. Analysis of biofluids by paper spray MS: advances and challenges. *Bioanalysis*, v. 8, n.6, p. 589-606, 2016.

MATUSZEWSKI, B. K.; CONSTANZER, M. L.; CHAVEZ-ENG, C. M. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. *Analytical Chemistry*, v. 75, p. 3019-3030, 2003.

MAURER, H. H. Mass Spectrometry for Research and Application in Therapeutic Drug Monitoring or Clinical and Forensic Toxicology. *Therapeutic Drug Monitoring*, v. 40, n. 4, p. 389-393, 2018.

MBUGHUNI, M. M.; JANNETTO, P. J.; LANGMAN, L. J. Mass Spectrometry Applications for Toxicology. *Journal of the International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, v. 27, n. 4, p. 272-287, 2016.

MCKENNA, J.; JETT, R.; SHANKS, K.; MANICKE, N. E. Toxicological Drug Screening using Paper Spray High-Resolution Tandem Mass Spectrometry (HR-MS/MS). *Journal of Analytical Toxicology*, v. 42, n. 5, p. 300-310, 2018.

MEESTERS, R. J. W.; ZHANG, J.; HUIZEN, N. A.; HOOFF, G. P.; GRUTERS, R. A.; LUIDER, T. M. Dried matrix on paper disks: the next generation DBS microsampling technique for managing the hematocrit effect in DBS analysis. *Bioanalysis*, v. 4, n. 16, p. 2027-2035, 2012.

MEESTERS, R. J. W.; HOOFF, G. P. State-of-the-art dried blood spot analysis: an overview of recent advances and future trends. *Bioanalysis*, n. 5, v. 17, p. 2187-2208, 2013.

MERCOLINI, L.; PROTTI, M. Biosampling strategies for emerging drugs of abuse: towards the future of toxicological and forensic analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.130 p. 202-219, 2016.

MICHELY, J. A.; MEYER, M. R.; MAURER, H. H. Power of Orbitrap-based LC-high resolution-MS/MS for comprehensive drug testing in urine with or without conjugate cleavage or using dried urine spots after on-spot cleavage in comparison to established LC-MS or GC-MS procedures. *Drug Testing and Analysis*, v. 10, p. 158-163, 2017a.

MICHELY, J. A.; MEYER, M. R.; MAURER, H. H. Dried urine spots - A novel sampling technique for comprehensive LCMS drug screening. *Analytica Chimica Acta*, v. 982, p. 112-121, 2017b.

MICHELY, J. A.; MEYER, M. R.; MAURER, H. H. Paper Spray Ionization Coupled to High Resolution Tandem Mass Spectrometry for Comprehensive Urine Drug Testing in Comparison to Liquid Chromatography-Coupled Techniques after Urine Precipitation or Dried Urine Spot Workup. *Analytical Chemistry*, v. 89, n. 21, p. 11779-11786, 2017c.

MOTTRAM, D. *Drugs in sport*. 5th edition. Abingdon: Routledge, 2011.

MÜLLER, R. K. History of doping and doping control. *Doping in Sports in: Handbook of Experimental Pharmacology*, v. 195, 2010.

NIDA. NATIONAL INSTITUTE ON DRUG ABUSE. Anabolic Steroids. 2016. Acesso em 8 outubro 2017. Disponível em:
https://d14rmgtrwzf5a.cloudfront.net/sites/default/files/df_anabolic_steroids_3_2016.pdf

NIDA. NATIONAL INSTITUTE ON DRUG ABUSE. Who uses anabolic steroids? 2020. Acesso em 7 de julho 2020. Disponível em: <https://www.drugabuse.gov/publications/research-reports/steroids-other-appearance-performance-enhancing-drugs-apeds/who-uses-anabolic-steroids>

- NIETZSCHE, F. Assim falou Zarathustra. São Paulo: Martin Claret, 2012. p. 298.
- NOGUEIRA, F. R. S.; BRITO, A. F.; OLIVEIRA, C. V. C.; ISIDRO VIEIRA, T. I.; GOUVEIA, R. L. B. Anabolic-androgenic steroid use among brazilian bodybuilders. *Substance Use & Misuse*, v. 49, p. 1138–1145, 2014.
- OKANO, M.; SATO, M.; KOJIMA, A.; KAGEYAMA, S. Determination of mepitiostane metabolites in human urine by liquidchromatography/tandem mass spectrometry for sports drug testing. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 115, p. 236–244, 2015.
- OTERO-FERNÁNDEZ, M.; COCHO, J. A.; TABERNERO, M. J.; BERMEJO, A. M.; BERMEJO-BARRERA, P.; MOREDA-PIÑEIRO, A. Direct tandem mass spectrometry for the simultaneous assay of opioids, cocaine and metabolites in dried urine spots. *Analytica Chimica Acta*, v. 784; p. 25–32, 2013.
- OUYANG, Z. Ambient mass spectrometry. *China Analyst*. v. 135, p. 659–660, 2010.
- PABLO, A.; BREAUD, A. R.; CLARKE, W. Automated Analysis of Dried Urine Spot (DUS) Samples for Toxicology Screening. *Clinical Biochemistry*, v. 75, p. 70-77, 2019.
- PALMER, K. L.; KRASOWSKI, M. D. *Alternate matrices: meconium, cord tissue, hair, and oral fluid. LC-MS in drug analysis: methods and protocols, methods in molecular biology*, vol. 1872, 2018.
- PALMER, E. A.; COOPER, H. J.; DUNN, W. B. Investigation of the 12-month stability of dried blood and urine spots applying untargeted UHPLC-MS metabolomic assays. *Analytical Chemistry*, v. 91, n. 22, p. 14306-14313, 2019.
- PARKINSON, A. B.; EVANS, N. A. Anabolic Androgenic Steroids: A Survey of 500 Users. *Medicine & science in sports & exercise*, 2006.
- PÄRSSINEN, M.; KUJALA, U.; VARTIAINEN, E.; SARNA, S.; SEPPÄLÄ, T. Increased Premature Mortality of Competitive Powerlifters Suspected to Have Used Anabolic Agents. *International Journal of Sports Medicine*, v. 21, p. 225–227, 2000.
- PAULA, C. C. A.; VALADARES, A.; JURISCH, M.; PICCIN, E.; AUGUSTI, R. Paper spray mass spectrometry applied in the monitoring of a chemical system in dynamic chemical equilibrium: the redox process of methylene blue. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. v. 30, p. 1176–1180, 2018.
- PEREIRA, H. V.; AMADOR, V. S.; SENA, M. M.; AUGUSTI, R.; PICCIN, E. Paper spray mass spectrometry and PLS-DA improved by variable selection for the forensic discrimination of beers. *Analytica Chimica Acta*, v. 940, p. 104-112, 2016.
- PETERS, F. T.; DRUMMER, O. H.; MUSSHOFF, F. Validation of new methods. *Forensic Science International*, v. 165, n. 2–3, p. 216–224, 2007.
- PIACENTINO, D.; KOTZALIDIS, G. D.; CASALE, A.; AROMATARIO, M. R.; POMARA, C.; GIRARDI, P.; SANI, G. Anabolic-androgenic Steroid use and Psychopathology in Athletes. A Systematic Review. *Current Neuropharmacology*, v. 13, p. 101-121, 2015.
- PIZZATO, E. C.; FILONZI, M.; ROSA, H. S.; BAIROS, A. V. Pre-treatment of different biological matrices for exogenous testosterone analysis: A review. *Toxicology Mechanisms and Methods*, v. 9, p. 641-656, 2017.
- PONZETTO, F.; BAUME, N.; SCHWEIZER, C.; SAUGY, M.; KUURANNE, T. Steroidal Module of the Athlete Biological Passport. *Current Opinion in Endocrine and Metabolic Research*, v. 9, p. 14-21, 2019.
- POPE, H. G.; WOOD, R. I.; ROGOL, A.; NYBERG, F.; BOWERS, L.; BHASIN, S. Adverse health consequences of performance-enhancing drugs: an endocrine society scientific statement. *Endocrine Reviews*, v. 35, n.3, p. 341–375, 2014.

- POZO, O. J.; EENOO, P. V.; DEVENTER, K.; DELBEKE, F. T. Detection and characterization of anabolic steroids in doping analysis by LC-MS. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 27, n. 8, 2008.
- PU, F.; CHIANG, S.; ZHANG, W.; OUYANG, Z. Direct sampling mass spectrometry for clinical Analysis. *Analyst*, v. 144, p. 1034-1051, 2019.
- RABIN, O. Involvement of the health industry in the fight against doping in sport. *Forensic Science International* 213, 10–14, 2011.
- RAOUF, M.; BETTINGER, J.J.; FUDIN, J. A practical guide to urine drug monitoring. *Federal practitioner*, 2018.
- REN, Y.; WANG, H.; LIU, J.; ZHANG, Z.; MCLUCKEY, M. N.; OUYANG, Z. Analysis of Biological Samples Using Paper Spray Mass Spectrometry: An Investigation of Impacts by the Substrates, Solvents and Elution Methods. *Chromatographia*, v. 76, v. 19-20, p. 1339–1346, 2013.
- ROCHA, F. L. Esteróides anabolizantes: mecanismos de ação e efeitos sobre o sistema cardiovascular. *O mundo da saúde*. v. 31, n. 4, p. 470-477, 2014.
- ROCHA, M.; AGUIAR, F.; RAMOS, H. O uso de esteroides androgênicos anabolizantes e outros suplementos ergogênicos – uma epidemia silenciosa. *Revista Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo*, v. 9, n. 2, p. 98–105, 2014.
- SADONES, N.; CAPIAU, S.; DE KESEL, P. M. M.; LAMBERT, W. E.; STOVE, C. P. Spot them in the spot: analysis of abused substances using dried blood spots. *Bioanalysis*. v. 6, n. 17, p. 2211–2227, 2014.
- SAGOE, D.; MOLDE, H.; ANDREASSEN, C. S.; TORSHEIM, T.; PALLESEN, S. The global epidemiology of anabolic-androgenic steroid use: a meta-analysis and meta-regression analysis. *Annals of Epidemiology*, n. 24, p. 383-398, 2014.
- SAUGY, M.; LUNDBY, C.; ROBINSON, N. Monitoring of biological markers indicative of doping: the athlete biological passport. *British Journal of Sports Medicine*, v. 48, n. 10, 2014.
- SCHLITTENBAUER, L.; SEIWERT, B.; REEMTSMA, T. Matrix effects in human urine analysis using multi-targeted liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1415, p. 91–99, 2015.
- SERRA, A.; RUBIÓ, L.; MACIÀ, A.; VALLS, R. M.; CATALÁN, U.; TORRE, R.; MOTILVA, M. J. Application of dried spot cards as a rapid sample treatment method for determining hydroxytyrosol metabolites in human urine samples. Comparison with microelution solid-phase extraction. *Anal Bioanalytical Chemistry*, n. 405, p. 9179–9192, 2013.
- SCHÄNZER, W.; OPFERMANN, G.; DONIKE, M. Metabolism of stanozolol: identification and synthesis of urinary metabolites. *Journal of Steroid Biochemistry*, v. 36, p. 153-174, 1990.
- SHEN, L.; ZHANG, J.; YANG, Q.; MANICKE, N. E.; OUYANG, Z. High throughput paper spray mass spectrometry analysis. *Clinica Chimica Acta*, v. 420, p. 28–33, 2013.
- SHI, R. Z.; EL GIERARI, E. T. M.; MANICKE, N. E.; FAIX, J. D. Rapid measurement of tacrolimus in whole blood by paper spray-tandem mass spectrometry (PS-MS/MS). *Clinica Chimica Acta*, v. 441, p. 99–104, 2015.
- SILVEIRA, G. O.; PEGO, A. M. F.; SILVA, J. P.; YONAMINE, M. Green sample preparations for the bioanalysis of drugs of abuse in complex matrices. *Bioanalysis*, v. 11, n. 4, 2019.
- SKARBERG, K.; NYBERG, F.; ENGSTROM, I. Multisubstance use as a feature of addiction to anabolic-androgenic steroids. *European Addict Research*, 15:99–106, 2009.

SOLIMINI, R.; ROTOLO, M. C.; MASTROBATTISTA, L.; MORTALI, C.; MINUTILLO, A.; PICHINI, S.; PACIFICI, R.; PALMI, I. Hepatotoxicity associated with illicit use of anabolic androgenic steroids in doping. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, v. 21, p. 7-16, 2017.

SOTTAS, P. E.; VERNEC, A. Current implementation and future of the Athlete Biological Passport. *Bioanalysis*, v. 4, n. 13, p. 1645–1652, 2012.

STOVE, C. P.; INGELS, A. S. M. E.; DE KESEL, P. M. M.; LAMBERT, W. E. Dried blood spots in toxicology: from the cradle to the grave? *Critical Reviews in Toxicology*, v. 4, n. 3, p. 230–243, 2012.

SUH, J. H.; EOM, H. Y.; KIM, U.; KIM, J.; CHO, H. D.; KANG, W.; KIM, D. S.; HAN, S. B. Highly sensitive electromembrane extraction for the determination of volatile organic compound metabolites in dried urine spot. *Journal of Chromatography A*, v. 1416, p. 1–9, 2015.

SU, Y.; WANGA, H.; LIUA, J.; WEIB, P.; COOKS, R. G.; ZHENG, O. Quantitative Paper Spray Mass Spectrometry Analysis of Drugs of Abuse. *Analyst*, v. 138, n. 16, p. 4443–4447, 2013.

SWGTOX. Scientific Working Group for Forensic Toxicology (SWGTOX). Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology. *Journal of Analytical Toxicology*, v. 37, n. 7, p. 452–474, 1 set. 2013.

TAKÁTS, Z.; WISEMAN, J. M.; GOLOGAN, B.; COOKS, R. G. Mass spectrometry sampling under ambient conditions with desorption electrospray ionization. *Science*, v. 15, n. 306, 5695, p. 471-473, 2004.

TAKYI-WILLIAMS, J.; LIU, C.F.; TANG, K. Ambient ionization MS for bioanalysis: recent developments and challenges. *Bioanalysis*, v. 7, n. 15, 1901–1923, 2015.

TEODORO, J. R.A.; PEREIRA, H. V.; SENA, M. M. S.; PICCIN, E.; ZACCA, J. J.; AUGUSTI, R. Paper spray mass spectrometry and chemometric tools for a fast and reliable identification of counterfeit blended Scottish whiskies. *Food Chemistry*, v. 237, p. 1058–1064, 2017.

TRETZEL, L.; THOMAS, A.; GEYER, H.; DELAHAUT, P.; SCHÄNZER, W.; THEVIS, M. Determination of Synacthen® in dried blood spots for doping control analysis using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 407, n. 16, p. 4709–4720, 2015.

TSIVOU, M.; GIANNADAKI, E.; HOOGHE, F.; ROELS, K.; VAN GANSBEKE, W.; GARRIBBA, F.; LYRIS, E.; DEVENTER, K.; MAZZARINO, M.; DONATI, F.; GEORGAKOPOULOS, D. G.; VAN EENOO, P.; GEORGAKOPOULOS, C. G.; DE LA TORRE, X.; BOTRÈ, F. Doping control container for urine stabilization: a pilot study. *Drug Testing and Analysis*, v. 9, p. 699–712, 2017.

UNODC. *World Drug Report 2020*. United Nations publication, Sales No. E.20.XI.6, 2020.

VANDERGRIFT, G. W.; HESSELS, A. J.; PALATY, J.; KROGH, E. T.; GILL, C. G. Paper spray mass spectrometry for the direct, semi-quantitative measurement of fentanyl and norfentanyl in complex matrices. *Clinical Biochemistry*, v. 54, p. 106–111, 2018.

VAN EECKHAUT, A.; LANCKMANS, K.; SARRE, S.; SMOLDERS, I.; MICHOTTE, Y. Validation of bioanalytical LC–MS/MS assays: Evaluation of matrix effects. *Journal of Chromatography B*, v. 877, n. 23, p. 2198–2207, 2009.

VEGA, C.; SPENCE, C.; ZHANG, C.; BILLS, B. J.; MANICKE, N. E. Ionization suppression and recovery in direct biofluid analysis using paper spray mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, v. 27, p. 726-734, 2016.

VLAD, R. A.; HANCU, G.; POPESCU, G. C.; LUNGU, I. A. Doping in sports, a never-ending story? *Advanced Pharmaceutical Bulletin*. v. 8, n. 4, p. 529-534, 2018.

WADA. Detection of Synthetic Forms of Endogenous Anabolic Androgenic Steroids by GC/C/IRMS. *WADA Technical Document – TD2016IRMS*, 2015.

WADA. Minimum Required Performance Levels For Detection and Identification of Non-Threshold Substances. *WADA Technical Document – TD2017MRPL*, 2017.

WADA. WADA Executive Committee unanimously endorses four-year period of non-compliance for the Russian Anti-Doping Agency. 2019a. Disponível em: <<https://www.wada-ama.org/en/media/news/2019-12/wada-executive-committee-unanimously-endorses-four-year-period-of-non-compliance>>. Acesso em: 20 fev. 2020.

WADA. WADA leads exciting collaboration on dried-blood-spot testing. 2019b. Disponível em: <<https://www.wada-ama.org/en/media/news/2019-10/wada-leads-exciting-collaboration-on-dried-blood-spot-testing>>. Acesso em: 07 fev. 2020.

WADA. 2017 Anti-Doping Rule Violations (ADRVs) Report. *World Anti-doping Agency*, 2019c.

WADA. World Anti-doping Code. *World Anti-doping Agency*, 2019d.

WADA. Prohibited List: January 2020. *World Anti-doping Agency*, 2020.

WAGNER, M.; TONOLI, D.; VARESIO, E.; HOPFGARTNER, G. The use of mass spectrometry to analyze dried blood spots. *Mass Spectrometry Reviews*, v. 35, n. 3, p. 361–438, 2014.

WALKER, J.; ADAMS, B. Cutaneous manifestations of anabolic–androgenic steroid use in athletes. *International Journal of Dermatology*, 48, 1044–1048, 2009.

WANG, H.; LIU, J.; COOKS, R. G.; OUYANG, Z. Paper Spray for Direct Analysis of Complex Mixtures Using Mass Spectrometry. *Angewandte Chemie International Edition*. v. 49, 877–880, 2010.

WANG, H.; MANICKE, N. E.; YANG, Q.; ZHENG, L.; SHI, R.; COOKS, R. G.; OUYANG, Z. Direct Analysis of Biological Tissue by Paper Spray Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, v. 83, n. 4, p. 1197–1201, 2011.

WHO. World Health Organization. Health topics: Drugs (psychoactive). 2019a. Disponível em: <https://www.who.int/health-topics/drugs-psychoactive#tab=tab_1>. Acesso em: 18 dezembro 2019.

WHO. World Health Organization. Management of substance abuse: facts and figures. 2019b. Disponível em: <https://www.who.int/substance_abuse/facts/en/>. Acesso em: 18 dezembro 2019.

WINTERMANTEL, J.; WACHSMUTH, N.; SCHMIDT, W. Doping Cases among Elite Athletes from 2000 to 2013. *Deutsche Zeitschrift Für Sportmedizin*, v. 67, p. 263-269, 2016.

WISHART, D. S.; FEUNANG, Y. D.; MARCU, A.; GUO, A. C.; LIANG, K. *et al.* HMDB 4.0 — The Human Metabolome Database for 2018. *Nucleic Acids Research*, v. 4, n. 46, p. 608-617, 2018.

XU, W.; MANICKE, N. E.; COOKS, G. R.; OUYANG, Z. Miniaturization of Mass Spectrometry Analysis Systems. *Journal of the Association for Laboratory Automation*. v. 15, n. 6, p. 433–439, 2010.

YANG, Q.; WANG, H.; MAAS, J. D.; CHAPPELL, W. J.; MANICKE, N. E.; COOKS, R. G.; OUYANG, Z. Paper spray ionization devices for direct, biomedical analysis using mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry*. February 15; 312: 201–207, 2012.

YANG, Y.; WU, J.; DENG, J.; YUAN, K.; CHEN, X.; LIU, N.; WANG, X.; LUAN, T. Rapid and on-site analysis of amphetamine-type illicit drugs in whole blood and raw urine by slug-flow microextraction coupled with paper spray mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, v. 1032, p. 75-82, 2018.

YANNELL, K. E.; KESELY, K. R.; CHIEN, R. D.; KISSINGER, C. B.; COOKS, R. G. Comparison of paper spray mass spectrometry analysis of dried blood spots from devices used for in-field collection of clinical samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 409, p. 121–131, 2017.

YESALIS, C. E.; BAHRKE, M. S. Anabolic steroid and stimulant use in north american sport between 1850 and 1980, *Sport in History*, v. 25, n. 3, p. 434-45, 2005.

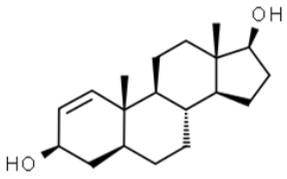
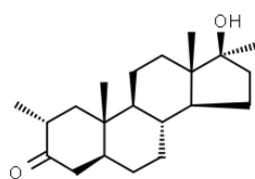
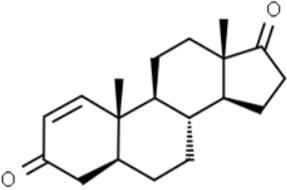
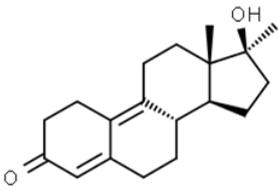
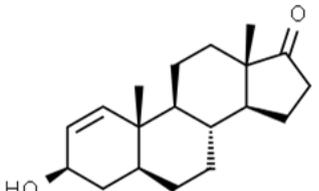
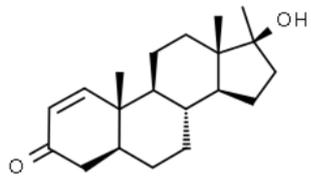
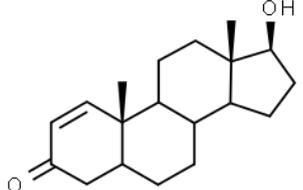
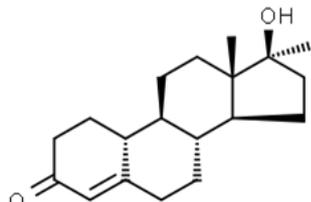
ZAKARIA, R.; ALLEN, K. J.; KOPLIN, J. J.; ROCHE, P.; GREAVES, R. F. Advantages and challenges of dried blood spot analysis by mass spectrometry across the total testing process. *Journal of the International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, v. 27, n. 4, p. 288-317, 2016.

ZHANG, Z.; XU, W.; MANICKE, N. E.; COOKS, R. G.; OUYANG, Z. Therapeutic Drugs in Dried Blood Spots. *Analytical Chemistry*. v. 84, p. 931–938, 2012.

ZHANG, C.; MANICKE, N. E. Development of a Paper Spray Mass Spectrometry Cartridge with Integrated Solid Phase Extraction for Bioanalysis. *Analytical Chemistry*, v. 8, n. 12, p. 6212–6219, 2015.

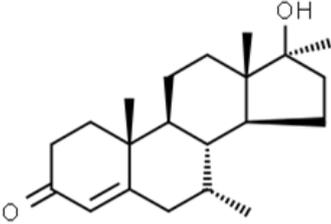
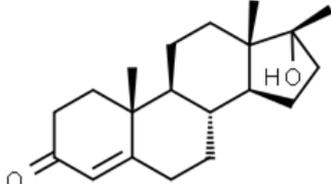
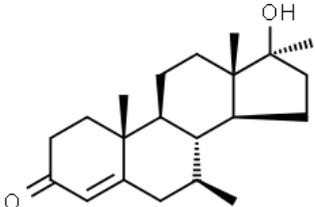
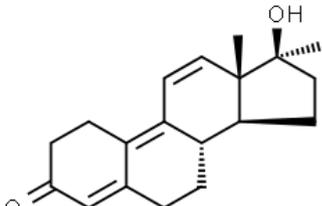
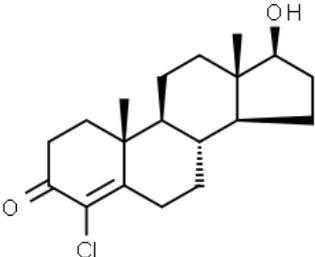
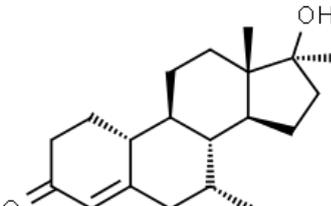
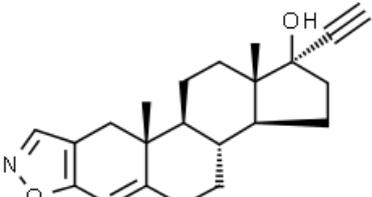
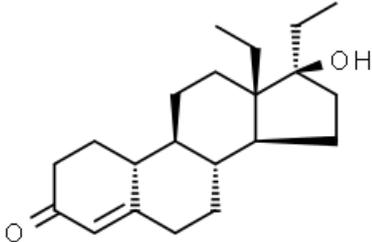
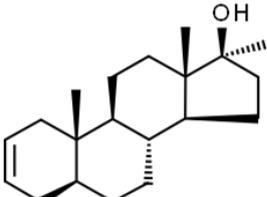
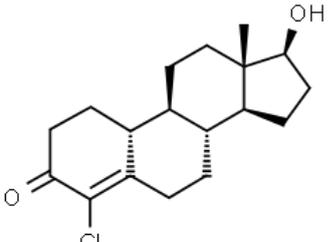
ANEXO 1 – ESTEROIDES ANABÓLICOS ANDROGÊNICOS PROIBIDOS PELA WADA

Lista de EAAs exógenos proibidos pela WADA dentro e fora das competições.

Esteroides anabólicos androgênicos exógenos proibidos pela WADA	
<p>1-Androstenediol (5α-androst-1-ene-3β,17β-diol)</p> 	<p>Methasterone (17β-hydroxy-2α,17α-dimethyl-5αandrostan-3-one)</p> 
<p>1-Androstenedione (5α-androst-1-ene-3,17-dione)</p> 	<p>Methyldienolone (17β-hydroxy-17α-methyl-4,9-dien-3-one)</p> 
<p>1-Androsterone (3α-hydroxy-5α-androst-1-ene-17-one)</p> 	<p>Methyl-1-testosterone (17β-hydroxy-17α-methyl-5αandrost-1-en-3-one)</p> 
<p>1-Testosterone (17β-hydroxy-5α-androst-1-en-3-one)</p> 	<p>Methylnortestosterone (17β-hydroxy-17α-methyl-4-en-3-one)</p> 

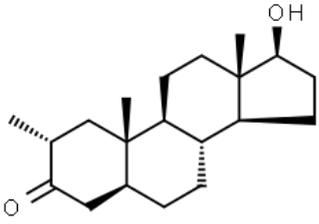
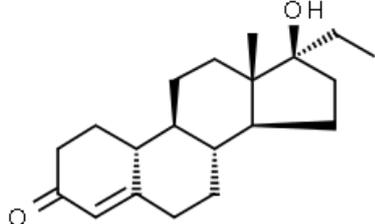
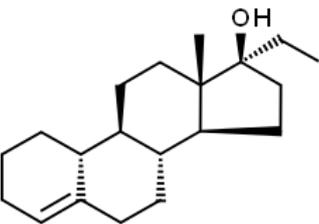
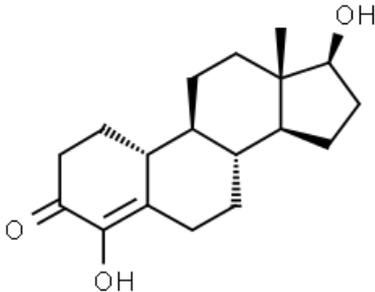
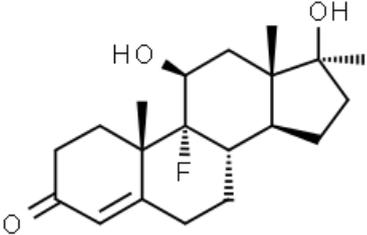
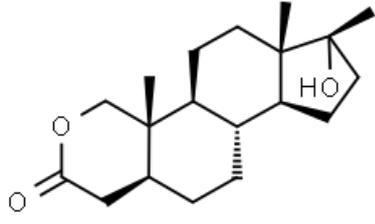
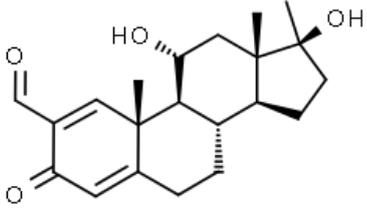
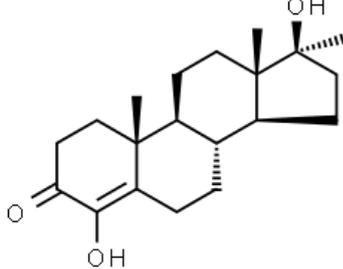
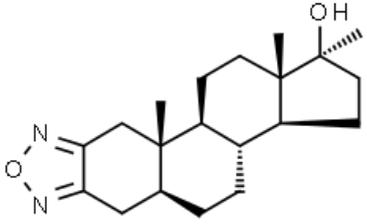
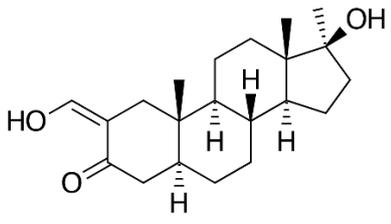
Lista de EAAs exógenos proibidos pela WADA dentro e fora das competições

(continuação)

<p>Bolasterone</p> 	<p>Methyltestosterone</p> 
<p>Calusterone</p> 	<p>Metribolone (methyltrienolone, 17β-hydroxy-17αmethylestra-4,9,11-trien-3-one)</p> 
<p>Clostebol</p> 	<p>Mibolone</p> 
<p>Danazol ([1,2]oxazolo[4',5':2,3]pregna-4-en-20-yn-17α-ol)</p> 	<p>Norboletone</p> 
<p>Desoxymethyltestosterone (17α-methyl-5α-androst-2-en-17β-ol and 17α-methyl-5α-androst-3-en-17β-ol)</p> 	<p>Norclostebol</p> 

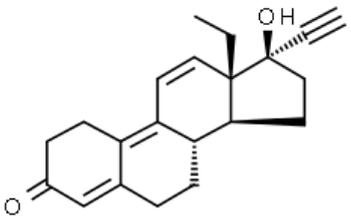
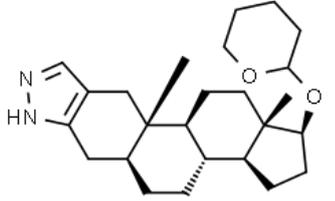
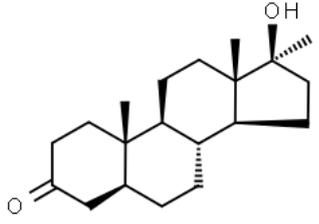
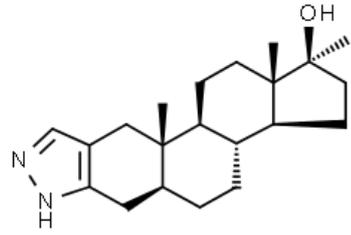
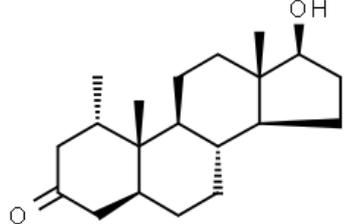
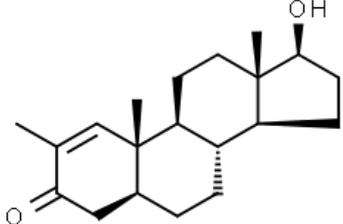
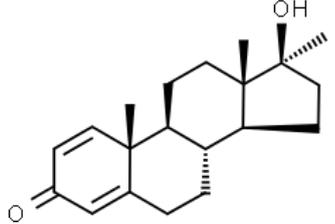
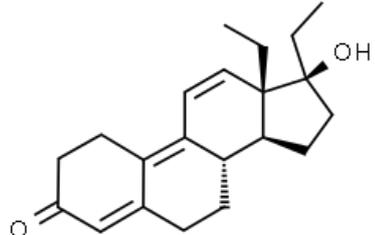
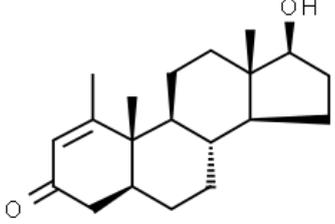
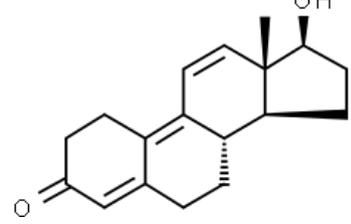
Lista de EAAs exógenos proibidos pela WADA dentro e fora das competições

(continuação)

<p>Drostanolone</p> 	<p>Norethandrolone</p> 
<p>Ethylestrenol (19-norpregna-4-en-17α-ol)</p> 	<p>Oxabolone</p> 
<p>Fluoxymesterone</p> 	<p>Oxandrolone</p> 
<p>Formebolone</p> 	<p>Oxymesterone</p> 
<p>Furazabol (17α-methyl [1,2,5] oxadiazolo [3',4':2,3] - 5αandrostan-17β-ol)</p> 	<p>Oxymetholone;</p> 

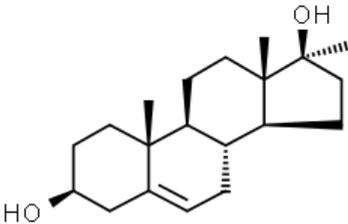
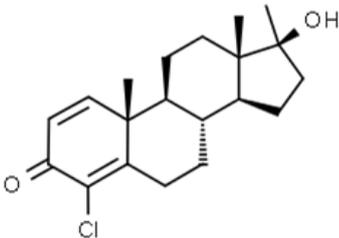
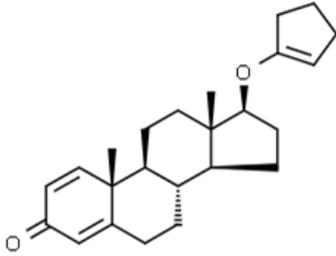
Lista de EAAs exógenos proibidos pela WADA dentro e fora das competições

(continuação)

<p>Gestrinone</p> 	<p>Prostanozol (17β-[(tetrahydropyran-2-yl)oxy]-1'Hpyrazolo[3,4:2,3]-5α-androstane)</p> 
<p>Mestanolone</p> 	<p>Stanozolol</p> 
<p>Mesterolone</p> 	<p>Stenbolone</p> 
<p>Metandienone (17β-hydroxy-17α-methylandrosta-1,4-dien-3-one)</p> 	<p>Tetrahydrogestrinone (17-hydroxy-18α-homo-19-nor-17αpregna-4,9,11-trien-3-one)</p> 
<p>Metenolone</p> 	<p>Trenbolone (17β-hydroxyestr-4,9,11-trien-3-one)</p> 

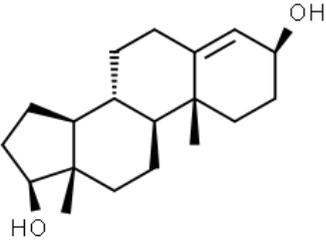
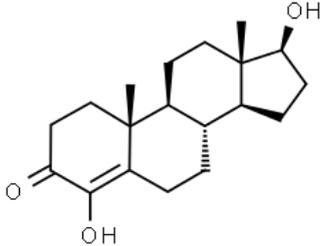
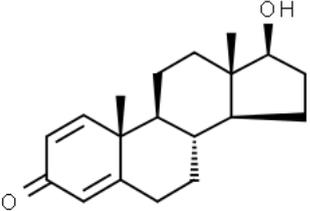
Lista de EAAs exógenos proibidos pela WADA dentro e fora das competições

(continuação)

<p style="text-align: center;">Methandriol</p> 	<p style="text-align: center;">Dehydrochloromethyltestosterone (4-chloro-17β-hydroxy-17α-methylandrosta-1,4-dien-3-one)</p> 
<p style="text-align: center;">Quinbolone</p> 	

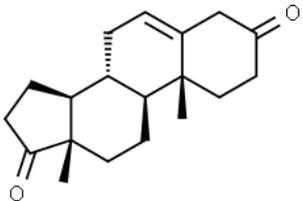
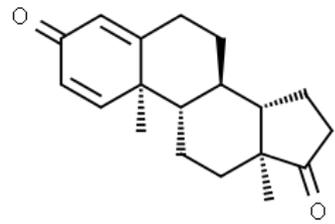
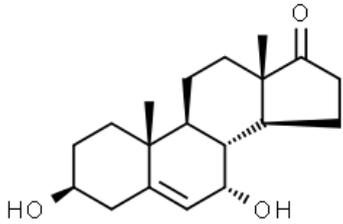
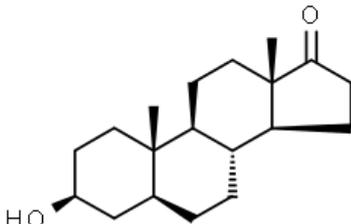
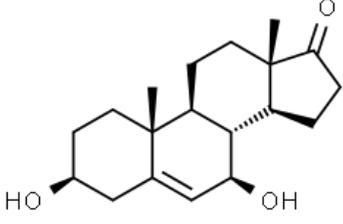
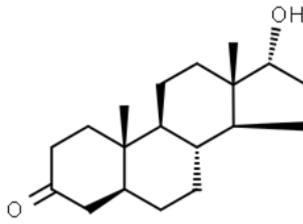
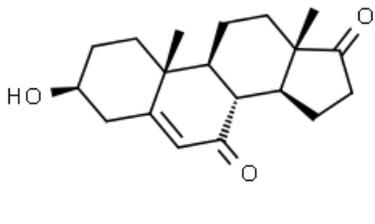
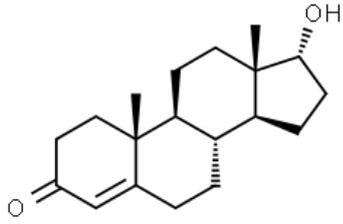
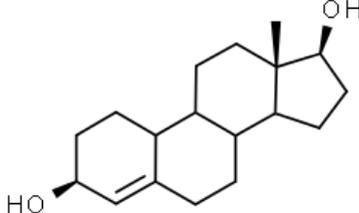
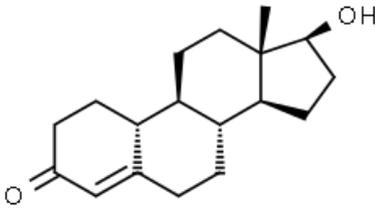
Fonte: WADA, 2020.

Lista de EAAs endógenos proibidos pela WADA dentro e fora das competições.

Esteroides anabólicos androgênicos endógenos proibidos pela WADA	
<p style="text-align: center;">4-Androstenediol (androst-4-ene-3β,17β-diol)</p> 	<p style="text-align: center;">Androstenedione (androst-4-ene-3,17-dione)</p> 
<p style="text-align: center;">4-Hydroxytestosterone (4,17β-dihydroxyandrost-4-en-3-one)</p> 	<p style="text-align: center;">Boldenone</p> 

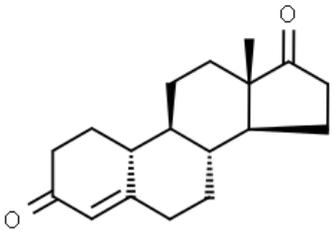
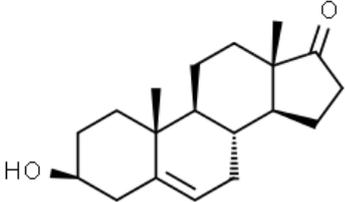
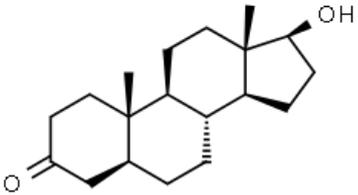
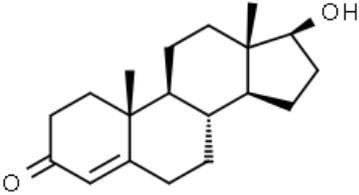
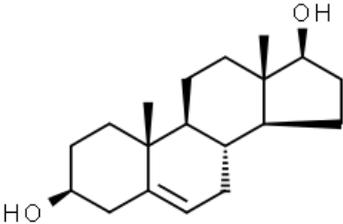
Quadro 2. Lista de EAAs endógenos proibidos pela WADA dentro e fora das competições

(continuação)

<p>5-Androstenedione (androst-5-ene-3,17-dione)</p> 	<p>Boldione</p> 
<p>7α-hydroxy-DHEA</p> 	<p>Epiandrosterone (3β-hydroxy-5α-androstan-17-one)</p> 
<p>7β-hydroxy-DHEA</p> 	<p>Epi-dihydrotestosterone (17β-hydroxy-5β-androstan-3-one)</p> 
<p>7-keto-DHEA</p> 	<p>Epitestosterone</p> 
<p>19-Norandrostenediol (estr-4-ene-3,17-diol)</p> 	<p>Nandrolone (19-nortestosterone)</p> 

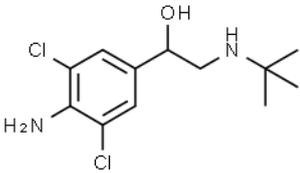
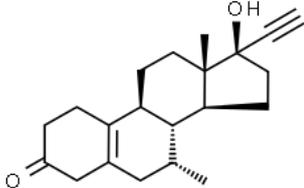
Lista de EAAs endógenos proibidos pela WADA dentro e fora das competições

(continuação)

<p>19-Norandrostenedione (estr-4-ene-3,17-dione)</p> 	<p>Prasterone (dehydroepiandrosterone, DHEA, 3β-hydroxyandrost-5-en-17-one)</p> 
<p>Androstanolone (5α-dihydrotestosterone, 17β-hydroxy-5αandrostan-3-one)</p> 	<p>Testosterone</p> 
<p>Androstenediol (androst-5-ene-3β,17β-diol)</p> 	

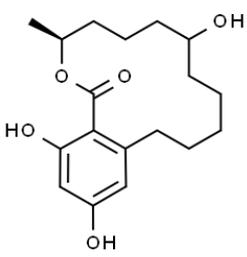
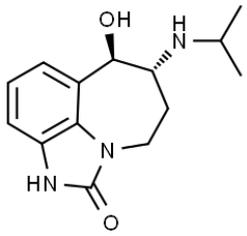
Fonte: WADA, 2020.

Lista de outros agentes anabólicos proibidos pela WADA dentro e fora das competições.

<p>Outros agentes anabólicos proibidos pela WADA dentro e fora das competições</p>
<p>Clenbuterol</p> 
<p>Tibolone</p> 

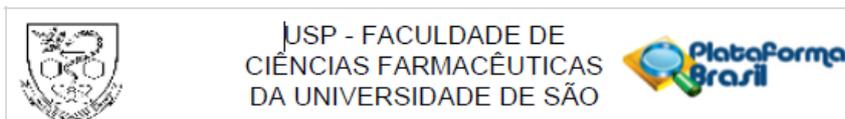
Lista de outros agentes anabólicos proibidos pela WADA dentro e fora das competições

(continuação)

<p style="text-align: center;">Zeranol</p>  <p>The chemical structure of Zeranol is a complex polycyclic molecule. It features a central benzene ring with two hydroxyl groups (HO and OH) at the 3 and 5 positions. Attached to the benzene ring are a long-chain alkyl group, a lactone ring, and a side chain containing a hydroxyl group and a methyl group.</p>
<p style="text-align: center;">Zilpaterol</p>  <p>The chemical structure of Zilpaterol consists of a benzimidazole core. One of the nitrogen atoms is part of a seven-membered ring system. The other nitrogen atom is bonded to a hydrogen atom and a carbonyl group. The seven-membered ring has a hydroxyl group and a side chain with a secondary amine group attached to a methyl group.</p>
<p style="text-align: center;">Modulador seletivo de receptor de androgênio (SARMs):</p> <ul style="list-style-type: none">• Andarine• LGD-4033 (ligandrol)• Enobosarm (ostarine)• RAD140

Fonte: WADA, 2020.

ANEXO 2 - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Detecção de esteroides anabólicos androgênicos e seus produtos de biotransformação em dried urine spots por paper spray (PS-MS) e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS)

Pesquisador: Mauricio Yonamine

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 00666818.3.0000.0067

Instituição Proponente: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: FUND COORD DE APERFEICOAMENTO DE PESSOAL DE NIVEL SUP

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.019.161

Apresentação do Projeto:

Os esteroides anabólicos androgênicos (EAA) se caracterizam como substâncias naturais, sintéticas ou semi-sintéticas semelhantes ao hormônio masculino testosterona, que a partir de mudanças em sua estrutura molecular diminuem os efeitos androgênicos e aumentam os efeitos anabólicos (CAMPOS et al., 2005; BARBALHO et al., 2015; ARAZI et al., 2017). São utilizados clinicamente para tratar diferentes doenças, porém, principalmente a partir da década de 1960 propagou-se o uso não terapêutico por atletas de elite e fisiculturistas, com o intuito de melhorar o desempenho físico e aumentar a massa muscular (ABRAHIN et al., 2014; SAGOE et al., 2014). Os efeitos anabólicos são caracterizados pelo crescimento, aumento do tamanho do músculo, metabolismo ósseo e síntese de proteínas e colágeno. Já o androgenismo é caracterizado pelo aparecimento das características sexuais masculinas secundárias, como padrão de crescimento do cabelo, maturação dos espermatozoides e libido (EL OSTA et al., 2016). Com a constante busca pelo corpo perfeito, tem-se aumentado o uso indiscriminado dessas drogas por atletas amadores para fins estéticos (BARBALHO et al., 2015).

O uso de substâncias ergogênicas, como fármacos estimulantes e narcóticos analgésicos no esporte, foi proibido em 1967 pelo Comitê Olímpico Internacional (COI), mas somente em 1976, após o surgimento do radioimunoensaio, os EAA entraram para a lista de substâncias proibidas

Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13A, sala 112
Bairro: Butantã **CEP:** 05.508-000
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-3822 **Fax:** (11)3031-8986 **E-mail:** cepcf@usp.br



USP - FACULDADE DE
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DA UNIVERSIDADE DE SÃO



Continuação do Parecer: 3.019.161

(CAMPOS et al., 2005; ATHANASIADOU et al., 2012). O uso de EAA está associado a diversos efeitos adversos, principalmente cardiovasculares, neuroendócrinos e distúrbios psiquiátricos, além de dislipidemia, elevação dos marcadores inflamatórios e disfunção endotelial. As análises toxicológicas constam como a maneira mais eficaz de minimizar o doping no esporte. O material é fornecido pelo atleta durante as competições ou treinamentos e previne que os competidores alcancem uma vantagem competitiva devido ao uso de EAA. A espectrometria de massas é o método de escolha para detecção de EAA combinada com a cromatografia gasosa (GC-MS) ou a cromatografia líquida (LC-MS). A utilização de métodos para amostragem alternativos tem ganhado força, devido à necessidade de técnicas mais práticas que utilizam pouco volume de amostra e possuem facilidade de armazenamento. O dried urine spots é um método no qual pequenas amostras de urina são aplicadas em papéis de filtro para análises qualitativas ou quantitativas. Ele se caracteriza por ser uma técnica rápida, fácil, simples e barata para a coleta, armazenamento e distribuição, além de minimizar os riscos de infecção, podendo ser utilizado na rotina. A técnica de paper spray (PS-MS) foi desenvolvida a partir da relevância de métodos como o dried blood spots por proporcionar análises mais rápidas apresenta alta especificidade, capacidade de analisar diferentes analitos simultaneamente, baixo limite de detecção e dispensa a necessidade de reagentes específicos. Por isso, o PS-MS tem um grande potencial para se tornar um método alternativo no monitoramento rápido de drogas de abuso. Sendo assim, este projeto visa o desenvolvimento e aplicação do método de identificação de esteroides anabólicos androgênicos e seus produtos de biotransformação em dried urine spots por ionização por paper spray (PS-MS) e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS). Após o seu desenvolvimento, este método será aplicado em amostras de urina de indivíduos usuários de EAA do sexo masculino praticantes de musculação em diferentes academias de São Paulo, SP.

Objetivo da Pesquisa:

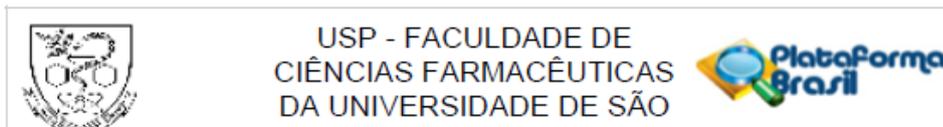
Objetivo Primário:

Desenvolvimento e aplicação do método de identificação de esteroides anabólicos androgênicos e seus principais produtos de biotransformação em dried urine spots por ionização por paper spray e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas.

Objetivo Secundário:

Desenvolver métodos analíticos, validados segundo guias internacionais para determinação de

Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13A, sala 112
Bairro: Butantã CEP: 05.508-000
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)3091-3622 Fax: (11)3031-8986 E-mail: cepfcf@usp.br



Continuação do Parecer: 3.019.161

esteroides anabólicos androgênicos em amostras biológicas; desenvolver técnicas analíticas mais sensíveis, permitindo a utilização de pequeno volume de amostra, rapidez na análise e facilidade de preparo; gerar publicações para divulgação dos resultados para a comunidade científica.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos mínimos aos voluntários, os quais realizarão uma coleta de amostra de urina.

Não haverá benefícios diretos aos participantes doadores de amostra, mas os novos testes laboratoriais desenvolvidos poderão auxiliar os estudos e desenvolvimentos de métodos de detecção de esteroides anabólicos androgênicos produzidos no Brasil e no mundo.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto refere-se ao desenvolvimento de uma nova metodologia de análise da presença de hormônios anabolizantes e seus produtos de biotransformação em amostras de urina. Está bem redigido, claro e apresenta relevância científica. corresponde ao projeto de pesquisa de mestrado de uma aluna do Prof. Maurício, submetido à FAPESP.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

As correções indicadas por este CEP foram atendidas pelo pesquisador.

Recomendações:

Sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências ou lista de inadequações.

Considerações Finais a critério do CEP:

As correções indicadas por este CEP foram feitas pelo pesquisador.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1076154.pdf	06/11/2018 13:15:47		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Projeto_de_Pesquisa_Alterado.doc	06/11/2018 13:15:30	Mauricio Yonamine	Aceito
Outros	Carta_Resposta_CEP_Ana.pdf	06/11/2018 13:14:44	Mauricio Yonamine	Aceito
Outros	anuencia_incor.pdf	04/10/2018 17:53:57	Mauricio Yonamine	Aceito

Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13A, sala 112
 Bairro: Butantã CEP: 05.508-000
 UF: SP Município: SAO PAULO
 Telefone: (11)3091-3622 Fax: (11)3031-8986 E-mail: cepf@usp.br



USP - FACULDADE DE
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DA UNIVERSIDADE DE SÃO



Continuação do Parecer: 3.019.161

Outros	Descricao_Equipe_AnaLuiza.pdf	04/10/2018 17:52:26	Mauricio Yonamine	Aceito
Declaração de Pesquisadores	declaracao_mauricio.pdf	04/10/2018 17:50:59	Mauricio Yonamine	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_de_Pesquisa_Ana_Luiza_Freitas_de_Assis_Linhares.pdf	27/09/2018 15:01:35	Mauricio Yonamine	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_Dra_Janieire.pdf	24/09/2018 14:24:03	Mauricio Yonamine	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Projeto_de_Pesquisa.doc	12/09/2018 17:30:17	Mauricio Yonamine	Aceito
Orçamento	Orcamento.pdf	12/09/2018 17:28:34	Mauricio Yonamine	Aceito
Cronograma	Cronograma_Ana_Luiza.pdf	12/09/2018 17:28:15	Mauricio Yonamine	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	anuencia_fcf.pdf	12/09/2018 17:18:33	Mauricio Yonamine	Aceito
Declaração de Pesquisadores	participacao_Ana_Luiza.pdf	12/09/2018 17:15:44	Mauricio Yonamine	Aceito
Outros	carta_projeto.pdf	12/09/2018 17:10:23	Mauricio Yonamine	Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto.pdf	12/09/2018 17:08:17	Mauricio Yonamine	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 13 de Novembro de 2018

Assinado por:
Cristina Northfleet de Albuquerque
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13A, sala 112
Bairro: Butantã CEP: 05.508-000
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)3091-3622 Fax: (11)3031-8986 E-mail: cepfcf@usp.br

ANEXO 2 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE**1. Informações do Participante da Pesquisa**

Nome:		
Documento de Identidade (tipo):	Nº.:	Sexo: () M () F
Local de Nascimento:		Data de Nascimento: / /
Endereço:		Nº.:
Complementos:	Bairro:	
Cidade:		Estado:
CEP:	Telefones:	

2. Título do Projeto de Pesquisa

Detecção de esteroides anabólicos androgênicos e seus produtos de biotransformação em dried urine spots por paper spray (PS-MS) e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS)

3. Duração da Pesquisa

2 anos

4. Nome do Pesquisador Responsável

Prof. Dr. Mauricio Yonamine

Cargo/Função: Farmacêutico

Nº de registro do Conselho Regional: CRF-SP 21507

FCF/USP: Análises Clínicas e Toxicológicas

5. Instituição/Instituições

Faculdade de Ciências Farmacêuticas/USP: Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas

Prezado senhor,

Meu nome é Mauricio Yonamine, sou Professor e Pesquisador da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo e, junto com a aluna de mestrado Ana Luiza Freitas de Assis Linhares convidamos você a participar do nosso projeto de pesquisa intitulado “Detecção de esteroides anabólicos androgênicos e seus produtos de biotransformação em *dried urine spots* por *paper spray* (PS-MS) e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS)”.

Os esteroides anabólicos androgênicos são substâncias conhecidas popularmente como anabolizantes, utilizadas para melhorar o desempenho físico e aumentar a massa muscular. Com a constante busca pelo corpo perfeito, tem-se aumentado o uso dessas substâncias por atletas amadores para fins estéticos, além de ser utilizada no doping esportivo, permitindo que os competidores alcancem uma vantagem competitiva. O objetivo desta pesquisa é, portanto, desenvolver novos testes laboratoriais para verificar a presença de anabolizantes em amostras de urina de pessoas que fazem uso dessas substâncias.

Portanto, estamos solicitando a sua permissão para coletar cerca de 10 mL de urina. A coleta será realizada por você em um frasco de plástico fornecido pelo nosso laboratório com pelo menos 3 horas de retenção da última micção. Você responderá um questionário com perguntas sobre o uso de substâncias e suas práticas esportivas. Essas amostras serão encaminhadas para análise no Laboratório de Análises Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas/USP para a busca de substâncias derivadas do uso de esteroides anabólicos androgênicos. Serão utilizados frascos identificados por números e, portanto, a identidade do participante não será conhecida. Ao final da pesquisa as amostras serão descartadas. Esta pesquisa não trará nenhum benefício direto para os pacientes, mas poderá futuramente contribuir para o diagnóstico, tratamento e acompanhamento adequado dos usuários de esteroides anabólicos androgênicos.

As amostras serão necessárias para que se comprove a eficiência do novo teste desenvolvido para detecção dos anabolizantes em urina. O risco deste projeto de pesquisa é mínimo e a coleta será realizada pelo próprio participante da pesquisa, proporcionando mínimo desconforto.

É garantido ao participante da pesquisa, a qualquer tempo, receber informações sobre procedimentos, eventuais riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para eliminar alguma dúvida que possa surgir. O participante também possui a opção de recusar-se a participar ou retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa. Também está segura sua confidencialidade ao participar do estudo, além de sigilo e privacidade, uma vez que as amostras serão identificadas por código numérico e seu nome não constará nas publicações e teses resultantes do estudo. Eventuais despesas decorrentes da sua participação na pesquisa serão restituídas pelo pesquisador responsável. Diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa, os participantes serão ressarcidos.

Em caso de dúvidas, entrar em contato com: Ana Luiza Freitas de Assis Linhares (fone 3091-2194) e e-mail: analuiza.assis@usp.br; com o Prof. Dr. Mauricio Yonamine (fone 3091-2194) e e-mail: yonamine@usp.br

Duas vias do termo de consentimento livre e esclarecido serão assinadas pelo pesquisador responsável e o participante, sendo que uma via ficará com o participante e a outra via ficará com o pesquisador responsável desta pesquisa.

Consentimento Pós-Esclarecido

Declaro que, após ter sido convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

São Paulo, _____ de _____ de _____.

Assinatura do Participante de Pesquisa

Assinatura do Pesquisador Responsável

Para qualquer questão, dúvida, esclarecimento ou reclamação sobre aspectos éticos relativos a este protocolo de pesquisa, favor entrar em contato com o **Comitê de Ética em Pesquisa** da **Faculdade de Ciências Farmacêuticas** da **Universidade de São Paulo**: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13 A, Butantã, São Paulo, CEP 05508-000, Telefones 3091-3622 e 3091-3677, e-mail: cepcf@usp.br.

ANEXO 3 - ASSIST 2.0 ADAPTADO

Identificação n°: _____ Idade: _____ Sexo: _____

Alcohol Smoking Substance Involvement Test – ASSIST
Teste para triagem do envolvimento com o fumo, álcool e outras drogas

1- Na sua vida, qual (is) dessas substâncias você já usou? (SOMENTE USO NÃO-MÉDICO)	Não	Sim
a. Derivados do tabaco (cigarros, charuto, cachimbo, fumo de corda)	0	1
b. Bebidas alcoólicas (cerveja, vinho, pinga, uísque, vodka, vermouths)	0	1
c. Maconha (baseado, erva, haxixe)	0	1
d. Cocaína, crack (pó, pedra, branquinha, nuvem)	0	1
e. Estimulantes como anfetaminas ou ecstasy (bolinhas, rebites)	0	1
f. Esteroides anabólicos androgênicos (anabolizantes, bomba)	0	1

2- Alguma vez você já usou drogas por injeção (Apenas uso não-médico)?	NÃO, nunca	SIM	SIM, mas não nos últimos 3 meses	SIM, nos últimos 3 meses

3A- Durante os três últimos meses, com que frequência você utilizou essas(s) substâncias? (Primeira droga, depois a segunda droga, etc)	Nunca	1 ou 2 vezes	Todo mês	Toda semana	Todo dia (ou quase todo)
a. Derivados do tabaco (cigarros, charuto, cachimbo, fumo de corda)	0	1			
b. Bebidas alcoólicas (cerveja, vinho, pinga, uísque, vodka, vermouths)	0	1			
c. Maconha (baseado, erva, haxixe)	0	1			
d. Cocaína, crack (pó, pedra, branquinha, nuvem)	0	1			
e. Estimulantes como anfetaminas ou ecstasy (bolinhas, rebites)	0	1			
f. Esteroides anabólicos androgênicos (anabolizantes, bomba)	0	1			

4- Durante os três últimos meses, com que frequência você teve forte desejo ou urgência em consumir? (Primeira droga, depois a segunda droga, etc)	Nunca	1 ou 2 vezes	Todo mês	Toda semana	Todo dia (ou quase todo)
a. Derivados do tabaco (cigarros, charuto, cachimbo, fumo de corda)	0	1			
b. Bebidas alcoólicas (cerveja, vinho, pinga, uísque, vodka, vermouths)	0	1			
c. Maconha (baseado, erva, haxixe)	0	1			
d. Cocaína, crack (pó, pedra, branquinha, nuvem)	0	1			
e. Estimulantes como anfetaminas ou ecstasy (bolinhas, rebites)	0	1			
f. Esteroides anabólicos androgênicos (anabolizantes, bomba)	0	1			

5- Durante os três últimos meses, com que frequência o seu uso das drogas a seguir (Primeira droga, depois a segunda droga, etc) resultou em problemas de saúde, sociais, legais ou financeiros?	Nunca	1 ou 2 vezes	Todo mês	Toda semana	Todo dia (ou quase todo)
a. Derivados do tabaco (cigarros, charuto, cachimbo, fumo de corda)	0	1			
b. Bebidas alcoólicas (cerveja, vinho, pinga, uísque, vodka, vermouths)	0	1			
c. Maconha (baseado, erva, haxixe)	0	1			
d. Cocaína, crack (pó, pedra, branquinha, nuvem)	0	1			
e. Estimulantes como anfetaminas ou ecstasy (bolinhas, rebites)	0	1			
f. Esteroides anabólicos androgênicos (anabolizantes, bomba)	0	1			

6- Durante os três últimos meses, com que frequência por causa do seu uso das drogas a seguir (Primeira droga, depois a segunda droga, etc) você deixou de fazer coisas que eram normalmente esperadas por você?	Nunca	1 ou 2 vezes	Todo mês	Toda semana	Todo dia (ou quase todo)
a. Derivados do tabaco (cigarros, charuto, cachimbo, fumo de corda)	0	1			
b. Bebidas alcoólicas (cerveja, vinho, pinga, uísque, vodka, vermouths)	0	1			
c. Maconha (baseado, erva, haxixe)	0	1			
d. Cocaína, crack (pó, pedra, branquinha, nuvem)	0	1			
e. Estimulantes como anfetaminas ou ecstasy (bolinhas, rebites)	0	1			
f. Esteroides anabólicos androgênicos (anabolizantes, bomba)	0	1			

7- Há amigos, parentes ou outra pessoa que tenha demonstrado preocupação com o seu uso das drogas a seguir (Primeira droga, depois a segunda droga, etc)?	Nunca	1 ou 2 vezes	Todo mês	Toda semana	Todo dia (ou quase todo)
a. Derivados do tabaco (cigarros, charuto, cachimbo, fumo de corda)	0	1			
b. Bebidas alcoólicas (cerveja, vinho, pinga, uísque, vodka, vermouthes)	0	1			
c. Maconha (baseado, erva, haxixe)	0	1			
d. Cocaína, crack (pó, pedra, branquinha, nuvem)	0	1			
e. Estimulantes como anfetaminas ou ecstasy (bolinhas, rebites)	0	1			
f. Esteroides anabólicos androgênicos (anabolizantes, bomba)	0	1			

8- Alguma vez você já tentou controlar, diminuir ou parar o uso das drogas a seguir (Primeira droga, depois a segunda droga, etc)?	Nunca	1 ou 2 vezes	Todo mês	Toda semana	Todo dia (ou quase todo)
a. Derivados do tabaco (cigarros, charuto, cachimbo, fumo de corda)	0	1			
b. Bebidas alcoólicas (cerveja, vinho, pinga, uísque, vodka, vermouthes)	0	1			
c. Maconha (baseado, erva, haxixe)	0	1			
d. Cocaína, crack (pó, pedra, branquinha, nuvem)	0	1			
e. Estimulantes como anfetaminas ou ecstasy (bolinhas, rebites)	0	1			
f. Esteroides anabólicos androgênicos (anabolizantes, bomba)	0	1			

9- Você é praticante de musculação?	NÃO	SIM

10- Há quanto tempo você pratica musculação?	Menos de 2 anos	Mais de 2 anos

11- Qual a sua frequência semanal na prática de musculação?	Não pratico musculação	1-2 vezes por semana	3 vezes ou mais por semana		
12- Você realiza ou já realizou algum treinamento aeróbico?	NÃO	SIM	SIM, mas não nos últimos 2 anos	SIM, nos últimos 2 anos	
13- Você já fez o uso de esteroides anabólicos androgênicos (bomba, anabolizantes)?	NÃO, nunca	SIM	SIM, mas não nos últimos 2 anos	SIM, nos últimos 2 anos	
14- Quantos ciclos de uso de esteroides anabólicos androgênicos (bomba, anabolizantes) você faz por ano?	Não faço uso dessas substâncias	1 ciclo por ano	2 ciclos por ano com intervalo acima de 4 semanas	2 ciclos por ano com intervalo abaixo de 4 semanas	3 ciclos ou mais por ano
15- Quantos tipos de esteroides anabólicos androgênicos (bomba, anabolizantes) diferentes você utiliza nos ciclos de uso (oral ou injetável)?	Não faço uso dessas substâncias	Somente 1	Somente 2	2 ou mais	
16- Você possui algum tipo de cardiopatia congênita ou adquirida (valvopatias cardíacas e etc)?	NÃO		SIM		

ANEXO 4 – CURRÍCULO LATTES



Ana Luíza Freitas de Assis Linhares

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/4073802978586906>

ID Lattes: **4073802978586906**

Última atualização do currículo em 17/01/2020

Biomédica pelo Centro Universitário de Belo Horizonte, com habilitação em Análises Clínicas e Análises Toxicológicas e mestranda em Fisiopatologia e Toxicologia pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Possui experiência em Toxicologia e Análises Toxicológicas com ênfase em Toxicologia Analítica, Toxicologia Social, Drogas de Abuso e Matrizes Biológicas Alternativas. Tem experiência em técnicas de preparo de amostras, separações cromatográficas e espectrometria de massas. É membro da The International Association of Forensic Toxicologists (TIAFT) e da Sociedade Brasileira de Espectrometria de Massas. **(Texto informado pelo autor)**

Identificação

Nome	Ana Luíza Freitas de Assis Linhares
Nome em citações bibliográficas	LINHARES, A. L. F. A.; Ana Luíza Freitas de Assis Linhares
Lattes iD	 http://lattes.cnpq.br/4073802978586906

Endereço

Endereço Profissional	Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Avenida Professor Lineu Prestes, 580 Butantã 05508000 - São Paulo, SP - Brasil Telefone: (11) 30912194
------------------------------	--

Formação acadêmica/titulação

2018	Mestrado em andamento em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia) (Conceito CAPES 7). Universidade de São Paulo, USP, Brasil. Título: Detecção de esteroides anabólicos androgênicos e seus produtos de biotransformação em dried urine spots por paper spray (PS-MS) e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS). Orientador:  Maurício Yonamine. Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, Brasil. Palavras-chave: dried urine spots; paper spray; esteroides anabólicos androgênicos; cromatografia; espectrometria de massas. Grande área: Ciências da Saúde Grande Área: Ciências da Saúde / Área: Farmácia / Subárea: Toxicologia.
2012 - 2017	Graduação em Biomedicina. Centro Universitário de Belo Horizonte, UniBH, Brasil. Título: Determinação Quantitativa de Ácido Cianídrico em Mandioca. Orientador: Marcelo José de Oliveira Maia.
2007 - 2009	Ensino Médio (2º grau). Escola Estadual Governador Milton Campos, EEGMC, Brasil.

Formação Complementar

2019 - 2019	TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS (GC, LC) E ESPECTROMETRIA DE MASSAS (BAIXA E ALTA). (Carga horária: 30h). Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Brasil.
2019 - 2019	Estimating Measurement Uncertainty in Forensic Toxicology Laboratories. (Carga horária: 8h). Congresso Brasileiro de Toxicologia, CBTOX, Brasil.
2018 - 2018	Pharmacokinetics/Pharmacodynamics of drugs of abuse by Marilyn Huestis. (Carga horária: 32h). Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Brasil.
2018 - 2018	Workshop de Preparo de Amostras. (Carga horária: 8h). Agilent Technologies Brasil, AGILENT, Brasil.
2017 - 2017	Extensão universitária em VI Escola de Inverno em Toxicologia. (Carga horária: 40h). Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
2017 - 2017	Extensão universitária em Manejo Clínico de Chikungunya. (Carga horária: 30h). Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, UFMS, Brasil.
2017 - 2017	Extensão universitária em Zika: abordagem clínica na atenção básica. (Carga horária: 45h). Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, UFMS, Brasil.
2017 - 2017	Extensão universitária em Vigilância, Prevenção, Atenção e Controle da Leishmaniose Visceral. (Carga horária: 30h). Universidade Federal do Maranhão, UFMA, Brasil.
2017 - 2017	Extensão universitária em Diagnóstico da Doença Renal Crônica. (Carga horária: 30h). Universidade Federal do Maranhão, UFMA, Brasil.
2016 - 2016	Extensão universitária em III Curso de Inverno em Fisiopatologia e Análises Clínicas. (Carga horária: 42h). Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
2016 - 2016	Toxicologia e suas implicações clínicas e forenses. (Carga horária: 8h). Sociedade Brasileira de Toxicologia, SBTOx, Brasil.
2016 - 2016	Técnicas Parasitológicas Aplicadas às Análises Clínicas. (Carga horária: 20h). Instituto Biomédico de Aprimoramento Profissional, IBAP, Brasil.
2016 - 2016	Medicina Legal. (Carga horária: 20h). Instituto Politécnico de Ensino a Distância, iPED, Brasil.
2016 - 2016	Toxicologia Forense ? Avaliação Clínica e Laboratorial de Entorpecentes. (Carga horária: 10h). Instituto Biomédico de Aprimoramento Profissional, IBAP, Brasil.
2015 - 2015	Cromatografia Gasosa. (Carga horária: 6h). Centro Universitário de Belo Horizonte, UniBH, Brasil.
2015 - 2015	Programa de Inserção de Novos Colaboradores. (Carga horária: 3h). Centro de Pesquisas René Rachou, CPQRR - FIOCRUZ, Brasil.
2015 - 2015	Bioinformática. (Carga horária: 4h). Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Brasil.
2012 - 2012	Perícia Criminal - Toxicologia Forense. (Carga horária: 8h). Renova Cursos, RENOVA, Brasil.

Atuação Profissional

Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

Vínculo institucional
2018 - Atual

Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Mestranda, Carga horária: 40, Regime: Dedicção exclusiva.

Vínculo institucional
2019 - 2019
Outras informações

Vínculo: Monitoria, Enquadramento Funcional: Monitora, Carga horária: 6
Monitora do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE). Estágio Supervisionado em Docência, Farmácia e Bioquímica, Nível: Graduação. Disciplina: Toxicologia Social II - FBC 0426-7 (Integrado Fisiopatologia e Farmacologia II)

Vínculo institucional
2017 - 2017
Outras informações

Vínculo: Estágio, Enquadramento Funcional: Estagiária, Carga horária: 40
Laboratório de Análises Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP.

Centro Universitário de Belo Horizonte, UniBH, Brasil.

Vínculo institucional
2012 - 2017

Vínculo: Estudante, Enquadramento Funcional: Estudante

Vínculo institucional
2016 - 2016
Outras informações

Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Monitoria, Carga horária: 6
Monitora da disciplina de Hematologia Clínica.

Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Brasil.

Vínculo institucional
2016 - 2017

Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Bolsista de Iniciação Científica Voluntária, Carga horária: 12

Outras informações

Laboratório de Toxicologia Ocupacional da Faculdade de Farmácia - UFMG. Análise de amostras de plasma por espectrometria de absorção atômica com forno de grafite.

Polícia Civil do Estado de Minas Gerais, PCMG, Brasil.

Vínculo institucional
2016 - 2017
Outras informações

Vínculo: Estágio Curricular, Enquadramento Funcional: Estagiária, Carga horária: 25
Instituto de Criminalística - Setor Técnico de Química e Física Legal. Detecção de drogas através de testes colorimétricos, químicos e toxicológicos. Preparação de reagentes, soluções e amostras para análises instrumentais. Utilização de GC-MS, LC-MS, Cromatografia em Camada Delgada e Espectroscopia de Infravermelho.

Centro de Pesquisas René Rachou, CPQRR - FIOCRUZ, Brasil.

Vínculo institucional
2015 - 2016
Outras informações

Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Estudante, Carga horária: 20
Pesquisa Clínica e Políticas Públicas em Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Grupo Mineiro de Nefrologia, GMN, Brasil.

Vínculo institucional
2017 - 2017
Outras informações

Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Estagiária, Carga horária: 30
Estágio em Análises Clínicas. Atuação na área técnica laboratorial, executando e interpretando exames laboratoriais de hematologia, bioquímica e sorologia. Experiência com as plataformas Abbott e Sysmex.

Laboratório Oswaldo Cruz, LOC, Brasil.

Vínculo institucional
2012 - 2013
Outras informações

Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Estagiária, Carga horária: 30
Observação de coleta de materiais biológicos e atendimento ao público.

Projetos de pesquisa

2016 - 2017	<p>Desenvolvimento e validação de método analítico para determinação da concentração plasmática do antimônio no tratamento da leishmaniose cutânea localizada. Descrição: Estudo clínico para avaliação da eficácia e segurança do uso intralesional de antimoniato de meglumina no tratamento da leishmaniose cutânea localizada. Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa. Alunos envolvidos: Graduação: (1) .</p> <p>Integrantes: Ana Luíza Freitas de Assis Linhares - Integrante / Leiliane Coelho André - Integrante / Josianne Nicácio Silveira - Coordenador.</p>
2015 - 2016	<p>Análise do desenvolvimento tecnológico para o diagnóstico e tratamento da doença de Chagas: da proteção intelectual à disponibilidade comercial Descrição: Programa Colaborativo de Pesquisa e Desenvolvimento de Novas Alternativas Terapêuticas e de Diagnóstico para doenças Negligenciadas 2012-2016: Estudos estratégicos para Inovação e Desenvolvimento Tecnológico em Diagnostico e Terapêutica de Doenças Negligenciadas. Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa.</p> <p>Integrantes: Ana Luíza Freitas de Assis Linhares - Integrante / Ana Lúcia Telles Rabello - Coordenador / Tália Santana Machado de Assis - Integrante.</p>

Projetos de extensão

2015 - 2015	<p>Posso Ajudar? Descrição: O Programa "Posso Ajudar?" foi realizado no hospital João XXIII da Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais/FHEMIG e surgiu em atendimento à Política Nacional de Humanização, do Ministério da Saúde com os objetivos de acolher com resolutividade e agilidade os usuários que procuram atendimento nas unidades assistenciais da FHEMIG, contribuir na formação acadêmica, profissional e humana das futuras gerações da graduação dos cursos de saúde, e humano/social e possibilitar conhecimento e formas positivas de enfrentamento da realidade da saúde do país e, particularmente, a do Sistema Único de Saúde (SUS). Além da aplicação dos conhecimentos adquiridos durante a graduação, o aluno desenvolverá habilidades de Relacionamento Interpessoal tais como observação, carisma, automotivação, curiosidade, sensatez, flexibilidade, pró-atividade, comunicação, escuta, assertividade, persistência, postura profissional, negociação e estratégia, ampliando sua formação sobre comportamento e processos mentais das pessoas, fundamentais para um bom desempenho em sua área de formação. Situação: Concluído; Natureza: Extensão. Alunos envolvidos: Graduação: (16) .</p> <p>Integrantes: Ana Luíza Freitas de Assis Linhares - Integrante / Camilo Cândido - Coordenador.</p>
2012 - 2012	<p>Boca Louca Descrição: O projeto tem como principal objetivo orientar adolescentes quanto à "doença do beijo (mononucleose infecciosa) e outras doenças transmissíveis pela saliva. Situação: Concluído; Natureza: Extensão. Alunos envolvidos: Graduação: (6) / Especialização: (0) / Mestrado acadêmico: (0) / Mestrado profissional: (0) / Doutorado: (0) .</p> <p>Integrantes: Ana Luíza Freitas de Assis Linhares - Integrante / Lízia Maria Franco dos Reis e Campos - Coordenador.</p>

Áreas de atuação

1.	Grande área: Ciências Exatas e da Terra / Área: Química / Subárea: Química Forense.
2.	Grande área: Ciências da Saúde / Área: Farmácia / Subárea: Toxicologia.
3.	Grande área: Ciências da Saúde / Área: Farmácia / Subárea: Análises Toxicológicas.
4.	Grande área: Ciências da Saúde / Área: Farmácia / Subárea: Análises Clínicas.
5.	Grande área: Ciências da Saúde / Área: Farmácia / Subárea: Saúde Coletiva.

Idiomas

Inglês	Compreende Bem, Fala Bem, Lê Bem, Escreve Bem.
Espanhol	Compreende Bem, Fala Razoavelmente, Lê Bem, Escreve Bem.
Português	Compreende Bem, Fala Bem, Lê Bem, Escreve Bem.

Prêmios e títulos

2019	TIAFT Travel Grant, The International Association of Forensic Toxicologists.
2019	Top 10 Scored Poster Presentation, 13th Summer School of Mass Spectrometry in Biotechnology and Medicine - Croatia.
2019	Best Poster Presentation, XV TIAFT LATIN-AMERICAN REGIONAL MEETING.
2017	Premiação ENADE 2016, Centro Universitário de Belo Horizonte.
2017	Seleção para Apresentação Oral de Trabalho na VI Escola de Inverno em Toxicologia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Produções

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

Ordenar por

Ordem Cronológica ▼

1. **Ana Luiza Freitas de Assis Linhares**; Bruna da Costa Seixas ; Marcelo José de Oliveira Maia . Determinação quantitativa do ácido cianídrico em mandioca. E-SCIENTIA, v. 11, p. 1-7, 2019.

Resumos publicados em anais de congressos

1. SILVA, J. P. ; YONAMINE, M. ; **LINHARES, A. L. F. A.** ; FRANCISCO, R. P. V. ; HALER, J. ; FERNANDEZ-LIMA, F. . Trapped Ion Mobility Mass Spectrometry and LC-MS/MS-Based Proteomics for Prospection of Drug Exposure and Toxicity Biomarkers in Human Umbilical Cord Tissue. In: 13th Summer School of Mass Spectrometry in Biotechnology and Medicine, 2019, Dubrovnik. XIII Mass Spectrometry in Biotechnology and Medicine (MSBM), 2019. v. 3, p. 1-54.
2. **LINHARES, A. L. F. A.**; SOUZA, F. R. ; ALVES, M. J. N. N. ; MACHADO, Y. ; LORDEIRO, R. A. ; YONAMINE, M. . Optimization of a method for the detection of anabolic androgenic steroids in dried urine spots by paper spray-mass spectrometry ionization. In: 57th Annual Meeting of The International Association of Forensic Toxicologists, 2019, Birmingham. 57th Annual Meeting of The International Association of Forensic Toxicologists - Programme and Abstracts, 2019.
3. **LINHARES, A. L. F. A.**; SOUZA, F. R. ; ALVES, M. J. N. N. ; MACHADO, Y. ; LORDEIRO, R. A. ; SILVA, J. P. ; YONAMINE, M. . Paper spray-mass spectrometry ionization of anabolic androgenic steroids in dried urine spots. In: XXI Brazilian Congress of Toxicology - XV TIAFT LATIN-AMERICAN REGIONAL MEETING., 2019, Águas de Lindoia. Abstract Book, 2019.
4. SILVA, J. P. ; YONAMINE, M. ; **LINHARES, A. L. F. A.** ; FRANCISCO, R. P. V. ; HALER, J. ; FERNANDEZ-LIMA, F. . Fetotoxicity and Drug Abuse: New Clues on Molecular Pathways Unveiled by Trapped Ion Mobility Mass Spectrometry and LC-MS/MS-Based Proteomics. In: XXI Brazilian Congress of Toxicology - XV TIAFT Latin-America Regional Meeting, 2019, Águas de Lindoia. Abstract Book, 2019.
5. ★ **LINHARES, A. L. F. A.**; SEIXAS, B. C. ; MAIA, M. J. O. . Determinação Quantitativa de Ácido Cianídrico em Mandioca. In: Escola de Inverno em Toxicologia, 2017, São Paulo. Livro de Resumos Escola de Inverno em Toxicologia, 2017.

Apresentações de Trabalho

1. **LINHARES, A. L. F. A.**; SOUZA, F. R.; ALVES, M. J. N. N.; MACHADO, Y.; LORDEIRO, R. A.; YONAMINE, M. . Optimization of a method for the detection of anabolic androgenic steroids in dried urine spots by paper spray-mass spectrometry ionization. 2019. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
2. SILVA, J. P.; YONAMINE, M.; **LINHARES, A. L. F. A.**; FRANCISCO, R. P. V.; HALER, J.; FERNANDEZ-LIMA, F. . Trapped Ion Mobility Mass Spectrometry and LC-MS/MS-Based Proteomics for Prospection of Drug Exposure and Toxicity Biomarkers in Human Umbilical Cord Tissue. 2019. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).
3. SILVA, J. P.; YONAMINE, M.; **LINHARES, A. L. F. A.**; FRANCISCO, R. P. V.; HALER, J.; FERNANDEZ-LIMA, F. . Fetotoxicity and Drug Abuse: New Clues on Molecular Pathways Unveiled by Trapped Ion Mobility Mass Spectrometry and LC-MS/MS-Based Proteomics. 2019. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
4. **LINHARES, A. L. F. A.**; SOUZA, F. R.; ALVES, M. J. N. N.; MACHADO, Y.; LORDEIRO, R. A.; SILVA, J. P.; YONAMINE, M. . Paper spray-mass spectrometry ionization of anabolic androgenic steroids in dried urine spots. 2019. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
5. **LINHARES, A. L. F. A.**. Anabolizantes e o doping no esporte. 2019. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).
6. **LINHARES, A. L. F. A.**; SEDXAS, B. C.; MAIA, M. J. O. . Determinação Quantitativa de Ácido Cianídrico em Mandioca. 2017. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).
7. **LINHARES, A. L. F. A.**; SEDXAS, B. C.; MAIA, M. J. O. . Determinação Quantitativa de Ácido Cianídrico em Mandioca. 2017. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
8. **LINHARES, A. L. F. A.**; RABELLO, A.; ASSIS, T. S. M.; CARRARA, C. L. . Análise de cenário do desenvolvimento de produtos diagnósticos e terapêuticos para doença de Chagas: da proteção intelectual à disponibilidade comercial. 2016. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

Demais tipos de produção técnica

1. **LINHARES, A. L. F. A.**. Anabolizantes e o doping no esporte. 2019. (Curso de curta duração ministrado/Extensão).
2. **LINHARES, A. L. F. A.**; MENDES, F. A. . Detecção de drogas em matrizes biológicas. 2019. (Curso de curta duração ministrado/Outra).

Eventos

Participação em eventos, congressos, exposições e feiras

1. 57th Annual Meeting of The International Association of Forensic Toxicologists (TIAFT). Optimization of a method for the detection of anabolic androgenic steroids in dried urine spots by paper spray-mass spectrometry ionization. 2019. (Congresso).
2. XXI Brazilian Congress of Toxicology - XV TIAFT Latin-American Regional Meeting. Paper spray-mass spectrometry ionization of anabolic androgenic steroids in dried urine spots. 2019. (Congresso).
3. Simpósio Internacional U.S. Pharmacopeia - Empowering a health tomorrow. 2018. (Simpósio).
4. Workshop Agilent de Drogas de Abuso. 2018. (Encontro).
5. Congresso Mineiro de Biomedicina e Congresso Mineiro de Análises Clínicas. Determinação Quantitativa de Ácido Cianídrico em Mandioca. 2017. (Congresso).
6. II Workshop Mineiro de Ciências Forenses. 2017. (Simpósio).
7. VI Escola de Inverno em Toxicologia. Determinação quantitativa de ácido cianídrico em mandioca. 2017. (Oficina).
8. III Simpósio de Oncologia e Hematologia. 2016. (Simpósio).
9. XXVI Reunião Anual de Iniciação Científica - FIOCRUZ. Análise de cenário do desenvolvimento de produtos diagnósticos e terapêuticos para doença de Chagas: da proteção intelectual à disponibilidade comercial.. 2016. (Encontro).
10. Antropologia Forense - Perícia Criminal. 2015. (Seminário).
11. III Simpósio Acadêmico de Biomedicina. 2015. (Simpósio).
12. II Simpósio Internacional de Análises Clínicas e Toxicológicas. 2015. (Simpósio).
13. Práticas Integrativas e Complementares em Saúde. 2015. (Seminário).
14. Insetos de importância médica: principais dípteros envolvidos na transmissão de doenças infecto-parasitárias no Brasil. 2014. (Seminário).
15. Citopatologia: diagnóstico de infecção cérvico-vaginal. 2012. (Oficina).
16. Prática de Aferição de Dados Vitais. 2012. (Oficina).
17. Uni + Saúde. 2012. (Seminário).
18. Youth to Business Forum. 2012. (Congresso).

Organização de eventos, congressos, exposições e feiras

1. BRUNO, V.; CARVALHO, L. A. C.; ALMEIDA, S. R.; **LINHARES, A. L. F. A.**; SANTOS, A. C. A.; SILVA, R. O.; VIVIAN, G. K.; PAULO, L. N. M.; SPELTA, L. E. W.; QUEIROZ, L. A. D.; LOS, B.; HERNANDEZ, C. D.; SILVA, J. R.; MARCAL, E. S. R.; ROCHA, G. H. O.; CORDEIRO, E. W. F.; MENEZES, I. G. . I Escola de Inverno em Análises Clínicas e Toxicológicas - ClinTox. 2019. (Outro).

Inovação

Projetos de pesquisa

2015 - 2016

Análise do desenvolvimento tecnológico para o diagnóstico e tratamento da doença de Chagas: da proteção intelectual à disponibilidade comercial
Descrição: Programa Colaborativo de Pesquisa e Desenvolvimento de Novas Alternativas Terapêuticas e de Diagnóstico para doenças Negligenciadas 2012-2016: Estudos estratégicos para Inovação e Desenvolvimento Tecnológico em Diagnostico e Terapêutica de Doenças Negligenciadas..
Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa.

Integrantes: Ana Luíza Freitas de Assis Linhares - Integrante / Ana Lúcia Telles Rabello - Coordenador / Tália Santana Machado de Assis - Integrante.

Educação e Popularização de C & T

Cursos de curta duração ministrados

1. **LINHARES, A. L. F. A.**. Anabolizantes e o doping no esporte. 2019. (Curso de curta duração ministrado/Extensão).
2. **LINHARES, A. L. F. A.**; MENDES, F. A. . Detecção de drogas em matrizes biológicas. 2019. (Curso de curta duração ministrado/Outra).

Outras informações relevantes

Intercâmbio nos Estados Unidos de maio a setembro de 2012. Membro da The International Association of Forensic Toxicologists (TIAFT).